

R.4346



ESTRUCTURA, COMPOSICION Y CINETICA DE FORMACION
DE LA PARED QUISTICA DEL CILIADO HIPOTRICO;
LAURENTIELLA ACUMINATA.

*Trabajo realizado en el Departamento
de Microbiología de la Facultad de
Biología, Universidad de Sevilla,
para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas, por el Licenciado.*

JUAN CARLOS GUTIERREZ F.

Juan Carlos Gutiérrez

Sevilla, Septiembre de 1982.

Director.

Dr. D. Antonio Torres Rueda.

Ponente.

Prof. Dr. D. J. Perez-Silva

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

27-9-82

ENTRADA N.º 452

T.D. 70



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral ESTRUCTURA, COMPOSICION Y CINETICA DE
FORMACION DE LA PARED QUISTICA DEL CILIADO HIPOTRICO:
Laurentiella acuminata.

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Juan Carlos Jardi

Sevilla, a 22 de Mayo de 1995

La única cosa que no se puede embellecer sin que perezca es la verdad.

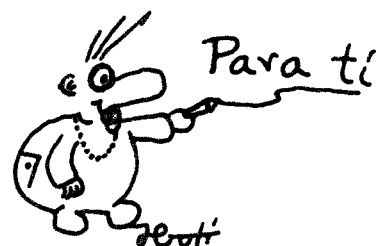
JEAN ROSTAND

(Pensées d'un biologiste. 1974)

La belleza está en el ojo del observador. En el caso de que el observador sea corto de vista, deberá preguntar a la persona más cercana qué chicas son bien parecidas. (De hecho las más lindas resultan casi siempre las más aburridas, y ese es el porqué de que ciertas personas no crean en Dios).

WOODY ALLEN

(Without feathers. 1976)



AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primer lugar, la oportunidad que se me ha ofrecido para la realización de este trabajo al Prof. Dr. Julio Perez-Silva, director del Departamento de Microbiología, que a lo largo de estos años ha mostrado gran interés en el desarrollo de los trabajos relativos a los quistes de resistencia.

Al Dr. Antonio Torres por su dirección.

Deseo agradecer, igualmente, la ayuda técnica recibida del servicio de Microscopía Electrónica 'Rector González García', del Departamento de Citología e Histología, que ha facilitado el desarrollo de la parte de este trabajo concerniente a la Microscopía Electrónica y Citoquímica.

A la Dra. Pilar Candau, del Departamento de Botánica, por el uso del Microscopio Electrónico de Barrido.

Mi más sincero agradecimiento a todos aquellos compañeros de Facultad que, independientemente de sus intereses científicos, han tenido hacia mi persona un momento de comprensión, un momento de ayuda o un momento de aliento.

Y a mis hermanos, Carmen y Pedro, mi única y verdadera familia durante estos últimos años, por su amor y ayuda. GRACIAS.

INDICE

INTRODUCCION

1. <i>Formas de resistencia en los sistemas vivos.....</i>	1
2. <i>Quistes de Protozoos.....</i>	3
2.1. <i>Consideraciones sobre la bibliografía quística....</i>	4
2.2. <i>Tipos quísticos.....</i>	6
2.3. <i>Morfología quística.....</i>	7
3. <i>Pared quística.....</i>	8
3.1. <i>Conocimientos actuales sobre paredes quísticas....</i>	8
3.2. <i>Número de capas quísticas.....</i>	9
3.3. <i>Estructura de la pared quística.....</i>	11
3.4. <i>Composición de la pared quística.....</i>	16
3.5. <i>Formación y origen de precursores de la pared quística.....</i>	20
4. <i>Características fisiológicas del estado quiste.....</i>	24
5. <i>Resistencia y longevidad quística.....</i>	28
5.1. <i>Altas temperaturas.....</i>	29
5.2. <i>Bajas temperaturas.....</i>	30
5.3. <i>Otros factores físicos.....</i>	30
5.4. <i>Factores químicos.....</i>	30
6. <i>Enquistamiento.....</i>	31
6.1. <i>Implicaciones teóricas en torno al Enquistamiento como proceso biológico de diferenciación celular..</i>	31
6.2. <i>Inductores exógenos de Enquistamiento.....</i>	35
6.3. <i>Fenómenos celulares durante el Enquistamiento.....</i>	39
6.3.1. <i>Estructuras corticales.....</i>	40
6.3.2. <i>Cambios mitocondriales.....</i>	41

6.3.3. Cambios nucleares.....	41
6.3.4. Ribosomas.....	45
6.3.5. Vacuolas y Lisosomas.....	45
6.3.6. Inclusiones.....	46
6.4. El enquistamiento como proceso degenerativo.....	48
6.5. Actividades metabólicas durante el Enquistamiento.	49
6.5.1. Acidos nucleicos.....	50
6.5.1.1. ADN.....	50
6.5.1.2. ARN.....	51
6.5.2. Proteinas.....	52
6.5.3. Hidratos de Carbono.....	54
6.5.4. Actividades enzimáticas.....	55
6.5.5. Cambios en el metabolismo respiratorio y bioenergético.....	57
6.5.6. Resumen y Conclusiones.....	58
6.6. Cinética de Enquistamiento.....	59
6.7. Problemas morfogénéticos y genéticos en torno al ciclo E-E.....	65
6.8. Significado Ecológico del ciclo E-E.....	68
6.9. Taxonomía y Filogenia quísticas.....	72
7. Plan de Trabajo.....	78

MATERIALES Y METODOS

1. Material vivo. Condiciones y medios de cultivo. Inducción del Enquistamiento.....	79
---	----

2. Aislamientos de paredes quísticas.....	80
2.1. Estudio de rotura de los quistes.....	80
2.2. Diseño del método utilizado.....	81
3. Preparación de paredes para el estudio citoquímico por MO.....	83
4. Métodos Citoquímicos.....	83
4.1. Carbohidratos.....	84
4.2. Proteínas.....	85
4.3. Lípidos.....	85
5. Preparación de los quistes para estudios ultraestruc- turales y citoquímicos por ME.....	85
5.1. MEB (Microscopia Electronica de Barrido).....	85
5.2. MET (Microscopia Electronica de Transmisión).....	86
6. Técnica Microespectrofotométrica y Citoquímica cuantitativa.....	88
7. Irradiación con luz UV.....	89
8. Enzimas, Colorantes y Reactivos más importantes.....	90

RESULTADOS

1. Descripción del quiste de resistencia de <i>Laurentiella</i> <i>acuminata</i>	91
1.1. Pared quística.....	91
1.2. Citoplasma quístico.....	92
2. Citoquímica de las paredes quísticas.....	93
2.1. Citoquímica de paredes quísticas aisladas.....	94

2.1.1. Carbohidratos.....	94
2.1.2. Proteínas y Lípidos.....	98
2.2. Citoquímica sobre cortes semifinos.....	98
2.3. Estudio diferencial de MPS y de otras macromoleculas por hidrólisis enzimática.....	99
3. Tests de solubilidad y tratamientos enzimáticos realizados sobre quistes completos.....	100
4. Enquistamiento: Cinética y Etapas.....	101
5. Estructura de los precursores de la pared quística.....	103
5.1. Precursores Ectoquísticos.....	103
5.2. Precursores Mesoquísticos.....	103
5.3. Precursores Endoquísticos.....	104
5.4. Precursores de la capa Granulosa.....	104
6. Cinética de aparición de los precursores.....	104
7. Modelo de formación de la pared quística.....	105
8. Efecto de la radiación UV (254 nm) sobre la cinética de enquistamiento.....	106
9. Efecto de la radiación UV (254 nm) sobre la pared quística.....	107

DISCUSION

1. Estructura de la pared quística de <i>Laurentiella acuminata</i>	109
2. Estructura del citoplasma quístico de <i>Laurentiella acuminata</i>	110

3. Estudio de la composición de la pared quística.....	111
3.1. Resultados Citoquímicos.....	111
3.2. Hidrólisis enzimática y tests de solubilidad.....	113
3.3. Estudio comparativo de la composición de la pared quística de <i>Laurentiella acuminata</i> con otros cilia- dos.....	117
3.4. Función de las diferentes envueltas quísticas de de la pared del quiste de resistencia.....	119
4. Estructura y cinética de aparición de los precursores de la pared durante el Enquistamiento.....	123
5. Cinética del Enquistamiento y sus alteraciones por la luz UV.....	127
6. Efectos de la radiación UV sobre la pared quística..	130
7. Perspectivas en la investigación sobre quistes y el ciclo E-E.....	132
<u>CONCLUSIONES</u>	135
<u>CITAS BIBLIOGRAFICAS</u>	138

INTRODUCCION

1. *Formas de resistencia en los sistemas vivos.*

En muchos sistemas vivos se dan mecanismos especiales que tienden a conservar y mantener dicho sistema ante condiciones ambientales que impiden o imposibilitan el normal metabolismo y desarrollo del mismo.

Según SNEATH (1975), en la Naturaleza se dan dos formas básicas de resistencia: Resistencia-Activa y Resistencia-Pasiva. La diferencia entre ambas consiste; en la existencia o inexistencia de una actividad metabólica suficiente que rechace o minimice la agresión externa. Un sistema vivo que presente una capacidad metabólica reparadora, mantenida por mecanismos altamente específicos, se puede decir que posee un mecanismo de resistencia-activa. Así, los procesos de regeneración celular pertenecen a éste primer grupo o forma de resistencia.

Por el contrario, la resistencia-pasiva son los típicos estados de latencia o dormancia en los que aparecen las "estructuras-barreras" (cubiertas, paredes, etc.). Esta última forma de resistencia se encuentra sumamente extendida entre los microorganismos, tanto procariotas como eucariotas.

Los modelos más conocidos entre los procariotas son; las endosporas del género *Bacillus*, los quistes mixobacterianos, los del género *Azotobacter* y las esporas de algas verde-azuladas como las del género *Anabaena* entre otros (SLEPECKY, 1978).

Dentro de los eucariotas conocemos; los quistes del alga unicelular gigante *Acetabularia* (PUISEUX-DAO, 1980), los macroquistes de la acrasial *Dictyostelium* (FILOSA & DENGLER, 1972) y los del género *Acanthamoeba* (BYERS, 1979) entre las amebas, también se presentan en otros muchos protozoos, principalmente flagelados y ciliados (KUDO, 1969).

Al conjunto de procesos que conducen a la formación de la spora o del quiste se llaman esporulación o esporogénesis y enquistamiento respectivamente. Cuando las causas que indujeron estos procesos desaparecen y surgen condiciones óptimas de crecimiento, sobreviene el proceso antagónico/complementario de emergencia celular en la spora o quiste, los cuales se suelen denominar germinación y exquistamiento respectivamente.

Estos dos procesos de diferenciación celular presentan carácter cíclico; ciclo esporulación-germinación (ciclo E-G) o ciclo enquistamiento-exquistamiento (ciclo E-E) (NEFF & NEFF, 1969). Siendo éste un ciclo facultativo y conectado a alguna etapa del ciclo crecimiento-división del sistema vivo (Fig. 1).

Teniendo en cuenta el hecho de que hasta la fecha no se ha publicado ninguna revisión más o menos completa de las investigaciones sobre los quistes de resistencia en Protozoos, hemos considerado conveniente intentar en esta introducción de nuestro trabajo de tesis doctoral recopilar,

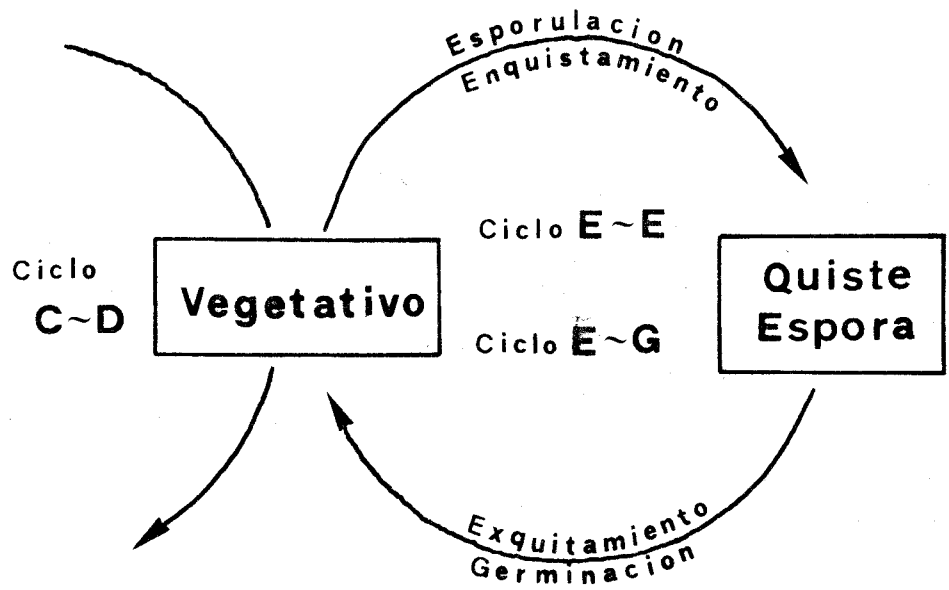


Fig. 1. Ciclo E-E (enquistamiento-exquistamiento)/
 Ciclo E-G (esporulación-germinación), Ciclo C-D
 (crecimiento-división).

ordenar y comentar los resultados que sobre este tema hemos encontrado en la bibliografía, de modo que ésta introducción pudiera servir de base para publicar una revisión del tema.

2. *Quistes de Protozoos.*

Existen aproximadamente 31.000 especies vivas reconocidas de protozoos según el Comité sobre Sistemática y Evolución de la Sociedad Americana de Protozoólogos (LEVINE et al, 1980). En ésta revisión de la clasificación de protozoos, se divide al subreino Protozoa, dentro del reino Protista, en siete grupos con categoría taxonómica de phylum. De éstas 31.000 especies, el Phylum-I o Sarcomastigophora abarca más de la mitad (59%), el Phylum-VII o Ciliophora el 23% y el resto ocupa el 18% aproximadamente del total. (Fig. 2A).

A partir de los datos recogidos de toda la bibliografía que se consulta en éste trabajo y de la obra "Protozoología" (KUDO, 1969), se han obtenido unos datos aproximativos acerca del número de órdenes taxonómicos que presentan normalmente quistes de resistencia.

El Phylum-I presenta 57 órdenes en total, de los cuales 15 (26%) forman éste tipo de quiste. Desde el Phylum-II al VI, sólo uno de ellos, el Phylum-III (Apicomplexa) presenta un sólo orden con quistes de resistencia. Esto es; un 5% de los órdenes que incluyen éstos grupos. De éstos no hemos considerado los llamados esporoquistes, ooquistes y otras formas que presentan otro significado dentro del ciclo

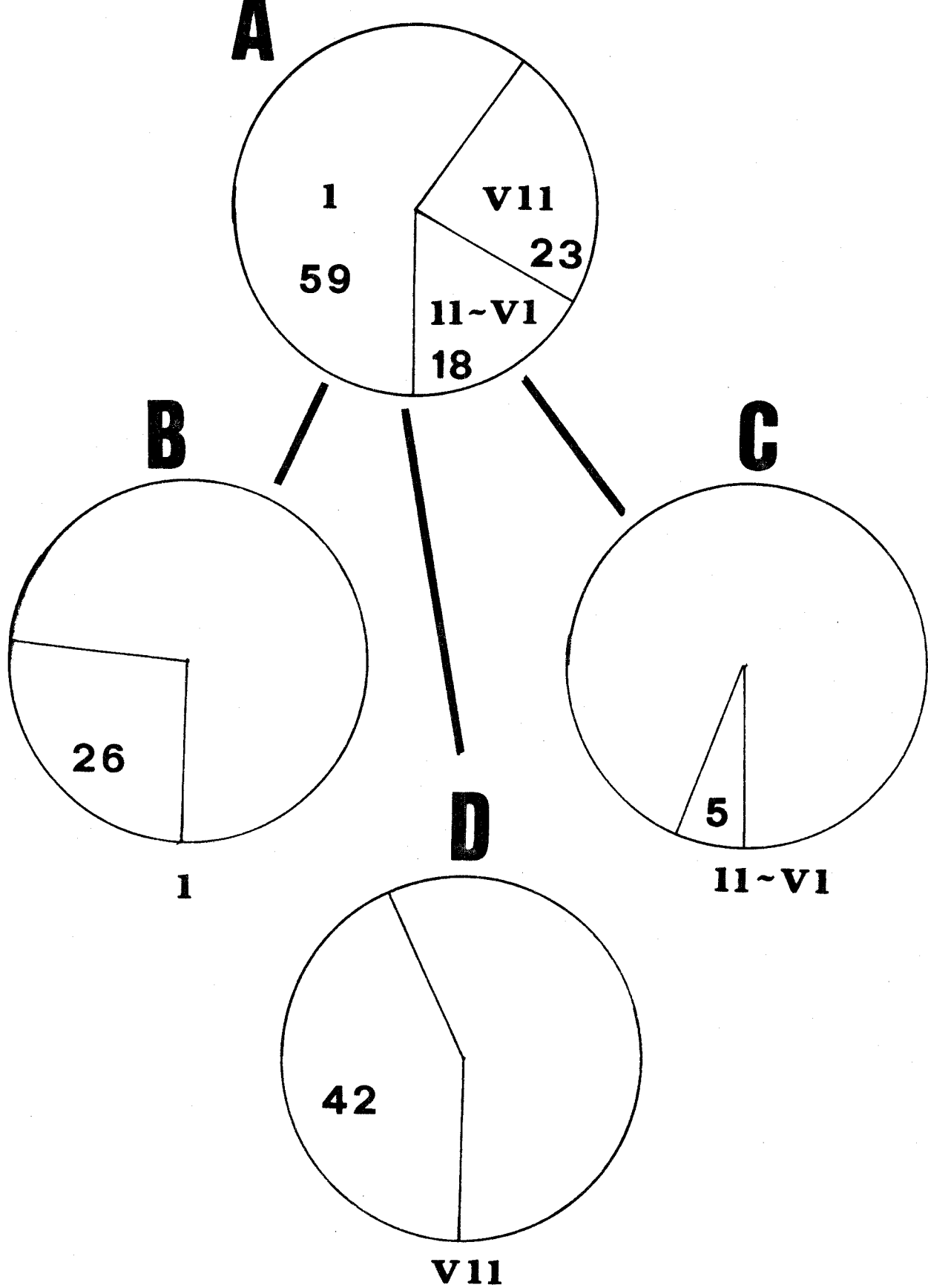


Fig. 2. Distribución aproximada de los órdenes de protozoos formadores de quistes en los 7 phylum del subreino Protozoa.

biológico del protozoo y se alejan un tanto del carácter fundamental del quiste de resistencia de un protozoo de vida libre. El Phylum-VII o Ciliophora, con un total de 19 órdenes, presenta 8 que habitualmente tienen quistes de resistencia, es decir; un 42%. Siendo el grupo de los Ciliados el que mayor cantidad relativa de órdenes con formas enquistables tiene. Todos éstos datos se muestran en los gráficos-circulares de la Fig. 2B, C y D.

2.1. *Consideraciones sobre la bibliografía quística.*

Abrimos éste apartado, en el que se analiza la literatura relativa a los quistes existente desde casi principios de siglo hasta el presente, porque creemos necesario apuntar el hecho de la extrema escasez de información utilizable sobre lo que podríamos llamar "Quistología", esto es la parcela de la Protozoología dedicada al estudio o análisis de los quistes de protozoos y a los dos procesos de diferenciación celular que constituyen lo que se llama ciclo E-E.

Como elemento base de éste estudio bibliográfico hemos utilizado la última "revisión" (se entrecomilla, porque no es una verdadera revisión) sobre quistes de protozoos de vida libre (CORLISS & ESSER, 1974). Otro trabajo que podemos titular de revisión sobre el tema es el de van WAGTENDONK (1955), pero que consideramos demasiado antiguo.

Entre la bibliografía que presentan estos trabajos y la recopilada por nosotros, recogemos un total de 141 referencias, siendo la más antigua de 1913. En la Fig. 3, se presenta la distribución, por décadas, del número aproximado de trabajos aparecidos en las mismas, sobre lo que llamaremos linealmente, el tema; Enquistamiento-Quiste-Exquistamiento.

Aparece un máximo en la década de los treinta con un número aproximado de 17 trabajos. Afortunadamente, en torno a los años sesenta se observa un incremento que continua en los años setenta, alcanzando un valor total y máximo de 48 trabajos. No obstante, pensamos que la cifra sigue siendo baja si la comparamos con el número de trabajos en otras parcelas de la Protozoología. No sabemos que pasará en la década de los ochenta, pero comenzamos con un buen índice, ya que sólo en el año 1980 hemos registrado 12 trabajos sobre el tema.

El avance experimentado en las dos décadas anteriores es paralelo a la introducción de las nuevas técnicas de observación, basadas fundamentalmente en la microscopia electrónica (ME).

De las 141 referencias registradas, hemos realizado una división temática en tres grupos: a)-Enquistamiento, b)-Exquistamiento y c)-Quistes. Predominan los temas relativos al proceso enquistamiento con un 51% del total, le siguen los referentes a exquistamiento (32,6%) y por último los que estudian el estado quiste con un 16,3%. (Fig. 4). La preponderancia de los estudios de enquistamiento sobre los de exquistamiento se observa también en la

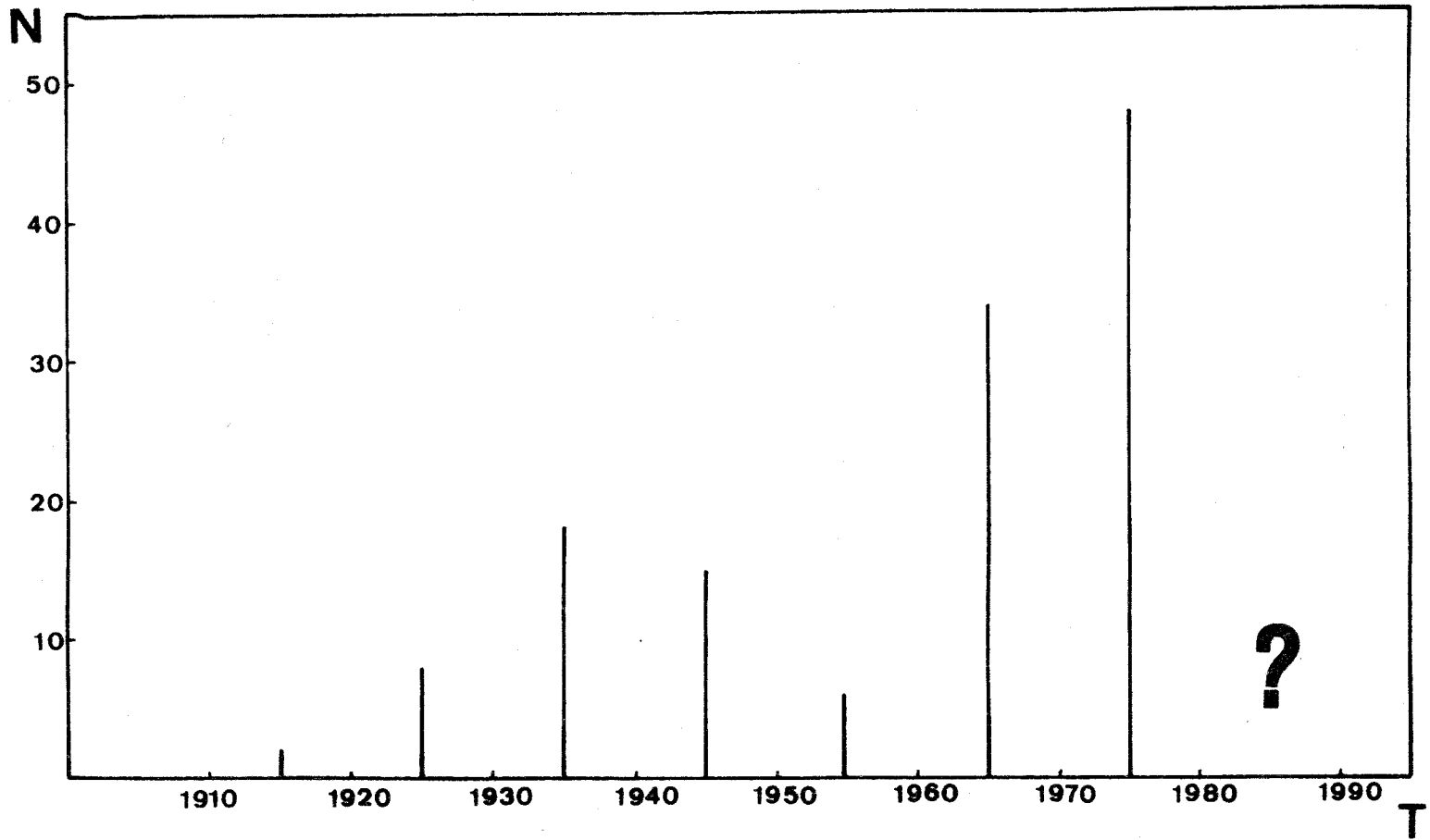


Fig. 3. Distribución, por décadas, de los trabajos relativos al tema: Enquistamiento-Quiste-Exquistamiento.

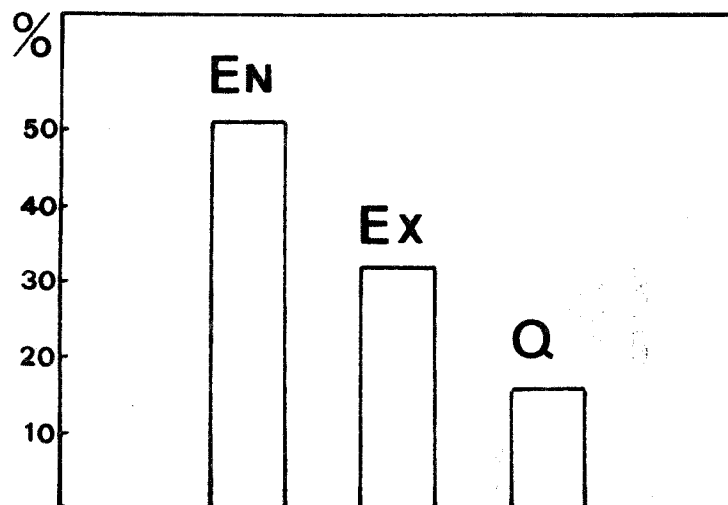


Fig. 4. Histograma de la distribución temática.
En: enquistamiento; Ex: exquistamiento; Q: quistes.

literatura referente a procariotas en la que hay predominio de trabajos de esporulación sobre los de germinación (FREESE, 1972).

2.2. *Tipos quísticos.*

Van WAGTENDONK (1955) y GRELL (1973), distinguen dos tipos de quistes entre los protozoos; los quistes resistentes o de protección y los temporales o de reproducción. Otros protozoólogos (BUSSERS, 1976) diferencian tres tipos quísticos; quistes de digestión o trofoquistes, quistes de división o tomoquistes y los quistes de resistencia. GIESE (1973), clasifica a los quistes de protozoos ciliados en tres grupos diferentes; quistes de protección de reposo, quistes temporales de reposo y los quistes de división.

Concretando, podemos hacer dos grupos básicos; los quistes de resistencia o protección y los tomoquistes o quistes de división. En el primer caso, una célula vegetativa forma un quiste de resistencia y de él se origina, posteriormente, una única célula. Mientras que en el segundo caso, se trata de un proceso de proliferación celular que origina, normalmente, dos o cuatro células que emergen del tomoquiste. El enquistamiento tiene como finalidad, en éste último caso, proteger a la célula durante su división. (Fig. 5).

Dentro de los quistes de resistencia, podemos hacer la distinción entre quistes de singlete y quistes de

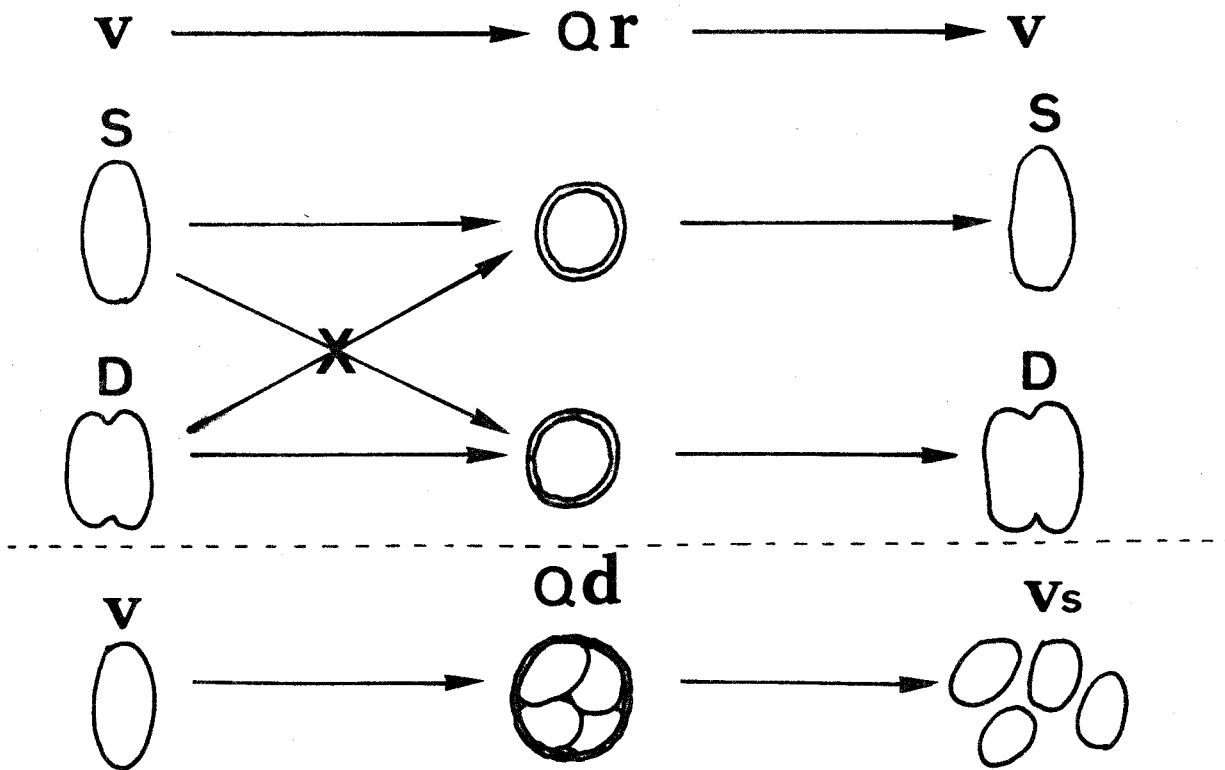


Fig. 5. Diferentes tipos quísticas. V: vegetativo; Qr: quiste de resistencia; S: singlete; D: doblete; Qd: quiste de división.

doblete. Los quistes-singlete, los más comunes, siempre originan singletes y nunca dobletes al exquistarse. Los quistes-doblete, originan normalmente células dobletes al exquistarse (Fig. 5), excepto cuando la célula doblote prequística es modificada experimentalmente (GRIMES, 1973).

2.3. *Morfología quística.*

La forma más generalizada que presenta el quiste de resistencia es la esférica, recuerdese que la esfera es la forma geométrica más termodinámicamente estable y uniforme, de aquí su preponderancia en la Naturaleza (GUTIERREZ, 1975). Asimismo, entre los cuerpos de igual volumen es el que presenta menor superficie, consideración importante si pensamos que al ser una forma de resistencia pasiva ha de presentar la menor superficie de exposición al medio que le es hostil.

Se ha realizado un computo de aquellos quistes descritos que presentan forma esférica frente a los elipsoidales u otras formas (piriformes, fusiformes, etc.). En la Fig. 6 se confirma que es la esférica, la bioforma más abundante (66%), le sigue la forma elipsoidal (26%) y por último el grupo heterogeneo, de otras formas, con un 6,8% aproximadamente.

En una población de quistes esféricos puede, a veces, surgir formas anómalas, es decir; se puede dar el

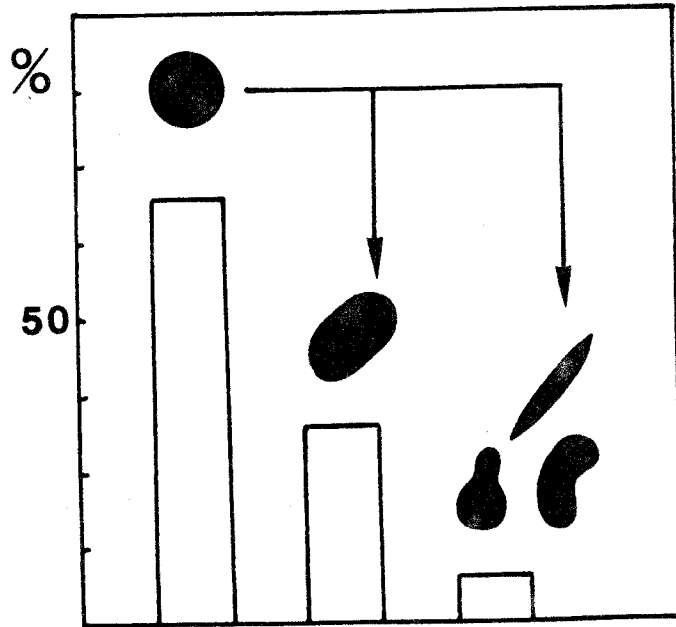


Fig. 6. Porcentajes aproximados de las bioformas presentadas por los quistes de resistencia en Protozoos.

transito morfológico, tanto espontaneo como inducido, de forma esférica a forma elipsoidal o piriforme, como ocurre en *Oxytricha fallax* (HASHIMOTO, 1971), que puede presentar quistes elipsoidales o en forma de varilla, además de los normales quistes esféricos, al realizar el enquistamiento sobre un sustrato sólido como el agar. En *Laurentiella acuminata* (GUTIERREZ & PEREZ-SILVA, 1980), a veces, tras irradiación ultravioleta durante el estado prequístico, se obtienen quistes piriformes.

Los quistes de dobletes a diferencia de los de singletes, dentro de una misma especie, suelen ser morfológicamente algo diferentes, así en *Laurentiella acuminata* suelen ser elipsoidales, y en *Oxytricha fallax* casi siempre son de mayor tamaño que los quistes-singletes (GRIMES, 1973).

3. Pared quística.

3.1. Conocimientos actuales sobre paredes quísticas.

La literatura sobre paredes quísticas es cuantitativamente igual o menor a la existente sobre lo que anteriormente hemos llamado el estado quiste, aproximadamente un 16,3% (Fig. 4). Y cualitativamente, los estudios de carácter morfológico y estructural sobrepasan a los bioquímicos y funcionales.

Iremos desglosando, en diferentes apartados, los pobres e incompletos conocimientos actuales sobre paredes

quísticas de protozoos en general, y en Ciliados en particular.

3.2. Número de capas quísticas.

El número de cubiertas o capas que conforman la pared quística varia de 1 a un máximo de 4 capas diferentes. En la Tabla-I se ha recogido los conocimientos actuales, que hemos podido registrar, acerca del número de capas de la pared quística en el phylum Ciliophora. Sólo se indican los recogidos de la bibliografía más moderna, ya que éstos, en algunos casos (llamadas * en la Tabla-I), corrigen el dato numérico propuesto por otros autores anteriores con, lógicamente, menores posibilidades técnicas de una observación más correcta.

Así, dentro de los Hipotricos; *Gastrostyla steinii*, según WEYER (1930) posee tres envueltas quísticas a diferencia del dato introducido recientemente por WALKER et al. (1980), tras observación por ME de cuatro envueltas quísticas. Algo parecido ocurre en los casos de *Pleurotricha* sp. y *Stylonychia mytilus*, ambos con cuatro capas en la pared quística (Tabla-I), fueron, en 1926, estudiados por ILOWAISKY, y para los cuales el autor describió sólo dos capas. En *Euplotes muscicola*, originalmente, FAURRE-FREMIET et al. (1954), observan dos y posteriormente, BUSSER (1976), corrige este dato sustituyendolo por tres.

TABLA-I. Número de capas quísticas en Ciliados.

	ORGANISMO	N°CAPAS	REFERENCIA	
Clase Polymenophorea	<i>Gastrostyla steinii*</i>	4	WALKER et al, (1980).	
Orden Hypotrichida	<i>Oxytricha fallax</i>	4	GRIMES (1973),	
	<i>Oxytricha bifaria</i>	3	KAY (1945).	
	<i>Pleurotricha sp.*</i>	4	MATSUSAKA (1976).	
	<i>Histriculus sp.</i>	3	MATSUSAKA (1979).	
	<i>Stylonychia mytilus*</i>	4	WALKER et al, (1975).	
	<i>Urostyla grandis</i>	1	TITTLER (1935).	
	<i>Euplotes muscicola*</i>	3	BUSSERS (1976).	
	<i>Diophrys scutum</i>	3	WALKER et al, (1980).	
	Orden Heterotrichida	<i>Blepharisma sp.</i>	2	REPAK & PFISTER (1967); GIESE (1973).
<i>Fabrea salina</i>		3	BUSSERS (1976).	
<i>Bursaria truncatela</i>		3	BUSSERS (1976).	
<i>Nyctotherus sp.</i>		1	VILLENEUVE-BRACHON (1940).	
Clase Kinetofragminophorea.		<i>Didinium nasutum</i>	3	HOLT & CHAPMAN (1971)
		<i>Nassula picta</i>	3	BUSSERS (1976).
	<i>Pseudomicrothorax agilis*</i>	3	BUSSERS (1976).	
	<i>Colpoda cucullus*</i>	3	JANISCH (1980).	
	<i>Nassulopsis lagenula</i>	1	TUFFRAU (1962).	
	<i>Dileptus anser</i>	3	DRAGESCO (1964).	
	Clase Oligohymenophorea	<i>Disematostoma colpidioides</i>	2	TUFFRAU & SAVOIE (1961).
<i>Vorticella microstoma</i>		3	BRAND (1923).	
<i>Tetrahymena rostrata</i>		3	McARDLE & ALLGAIER (1976).	

Igual sucede para *Pseudomicrothorax agilis*, con tres capas, según BUSSER (1976), que en 1922 fué observado por PENARD describiendolo con una sólo capa. *Colpoda cucullus*, con tres envueltas quísticas según JANISCH (1980), tras estudio por criofractura, en 1967, fué descrito por HASHIMOTO como un quiste con una sólo envuelta en su pared. También existe el dato, proporcionado por TIBBS (1968) sobre *Colpoda steinii*, con dos envueltas quísticas.

Por el contrario, existen trabajos que confirman observaciones realizadas anteriormente, como son los casos de *Blepharisma sp.*, *Didinium nasutum* y *Dileptus anser*. (Tabla-I).

De la recopilación bibliografica (Tabla-I) podemos extraer alguna información más:

- a)- El orden Hypotrichida parece presentar el más alto número de envueltas quísticas, a excepción del caso de *Urostyla grandis*, pero este es un dato poco fiable, ya que la fuente data de 1935. Es la pared quística de los hipotricos la que presenta mayor número de capas. Del total estudiado; 22 casos, el 18,1% (Fig. 7) poseen paredes con cuatro envueltas, y todas pertenecen a ciliados hipotricos.
- b)- Tres envueltas quísticas es lo más frecuente entre los Ciliados (Fig. 7), con un 59% del total, éste porcentaje se reparte entre las tres clases establecidas de la siguiente manera:

C1. Polymenophorea	45%
C1. Kinetofragminophorea ..	38%
C1. Oligohymenophorea	15%

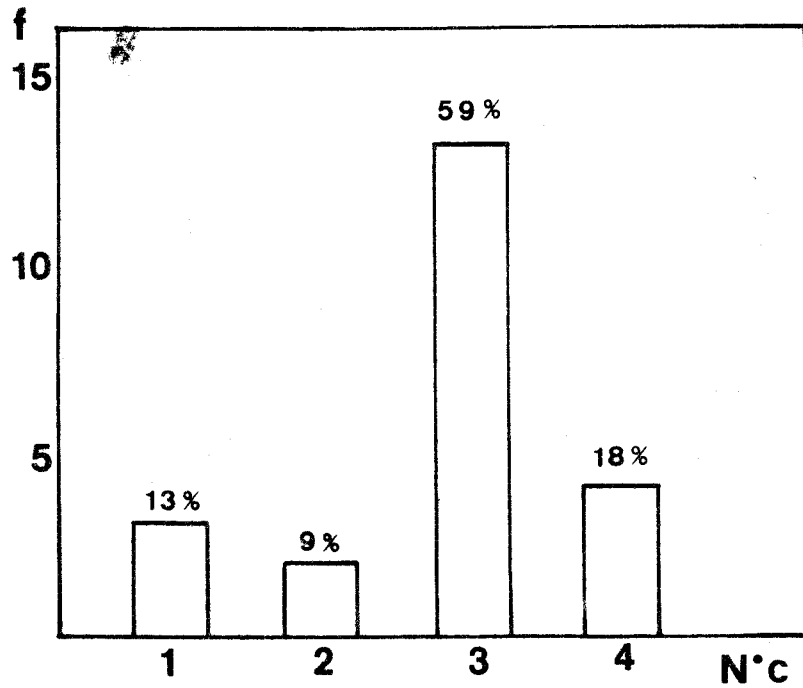


Fig. 7. Histograma de las frecuencias del número de capas quísticas presentes en los quistes de los ciliados estudiados. N°c: número de capas quísticas.

c)- Paredes quísticas con una y dos envueltas no son muy abundantes entre los Ciliados, siendo más abundantes (13,6%) las primeras que las segundas (9,0%).

d)- Como último punto a concluir, decimos que en Ciliatología, se puede establecer un modelo de pared quística constituido básicamente por tres unidades. Sobre este modelo generalizado cabe una variación que abarca un rango de 1 a 4 envueltas quísticas.

Dentro del Phylum-I (Sarcomastigophora), el número de envueltas que presentan los quistes, suele ser dos. Así, en *Opalina sp.*, tanto sus gamontocistes como los quistes de resistencia presentan dos envueltas (MIGNOT & BRUGEROLLE, 1974). En el grupo de las amebas; *Schizopyrenus russelli* tiene tres envueltas según MAITRA et al. (1974) y dos según RASTOGI et al. (1971). En general se puede admitir que el rango de varianza está entre 1 y 3 envueltas en estos individuos (GRIFFITHS, 1970). El caso más numéricamente complejo, lo presentan las paredes de algunos quistes de heliozoos Actinofridos, compuestas de 7-8 envueltas (PATTERSON & THOMPSON, 1981).

3.3. Estructura de la pared quística.

Antes de entrar en el tema de la estructura de las diferentes envueltas quísticas, hemos de conocer la habitual nomenclatura utilizada para la denominación de las mismas.

A la más externa se le llama, generalmente, Ectoquiste, mientras que la más interna recibe el nombre de Endoquiste, nomenclatura introducida, al parecer, por ILOWAISKY (1926). En la mayoría de los Ciliados (Fig. 7), se presenta una tercera, de localización intermedia, llamada Mesoquiste. Y para muchos hipotricos (Fig. 7), la cuarta y última, que está en contacto con la película del protozoo, se la suele denominar Capa Granulosa, ("intimoquiste" de ILOWAISKY).

En resumen; en los casos de 2, 3 y 4 envueltas, la nomenclatura normalmente utilizada se resume en el siguiente esquema:

N°de envueltas quísticas.		
2	3	4
Ectoquiste	Ectoquiste	Ectoquiste
Endoquiste	Mesoquiste	Mesoquiste
	Endoquiste	Endoquiste
		Capa Granulosa

Nomenclatura, de la más externa a la más interna.

Existe una característica común en todas las paredes, envueltas cutículas o recubrimientos externos de los sistemas vivos; estar formados por polímeros orientados (BOULIGAND et al, 1980). Esta característica se extiende desde la pared bacteriana, pasando por la pared de quistes de protozoos, pared de la célula vegetal, glicocalix de

metazoos, cutícula de Artrópodos, hasta la epidermis queratinizada de vertebrados.

Estas macromoléculas se pueden orientar formando placas, láminas, estructuras filamentosas, fibrosas o presentarse de una manera desordenada y amorfa.

A medida que profundizamos más en el estudio de la pared quística, las reseñas bibliográficas van decreciendo, o lo que es lo mismo; escasea más información. Con respecto a la estructura de la pared, los estudios más fiables son los realizados por ME, los cuales son muy escasos.

Comenzaremos con la envuelta más externa o Ectoquiste. En la Tabla-II, se recogen las observaciones de algunos autores acerca de la estructura de ésta envuelta, así como el espesor, en aquellos casos en que se ha realizado tal medida. Predomina la estructura laminar y fibrilar sobre otro tipo. En el caso de *Diophrys scutum* (WALKER et al, 1980), pensamos que los autores de éste trabajo confunden el ectoquiste, capa generalmente delgada, con el mesoquiste amorfo, envuelta generalmente más gruesa. El ectoquiste, en este ciliado, puede ser tan delgado que se confunda con la zona superior del mesoquiste.

En el grupo de las amebas; *Acanthamoeba* (SCHUSTER, 1979) presenta un ectoquiste fibroso de $0,5\mu$ de espesor y en *Schizopyrenus russelli* (MAITRA et al, 1974) está formado por un material granular.

El ectoquiste, como envuelta quística más externa, suele tener una superficie irregular, con salientes, apéndices o, en general, estructuras ornamentales, con una finalidad ecológica definida que se comentará en un posterior apartado.

TABLA-II. Estructura de la capa ectoquística en Ciliados.

CILIADO	ESTRUCTURA	GROSOR (μ)	REFERENCIA
<i>Oxytricha fallax</i>	Laminar	-	GRIMES (1973).
<i>Pleurotricha</i> sp.	Membranosa	0,1-0,2	MATSUSAKA (1976).
<i>Stylonychia mytilus</i>	Amorfa o laminar	-	WALKER et al, (1975).
<i>Gastrostyla steinii</i>	Laminar	-	WALKER et al, (1980).
<i>Diophys scutum</i>	Amorfa	-	WALKER et al, (1980).
<i>Blepharisma stoltei</i>	Fibrosa	0,46	REPAK & PFISTER (1967).
<i>Fabrea salina</i>	-	0,50	BUSSERS (1976).
<i>Didinium nasutum</i>	Filamentosa	8 - 9	HOLT & CHAPMAN (1971).
<i>Colpoda steinii</i>	Fibrilar	1,6	TIBBS (1968).
<i>Colpoda cucullus</i>	Mucosa	0,2-1,4	JANISCH (1980).

Entre las configuraciones descritas en la bibliografía, destacamos las siguientes:

<u>Organismo</u>	<u>Estructura-ectoquística</u>
<i>Pleurotricha</i> sp.	Espinas
<i>Nassula picta</i>	Pliegues
<i>Pseudomicrothoras agilis</i>	Crestas longitudinales
<i>Euplotes muscicola</i>	Una cara carenada
<i>Podophrya fixa</i>	Anillos
<i>Cystodinium</i>	Salientes en forma de cuernos
<i>Uroglena</i>	Espinas
<i>Lophomonas striata</i>	Agujas
<i>Stylocephalus</i>	Papilas

En general, podemos decir que el ectoquiste presenta una superficie irregular y muy pocas veces lisa.

Otra estructura, en la cual no sólo participa el ectoquiste sino también otras envueltas quísticas, es el poro u ostiolo; abertura en la pared que facilita la emergencia de la célula durante el exquistamiento. Nunca se han observado en paredes quísticas de Ciliados Hipotricos, pero sí en otros grupos; *Blepharisma stoltei* (REPAK & PFISTER, 1967; WALSH & ISQUITH, 1979) presenta un gran operculo saliente piriforme, que desaparece durante la emergencia celular. Igualmente, en el mismo grupo de Heterotricos; *Fabrea salina* y *Bursaria truncatella* (BUSSER, 1976) presentan micropilo con tapon. Las amebas del género *Acanthamoeba* (SHUSTER, 1979) también presentan ostiolos con tapón.

Al igual que para el ectoquiste, en la Tabla-III, se presentan las observaciones estructurales del Mesoquiste realizadas por algunos autores. En los hipotricos predomina la estructura fibrosa, y aunque algunos autores no cuantifiquen su espesor, detallan que es la envuelta más gruesa de todas las de la pared quística. Por el contrario, para miembros de la clase Kinetofragminophorea, tales como *Didinium* y *Colpoda* (Tabla-III) es laminar.

La tercera envuelta quística o Endoquiste presenta, en protozoos ciliados, las características mostradas en la Tabla-IV. Predomina la forma amorfa-empaquetada-homogénea sobre la laminar o fibrilar. Para la mayoría de los protozoos (Fig. 7), ésta es la última y más interna envuelta quística que se encuentra en íntimo contacto con la película celular.

En el casi 50% de los ciliados hipotricos estudiados, se da una cuarta y más interna envuelta quística; la Capa Granulosa. Esta denominación nos parece incorrecta por el hecho de que a veces no se presenta con la peculiaridad "granulosa" y muestra estructura fibrilar o floculenta. Por consiguiente, cabe la opción de volverla a llamar "intimoquiste" (ILOWAISKY, 1926) o podemos llamarla "Metaquiste" o de alguna otra forma que no implique -a priori- descripción de estructura alguna.

En la Tabla-V, se muestra la característica de ésta última envuelta en aquellos ciliados que la presentan. Esta capa al presentar una serie de invaginaciones en el citoplasma celular, hace que su espesor sea extremadamente irregular.

TABLA-III. Estructura de la capa mesoquistica en Ciliados.

CILIADO	ESTRUCTURA	GROSOR (μ)	REFERENCIA
<i>Oxytricha fallax</i>	Fibrosa	-	GRIMES (1973).
<i>Pleurotricha</i> sp.	Fibras en una matriz	1,2-2,0	MATSUSAKA (1976).
<i>Stylonychia mytilus</i>	Fibrosa	-	WALKER et al, (1975).
<i>Gastrostyla steinii</i>	Fibrosa	-	WALKER et al, (1980).
<i>Fabrea salina</i>	-	1	BUSSERS (1976).
<i>Bursaria truncatella</i>	-	3,5	BUSSERS (1976).
<i>Didinium nasutum</i>	Dos regiones: a)-láminas gruesas b)-láminas compactas	2,5	HOLT & CHAPMAN (1971).
<i>Colpoda cucullus</i>	Laminar.	0,2-0,4	JANISCH (1980).

TABLA-IV. Estructura de la capa endoquística en Ciliados.

CILIADO	ESTRUCTURA	GROSOR (μ)	REFERENCIA
<i>Oxytricha fallax</i>	Fibrilar o empaquetada amorfa.	-	GRIMES (1973).
<i>Pleurotricha</i> sp.	Amorfa.	0,2-0,3	MATSUSAKA (1976).
<i>Stylonychia mytilus</i>	Amorfa.	-	WALKER et al, (1975).
<i>Gastrostyla steinii</i>	Empaquetada.	-	WALKER et al, (1980).
<i>Euplotes muscicola</i>	Homogenea.	-	FAURRE-FREMIET et al, (1967)
<i>Blepharisma stoltei</i> .	Fibrilar y empaquetado	1	REPAK & PFISTER (1967).
<i>Fabrea salina</i>	-	2	BUSSERS (1976).
<i>Bursaria truncatella</i> .	-	2,5	BUSSERS (1976).
<i>Didinium nasutum</i>	Fibras en matriz compacta.	0,3	HOLT & CHAPMAN (1971).
<i>Colpoda cucullus</i>	Homogenea.	0,2-0,4	JANISCH (1980).

TABLA-V. *Estructura de la capa granulosa en Ciliados.*

CILIADO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
<i>Oxytricha fallax</i>	Granular o fibrilar disperso.	GRIMES (1973)
<i>Pleurotricha sp.</i>	Granular.	MATSUSAKA (1976).
<i>Stylonychia mytilus</i>	Granular - flocculenta	WALKER et al, (1975).
<i>Gastrostyla steinii</i>	Material disperso.	WALKER et al, (1980).

Estas invaginaciones o surcos en el citoplasma quístico a veces pueden llegar a fusionarse originando canales que atraviesan todo el quiste con material de ésta envuelta. Como ocurre en *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973) y en *Stylonychia mytilus* (WALKER et al, 1975).

A modo de resumen de lo expuesto, podríamos establecer una serie de conclusiones:

- a)- El Ectoquiste es una envuelta delgada y esencialmente laminar. Al ser la envuelta más externa, presenta salientes, protuberancias u otras estructuras que hace que su superficie sea irregular.
- b)- El Mesoquiste es una envuelta quística esencialmente fibrosa y la más gruesa de todas.
- c)- El Endoquiste es amorfo y homogéneo. Con un grosor parecido al Ectoquiste, aunque a veces mayor.
- d)- Estas tres envueltas quísticas presentes en la mayoría de los ciliados es un modelo básico de pared quística que admite todas las variaciones que se den en los casos restantes. (Fig. 8).
- e)- Sólo en el grupo de los Hipotricos, aparece una cuarta estructura a modo de capa o envuelta más interna, con características morfológicas menos definidas que las que forman el modelo básico.

3.4. *Composición de la pared quística.*

La información acerca de la composición de las llamadas, en general, producciones metaplasmas

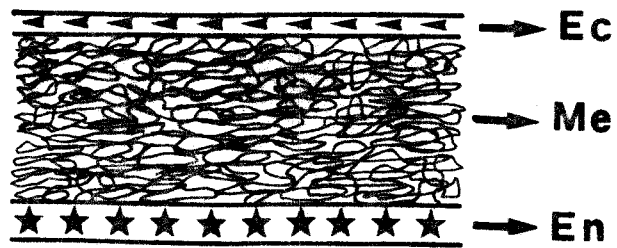


Fig. 8. Modelo básico de pared quística de Ciliado. Ec: ectoquiste; Me: mesoquiste; En: endoquiste.

(paredes quísticas, vainas o lórigas, conchas o tecas), no sólo es extremadamente escasa sino muy poco profunda y de baja calidad analítica. El principal problema que se suele presentar en el análisis de paredes es el conseguir las cantidades necesarias de material para poder detectar un determinado tipo macromolecular o grupo químico. Otro problema importante es la pureza de las muestras obtenidas, o lo que es lo mismo; la ausencia de componentes citoplasmáticos (TAYLOR & CAMERON, 1973).

Las técnicas de estudio que se suelen emplear en el análisis de los biopolímeros de paredes, tanto celulares como quísticas, se pueden agrupar en dos clases: Físicas y Químicas. Dentro de las primeras se destacan los estudios de los difragnetogramas de rayos-X y los espectros de absorción infrarroja. El segundo grupo se podría dividir a su vez en dos; trabajos Bioquímicos y Citoquímicos. La ME, sin incorporación de técnicas citoquímicas, también puede contribuir indirectamente al conocimiento aproximado de la naturaleza de las estructuras biológicas que observa; la osmiofilia o reactividad con el OsO_4 (fijador corriente en ME) nos puede indicar algo acerca de la naturaleza de la estructura con la cual interacciona. Así, los fosfolípidos y grasas insaturadas presentan una fuerte reactividad, las proteínas una reactividad moderada y los polisacáridos y ácidos nucleicos una reactividad nula o muy débil. (MERCER & BIRBECK, 1979).

En el análisis de la naturaleza de las paredes quísticas de protozoos, predominan los trabajos citoquímicos (72,2%) sobre los bioquímicos (22,2%). (Fig. 9). El grupo de las amebas presenta más estudios bioquímicos (80%) que

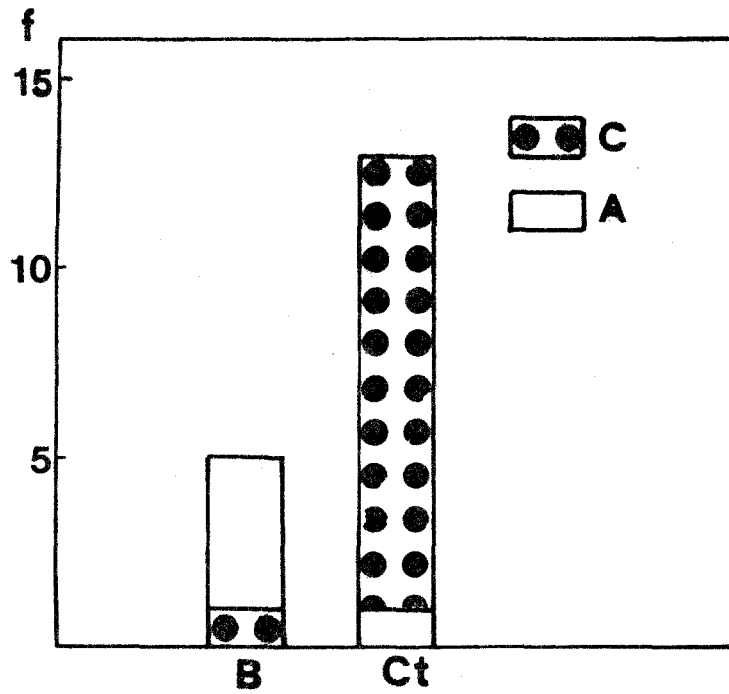


Fig. 9. Distribución de los trabajos Bioquímicos (B) y Citoquímicos (Ct), sobre paredes quísticas de Ciliados (C) y Amebas (A).

citoquímicos (20%) y lo contrario ocurre en el grupo de los ciliados; los citoquímicos abarcan un 92,3% y los bioquímicos un 7,6% (Fig. 9). Los cultivos axénicos en amebas y la cantidad y pureza del material obtenido hacen que sean relativamente fáciles los trabajos de tipo bioquímico, a diferencia de lo que ocurre en los ciliados. Esto explica el predominio del tipo de análisis citoquímico en éste último grupo.

Las macromoléculas más comúnmente presentes en paredes quísticas y otras producciones metaplasmaicas, pertenecen a tres grupos básicos: Proteínas, Hidratos de Carbono y Lípidos. Atendiendo a la riqueza en éstos tres componentes básicos, se ha realizado un gráfico trilineal (Fig. 10A) para las paredes quísticas estudiadas en Ciliados y Amebas. Como se aprecia en dicho gráfico, es más abundante el componente proteínico en las paredes quísticas estudiadas en Ciliados que en Amebas, por el contrario éstas últimas son más ricas en Hidratos de Carbono, y ambos se encuentran a una distancia aproximadamente igual con respecto a los Lípidos.

El único análisis bioquímico realizado sobre paredes quísticas en Ciliados, es el realizado sobre *Colpoda steinii* (TIBBS, 1966), en el que se detecta una gran proporción proteica (70%); el autor la compara con las paredes de esporas bacterianas, igualmente ricas en proteína. En dicha proteína abunda el ácido glutámico ($0,31 \pm 0,005$ moles/100 gr de pared). El autor (TIBBS, 1966) detecta también la presencia de enlaces disulfuros y se especula acerca del tipo de uniones directas o indirectas del ácido

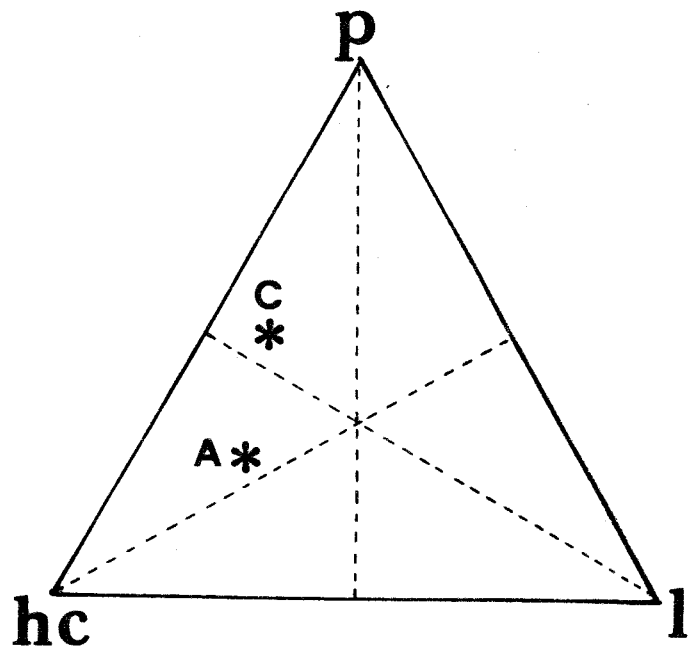


Fig. 10A. Gráfico trilineal de la composición de las paredes quísticas en Ciliados (C) y Amebas (A); P: proteínas; hc: hidratos de carbono; L: lípidos.

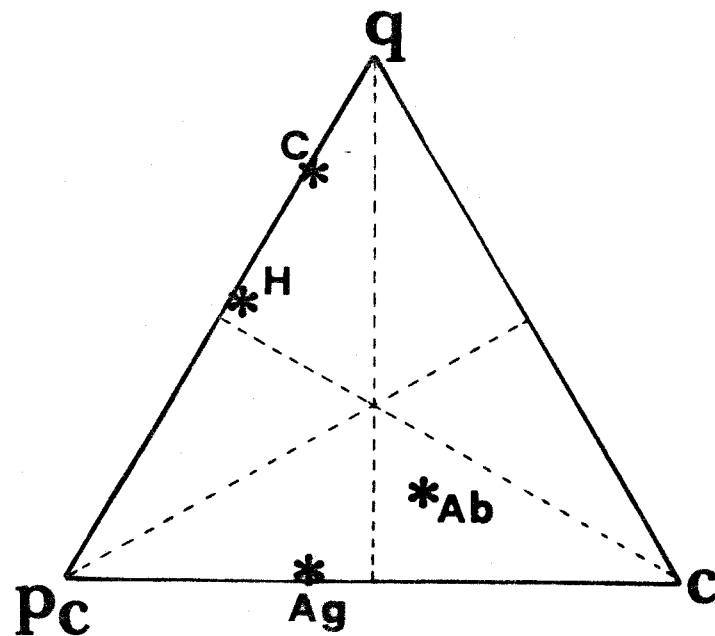


Fig. 10B. Gráfico trilineal de los tipos de polisacáridos más comunes presentes en Ciliados (C), Amebas (Ab), Algas (Ag) y Hongos (H). q: quitina; c: celulosa; Pc: polisacáridos complejos.

glutámico con los residuos de cisteína. Acerca de la arquitectura molecular proteica, se incide en la posibilidad de la formación de cadenas lineales de poliglutámico unidas por cadenas polipeptídicas transversales, enlazadas a su vez por residuos cisteínicos.

GOODEY (1913), estudiando las propiedades de la pared quística de *Colpoda cucullus*, propuso el nombre de "Quistosa" para el componente polisacárido de la misma. En *Schizopyrenus russelli* (RASTOGI et al, 1971), la proteína actúa de "cubierta" para la celulosa, componente principal de la pared quística de ésta ameba.

Siendo el polisacárido un biopolímero cualitativa y cuantitativamente importante en lo que se refiere a configuración de paredes, se ha efectuado un estudio de presencia de los mismos en paredes quísticas (Amebas y Ciliados) y celulares (Algas y Hongos), dividiéndolos en las tres clases más comunes; Celulosa = Poli {(1-4)- β -D-Glcp}, Quitina = Poli {(1-4)- β -D-GlcpNAc} y Polisacáridos complejos (Glucoproteínas, Peptido-polisacáridos...etc.). Con éstos datos hemos diseñado un gráfico trilineal (Fig. 10B), en el que se aprecian dos grupos bien delimitados; Ciliados y Hongos, con abundancia de Quitina y Amebas y Algas, con abundancia de Celulosa. Estos resultados han de tomarse con prudencia considerando la escasez de estudios realizados, principalmente sobre paredes quísticas de Ciliados.

BUSSER & JEUNIAUX (1974), estudian la presencia de quitina (test-enzimático con quitinasa) en 22 especies de Ciliados, de los cuales un 63% presentan quitina aunque sea parcialmente. A veces, esta quitina está protegida por incrustaciones de sílice o silicatos y sólo es detectable tras

desilicificación con ácido fluorhídrico. En dicho estudio se concluye que la capacidad de biosíntesis de quitina es una propiedad general del Phylum Ciliophora.

Por lo tanto, el conocimiento de la naturaleza bioquímica de paredes quísticas y celulares no sólo sirve para incrementar el conocimiento de capacidades metabólicas de microorganismos eucariotas, sino también para interesantes estudios de evolución bioquímica, sobre todo a nivel de moléculas no informadoras o "episemánticas" (ZUKERKANDL & PAULING, 1965).

De todo lo expuesto podemos considerar varios puntos, como resumen:

- a)- Pobreza en la cantidad y calidad de los estudios bioquímicos en paredes quísticas de Ciliados.
- b)- En general, en las paredes quísticas de Ciliados abundan componentes de naturaleza proteínica.
- c)- En cuanto se refiere al tipo de Hidrato de Carbono presente en los Ciliados, el orden a establecer podría ser: Quitina, Polisacárido Complejo, Celulosa, éste último casi nunca se presenta.

3.5. *Formación y origen de precursores de la pared quística.*

Llegado a éste nivel de estudio, la información se hace más escasa aún y dispersa.

En lo que se refiere al grupo de las amebas, los conocimientos en éste tema se resumen de la siguiente forma;

tanto en el género *Acanthamoeba* (GRIFFITHS, 1970) como en *Schizopyrenus russelli* (MAITRA et al, 1974), se han detectado en el citoplasma de la célula prequística, lo que los autores mencionados, han denominado "cuerpos negros"; son vesículas rodeadas por una unidad de membrana, de 70-100 nm de diámetro, de contenido electro-denso. Estos cuerpos emigran hacia la periferia celular y se piensa que sean precursores de la pared. La síntesis de éstos precursores, según los mismos autores, parece realizarse en el aparato de Golgi. Se observan cambios en el mismo durante la formación del Ectoquiste y en general durante el enquistamiento.

En hongos, durante la formación de su pared celular, aparece igualmente un sistema de vesículas que se forman a partir de dictiosomas o del REI. Dentro de este tipo de vesícula, están bastante bien descritos, los llamados Quitosomas; microvesículas de 40-70 nm de diámetro que se han encontrado en homogenados de *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Agaricus bisporus* entre otros (GOODAY & TRINCI, 1980). A partir de ellos se sintetizan las microfibrillas de quitina que formarán una de las capas de la pared. No se han detectado estos orgánulos, en protozoos que presentan la quitina como un componente de la pared quística.

El alga unicelular gigante *Acetabularia* (WERZ, 1970) tanto su pared celular como su pared quística la forma a partir de vesículas de origen golgiano (vesículas dictiosomales).

Sólo se han podido recoger siete casos, en que se describen orgánulos precursores de pared quística en Ciliados, éstos se presentan en la Tabla-VI.

TABLA-VI. Estructura de los precursores de la pared en Ciliados.

CILIADO	ORGANULO-PRECURSOR	CAPA QUE ORIGINA	REFERENCIA
<i>Tetrahymena rostrata</i>	Mucocistos.	Totalidad.	McARDLE et al, (1980).
<i>Didinium nasutum</i>	Clatrocistos	Mesoquiste.	HOLT & CHAPMAN (1971).
	Mucocistos	Ectoquiste.	
<i>Ophryoglena mucifera</i>	Mucocistos	Totalidad.	GRASSE & MUGARD (1961).
<i>Diophrys scutum</i>	Vesículas con gránulos	-	WALKER & MAUGEL (1980).
<i>Gastrostyla steinii</i>	Discos empaquetados	Ectoquiste.	WALKER et al, (1980).
	Elemento fibrilar	Mesoquiste.	
	Material irregular	Capa Granulosa.	
<i>Pleurotricha sp.</i>	Discos empaquetados	Ectoquiste.	MATSUSAKA (1976).
	Cuerpos como cordones	Mesoquiste.	
	Cuerpos esféricos con sustancia amorfa.	Capa Granulosa.	
<i>Oxytricha fallax.</i>	Pilas de discos	Ectoquiste.	GRIMES (1973).
	Cuerpos largos y fibrosos.	Mesoquiste.	
	Cuerpos pequeños y densos.	Capa Granulosa.	

Aparecen estructuras mucocísticas, interviniendo en la formación de alguna de las membranas quísticas, en dos individuos de la clase Oligohymenophorea y uno de la clase Kinetofragminophorea, perteneciente a ésta última clase es *Didinium nasutum*, en él se describe un nuevo orgánulo, que los autores llaman clatrocisto, parecido a los mucocistos y que sólo surgen durante el enquistamiento. El resto (Tabla-VI) pertenece a la clase Polymenophorea, orden Hypotrichida, que presentan una serie de características comunes en cuanto a sus precursores, excepto en el caso de *Diophrys scutum*.

El precursor ectoquístico aparece como discos empaquetados en pilas, de origen común, con dimensiones que en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) va de 1,1-1,2 μ de diámetro y en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) miden 1,5-2,0 μ de longitud por 0,1 μ de espesor. Este último autor describe, sin mostrar micrografías de ello, unas partículas electro-densas de aproximadamente 1 μ de diámetro con un contenido granular fino, encontrándose en asociación con abundante REr, en cuyo interior se desarrollan los precursores del ectoquiste. En el caso de *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973), sólo se dice que los precursores son presumiblemente elaborados en el interior de vesículas a partir de un material no organizado en láminas.

En cuanto a precursores mesoquísticos, se describen en *Gastrostyla steinii*, *Pleurotricha* sp. y *Oxytricha fallax* como elementos fibrilares largos no envueltos en membrana.

En ningún caso se observan precursores endoquísticos y sólo en *Pleurotricha* sp. y *Oxytricha fallax* (Tabla-VI) se describen precursores de capa granulosa como cuerpos esféricos

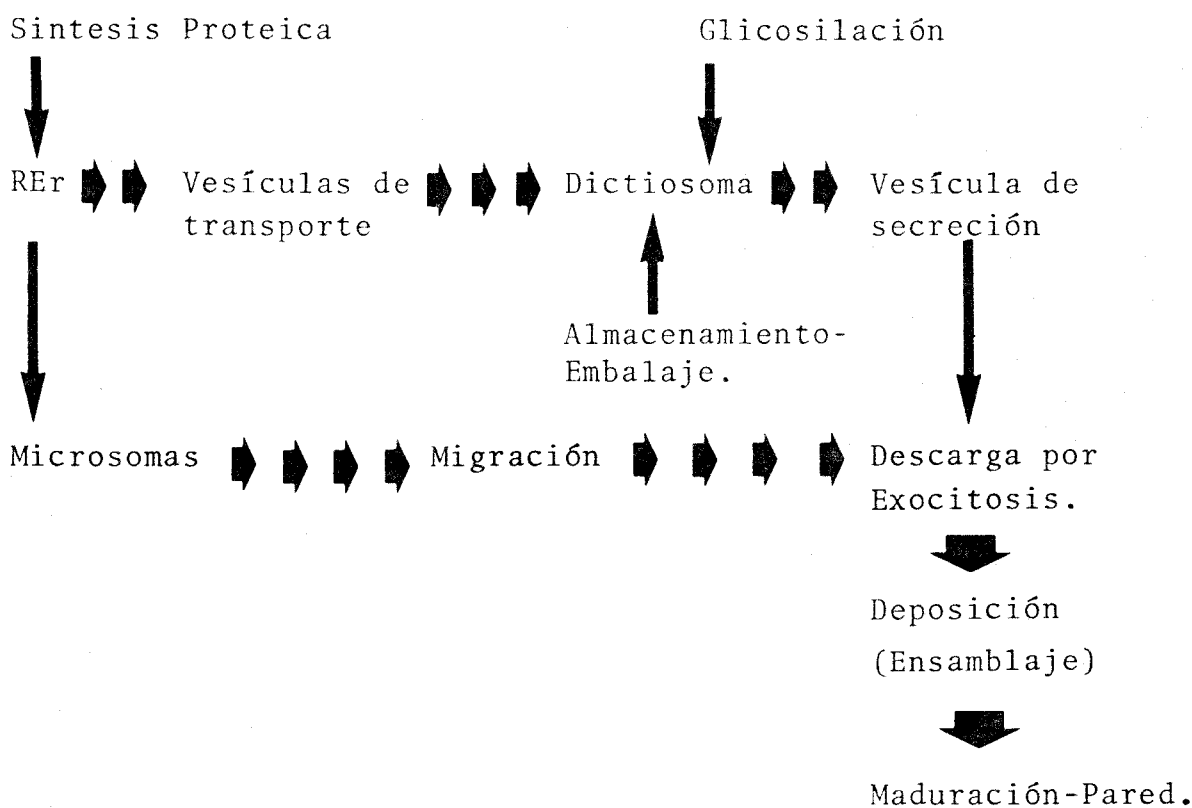
con sustancia amorfa en su interior, de 500 nm de diámetro en el caso de *Pleurotricha* sp.

Todos estos precursores migran desde el interior celular hasta la periferia citoplásmica en donde descargan sus contenidos. El transporte de éstos precursores no está aclarado, se ha supuesto, en Hongos y vegetales superiores, que el transporte podría realizarse via microtúbulos, ya que agentes anti-tubulina causan deposición anormal de quitina en *Trichophyton metagrophytes* (GOODAY & TRINCI, 1980).

Sólo hay un caso descrito de posible asociación microtubular en precursores quísticos, concretamente en precursores ectoquísticos de *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980). Microtúbulos que se encuentran asociados lateralmente a los discos y podrian estar involucrados en procesos de migración e inserción. No hay ninguna información fiable acerca del origen celular de dichos precursores, se especula entre el sistema de Golgi y el RER.

La salida de los precursores al exterior celular, puede realizarse por rotura de la película del protozoo o fusión de las membranas peliculares con la vesícula portadora de elemento precursor. Los precursores ectoquísticos en *Oxytricha fallax* y *Gastrostyla steinii*, se disponen entre las dos membranas de la película del protozoo, sirviendo la membrana distal como una envuelta que protege a los precursores de la dispersión después de su deposición (GRIMES, 1973) y antes de su fusión definitiva.

Para finalizar, podemos establecer un modelo general de comportamiento o ruta de acontecimientos:



4. Características fisiológicas del estado quiste.

Recordemos que la literatura sobre el estado quiste es la más escasa (16,3%) (Fig. 4), no obstante podemos dar algunos datos sobre las características fisiológicas de éste estado de dormancia o criptobiótico, estado transito en el ciclo E-E.

Dicho estado se caracteriza por su inactividad metabólica; citoplásmica y nuclear. Como se analizará en un apartado posterior, estas inactividades metabólicas no

surgen instantaneamente, sino progresivamente durante el proceso de enquistamiento.

En términos físicos; el quiste de resistencia es una forma altamente deshidratada, o deficiente en agua-libre (BENEZECH, 1973), esto inactiva tanto reacciones catabólicas (hidrólisis digestivas) como anabólicas (biosíntesis por anhidrización), quedando tan sólo lo que se ha llamado el agua-ligada, siendo ésta anormalmente resistente a la deshidratación y congelación (no se congela a temperaturas menores de -20°C), no presenta las conocidas propiedades disolventes y no obedece a las reglas osmóticas en los intercambios célula-ambiente. (BENEZECH, 1973).

En formas vegetativas de levaduras y *Escherichia coli* (MAZUR, 1978) este agua-ligada representa un 10%. No existen datos sobre formas de resistencia, pero la razón agua-libre/agua-ligada en ellas debe ser muy baja. Los cambios osmóticos de una célula enquistada son muy bajos respecto a la forma activa. Experimentos con *Actinosphaerium* indican que la permeabilidad del quiste al agua es sólo 1/10 de la del vegetativo (PIGON, 1955).

En cuanto a actividades enzimáticas en el estado quiste, MATTAR & BYERS (1971), encuentran que la capacidad biosintética proteica "in vitro" del citoplasma quístico en *Acanthamoeba*, es bastante menor que la presentada por el citoplasma vegetativo. También se observa baja actividad de síntesis de ARN en la misma ameba (RUDICK & WEISMAN, 1973).

La capacidad respiratoria, un buen índice de actividad metabólica, se vé intensamente disminuida en el quiste de resistencia. PIGON & EDSTROM (1961), estudian el

metabolismo respiratorio de dos tipos de quistes de *Colpoda cucullus*; los quistes inestables (QI) presentan medidas de respiración superior a los quistes estables (QE). El azul de metileno (1 mM) incrementa la respiración en los QI por un factor de cuatro, mientras que en los QE lo hace por dos. Estos autores, tras análisis de la capacidad para exquisitarse, contenido en ARN y la capacidad respiratoria, llegan a la conclusión de que los QE representan, en *Colpoda cucullus*, una forma más efectiva de resistencia y ofrecen una mayor protección que los QI.

PIGON (1961), estudia algunas actividades enzimáticas (dipeptidasa y aminoácido oxidasa) en quistes del ciliado *Urostyla*, mostrando en todos los casos actividades menores que las presentadas por células vegetativas.

Sobre la actividad genética o metabolismo nuclear del quiste de resistencia, se conoce aún mucho menos; al igual que la citoplásmica, la actividad nuclear ha de ser mínima o nula. En *Oxytricha fallax* (WADA & SPEAR, 1980) se ha realizado un estudio de espaciación nucleosomal en tres tipos cromatínicos macronucleares distintos; cromatina total vegetativa, cromatina de ADN ribosomal vegetativa y cromatina total quística. La cromatina quística contiene las mismas secuencias de ADN que la cromatina total vegetativa, pero la actividad génica está a un nivel mínimo. La espaciación nucleosomal es la misma en los tres tipos cromatínicos (198 pares de bases). A diferencia de lo que ocurre en la cromatina micronuclear de *Stylonychia* (LIPPS & MORRIS, 1977), transcripcionalmente inerte, que mantiene una espaciación nucleosomal de menor longitud que la del macronúcleo, la cromatina quística no sufre esta variación a pesar de su inactividad. Aunque, por otra parte, no está nada clara la

posible correlación entre la actividad transcripcional y la espaciación nucleosomal.

Pensando que la inactividad cromatínica puede ser consecuebcia, sino total, parcial, de cambios histónicos (MELLO, 1978; McCARTY & McCARTY Jr, 1978). GUTIERREZ & PEREZ-SILVA (1981), en otro ciliado hipotrico, *Gastrostyla steinii*, encuentran que el macronúcleo quístico contiene aproximadamente 1,23 veces más histonas que el macronúcleo vegetativo, y estas histonas quísticas son aproximadamente 1,59 veces más ricas en Arginina que las que posee el macronúcleo vegetativo. Sugiriendo la posibilidad de que, al igual que ocurre en células eucarióticas superiores (espermatogénesis), se presenten proteínas parecidas a las protaminas (ricas en Arginina) en el macronúcleo quístico, formadas durante el enquistamiento.

A veces, el citoplasma quístico muestra una pigmentación particular, que en muchos casos sólo se trata de un oscurecimiento debido a la deshidratación, pero que en otros se presenta como una verdadera pigmentación que no suele darse en la célula vegetativa. Hay poco descrito sobre quistes pigmentados, KUDO (1966) señala algunos casos; los quistes de *Peridinium* son rojos, los de *Balantidium coli*, amarillos-verdosos, *Hyalospora affinis* los presenta amarillos y los de la familia Vampyrellidae son rojos por la presencia de carotina. *Blepharisma* (GIESE, 1973), ciliado pigmentado en su forma activa debido a la blepharisma (pigmento de color rojo), presenta en su estado enquistado un color azul (oxiblepharisma).

En ciliados hipotricos tales como *Gastrostyla steinii*, *Histriculus* sp. y *Laurentiella acuminata* (GUTIERREZ et al, 1980), los quistes se muestran de color naranja intenso. En el último ciliado citado, se ha conseguido aislar e identi-

ficar este pigmento, tratándose de un α -caroteno, presentándose en una cantidad, referida a peso seco celular, de 110 ppm. También se ha observado que la vitamina-A (50 ppm), incrementa al doble la concentración de pigmento si se enquistaba en su presencia. (GUTIERREZ et al, 1980).

En general, la presencia de pigmentación en quistes de resistencia, puede traducirse en un mecanismo más, sumando los ya existentes, de protección, en este caso de fotoprotección.

Resumiendo, el quiste de resistencia es un perfecto estado criptobiótico, que se caracteriza por un bajo nivel metabólico y con una, así mismo, baja interacción con el medio. Este estado le proporciona una considerable resistencia a factores físico-químicos exógenos y longevidad.

5. Resistencia y longevidad quística.

La supervivencia en estados límite es asombrosamente extensa y variada, existiendo microorganismos que se acomodan a los ambientes más hostiles. Y, por supuesto, el estado más idóneo para esta supervivencia es el estado durmiente. Las semillas de *Lupinus* han sobrevivido 10.000 años en el subsuelo ártico, esporas bacterianas de 1.000 años de antigüedad se han mantenido viables en sedimentos lacustres (SNEATH, 1975). Varios flagelados, ciliados y amebas han sido recobrados de quistes en muestras secas de suelo, después de 49 años. (GRIFFITHS, 1970). KUDO (1966),

muestra también algunos datos de longevidad quística:

<u>Organismo</u>	<u>Longevidad (años)</u>
<i>Spathidium spathula</i>	4
<i>Oxytricha</i> sp.	4
<i>Colpoda cucullus</i>	5
<i>Ceratium</i>	6
<i>Haematococcus pluvialis</i>	8
<i>Didinium nasutum</i>	10

Parece ser que no hay un límite fijado en lo que concierne a la longevidad de quistes de resistencia.

La resistencia a factores físico-químicos, bajo los cuales las formas vegetativas no se mantendrían, es también muy variada:

5.1. *Altas temperaturas.*

Los quistes secos de *Colpoda steinii* pueden resistir una hora a 106°C y una exposición momentánea a 120°C, estos mismos quistes en humedad no sobreviven a 44°C (TAYLOR & STRICKLAND, 1936). Por el contrario, los quistes de *Entamoeba histolytica* no soportan una exposición prolongada a altas temperaturas. Mueren en un periodo de 5 a 10 segundos en agua hirviendo, y no sobreviven a la desecación (KUDO, 1966).

5.2. *Bajas temperaturas.*

Quistes de resistencia de *Colpoda* toleran la temperatura del aire líquido (-180°C). (BYCHENKOVA et al, 1969). En general, las bajas temperaturas tienden a conservar mejor los estados de dormancia, se usa un rango de 0° a -20°C para la conservación, en laboratorio, de quistes de protozoos.

5.3. *Otros factores físicos.*

De nuevo los quistes del ciliado *Colpoda* suelen resistir un tratamiento de alto vacío, si éste se efectúa gradualmente. (TAYLOR & STRICKLAND, 1936).

Los quistes de protozoos son áltamente resistentes a daños por radiación visible y/o ultravioleta. La luz visible intensa puede matar normalmente a *Blepharisma* pigmentado en pocos minutos, pero varias veces la misma dosis de luz no hace más que cambiar el color a los quistes. (GIESE, 1973). La dosis de UV lejana requerida para matar los quistes de división de *Colpoda maupasi* es superior a la necesaria para matar a los vegetativos, y los quistes de resistencia son mucho más resistentes que los de división (LOZINA-LOZINSKII & USPENSKAJA, 1968).

5.4. *Factores químicos.*

La información sobre el efecto letal de diversas sustancias o compuestos inhibidores metabólicos sobre el estado quiste, está orientada hacia el efecto de éstos sobre quistes de protozoos patógenos, y en particular, los que afectan a la especie humana (por ejemplo: sobre *E. histolytica*) No existe información del efecto letal de estos inhibidores sobre quistes de resistencia en protozoos no patógenos.

6. *Enquistamiento.*

6.1. *Implicaciones teóricas en torno al Enquistamiento como proceso biológico de diferenciación celular.*

Tanto en el Enquistamiento como en el Exquistamiento existe diferenciación temporal y espacial. En el paso vegetativo-quiste y quiste-vegetativo la diferenciación temporal se expresa en la drástica diferencia de comportamiento celular entre un estado activo y una forma de resistencia pasiva, mientras que la diferenciación espacial, así mismo drástica, es el cambio morfológico-estructural que tiene lugar en ambos procesos.

Los sistemas vivos se caracterizan, desde un punto de vista de dinámica fundamental, en que poseen un comportamiento oscilatorio. Según THOM (1969), en un sistema dinámico pueden surgir y desarrollarse, de una manera bien definida ciertas inestabilidades, cuando éstas son del tipo de "catastrofes elementales". Topológicamente hablando, decir diferenciación o "catastrofe elemental" es algo equiparable.

Cuando las alteraciones son relativamente drásticas, como en el caso del Enquistamiento (veanse apartados posteriores), el estado oscilatorio se abandona para entrar en el estado de quiescencia o dormancia. La dinámica de la estabilidad de éste tipo de estado es la que falta definir, o mejor dicho conocer. Cuando surge el Exquistamiento comienza de nuevo la oscilación.

El proceso elemental básico de cualquier diferenciación celular implica cierta desrepresión génica, por medio de sustancias "genotrópicas", que pueden estar originadas por algún otro locus genético. El cambio fenotípico de estado vegetativo a quiste es un cambio "decidido" por el mismo

fenotipo, estando las propiedades de éste determinadas ampliamente por el genotipo.

En el caso del Enquistamiento, una señal externa al sistema vivo induce de alguna forma a un "ligero" cambio fenotípico, "señal" que dispara la desrepresión génica, de toda la información concerniente a la formación de un quiste de resistencia. Estas interacciones epigenéticas implican cambios en la composición celular (diferenciación citoplásmica) y cambios en la bioforma o biogeometría del sistema (morfogénesis).

WADDINGTON (1970), señala que en sistemas vivos complejos, el proceso de diferenciación celular implica generalmente baterías-génicas, más bien que genes independientes, en el juego de la expresión de la información necesaria para la ejecución de la "catastrofe elemental".

En el ciclo E-G (Esporulación-Germinación) de bacterias, al conjunto génico implicado en la formación de la espora bacteriana, constituido por varios operones, se le llamó "esporulón" (BALASSA, 1971). De igual manera, al conjunto génico que proporciona la información para la construcción de un quiste de resistencia protozoico, le podemos llamar "enquistón" (= unidad génica de enquistamiento).

Estas baterías-génicas podrían presentar las tres siguientes propiedades básicas de actuación y relación, propiedades corroboradas por algunos hechos experimentales, en bacterias, y pocas evidencias en el caso de los protozoos, pero que nos puede servir de modelo/hipótesis base para el enfoque de la experimentación genética del Enquistamiento, éstas son:

- a)- Estar involucrados en la Esporulaci3n/Enquistamiento, pero inactivos durante el crecimiento vegetativo.
- b)- Estar secuencialmente activados y reprimidos durante la formaci3n de la espora/quiste.
- c)- Estar sometidos a interacciones pleiotr3picas unidireccionales.

La primera propiedad es muy l3gica, durante el estado vegetativo no se d3n en el citoplasma celular las macromol3culas que van a formar, por ejemplo; una de las capas qu3sticas. Existe, pu3s, una desrepresi3n de informaci3n en el Enquistamiento, informaci3n reprimida en el estado vegetativo.

La segunda propiedad; secuencialidad en la informaci3n utilizable, est3 apoyada (en el caso de la esporulaci3n), por 3lgunas conclusiones del trabajo gen3tico realizado. Durante la formaci3n de la espora existe una secuencia temporal de expresi3n g3nica que no est3 relacionada con su topologia o localizaci3n cromos3mica (BALASSA, 1971). Pues bi3n, en el Enquistamiento, a falta de estudios gen3ticos a3n por realizar, se d3 una verdadera secuencia morfol3gica, al igual que en la esporulaci3n, que muy bi3n podria venir sustentada por una secuenciaci3n g3nica, m3s o menos compleja.

La secuencia morfol3gica es paralela -y debido a- una s3ntesis "de novo" de prote3nas espec3ficas del Enquistamiento (veanse apartados posteriores).

Y sobre la tercera y 3ltima propiedad de 3sta hipot3tica unidad g3nica de acci3n, existen pruebas gen3ticas s3lo en bacterias (BALASSA, 1971), se supone que cada gen del complejo tiene efectos pleiotr3picos sobre todos los siguien-

tes, en el tiempo, pero no sobre los precedentes. Puede ser éste un modelo atractivo para el caso del Enquistamiento, aunque no existe evidencia genética alguna para su aplicación.

Otra característica (WADDINGTON, 1970), que presenta la diferenciación celular es que ésta puede desarrollarse en tres fases:

- Adquisición o Competencia.
- Determinación.
- y - Activación.

Las dos primeras se desarrollan a nivel génico; una célula es o no "competente" para formar quistes de resistencia, si posee o no la batería-génica que proporciona la información. Una célula está "determinada" para el enquistamiento, cuando una región de la unidad génica de enquistamiento (enquistón) se destaca funcionalmente sobre el resto, y encabeza la futura historia secuencial. Y la tercera y última, implica interacción genoma-citoplasma, y no es más que la expresión proteica de éstas baterías-génicas.

En resumen; el Enquistamiento puede ser concebido como un atractivo modelo eucariota primitivo de estudio de la diferenciación celular. En los siguientes apartados se irán desglosando diferentes aspectos a distintos niveles que apoyan lo sugerido anteriormente y muestran un amplio campo de exploración aún por comenzar o alcanzar la cota de conocimiento suficiente como para construir un modelo generalizado.

6.2. *Inductores exógenos de Enquistamiento.*

Los factores exógenos inductores o desencadenantes del Enquistamiento son muy variados. Se han descrito como inductores los siguientes:

- Ausencia de alimento.
- Abundancia de alimento.
- Acumulación de productos de deshecho.
- Densidad celular.
- Desecación del medio.
- Cambios en el pH.
- Cambios osmóticos/concentración iónica.
- Cambios de temperatura.
- Deficiencia de Oxígeno.
- Deficiencias nutricionales específicas.

Analizando la bibliografía existente sobre los inductores del Enquistamiento, hemos elaborado la Tabla-VII, en la que se recoge el total (%) de protozoos que responden a los diez tipos inductores, antes descritos. La muestra analizada tiene un tamaño de 61. De este recuento se han de destacar dos puntos:

- a)- Existen muchos factores físicos y/o químicos que desencadenan o inducen un mismo fenómeno de diferenciación celular; el Enquistamiento.
- y b)- El factor "ausencia de alimento" es el más universal o generalizado entre los protozoos.

En la Tabla-VIII, se muestran qué especies de protozoos responden a los distintos inductores anteriormente nombrados. Hay protozoos que responden indistintamente a dos

TABLA-VII. *Inductores de Enquistamiento y porcentaje de protozoos que son inducidos.*

<u>FACTORES</u>	<u>PROTOZOOS DESCRITOS (%)</u>
Ausencia de alimento (1)	36
Cambios de temperatura (2)	11,4
Acumulación de desechos (3)	9,8
Cambios osmóticos (4)	8,1
Abundancia de alimento (5)	6,5
Densidad celular (6)	6,5
Cambios de pH (7)	6,5
Deficiencias nutricionales específicas(8)	6,5
Dsecación del medio (9)	4,9
Deficiencia de Oxigeno (10)	3,2

TABLA-VIII. *Relación de protozoos que son afectados por los diferentes inductores.*

Inductor-Ausencia de alimento

<u>PROTOZOO</u>	<u>REFERENCIA</u>
<i>Amebas (en general)</i>	GRIFFITHS (1970).
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	WEISMAN (1976).
<i>Didinium nasutum</i>	BEERS (1928, 1930); HOLT (1930).
<i>Stylonychia pustulata</i>	EHRBG & FERMOR (1913).
<i>Woodruffia metabólica</i>	JOHNSON & EVANS (1939).
<i>Podophrya collini</i>	ROOT (1914).
<i>Spathidium</i>	MOORE (1924).
<i>Colpoda sp.</i>	KIDDER & STUART (1939).
<i>Gastrostyla steinii</i>	WALKER et al, (1980).
<i>Pleurotricha lanceolata</i>	PENN (1935).
<i>Colpoda steinii</i>	TAYLOR & STRICKLAND (1938).
<i>Euplotes muscicola</i>	FAURE-FREMIET et al, (1954).
<i>Laurentiella acuminata</i>	GUTIERREZ et al, (1981).
<i>Blepharisma americanum</i>	GIESE (1973).
<i>Urostyla sp.</i>	PIGON (1961).
<i>Stylonychia mytilus</i>	WALKER et al, (1975).
<i>Diophrys scutum</i>	WALKER & MAUGEL (1980).
<i>Pleurotricha sp.</i>	MATSUSAKA (1976).
<i>Oxytricha fallax</i>	GRIMES (1973).
<i>Oxytricha bifaria</i>	KAY (1945).
<i>Tetrahymena rostrata</i>	McARDLE et al, (1980).

Inductor-Abundancia de alimento.

<i>Vahlkampfia calkensi</i>	HOGUE (1915).
<i>Vampyrella elegans</i>	KEDNER (1924).
<i>Blepharisma undulans</i>	STOLTE (1924).
<i>Polytomella citri</i>	KATER & BURROUGHS (1926).

TABLA-VIII. (continuación).

Inductor-Acumulación de desechos.

<i>Amebas (en general)</i>	GRIFFITHS (1970).
<i>Didinium nasutum</i>	BEERS (1930, 1947).
<i>Tillina magna</i>	McINTYRE (1949).
<i>Pleurotricha lanceolata</i>	PENN (1935).
<i>Dileptus anser</i>	JONES (1951).
<i>Blepharisma americanum</i>	GIESE (1973).

Inductor-Densidad celular.

<i>Amebas (en general)</i>	GRIFFITHS (1970).
<i>Naegleria gruberi</i>	CHIOVETTI (1976).
<i>Dileptus anser</i>	JONES (1951).
<i>Colpoda cucullus</i>	BARKER & TAYLOR (1931).
<i>Colpoda steinii</i>	STRICKLAND (1940).

Inductor-Desecación del medio.

<i>Amebas (en general)</i>	GRIFFITHS (1970).
<i>Stylonethes sterkii</i>	GARNJOBST (1937).
<i>Euplotes taylori</i>	GARNJOBST (1937).
<i>Tetrahymena rostrata</i>	McARDLE et al, (1980).

Inductor-Cambios de pH.

<i>Amebas (en general)</i>	GRIFFITHS (1970).
<i>Prostostelium microphaga</i>	KAHN & TAYLOR (1969).
<i>Colpoda steinii</i>	DARBY (1929).
<i>Colpoda cucullus</i>	DARBY (1929).
<i>Blepharisma americanum</i>	GIESE (1973).

TABLA-VIII. (continuación).

Inductor- Cambios osmóticos.

<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	LASMAN & SHAFRAN (1978).
<i>Gyrodinium</i>	BURSA (1961).
<i>Gonyaulax</i>	BURSA (1961).
<i>Prostostelium mycophaga</i>	KAHN & TAYLOR (1969).
<i>Blepharisma sp.</i>	McLOUGHLIN (1955).

Inductor-Cambios de temperatura.

<i>Blepharisma americanum</i>	GIESE (1973).
<i>Stylonychia curvata</i>	GIESE (1951).
<i>Urostyla</i>	PIGON (1961).
<i>Gonyaulax</i>	BURSA (1961).
<i>Gastrostyla steinii</i>	HASHIMOTO (1963).
<i>Woodruffia metabolica</i>	HASHIMOTO (1963).
<i>Laurentiella acuminata</i>	GUTIERREZ et al, (1981).

Inductor-Deficiencia de Oxígeno.

<i>Amebas (en general)</i>	GRIFFITHS (1970).
<i>Tillina magna</i>	BRIDGMAN (1948).
<i>Vahlkamphia calkensi</i>	HOGUE (1915).

Inductor-Deficiencias nutricionales específicas.

<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	LASMAN & SHAFRAN (1978).
<i>Hartmannella culbertsoni</i>	RAIZADA & MURTI (1972).
<i>Dictyostelium mucoroides</i>	FILOSA (1979).
<i>Colpoda duodenaria</i>	GARNJOBST et al, (1943).

o más de éstos inductores exógenos de Enquistamiento (Tabla-IX). La mayoría de éstos responden tanto a la ausencia de alimento como a los cambios de temperatura, que son los factores, que por otra parte, más aparecen como factores inductores de Enquistamiento (Tabla-VII). En la totalidad de los estudios que se presentan, no existe ninguno que observe diferencias cuantificadas acerca de cual o cuales de estos factores son "mejores inductores". En el caso de *Colpoda* (Tabla-IX), hay cuatro factores diferentes que pueden inducir enquistamiento en éste ciliado, *Blepharisma* responde a seis de los diez descritos, así mismo en Amebas, en general, también se ha observado que seis de éstos factores pueden inducir enquistamiento.

Los diez tipos de inductores de Enquistamiento están relacionados o interconectados, de manera que uno de ellos puede llevar consigo la aparición en el medio físico de otro u otros deferentes. (Fig. 11). Así, la desecación del medio lleva consigo; cambios osmóticos y de pH, incremento de densidad celular y acumulación de productos de deshecho. Y aún no podemos afirmar cual de éstos factores es el desencadenante real del Enquistamiento, si existe uno específico (caracter monofactorial) o es la acción conjunta de varios de ellos (caracter multifactorial).

Otro problema aún por resolver es el mecanismo molecular de la inducción celular, se podría pensar en un modelo consistente en tres pasos:

TABLA-IX. *Tipos de inductores que inducen a un mismo protozoo.*

PROTOZOO	INDUCTORES*
<i>Amebas (en general)</i>	(1) (3) (6) (7) (8) (10)
<i>Acanthamoeba</i>	(1) (4) (8)
<i>Didinium nasutum</i>	(1) (3)
<i>Stylonychia</i>	(1) (2)
<i>Woodruffia metabolica</i>	(1) (2)
<i>Colpoda</i>	(1) (6) (7) (8)
<i>Gastrostyla steinii</i>	(1) (2)
<i>Pleurotricha lanceolata</i>	(1) (3)
<i>Euplotes</i>	(1) (9)
<i>Laurentiella acuminata</i>	(1) (2)
<i>Blepharisma</i>	(1) (2) (3) (4) (5) (7)
<i>Urostyla</i>	(1) (2)
<i>Tetrahymena rostrata</i>	(1) (9)

(*): consultar tabla-VII.

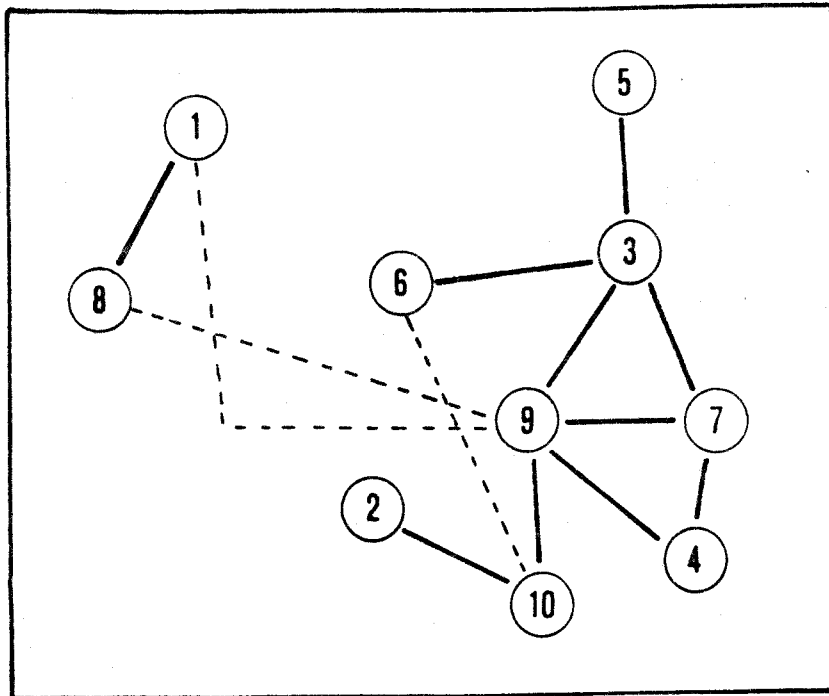


Fig. 11. Esquema representativo de las posibles interconexiones entre los diferentes tipos de inductores del enquistamiento. (1-10): consultar Tabla-VII. (—): conexión estrecha. (---): conexión débil.

- a)- El factor exógeno desencadenante podría influir a nivel pelicular (¿receptores?).
- b)- El cual desencadenaría la producción de un intermedio citoplásmico, que sería el desrepressor de lo que anteriormente llamamos el Enquistón.
- y c)- Expresión y biosíntesis de elementos celulares de Enquistamiento.

Podríamos construir otros modelos/hipótesis en torno a un sólo factor inductor, por ejemplo; la falta de alimento. En éste caso, la señal celular desencadenante del Enquistamiento podría ser la existencia de un umbral de vacuolas alimenticias en el individuo no alimentado.

Estudios que realicen una cuantificación o análisis de factores inductores, controlados experimentalmente, ya hemos indicado que son extremadamente escasos, y los existentes se ciñen al grupo de las amebas, esencialmente.

Es de destacar, sin embargo, el trabajo realizado por BUTZEL & BOLTEN (1968) sobre la relación del estado nutricional de *Didinium nasutum* con su crecimiento y enquistamiento, utilizando como organismo-presa *Paramecium aurelia*. Estos autores comprobaron que era necesario un cierto nivel de estado nutricional en *Didinium nasutum* para poder enquistarse, equivalente a dos presas ingeridas. Las células desprovistas totalmente de material ingerido fueron incapaces de enquistarse. Se estableció que un número de presas ingeridas insuficiente para provocar una sólo división celular era igualmente insuficiente para el enquistamiento. También se comprobó que el acinamiento celular no era un requisito necesario para inducir enquistamiento en éste ciliado.

En *Acanthamoeba palestinensis* (LASMAN & SHAFRAN, 1978) se ha hecho un registro de algunos inductores de enquistamiento. El efecto de la presión osmótica fué estudiada con soluciones de Cl_2Mg a diferentes concentraciones, alcanzandose un máximo de enquistamiento en el rango entre 0,05 y 0,08 M de Cl_2Mg . Concentraciones superiores originan una rápida lisis celular. Esta presión osmótica óptima para el enquistamiento, no difiere significativamente de aquella para el medio de crecimiento (0,168 osmolar).

Sobre el efecto de diferentes cationes y aniones en *A. palestinensis*, los autores concluyen que el ClNa , ClK y Cl_2Mg dan los mismos resultados (90% de enquistamiento). El Cl_2Ca produce un menor porcentaje de quistes (80%), y el ClNH_4 muy bajo (20%). Siendo el anión más efectivo el cloruro.

En cuanto al efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, sólo la sacarosa y la glicina inducen un 90% de enquistamiento en *A. palestinensis*. La función específica de los diferentes cationes no está clara, se ha supuesto que originan una adecuada tonicidad, afectando la superficie de la ameba y su permeabilidad.

También, en el género *Acanthamoeba* (BYERS et al, 1980), se ha establecido que la proporción de enquistamiento varia con la densidad celular. Los enquistamientos más rápidos ocurren en poblaciones con densidad inicial de 400-800 amebas/ mm^2 . Por otro lado, la falta de glucosa o de acetato inducen enquistamiento, y son necesarios, no se sabe si ambos, para el exquistamiento.

A modo de resumen de lo expuesto, podemos establecer una serie de puntos y/o cuestiones a plantear:

- 1.- Se hace necesario un estudio serio, con diseño experimental adecuado cuantificable, en lo referente a inductores de enquistamiento en Ciliados.
- 2.- La información existente utilizable es escasa y contradictoria, con lo cual también es necesario una revisión-experimental de dichos datos sobre los organismos de mayor interés.
- 3.- Como se ha dicho anteriormente, un mismo protozoo puede ser inducido a enquistar por varios factores diferentes, estos factores pueden estar interconectados entre sí. ¿Cuál de ellos es el real, el definitivo? ¿Cuál de ellos es el más efectivo en un ambiente natural?.
- 4.- Se desconoce absolutamente todo acerca del mecanismo de recepción celular de la señal exógena inductora de enquistamiento. Si se encuentra a nivel pelicular, ¿existen receptores para dichas señales?, ¿cómo se traduce esa señal exógena en otra endógena citoplásmica, desrepresora de la información génica desencadenante del enquistamiento?.

6.3. *Fenómenos celulares durante el Enquistamiento.*

Durante el enquistamiento, en general, existen profundos cambios celulares a diferentes niveles estructurales. El grado de reorganización estructural en un organismo enquistándose suele depender de la complejidad morfológica de la forma vegetativa.

Uno de los cambios más fácilmente observables que se producen, son las reducciones en el volumen celular y la

adopción de la forma esférica, como bioforma definitiva del estado resistente. Encontramos en la bibliografía muy pocos datos de ésta disminución del volumen celular y su cuantificación. En *Colpoda steinii* (MARSHALL & TIBBS, 1970) hay una pérdida aproximada de un 60%, en *Laurentiella acuminata* (GUTIERREZ et al, 1981) es de un 70% y en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) de un 85 al 93%. Por el contrario, en *Diophrys scutum* (WALKER et al, 1980) no se aprecia disminución significativa de volumen, manteniéndose una razón volumen-quiste/volumen-célula vegetativa de 1:1. Esta pérdida de volumen se puede atribuir a la considerable deshidratación que sufre la célula durante éste proceso.

6.3.1. Estructuras corticales.

Aquellos protozoos que presentan estructuras corticales (flagelos, cilios, cirros), experimentan la más llamada desdiferenciación o pérdida de éstos elementos a lo largo del enquistamiento. Esta pérdida o reabsorción cortical puede ser total o parcial y atendiendo a esto, MAUGEL y WALKER (1976), establecen dos grandes grupos para los protozoos ciliados; el grupo-KR (Kinetosome-resorbing) y el grupo-NKR (Non-kinetosome-resorbing).

En la Tabla-X se especifican los ciliados estudiados en ambos grupos, un total de doce para el grupo-KR y cinco para el grupo-NKR. Los ciliados que pertenecen a cada uno de estos dos grupos establecidos son también coincidentes en otras características de enquistamiento, por lo que éstos dos grupos pueden tener cierta correspondencia con grupos naturales.

TABLA-X. Ciliados que pertenecen al grupo-KR y al grupo-NKR.

<u>GRUPO-KR</u>	<u>REFERENCIA</u>	<u>GRUPO-NKR</u>	<u>REFERENCIA</u>
<i>Porodon</i>	TANNREUTHER (1926)	<i>Colpoda steinii</i>	TIBBS (1968)
<i>Vorticella microstoma</i>	von BRAND (1923)	<i>Dileptus risseheri</i>	KINK (1973)
<i>Blepharisma stoltei</i>	REPAK (1968)	<i>Euplotes muscicola</i>	FAURE-FREMIET et al(198
<i>Laurentiella acuminata</i>	GUTIERREZ et al(1981)	<i>Diophrys scutum</i>	WALKER et al,(1980)
<i>Gastrostyla steinii</i>	WALKER et al,(1980)	<i>Nyctotherus sp.</i>	VILLENEUVE-BRACHON (194
<i>Oxytricha fallax</i>	GRIMES (1973)		
<i>Oxytricha bifaria</i>	KAY (1945)		
<i>Pleurotricha sp.</i>	MATSUSAKA (1976)		
<i>Didinium nasutum</i>	HOLT & CHAPMAN (1971)		
<i>Stylonethes sterkii</i>	GARNJOBST (1937)		
<i>Stylonychia mytilus</i>	WALKER et al, (1975)		
<i>Chilodonella uncinata</i>	IVANIC (1928)		

6.3.2. Cambios mitocondriales.

Uno de los orgánulos celulares que mayores alteraciones estructurales experimenta a lo largo del enquistamiento son las mitocondrias.

En amebas, las más estudiadas en éste aspecto han sido; *Acanthamoeba*, *Schizopyrenus* y *Naegleria sp.* (GRIFFITHS, 1970), en la última las mitocondrias se elongan como si se tratase de una división mitocondrial. En *Schizopyrenus* y *Acanthamoeba* se hacen más pequeñas y esféricas, las inclusiones cristalinas aparecen menos definidas.

En cuanto a los Ciliados se refiere, se dá un fenómeno común en todos los casos descritos; el empaquetamiento mitocondrial. Este empaquetamiento implica la reunión de una gran cantidad de mitocondrias en una misma zona citoplásmica. No suele existir fusión de las membranas mitocondriales vecinas, conservando en un mismo recinto la individualidad estructural. Estos paquetes mitocondriales, generalmente no más de dos por célula quística, conservan a los elementos mitocondriales en un estado de funcionamiento mínimo o tal vez nulo. No se conoce con precisión el mecanismo por el cual se forman estos paquetes mitocondriales, ni tampoco cómo surgen las mitocondrias individuales durante el exquistamiento. También existe cierta degeneración o degradación mitocondrial, con la aparición de estructuras atípicas. En la Tabla- XI se muestran los casos descritos en ciliados cuyas mitocondrias sufren empaquetamiento.

6.3.3. Cambios nucleares.

Como en la mayoría de los procesos de diferenciación

TABLA-XI. *Ciliados que presentan empaquetamiento mitocondrial.*

<u>CILIADO</u>	<u>REFERENCIA</u>
<i>Colpoda steinii</i>	TIBBS (1968)
<i>Gastrostyla steinii</i>	WALKER et al, (1980)
<i>Pleurotricha</i> sp.	MATSUSAKA (1976)
<i>Oxytricha fallax</i>	GRIMES (1973)
<i>Stylonychia mytilus</i>	WALKER et al, (1975)

celular, el núcleo sufre una drástica reorganización estructural, unas veces visible o detectable por microscopía óptica (M0) y otras sólo por ME.

En lo referente a las amebas, ambos; núcleo y nucleolos decrecen en volumen (GRIFFITHS, 1970). El núcleo de *Acanthamoeba* sp. forma yemas que no parecen contener material nucleolar, y muchas de éstas yemas son degradadas por autolisosomas. Un trabajo más reciente (TOMLINSON, 1981), muestra que en esta ameba durante el estado prequístico aparecen grandes cuerpos intranucleares, que no son observados en los vegetativos ni en los quistes maduros. Pierden, igualmente, masas nucleolares que presentan una distribución difusa en contraste con el nucleolo esférico y simple que aparece antes del enquistamiento.

En los Ciliados, estos cambios se pueden dar tanto en el Macronúcleo como en el Micronúcleo. Siendo los más llamativos los que afectan al Macronúcleo. Muchos ciliados tienen varias masas macronucleares en su citoplasma y, generalmente, durante el enquistamiento estas masas fusionan originando una única masa macronuclear quística, existiendo así una considerable disminución del volumen que ocupan los elementos macronucleares en el citoplasma de la célula vegetativa. Esta fusión representa una considerable condensación cromatínica, siendo el estado inactivo del ADN-macronuclear quístico. Posiblemente, los efectos mutagénicos de la desecación, estudiados en bacterias por WEBB (1967), se ven minimizados por el efecto de la condensación cromatínica. Así, en *Gastrostyla steinii* (GUTIERREZ & PEREZ-SILVA, 1981), existe un gran paralelismo entre la pérdida de volumen-citoplásmico durante el enquistamiento (87,3%) y la que sufren las cuatro masas macronucleares que presenta éste ciliado en estado vegetativo (80%). Es decir,

hay una relación directa entre ambas érdidas de volumen. El grado de condensación cromatínica ha sido también medido en éste ciliado hipotrico (GUTIERREZ & PEREZ-SILVA, 1981), por microespectrofotometria, usando el método del Bando-C, las absorbancias referidas al volumen nuclear indican que la condensación cromatínica en el macronucleo quístico es doble a aquella obtenida para una sólo masa macronuclear vegetativa.

La fusión de masas macronucleares también se produce en otros acontecimientos celulares, como la división celular o la llamada "paraconjugación" (BANCHETTI et al, 1980). Algunos autores han observado una "banda de fusión" en estos nucleos fusionandose, concretamente en *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973) y en *Oxytricha hymenostoma* (BANCHETTI et al, 1980), pero aún no está nada claro la existencia y función de la misma. Nosotros hemos observado por ME en repetidas ocasiones macronucleos fusionandose en *Gastrostyla steinii* pero nunca hemos apreciado estas bandas, sólo fusión de membranas nucleares y mezcla cromatínica. Tampoco está claro aún el mecanismo por el cual varias masas macronucleares se fusionan en una sola, se ha observado en macronucleos de células enquistandose numerosos microtúbulos en las zonas de fusión, se piensa por consiguiente que los microtúbulos insertos tanto en la envuelta como en la cromatina puedan producir la fuerza necesaria para la condensación cromatínica.

En la Tabla-XII, se muestran aquellos ciliados (todos son ciliados hipotricos del grupo-KR) estudiados en los que se dá fusión macronuclear durante el enquistamiento. No en todos los ciliados se dá fusión macronuclear, ya que en aquellos que sólo poseen un macronucleo, únicamente se dá una mayor condensación cromatínica, como en el caso de *Blepharisma*

TABLA-XII. *Ciliados que presentan
fusión macronuclear.*

CILIADO	REFERENCIA
<i>Stylonychia mytilus</i>	WALKER et al, (1975)
<i>Stylonychia pustulata</i>	FERMOR (1913)
<i>Gastrostyla steinii</i>	WALKER et al, (1980)
<i>Pleurotricha sp.</i>	MATSUSAKA (1976)
<i>Oxytricha fallax</i>	GRIMES (1973)

(GIESE, 1973). Otros, aunque presentando más de una masa macronuclear no fusionan, como *Diophrys scutum* (WALKER & MAUGEL, 1980). Hay otros que aparentemente permanecen invariables como el de *Stylonethes sterkii* (GARNJOBST, 1937) y *Colpoda steinii* (TIBBS, 1968). Siendo aún menos comun el caso de degeneración macronuclear y neoformación, durante el exquistamiento, a partir de un micronucleo, como se ha descrito en *Pleurotricha lanceolata* (MANWELL, 1928) y *Uroleptus movilis* (CALKINS, 1941). En estos últimos casos, al igual que la autogamia, que se dá en los quistes de resistencia de *Tetrahymena rostrata* (CORLISS, 1973), los macronucleos de los nuevos vegetativos exquistados pueden presentar un fenotipo diferente si se expresa información genética que antes estaba reprimida en el componente micronuclear.

Sobre nucleolos, existen ciertas observaciones al ME en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) y en *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973), que indican que estos componentes macronucleares se hacen más pequeños y esféricos.

En cuanto al micronucleo, no se aprecian demasiados cambios. Nunca se dá fusión micronuclear, pero se puede dar degeneración de algunos micronucleos, como en los ciliados hipotricos *Laurentiella acuminata* (GUTIERREZ et al, 1981) y *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973). Estos micronucleos se res- tituyen durante el exquistamiento debido a mitosis que sufren aquellos micronucleos no desaparecidos. A veces, el micronucleo se rodea de varias membranas, como en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) y *Stylonychia mytilus* (WALKER et al, 1975).

6.3.4. Ribosomas.

Como se especificará más adelante, el enquistamiento es un proceso dependiente de síntesis proteica. Podemos suponer, por consiguiente, que el citoplasma de la célula prequística ha de contener numeroso material ribosomal o ser rico en RER. En *Histriculus* sp. (MATSUSAKA, 1979), *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973) y en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) se ha observado por ME, durante las primeras etapas del enquistamiento, un citoplasma rico en ribosomas en estado polisomal. Cambiando del estado polisomal al monosomal al tratarlos con Cicloheximida, durante el enquistamiento (MATSUSAKA, 1979).

En *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973), *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) y *Stylonychia mytilus* (WALKER et al, 1975), aparecen complejos ribosomales en estructura paracristalina, debido seguramente a la gran deshidratación que sufre el citoplasma.

6.3.5. Vacuolas y Lisosomas.

Durante el enquistamiento, al igual que en el exquistamiento, existe una gran actividad de la vacuola contráctil. Esta actividad vacuolar se mantiene hasta alcanzada la forma esférica, una de las últimas etapas del enquistamiento, como se muestra en el caso de *Histriculus* (MATSUSAKA, 1979). Por el contrario, las vacuolas digestivas suelen desaparecer, tanto en amebas (GRIFFITHS, 1970) como en ciliados.

Los autores coinciden en la existencia de una muy importante actividad lisosomal, durante el enquistamiento, tanto en amebas como en ciliados. En los primeros los llamados autolisosomas aparecen y persisten durante todo el enquistamiento, conteniendo diversos orgánulos celulares. A veces, migran hacia la superficie donde descargan sus contenidos que son atrapados en la pared quística (GRIFFITHS, 1970). En los ciliados, esta actividad ya se aprecia en las primeras etapas del enquistamiento, como se ha descrito en *Histriculus* (MATSUSAKA, 1979). Se han observado dichos autolisosomas además en los siguientes ciliados: *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976), *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973) y *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980). Como en las amebas, el contenido de éstos orgánulos es muy variado; material membranoso, ribosomas, ocasionalmente mitocondrias y otros orgánulos citoplásmicos.

6.3.6. Inclusiones.

Al ser la deficiencia nutricional uno de los factores más universales no sólo del enquistamiento (Tabla-VII), sino de otros procesos de diferenciación como la conjugación (MAUPAS, 1888), el organismo así se comporta como un "sistema cerrado" (WRIGHT, 1967), dependiendo completamente sólo de materiales endógenos para todas las reacciones catabólicas y anabólicas necesarias para la supervivencia y morfogénesis. Una consecuencia de ello es la lisis de materiales macromoleculares de reserva.

Durante el enquistamiento, existe por una parte síntesis de nuevas macromoléculas que forman la pared del quiste, y por otra el mantenimiento de un metabolismo mínimo pero necesario para la subsistencia. Por lo que la eficiente utilización de las reservas macromoleculares, a falta de nuevo aporte exógeno, hace que se realice con éxito el proceso autosuficiente del enquistamiento.

Existe una clara correlación entre la cantidad de material de reserva acumulado por un microorganismo y su capacidad para la supervivencia durante la época de hambre. La experiencia cotidiana de laboratorio nos indica que poblaciones bien alimentadas, al inducirles a enquistar alcanzan una alta eficiencia de enquistamiento, mientras que poblaciones originalmente poco alimentadas la eficiencia a enquistar disminuye. Se puede pensar en la necesidad de un umbral de reserva endógena para el buen funcionamiento del proceso.

En amebas (GRIFFITHS, 1970), las reservas de glucógeno de la forma vegetativa comienzan a decrecer durante el enquistamiento. Las amebas parásitas, sin embargo, forman una o más masas de glucógeno que ocupan volúmenes sustanciales en el quiste. *Acanthamoeba sp.* tiene gotas lipídicas que ocupan una considerable fracción del volumen quístico.

El material acumulado en el estado quiste ha de servir para alcanzar, de nuevo, las cotas metabólicas de la forma vegetativa durante el exquistamiento.

Tanto en ciliados enquistándose como en sus quistes se han observado inclusiones y/o elementos de reserva, que en cuanto a su composición bioquímica pocas veces han sido bien identificados. Así, en *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973)

se describen conjuntos de gránulos semejantes al almidón. En *Diophrys scutum* (WALKER & MAUGEL, 1980) aparecen, en etapas tempranas del enquistamiento conjuntos de material parecido al glucógeno. Ocurre algo semejante en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) y en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980).

El origen, función y naturaleza de estos materiales de reserva, en protozoos enquistándose y quistes de resistencia, están poco estudiados.

6.4. *El enquistamiento como proceso degenerativo.*

Como ya se ha descrito anteriormente, el proceso de enquistamiento se caracteriza por una serie de procesos degenerativos (perdida de estructuras corticales, perdida de actividad vacuolar alimenticia, aparición de autolisosomas). Estos procesos degradativos son importantes tanto en fenómenos de morfogénesis normal (HURLEY, 1978), como en la muerte celular masiva.

A la célula se le puede atribuir la capacidad de un cierto control en los procesos degradativos, si estos procesos degradativos no son regulados por la célula que los experimenta sobreviene la muerte celular. Una vez inducido un proceso de diferenciación/morfogénesis celular, como el enquistamiento, aparecen unos procesos degenerativos que pueden o no estar controlados por la célula, en el primer caso tenemos un enquistamiento normal que culmina en la formación del quiste de resistencia, en el segundo caso sobreviene la muerte celular (Fig. 12).

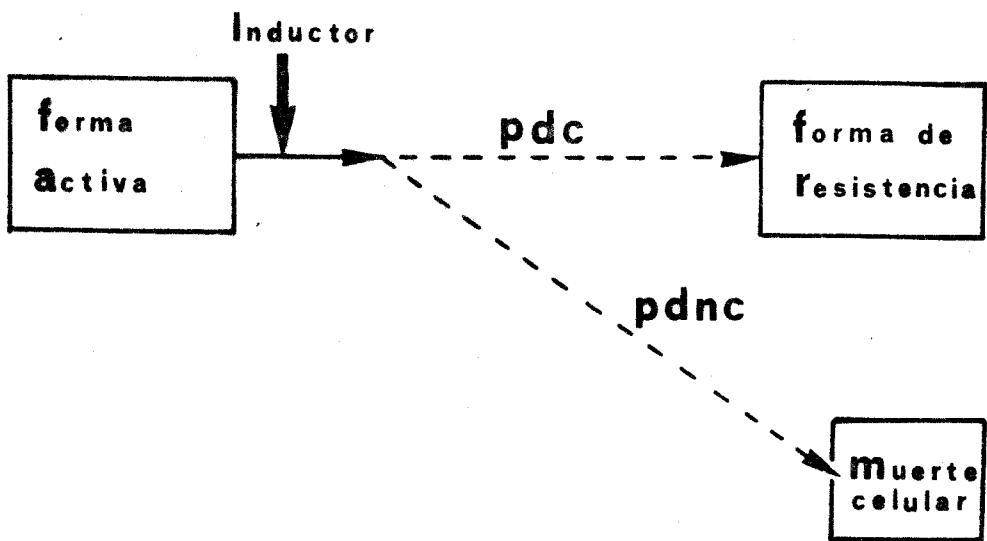


Fig. 12. Esquema del enquistamiento como proceso degenerativo. pdc: procesos degenerativos controlados; pdnc: procesos degenerativos no controlados.

6.5. *Actividades metabólicas durante el Enquistamiento.*

El estudio de las actividades metabólicas durante el enquistamiento en protozoos se ha abordado por dos vías distintas; la utilización de inhibidores metabólicos específicos, que puedan indicar la necesidad de una determinada actividad en dicho proceso de diferenciación, y el uso de técnicas bioquímicas que determinen actividades enzimáticas o que detecten y cuantifiquen los cambios de ciertas macromoléculas.

Estos estudios no están equivalentemente repartidos entre los distintos grandes grupos de protozoos, existiendo una considerable desproporción entre los realizados en el grupo de las Amebas y los del grupo de los Ciliados. La razón de esta diferencia es obvia si pensamos que muchas amebas que se enquistan se pueden cultivar axénicamente a diferencia de la mayoría de los ciliados enquistables, que no presentan esta facilidad de cultivo y análisis bioquímico correspondiente.

Los cambios metabólicos que sufre la célula en el enquistamiento están en buena parte motivados por la deshidratación que experimenta el citoplasma, coloide hidrófilo molecular o plasmagel (BUVAT, 1969), que pasa a plasmagel (de consistencia más sólida) cuando pierde el "agua-libre", conservándose en el criptobiótico o de dormancia la denominada "agua-ligada" (BENEZECH, 1973). El mecanismo por el cual se produce esta deshidratación no está bien conocido. Muchas veces, sin que exista una desecación del medio que le rodea, se consigue el mismo nivel de deshidratación intracelular que se alcanza cuando existe hipertomía extracelular debida a la desecación.

Atendiendo a la naturaleza de las macromoléculas estudiadas durante el enquistamiento, y la relevancia de determinados procesos, dividiremos la exposición de este tema en los siguientes apartados: Ácidos nucleicos, Proteínas, Hidratos de carbono, Actividades enzimáticas y Cambios en el metabolismo respiratorio y bioenergético.

6.5.1. *Ácidos Nucleicos.*

6.5.1.1. *ADN.*

Una primera aproximación para saber si existe síntesis de ADN durante el enquistamiento y su relevancia en el desarrollo del mismo, se alcanza con la utilización de inhibidores de dicha síntesis.

En todos los casos descritos, tanto en amebas (WEISMAN, 1976) como en ciliados (GUTIERREZ & TORRES, 1979), inhibidores de síntesis de ADN tales como la Hidroxiurea (HU) o la 5-fluorodesoxiuridina (FUdR) no bloquean o impiden el enquistamiento, sólo alteran la cinética del proceso. Al no tratarse de quistes de división, no es necesaria duplicación alguna de la carga génica, siendo por tanto razonables los resultados encontrados por los distintos autores en lo concerniente a quistes de resistencia.

Por el contrario, parece ser que existe cierta pérdida de ADN. Así, se ha descrito en amebas (KRISHNA, 1971), más concretamente en *Acanthamoeba castellanii*, que se da una disminución del orden del 25-30% del ADN total, durante el enquistamiento, aunque se cree (BYERS, 1979) que se debe principalmente a degradación de ADN mitocondrial. En el ciliado *Colpoda cucullus*, tras estudios citofotométricos,

detecta una despoliploidización, via cuerpos de extrusión, en el ADN macronuclear de este ciliado durante su enquistamiento.

6.5.1.2. *ARN*.

Algo muy diferente ocurre con el metabolismo del ARN durante el enquistamiento. Como ya se ha descrito anteriormente, el citoplasma prequístico es abundante en ribosomas en estado polisomal, que implica generalmente una síntesis de novo de ARN en sus diferentes modalidades.

Los mejores estudios efectuados sobre el metabolismo del ARN son los realizados en amebas (WEISMAN, 1976; GRIFFITHS, 1970; BYERS, 1979), de ellos extraemos los siguientes puntos:

a)- El enquistamiento es inhibido con Actinomicina D (AmD), lo que indica que algunas transcripciones son necesarias en dicho proceso.

b)- Existe, durante el enquistamiento, una pérdida neta de ARN celular.

y c)- Pocos nuevos tipos de ARN son sintetizados durante el enquistamiento, y algunos de los nuevos tipos no so al parecer necesarios para dicho proceso.

WRIGHT et al. (WEISMAN, 1976) han presentado datos por los cuales los controles transcripcionales y traduccionales no son las variables más críticas durante la diferenciación celular. Aunque se ha indicado que existe una pérdida neta de ARN celular durante el enquistamiento, experimentos de incorporación de Uridina-H³ revelan un incremento de actividad

total específica polimerasa de 1.5-2.0 veces durante un periodo de 5-10 h después de la inducción. Posteriormente, existe una disminución de un 60-70% de dicha actividad. El incremento de actividad polimerasa se debe esencialmente a la ARN polimerasa-II.

MATTAR & BYERS (WEISMAN, 1976) han estudiado la habilidad del citoplasma quístico y vegetativo para soportar síntesis proteica en un sistema libre de células, siendo el citoplasma quístico mucho menos eficiente que el vegetativo. Se han utilizado técnicas de hibridación ADN-ARN para estudiar la población de ARN en el enquistamiento, y los resultados indican que se fabrican muy pocos nuevos tipos de ARN y algunos de estos no son totalmente necesarios para la buena marcha del proceso.

En *Acanthamoeba* (BYERS, 1979), se encontraron tres seryl-ARNt en el estado vegetativo y sólo dos en células prequísticas. Es interesante que la diferencia más significativa fuera en seryl-ARNt, ya que la Serina puede ser uno de los aminoácidos más eficaces para la inducción del enquistamiento en esta ameba.

Con respecto a los ciliados, sólo podemos indicar que el enquistamiento de *Laurentiella acuminata*, ciliado hipotrico, se bloquea por la acción de la AmD (GUTIERREZ & TORRES, 1979), lo que indica la necesidad de alguna transcripción en dicho proceso.

6.5.2. Proteínas.

Es claro que el enquistamiento es un proceso dependiente de síntesis proteica, tanto en amebas como en

ciliados. Antibióticos como la Cicloheximida (CH) y el Cloranfenicol inhiben, en amebas, el proceso de enquistamiento, tanto en *Hartmanella castellanii* como *Hartmanella rhysodes* el enquistamiento es inhibido en un 70-80% por estos antibióticos.

Al igual que el ARN, respecto a las proteínas, existe una disminución neta de las mismas a lo largo del enquistamiento (KRISHNA, 1971; WEISMAN, 1976). A pesar de lo cual, se mantiene cierta síntesis proteica específica necesaria para dicho proceso. Así, la actina ameboide de *Acanthamoeba castellanii*, expresada en % de proteína total celular, se incrementa durante la inducción del enquistamiento (RUBIN et al, 1976).

Entre las nuevas síntesis aparecidas durante el enquistamiento, se puede indicar las siete nuevas proteínas de membrana plasmática que sintetizan antes de comenzar la formación de la pared quística en *Polysphondylium pallidum* (PHILIPPI & PARISH, 1981), o los cambios que experimentan las proteínas nucleares y nucleolares solubles en fenol, cuyo patrón electroforético en diferentes estados de crecimiento siempre presenta 50 bandas, mientras que al inicio del enquistamiento, 10 de estas bandas desaparecen y la intensidad de unas 19 se incrementaba o decrecía (WEISMAN, 1976). Estos cambios en las proteínas nucleares y nucleolares puede estar relacionados con cambios en el control de la expresión génica, así, algunas de las proteínas extraídas con fenol, pueden ser proteínas ácidas que intervienen en la síntesis nucleolar de ribosomas.

En lo referente a los ciliados, los inhibidores de biosíntesis proteica retrasan o bloquean el enquistamiento. En *Blepharisma americanum* (GIESE, 1973), la Puromicina lo bloquea y el Cloranfenicol lo prolonga. La CH bloquea el enquistamiento en el hipotrico *Laurentiella acuminata* (GUTIERREZ & TORRES, 1979), como también ocurre en *Histriculus* (MATSUSAKA, 1979). En éste último, se ha estudiado con más precisión el efecto de este inhibidor sobre dicho proceso, y parece ser que la síntesis proteica es esencial en los primeros estadios, posteriormente no parece influir. Los ribosomas, normalmente en estado polisomal durante las primeras etapas del enquistamiento, aparecen en estado monosomal al tratar las células con CH. Igualmente, la aparición y migración de precursores ectoquísticos parece depender de síntesis proteica (MATSUSAKA, 1979). Como ocurre en las amebas, el contenido proteico en los ciliados decrece durante el enquistamiento, la reducción alcanza un valor de un aproximadamente 30% en *Colpoda steinii* (TIBBS & MARSHALL, 1970).

6.5.3. Hidratos de Carbono.

Es conocida la función de determinados hidratos de carbono (glucógeno, almidón), como constituyentes de depósitos de material de reserva. Durante el enquistamiento, en amebas, el glucógeno es el hidrato de carbono más rápidamente degradable. En la fase inicial los niveles celulares de glucógeno decrecen 1/2 a 2/3 dentro de 4 h, y luego decrecen el 10-20% (WEISMAN, 1976).

Por otra parte, y debido a la naturaleza en buena parte glucídica de la pared quística, existe una muy activa síntesis de polisacaridos durante el enquistamiento. Al no existir ninguna información, sobre ciliados, referente a este tema, nos ceñiremos a las amebas. En éstas, se dá tanto síntesis de celulosa como de mucopolisacáridos durante el enquistamiento (KRISHNA, 1971; RAIZADA & KRISHNA, 1972). En *Acanthamoeba castellanii* (DESLAURIERS et al, 1980), la trehalosa parece ser el único azucar oligomérico presente en la forma enquistada, pudiendo servir como una reserva de carbohidratos y energia.

6.5.4. *Actividades Enzimáticas.*

Como ya se ha especificado anteriormente, durante el enquistamiento se dan intensos procesos degradativos, esencialmente debidos a la intervención de una gran variedad de enzimas lisosomales; α y β -glucosidasas, amilasas, β -galactosidasa, β -N-acetilglucosidasa, β -glucuronidasa, proteasas, fosfatasas, ribonucleasas y desoxirribonucleasas. Estos enzimas hidrolíticos se han encontrado tanto en amebas (WEISMAN, 1976; GRIFFITHS & BOWEN, 1969) como en ciliados (TIBBS & MARSHALL, 1970; PIGON, 1961).

Muy diferentes implicaciones metabólicas se han sugerido de los cambios experimentados durante el enquistamiento, en diversas actividades enzimáticas. En *Colpoda steinii* (TIBBS & MARSHALL, 1969), la succinato:fenacina metasulfonato oxidoreductasa decrece aproximadamente un 30% cuando este ciliado se enquista, indicando que no hay una degradación mitocondrial muy grande. En *Urostyla caudata*-

estirpe B, PIGON (1961), analiza diversas actividades enzimáticas; la amilasa y catalasa decrecen rápidamente al principio del enquistamiento, y más lentamente después. En un estado temprano del enquistamiento de este ciliado, hay un incremento de la actividad dipeptidasa y no de la aminoácido oxidasa, aunque ambas decrecen no de forma tan pronunciada como la amilasa y catalasa.

La actividad glucano sintetasa incrementa drásticamente durante el enquistamiento de la ameba *Polysphondylium pallidum* (PHILIPPI & PARISH, 1981). El incremento de esta actividad en el citoplasma precede al incremento en la membrana plasmática, ocurriendo un rápido transporte de dicha enzima a la membrana plasmática.

Otra actividad enzimática interesante detectada en amebas, *Acanthamoeba castellanii* estirpe-HR (SYKES & BAND, 1980), es la actividad lacasa, capaz de oxidar compuestos fenólicos. Su topografía celular se distribuye entre la parte más externa de la pared quística, el citoplasma prequístico y el medio externo en donde se produce el enquistamiento. Inhibidores de esta enzima inhibían también la formación de quistes, su función es desconocida aunque se supone que puede desempeñar algún papel en las propiedades de resistencia a la rotura por agentes químicos y mecánicos.

Es conocida, en amebas (BYERS, 1979), la existencia de un incremento en los niveles de AMPc celular en las primeras 6-8h del enquistamiento, decayendo luego hasta los niveles iniciales. La actividad de la AMPc-fosfodiesterasa no decae durante este incremento.

Se asocia este incremento del AMPc con la inducción del enquistamiento, ya que las bioaminas; epinefrina, 5-hidroxitriptamina, dopamina y tiramina se han usado para inducir enquistamiento en *Acanthamoeba culbertsoni*, y cada uno de estos agentes elevan la actividad adenil ciclase y los niveles de AMPc. Generalmente, el AMPc actúa vía protein-quinasa mediatizando la modificación de enzimas y proteínas, pudiendo influir en procesos transcripcionales, translacionales y postranslacionales, pero aún no se conoce la verdadera función del AMPc en el enquistamiento.

6.5.5. Cambios en el metabolismo respiratorio y bioenergético.

Como sucede en los casos anteriores, son más extensos e intensos los estudios realizados sobre amebas que sobre ciliados. En las primeras, existe un incremento inicial en el consumo de oxígeno que luego decrece gradualmente hasta un valor inmedible. Aunque en la formación del quiste se introduce paulatinamente un metabolismo anaeróbico, un metabolismo aeróbico previo es esencial para el mismo, así en *Hartmanella castellanii* (GRIFFITHS, 1970) el enquistamiento es inhibido por iodoacetato, arsenato y arsenito y en el ciliado *Blepharisma americanum* (GIESE, 1973) la acida sódica y el cianuro potásico, introducen un considerable retraso en el enquistamiento. En *Colpoda cucullus* (PIGON & EDSTROM, 1961), el 2,4-dinitrofenol inhibe la respiración en quistes estables (con menor metabolismo) e inestables (con mayor metabolismo), las amebas en presencia de este agente

se enquistan, pero pierden un 20% o más del peso seco de sus quistes. La inhibición por este inhibidor en *Hartmannella rhysodes* (GRIFFITHS, 1970) puede ser revertida por adición de acetato sódico o glucosa.

Mitocondrias aisladas de quistes de *Acanthamoeba rhysodes* (BYERS, 1979), presentan un cociente respiratorio más bajo sobre varios sustratos cuando se compara con las mitocondrias de células en fase de crecimiento logarítmico. Se establece que las mitocondrias quísticas disminuyen aproximadamente 30 veces su capacidad para usar NADH, mientras que la capacidad para usar succinato decrece sólo 2 veces.

6.5.6. *Resumen y Conclusiones.*

De todo lo expuesto anteriormente, se puede extraer los siguientes puntos, como características generales del metabolismo de la célula enquistándose:

- a)- El proceso de enquistamiento está ligado a una muy alta deshidratación celular, que implica la típica inactivación metabólica del estado criptobiótico.
- b)- El proceso de enquistamiento no es dependiente de síntesis de ADN, existiendo, por el contrario, cierta pérdida del mismo ligado a los procesos degradativos.
- c)- El enquistamiento es dependiente de ciertas síntesis de ARN y proteínas.
- d)- Durante el enquistamiento existe síntesis específica de hidratos de carbono, como constituyentes importantes de la pared quística.
- e)- Existe una pérdida de la capacidad respiratoria aeróbica de la célula, alcanzando en el estado quístico unos niveles anaeróbicos sino estrictos, bastante acusados.

y f)- En un balance global, los procesos catabólicos o líticos superan a los anabólicos o sintéticos, obteniéndose un balance neto degradativo, esencialmente debido a las actividades autofágicas celulares.

6.6. *Cinética del Enquistamiento.*

En todos los casos en que se ha podido estudiar la cinética del enquistamiento, tanto en amebas (RASTOGI et al, 1977; RUDICK, 1971) como en ciliados (MATSUSAKA, 1977), esta se presenta como una cinética de tipo sigmoide. Y como ocurre con otros muchos procesos biológicos, la forma sigmoide de la curva puede ser traducida a una distribución normal, así la frecuencia de enquistamiento puede ser normalmente distribuida sobre un tiempo medio.

Los dos parámetros más importantes que pueden caracterizar una curva de enquistamiento son; la media aritmética o tiempo medio de enquistamiento (tiempo en que se ha enquistado el 50%) y la desviación standard, que cualitativamente representa la sincronía de una población enquistándose.

En una curva sigmoide hipotética de enquistamiento (Fig. 13), podemos apreciar que siempre hay una fase, que puede ser más o menos amplia, antes de detectarse enquistamiento. Este periodo que podríamos llamar "mínimo tiempo prequistico necesario" (mtp) puede alargarse o acortarse por distintos métodos. La mayor o menor pendiente de la curva nos indica la mayor o menor sincronía del proceso, alcanzándose un "plateau"

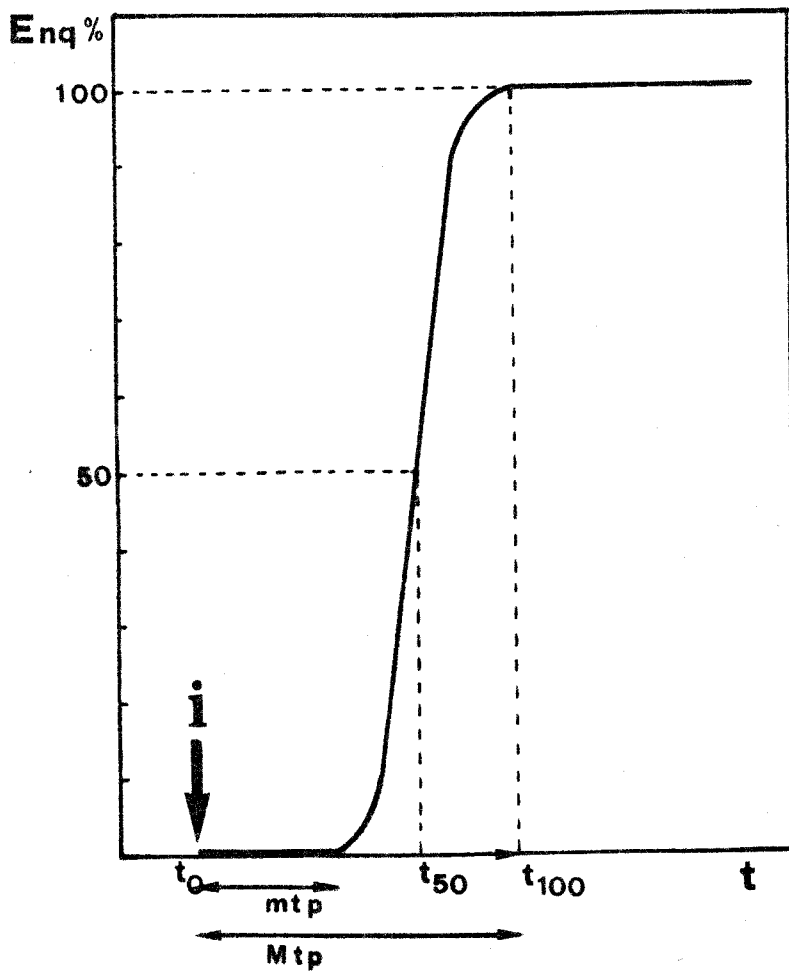


Fig. 13. Curva teórica de Enquistamiento. Ordenada: Enquistamiento (%); Abscisa: Tiempo.; mtp: mínimo tiempo prequístico necesario; Mtp: máximo tiempo prequístico necesario. t_0 : tiempo de inducción (i); t_{50} : tiempo en que se ha enquistado el 50%; t_{100} : tiempo en que se ha enquistado el 100%.

final cerca del 100% de enquistamiento. Suponiendo que todos los miembros de la población han recibido igualmente la señal para enquistar, al periodo de tiempo transcurrido desde la inducción hasta alcanzado el 100% sería el "máximo tiempo prequistico necesario" (Mtp), es decir; desde el t_0 (inducción) hasta el t_{100} tendríamos la máxima gama de tiempos prequisticos teóricos a considerar en esa población. Lo cierto es que el momento de inducción real (t_0) no es el mismo para toda la población, de lo que surge la mayor/menor asincronía del proceso.

Del estudio de estas curvas y sus variaciones respecto a la standard, bajo diversas condiciones y tratamientos, se puede obtener información sobre el comportamiento de una población heterogénea inducida a enquistar y de la capacidad sincrónica de la misma.

Existen "aceleradores" (que acortan el Mtp) o mejores inductores del proceso de enquistamiento descritos, y a veces comunes, para ambos grupos; amebas y ciliados.

Los inhibidores de la síntesis de ADN son buenos inductores del enquistamiento. Según SCHUSTER (1979), la Mitomicina C induce el enquistamiento en amebas a través de una alteración de la conformación cromatínica, activando los genes responsables de la dormancia. Esta propiedad inductora de enquistamiento por los inhibidores de ADN, se ve más o menos influenciada por el estado en el que se encuentra la célula dentro de su ciclo y su curva de crecimiento. BYERS et al. (1977), encuentran que el Bromuro de Etidio y la Mitomicina C inducen un alto porcentaje de enquistamiento, tanto si se parte de células en fase de crecimiento logarítmico como si es post-logarítmico, mientras que la HU y la

FUdR inducen un bajo enquistamiento en fase logaritmica pero considerablemente superior en fase post-logaritmica. En ciliados, el único caso registrado en donde se aprecia inducción de enquistamiento por uno de estos inhibidores, es en el hipotrico *Laurentiella acuminata* (GUTIERREZ & TORRES, 1979), usando en este caso la HU. Otros factores como la temperatura (GUTIERREZ et al, 1981) y la osmolaridad (MATSUSAKA, 1977) pueden influir en la cinética del enquistamiento.

No es sorprendente que el estado fisiológico del protozoo sea un importante condicionante de su respuesta a enquistar en condiciones de hambre. Así, *Acanthamoeba sp.* (GRIFFITHS, 1970) dió el más rápido y sincrónico enquistamiento cuando se indujo en fase estacionaria. Estudios de este tipo sólo se han realizado en el grupo de las amebas (BYERS et al, 1977), no obteniendose resultados demasiado claros. En lo que se refiere a los ciliados, no sabemos nada de la importancia del estado fisiológico de la célula para la inducción quística.

Como la mayoría de los procesos de diferenciación celular que impliquen una "desviación" del ciclo normal de crecimiento y división, el enquistamiento es un proceso considerablemente más largo que el crecimiento en el mismo organismo. Los pocos estudios realizados en este sentido nos indican que la duración del proceso de enquistamiento es extremadamente variable, y es dependiente de una serie de factores, algunos de los cuales ya hemos considerado anteriormente, que son capaces de alargar o acortar este proceso. Para un determinado organismo, es difícil apuntar las condiciones en donde se obtenga un buen rendimiento quístico

en el menor tiempo. En *Acanthamoeba* sp. (GRIFFITHS, 1970) parece que se desarrolla en 24h, aunque este dato varia de unos autores a otros. Entre los ciliados, tenemos que en *Tetrahymena rostrata* (McARDLE et al, 1980), el enquistamiento se completa en 24h. En *Blepharisma* (GIESE, 1973) es de 40h y en *Histriculus* sp. (MATSUSAKA, 1979), dependiendo de la osmolaridad del medio, tiene un óptimo de 4-4,5h y un máximo de 36h.

Gran parte de estos autores, han dividido el proceso de enquistamiento en varias etapas, basandose esencialmente en cambios morfológicos observables por MO y a veces estas fases morfológicamente distinguibles presentan cierta base fisiológica, como es el caso de *Histriculus* sp. (MATSUSAKA, 1979).

Para la célula, el enquistamiento, una vez inducido es un proceso continuo, en el que definido linealmente pueden señalarse tres etapas; "célula vegetativa ---► quiste inmaduro ---► quiste maduro", siendo la cinética de esta secuencia, la reminiscencia de la cinética para dos transformaciones secuenciales, cada una de primer orden e irreversible. Dentro de la primera secuencia, no obstante, pueden existir "puntos de reversibilidad", los cuales al parecer se encuentran entre las primeras horas del proceso, pudiendo volver al estado vegetativo y al ciclo división-crecimiento si se les suprime el inductor. Esta cuestión tan interesante para comprender bién el proceso de enquistamiento, ha sido sólo abordada en algunos experimentos con *Acanthamoeba castellanii* (WEISMAN, 1976), y nada se ha hecho en ciliados.

Otro interesante fenómeno, que se dá tanto en amebas como en ciliados, y que ha sido abandonado en sus comienzos, es el proceso llamado de "re-enquistamiento".

Este fenómeno puede darse de una forma espontánea o inducida. Se trata de un doble o triple enquistamiento, formándose así una pared quística aparentemente normal que encierra a su vez al organismo enquistado con otra completa pared quística. Se ha obtenido re-enquistamiento de una manera inducida experimentalmente en la ameba *Naegleria gruberi* (SCHUSTER, 1979), en los ciliados; *Gastrostyla steinii*, por WEYER en 1930 (HASHIMOTO, 1963), *Bursaria truncatella* por BEERS (HASHIMOTO, 1963) y *Oxytricha fallax* (HASHIMOTO, 1963). Y de una forma espontánea por MOORE (HASHIMOTO, 1963) en *Spathidium spathula*.

La experimentación más completa ha sido realizada por HASHIMOTO (1963) en *Oxytricha fallax*. El re-enquistamiento inducido consiste en someter a células exquistándose a una nueva inducción de enquistamiento, con lo que se obtiene un ciclo E-E más corto, ya que no existe emergencia y no pasa por el estado vegetativo, realizando una nueva etapa de enquistamiento dentro de la pared quística. (Fig. 14). Los experimentos de HASHIMOTO (1963), señalan que el tiempo requerido para el re-enquistamiento, a partir de estados tempranos de exquistamiento (estado-B), es mayor que aquellos en donde se parte de estados tardíos de exquistamiento (estados C y D). Lo que indica que una vez que la célula ha iniciado la morfogénesis de exquistamiento lo completa irreversiblemente antes de entrar en un nuevo enquistamiento. En estados muy tempranos (estado-A) no se produce ni re-enquistamiento ni exquistamiento, siendo así el proceso de exquistamiento reversible, al igual que el enquistamiento, en sus primeros momentos (Fig. 14).

Al igual que en un proceso de enquistamiento normal, el re-enquistamiento puede acelerarse, para un mismo estado de

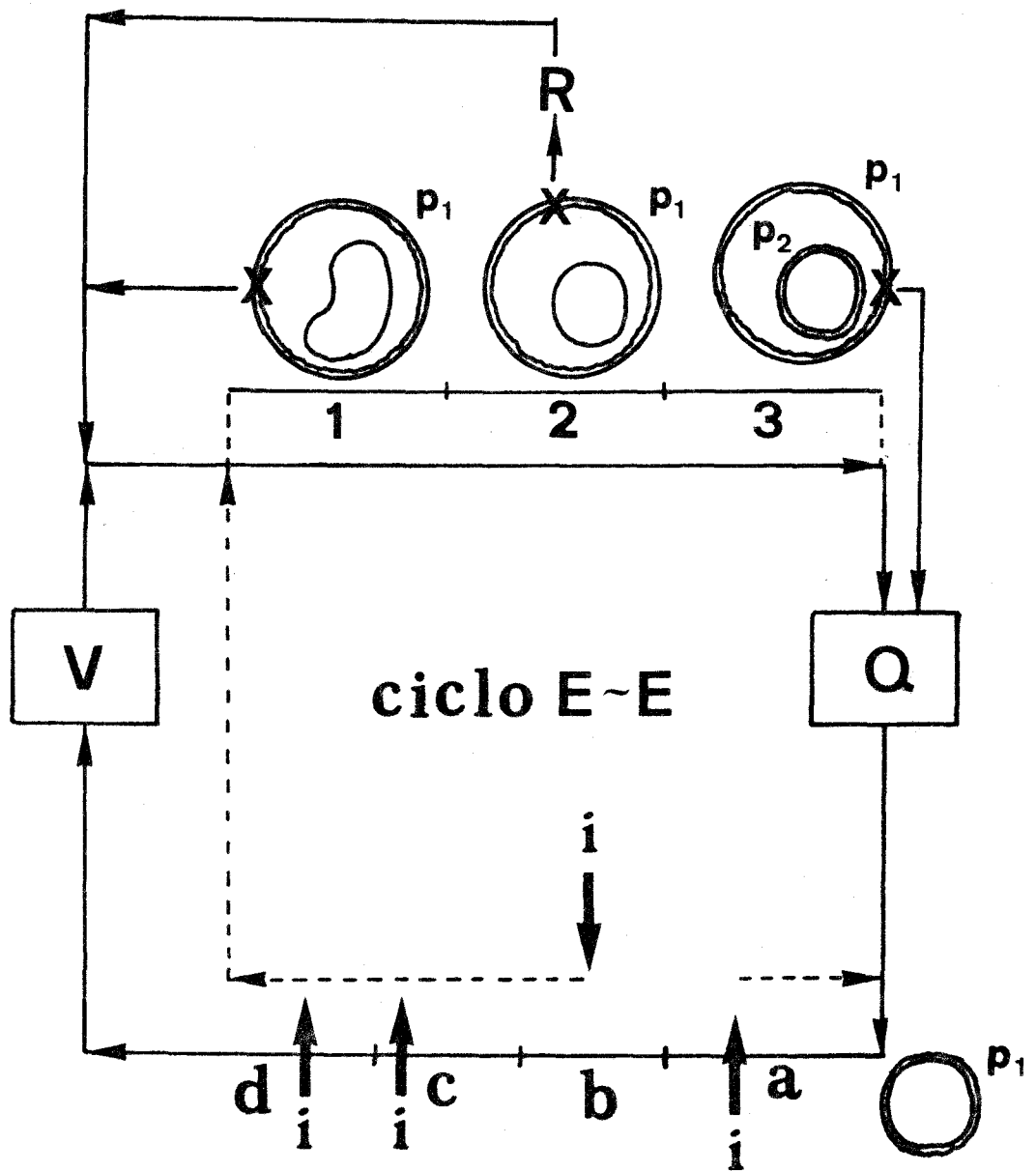


Fig. 14. Esquema de los experimentos sobre re-enquistamiento. V: vegetativo; Q: quiste; (i): inducción re-enquistamiento; (a,b,c y d): estados de exquistamiento en *Oxytricha fallax*; (1, 2 y 3): estados de re-enquistamiento; R: regeneración; P₁: pared quística primaria; P₂: pared quística secundaria.

exquistamiento, al aumentar la temperatura. El re-enquistamiento presenta también todas las etapas típicas de un enquistamiento normal con la formación de una nueva pared con todas sus capas.

¿Cuántos ciclos "re-enquistamiento-exquistamiento" puede realizar una célula, contando sólo con el potencial energético de los materiales almacenados en su citoplasma?. Parece ser que el límite se encuentra en dos vueltas a este ciclo, originando un quiste a su vez encerrado en tres paredes quísticas y que posteriormente es exquistable. Un tercer re-enquistamiento ya no es posible en el caso de *O. fallax* (HASHIMOTO, 1963), muriendo la célula dentro de las tres paredes quísticas.

Durante el re-enquistamiento en *O. fallax*, se han establecido tres etapas (HASHIMOTO, 1963) (Fig. 14), y si se elimina por micromanipulación la pared quística primaria (P_1) en cada una de estas etapas de re-enquistamiento, los comportamientos resultantes de la célula son muy diferentes. Si la quitamos en el estado-I, estado temprano, la célula vuelve al estado vegetativo siguiendo el ciclo de crecimiento y división. Si se realiza esta operación en el estado-II, la célula prequística sufre regeneración fisiológica conectando luego con el estado vegetativo, y si se elimina la P_1 en el estado-III, la célula prequística continua su enquistamiento hasta el estado de quiste maduro (Fig. 14). Existiendo así en el re-enquistamiento reversibilidad tanto en un estado inicial, como en un estado intermedio pasando, en este caso, por una etapa de regeneración fisiológica previa al estado vegetativo.

Seria muy interesante continuar y profundizar en torno a este fenómeno del re-enquistamiento, su interes básico

se centra en el estudio del control de un sistema génico que se vé reprimido y desreprimido en un corto espacio de tiempo, y en la capacidad celular de responder a un estímulo exógeno al sistema con la única vía de gasto energético que la suministrada por las reservas acumuladas.

6.7. *Problemas morfogénéticos y genéticos en torno al ciclo E-E.*

El estado de quiste de resistencia y el ciclo E-E se ofrecen como una buena herramienta para determinados estudios morfogénéticos. Los principales y únicos estudios experimentales realizados en este sentido, han sido sobre el ciliado hipotrico *Oxytricha fallax* (HASHIMOTO, 1964; HAMMERSMITH, 1976; HAMMERSMITH & GRIMES, 1981; GRIMES & HAMMERSMITH, 1980; GRIMES, 1982).

Teniendo en cuenta que los quistes de ciliados del tipo KR reabsorben todo tipo de ciliación e infraciliación, y dado que a partir del estado quístico ha de surgir toda la nueva ciliación del vegetativo, durante el exquistamiento, manteniendo el mismo patrón ciliar, surge una pregunta inmediata; ¿qué mecanismo o estructura puede estar involucrada en la retención o conservación de la información necesaria para la elaboración de un patrón ciliar determinado o corticotipo en el estado quiste?, esta cuestión permanece aún sin contestar.

GRIMES (1982), como un resultado general, pero no definitivo, de todos los estudios morfogénéticos realizados

sobre *O. fallax* y en especial aquellos ligados al estado quiste, distingue tres sistemas informacionales diferentes (todos extranucleares) que controlan el patron y forma final del cortex del ciliado:

1.- Patrones de "rango-corto" basados en una estructura preexistente visible.

Este tipo de citotaxis fué ampliamente estudiado por SONNEBORN en las hileras ciliares invertidas de *Paramecium*. En *O. fallax* se pueden transplantar dorsalmente hileras de cirros marginales que sufren morfogénesis y son heredadas de generación en generación. Cuando estas células sufren el ciclo E-E, las células exquistadas resultantes han perdido estas estructuras supernumerarias de posición atípica (GRIMES & HAMMERSMITH, 1980). Cuando estas estructuras estan ausentes, como ocurre en el quiste, se pierde la información para la propagación citotáctica de ellas.

2.- Patrones globales basados en una arquitectura molecular ultraestructuralmente no identificable.

La sospecha de la posibilidad de este tipo de sistema informacional, se basa en experimentos realizados sobre otras alteraciones del cortex celular que implican cambios de juegos ciliares. Este sistema es independiente del anteriormente descrito, heredandose igualmente citotácticamente; si se pierde no puede ser reemplazado.

y 3.- Interacciones entre componentes corticales.

El exacto desarrollo de un determinado primordio no es una propiedad inherente a ese primordio, sino más bien a otras propiedades más globales, como el estado y posición de otro primordio y/o estructura ya formada ("comunicación intracortical").

Los resultados de los principales estudios sobre la persistencia de caracteres fenotípicos a través del ciclo E-E se esquematizan en la Fig. 15. Estos trabajos han contribuido a la elaboración de los modelos de sistemas informacionales que antes se han enunciado. El interés de estos trabajos junto con aquellos que implican manipulación microquirúrgica durante el estado quístico (HASHIMOTO, 1964), estriba en un intento válido de elucidación de los mecanismos y formas que regulan o mantienen un patrón cortical citogenéticamente heredable. Y sobre el que aún se mantiene abiertas las principales y más básicas cuestiones.

Otra cuestión no menos importante y tan abandonada o más que la anteriormente expuesta es la relativa a los estudios de variabilidad fenotípica quística y su heredabilidad o base genética. PAGE (1975), describe en *Naegleria gruberi* tres tipos quísticos distintos; S(smooth=liso), R(rough=rugoso) y A(angulares), para este autor estas diferencias morfológicas tienen una base genética y son diferencias de estirpe. Posteriormente, WARHURST & THOMAS (1978), encuentran diferencias isoenzimáticas entre las estirpes R y S de *N. gruberi*, apuntando así diferencias bioquímicas además de las morfológicas.

De un análisis fenotípico de poblaciones quísticas de tres ciliados hipotricos; *Laurentiella acuninata*, *Gastrostylus steinii* e *Histiculus muscorum* (GUTIERREZ, no publicado), se ha estimado, en base a cálculos de genética cuantitativa, el número aproximado de genes que pueden interactuar de forma aditiva para determinar diferentes valores fenotípicos del tamaño quístico. Para los tres casos estudiados el número de genes encontrado es de dos, estando el valor de heredabilidad comprendido entre 0,5-0,7, con lo que el factor ambiente

<u>FENOTIPO</u>	<u>FENOTIPO</u>
Doblete Homopolar ----Ciclo E-E-----▶	Doblete Homopolar.
Doblete Heteropolar---Ciclo E-E-----▶	Doblete Heteropolar.
Célula Monstruo -----Ciclo E-E-----▶	Célula Monstruo.
Hileras dorsales supernumerarias -----Ciclo E-E ----▶	Hileras dorsales supernumerarias.
Hileras supernumerarias de cirros en situación dorsal. -----Ciclo E-E-----▶	Desaparición de estas hileras.
Corte ecuatorial a doblete -----Ciclo E-E-----▶	Dobletes.
Corte longitudinal a doblete. -----Ciclo E-E-----▶	Singletes.

Fig. 15. Esquema-resumen de los resultados morfogenéticos en los que se encuentra involucrado el ciclo E-E.

juega un importante papel en la variación de este carácter.

Sobre el carácter genético de la pérdida de la propiedad enquistable, GIESE (1979), en *Blepharisma americanum* y *Blepharisma japonicum* consiguió aislar clones no enquistables después de una selección durante dos años de estos individuos, que él considera mutantes espontáneos. Nada se conoce acerca del mecanismo de pérdida de esta información o sobre la importancia de ésta pérdida.

De interés son, igualmente, los procesos sexuales ligados al ciclo E-E, pobremente estudiados y que podrían facilitar los trabajos de tipo genético. En *Metopus sigmoides* (CORLISS & ESSER, 1974) después de conjugación, los exconjugantes suelen enquistarse, también en algunos fitoflagelados y amebas se ha señalado la existencia de enquistamiento, después de fusión sexual. Y en individuos del complejo *Tetrahymena rostrata* se da autogamia durante las últimas fases del enquistamiento (CORLISS, 1973; NANNEY, 1980; McARDLE et al, 1980).

Llegamos a la conclusión, de que los estudios genéticos en torno al ciclo E-E y estado quiste están aún por comenzar, no existiendo mutantes caracterizados de este proceso de diferenciación celular, ni una metodología adecuada que facilite éste tipo de estudios.

6.8. Significado Ecológico del ciclo E-E.

La necesidad de este apartado es obvia si partimos

de la base de que el quiste de resistencia nace de la interacción sistema vivo-medio ambiente. Si de hecho la protozoología-ecológica es un campo poco tratado, la función del quiste de resistencia dentro de él, aún lo ha sido menos.

CORLISS & ESSER (1974), plantean una serie de cuestiones, aún sin resolver, que iremos comentando. ¿Cuál es la posible función competitiva del quiste en la microbiocenosis de la cual puede formar una parte significativa? ¿Cuál puede ser su relación con la cadena trófica? ¿Es un componente de la dieta de otros microorganismos?

La importancia que puede tener el quiste de resistencia en la cadena trófica es una cuestión no fácil de resolver, sólo se conocen algunos casos de predación sobre quistes de protozoos. Se conoce que depredadores de ciliados (*Lacrymaria*, *Loxophyllum*) comunmente ingieren también quistes de esos ciliados. Igualmente, la observación cotidiana nos indica que bajo condiciones de hambre, inductor de enquistamiento, ciliados hypotricos tales como *Laurentiella acuminata*, *Gastrostyla steinii* e *Histriculus muscorum* se dá canibalismo sobre los quistes originados por la misma especie, observandose a menudo varios quistes en el interior de una célula vegetativa. SERRANO & TORRES (1979), estudiando el fenómeno del gigantismo-canibalismo en *Histriculus muscorum*, observan que en un cultivo inducido a enquistar, aparecen células caníbales que inicialmente se alimentan de quistes y luego extienden su dieta a las formas vegetativas. El que el quiste tenga un volumen inferior al vegetativo puede favorecer la predación sobre estos en la primera fase de esa transformación "célula normal --> gigante-canibal".

¿Hay una estacionalidad o periodicidad en la formación de los quistes?. En general parece ser que la estacionalidad en la producción quística ha sido observada en especies plantónicas de protozoos. CORLISS & ESSER (1974) señalan algunos casos; el rizopodo testaceo *Diffugia limnetica* según SCHONBORN se enquistaba preferentemente en invierno, y *Zoothamnium arbuscula* es una forma de verano que se enquista en otoño.

Otra cuestión ecológica a considerar, es la función que desarrolla el quiste de resistencia como mecanismo de dispersión de la especie. Según BORROR (1977), en evidente contraste con lo que ocurre con la mayoría de los metazoos, las barreras geográficas generalmente no determinan la distribución de los ciliados. Los medios de dispersión pasivos más frecuentes entre los protozoos son el viento y los animales. Entre estos últimos predominan los artrópodos, SCHLICHTING & SIDES (1969) estudiaron los microorganismos que eran habitualmente transportados por tres familias de hemipteros acuáticos, encontrando que abundaban los quistes de protozoos. Los mamíferos también pueden asumir la función de transportadores, así los quistes de *Colpoda cucullus* son viables después de pasar a través del tracto digestivo de herbívoros. Por otra parte, la misma anatomía quística facilita este tipo de transporte pasivo, como ya se ha comentado anteriormente el ectoquiste, capa más externa, suele presentar relieves, irregularidades más o menos complejas que facilitan la fijación o unión a diversos materiales que a su vez pueden ser fijados a los animales. También la pigmentación quística, tanto puede tener un efecto protector contra la radiación (fotooxidación) (GUTIERREZ et al, 1982), como un efecto mimético.

¿Se podría utilizar la sensibilidad y rango de tolerancia de los quistes para usarlos como organismos-ensayo o agentes registradores, o como indicadores de polución?. Esta podría ser otra parcela de utilización práctica ecológica del elemento quiste, que está íntimamente conectada con el estudio de la naturaleza de la pared quística, complementario con los estudios de agentes quisticidas.

Dentro de la Ecología, podemos introducir una nueva parcela de las ciencias biológicas, de reciente aparición y de gran futuro, se trata de la Exobiología. El protozoo, con el doble carácter de unicelularidad y eucariotismo se muestra como un material vivo interesante para estudios exobiológicos. De la XVII reunión plenaria del comité sobre investigación espacial (COSPAR) celebrada en 1974, elaboramos los siguientes datos; el material unicelular constituye un 45,4% del total de sistemas vivos empleados en estudios de este tipo, del cual, un 79,9% son procariotas y sólo un 9,91% son eucariotas, de éstos la mitad son protozoos.

Una de las cuestiones que se plantea la biología espacial es si la vida terrestre puede acomodarse a determinados ambientes o condiciones extraterrestres, ya sea en el espacio o en determinados planetas. En este aspecto, cabe destacar los trabajos realizados por LOZINA-LOZINSKY et al. (1971) en *Colpoda maupasii* y *Paramecium caudatum*. Los experimentos realizados por estos autores consisten en simular en el laboratorio las condiciones del habitat marciano, los parámetros analizados fueron; la temperatura, la humedad y la composición atmosférica. Más recientemente se han diseñado diversos experimentos espaciales en los que

se han utilizada protozoos. PLANEL et al. (1981), han elaborado dentro de los proyectos CYTOS-I y CYTOS-M diversos experimentos a bordo del SALYUT-6. Los parámetros biológicos analizados en *Paramecium tetraurelia* han sido; la proliferación celular, el volumen celular, cambios en el contenido de electrolitos y en el contenido proteico. (PLANEL et al, 1981; TIXADOR et al, 1979).

Los estudios sobre la respuesta de protozoos tanto en forma vegetativa como quística a condiciones ambientales extremas, son importantes por dos razones básicas; porque revelan los posibles mecanismos de su evolución y adaptación sobre la Tierra, y porque amplian nuestras nociones sobre los límites de la vida.

6.9. *Taxonomía y Filogenia quísticas.*

El quiste de resistencia junto con las características que presenta el ciclo E-E, pueden ser un excelente material que suministre una variedad de características suficientes para que sean incorporados al campo de la taxonomía y filogenia. CORLISS & ESSER (1974), atribuyen la escasez de estudios de la función ecológica del quiste a la falta de criterios de identificación taxonómica a nivel quístico, es lo que llaman "Taxonomía quística".

Este tipo de taxonomía sólo ha sido algo aplicada en los Rhizoflagelados y otras formas ameboides (HANSON, 1977; PUSSARD & PONS, 1977) y absolutamente nada en los ciliados.

Recientemente, DAGETT et al. (1980) han propuesto un método para codificación de datos relativos a la identificación taxonómica de protozoos y su procesamiento por computador. En este trabajo se presentan 37 secciones que exploran diferentes características de valor taxonómico. Una de estas secciones, la sección-6, está dedicada a Endosporas y Quistes. La sección está compuesta de 58 apartados codificados por números de seis cifras, 42 de estos apartados tratan sobre las dimensiones quísticas (006026-006067), 5 sobre la morfología, 4 sobre caracteres nucleares, 3 se dedican a quistes de parásitos y otros tres al tipo de emergencia, ya por ruptura parcial o disolución total de la pared (006078-006079), y la presencia de poro (006077).

Pensamos que faltan otras características con mayor valor taxonómico que las presentadas por este comité, tales como ser quiste KR o NKR, composición bioquímica de las paredes (presencia/ausencia de quitina y/o celulosa) y otras relativas al enquistamiento. No obstante, es un intento positivo el considerar ya el potencial valor taxonómico del quiste en el campo de la taxonomía de protozoos.

Al igual que en taxonomía, las características quísticas pueden ser aplicadas a estudios filogenéticos. Un intento de utilizarlos en este campo, ha sido iniciado por GUTIERREZ & PEREZ-SILVA (1981), realizando un análisis filogenético cuantitativo sobre semes establecidos en el enquistamiento y quistes de resistencia de protozoos del Phylum Ciliophora. Mediante comparaciones filogenéticas entre 16 especies de ciliados, se establecieron 11 semes, y para la determinación de la homología de los mismos se siguió el criterio Remaniano (HANSON, 1977) distinguiendo los tres grupos sémicos clásicos; Plesioseme, Aposeme y Neoseme. Del análisis de los pares sémicos se calculó la distancia

filética entre las especies consideradas, como caracteres del plesiomorfo, se consideraron; la presencia de quitina en la pared, ser quiste tipo-NKR y la presencia de poro u ostiolo. La ausencia de datos en lo que se refiere a quistes y el ciclo E-E hace que las comparaciones entre pares sémicos sea incompleta.

En la Fig. 16, se muestran las distancias obtenidas del orden Colpodida respecto a los órdenes Hypotrichida y Heterotrichida, observandose un acercamiento global de los Hipotricos a los Tricostómidos.

La importancia de los estudios sobre la composición bioquímica de las paredes quísticas se hace más patente en los trabajos de filogenia bioquímica. En este sentido, a las macromoléculas consideradas de mayor interes filogenético se las ha dividido en dos grandes grupos, según ZUCKERKANDL & PAULING (ASENSIO & VALLE, 1977), las "semánticas" (ADN, ARN y Proteínas) y las "episemánticas", que son los productos intermediarios de las rutas metabólicas biosintéticas y algunos productos finales (glucógeno, celulosa, quitina, etc.) que carecen intrínsecamente de información genómica. Dentro de estas últimas y referido a las paredes quísticas de protozoos, cabe destacar los trabajos realizados sobre la presencia/ausencia de quitina en dichas paredes. (JEUNIAUX, 1965; JEUNIAUX, 1971; BUSSERS & JEUNIAUX, 1974).

La distribución de la quitina en los animales sugiere que la biosíntesis de este polisacárido es un caracter bioquímico primitivo de la célula animal (JEUNIAUX, 1965). De las 22 especies estudiadas de ciliados, un aproximadamente 63,3% elaboran membranas metaplasmaicas cuya composición química es, al menos parcialmente, quitinosa. (BUSSERS & JEUNIAUX, 1974). La capacidad de biosíntesis de quitina no está uniformemente repartida entre los ciliados; todos los Gimnostómidos

estudiados excepto el caso de *Dileptus americanus* presentan quitina, igualmente todos los Heterotricos, Peritricos e Hymenostómidos. No la presentan los Tricostómidos e Hipotricos exceptuando en este último grupo el caso de un euplótido; *Euplotes inkystants* que la presenta. (Fig. 17). Este hecho se puede interpretar como la pérdida de una propiedad ancestral, que está muy repartida entre los grupos de ciliados menos evolucionados. La pérdida de la propiedad de biosíntesis de quitina para las especies situadas en los extremos de las ramas, constituye un nuevo ejemplo de la manifestación de una tendencia evolutiva que se expresa por la pérdida de un sistema biosintético. Comparando ambos esquemas (Figs. 16 y 17) se observa que los semes quísticos de Hipotricos y Tricostómidos están cercanos, hecho que se corresponde con la ausencia de quitina en ambos grupos.

Otro problema de gran interés es el origen y evolución del enquistamiento, de las formas de resistencia en general, y en particular referido a protozoos. La elaboración de estos mecanismos de resistencia pasiva (esporas, quistes) en sistemas tan distintos como el procariota y el eucariota presentan, no obstante, bastantes caracteres comunes (GUTIERREZ & PEREZ-SILVA, 1981). Semejanzas que pueden calificarse de homólogas o análogas dependiendo de un posible origen común o no. En los flagelados se pueden dar tres tipos distintos de enquistamiento:

- Formación de quiste a partir de una célula completa.
- Formación de quiste a partir de una región citoplasmática interna sin retracción de citoplasma extraquístico (Enquistamiento endógeno).

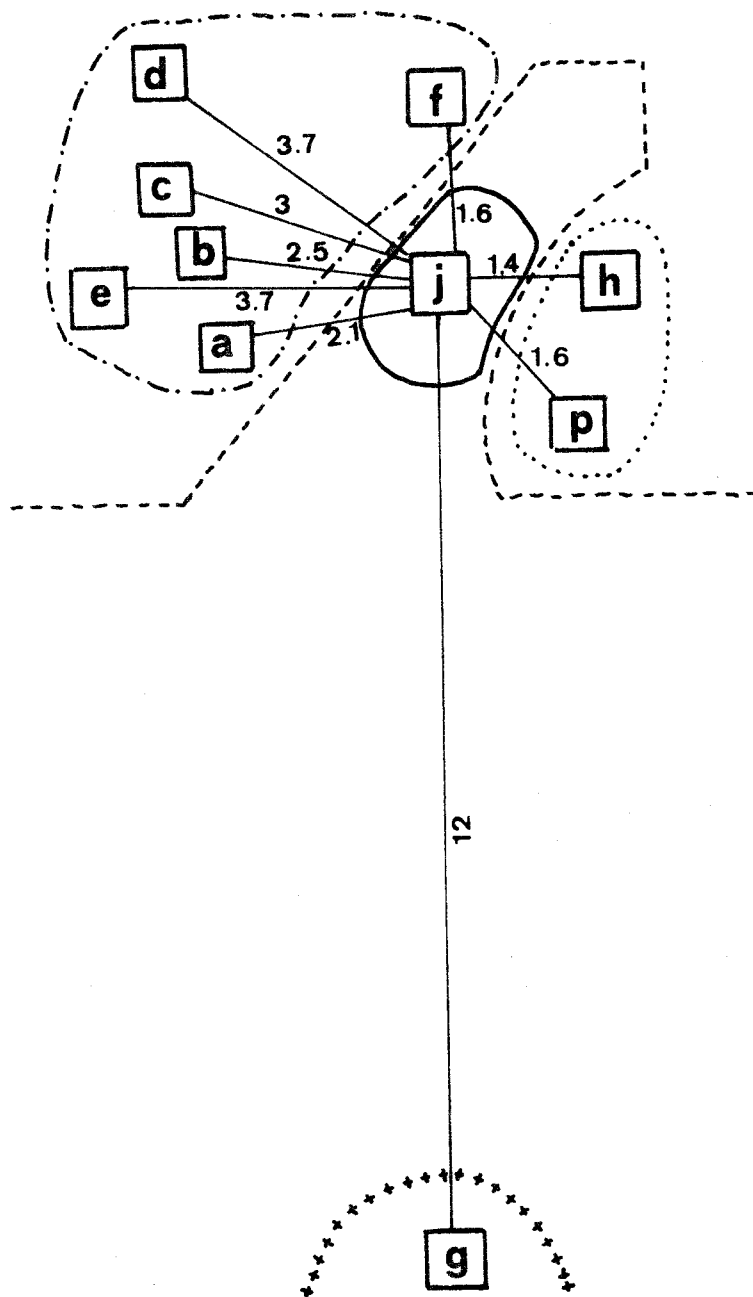


Fig. 16. Distancias filéticas obtenidas entre diferentes ciliados respecto a sus semes quísticos. a: *Laurentiella acuminata*; b: *Gastrostyla steinii*; c: *Oxytricha fallax*; d: *Oxytricha bifaria*; e: *Pleurotricha lanceolata*; f: *Histriculus* sp.; j: *Colpoda* sp.; h: *Euplotes muscicola*; p: *Diophrys scutum*; g: *Blepharisma* sp.; (—): Orden Colpodida; (---): Orden Hypotrichida; (-.-.): Fam. Oxytrichidae; (...): Fam. Euplotidae; (+++): Orden Heterotrichida.

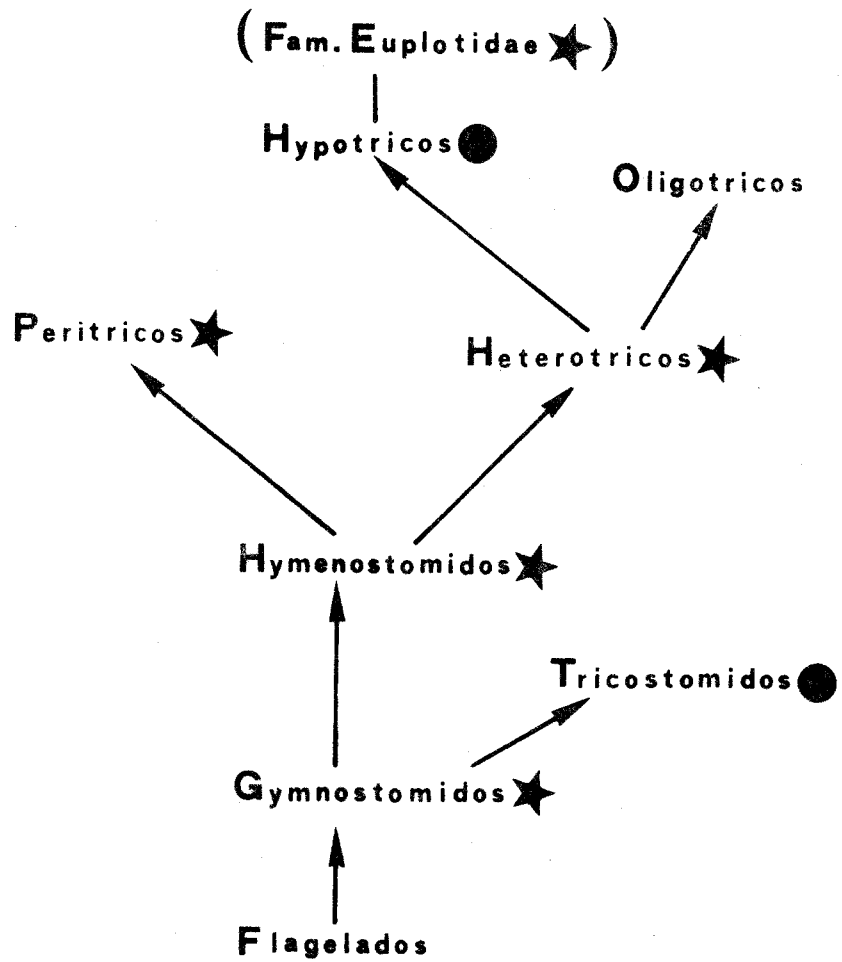


Fig. 17. Arbol filogenético de los grandes grupos de Ciliados. (modificado a partir de HANSON, 1977).
 (★): presentan quitina; (●): no presentan quitina.

(X*, Y*; ancestros con capacidad de originar una forma de resistencia).

DAWES (1981), refiriéndose a la espora bacteriana, apunta las ventajas y desventajas evolutivas que esta característica aportaría al sistema vivo. La Esporulación/Enquistamiento y la división celular son procesos mutuamente excluyentes, esto es una desventaja evolutiva ya que no se contribuye directamente al crecimiento de la población. Por el contrario, puede presentar dos posibles ventajas; que son la supervivencia en el tiempo y la dispersión.

7. Plan de trabajo.

Con el trabajo que aquí se presenta pretendemos contribuir a la elucidación de algunos problemas relativos a la pared quística. Y ordenamos la exposición de nuestros resultados en los siguientes apartados a desarrollar:

- a)- Descripción ultraestructural de la pared y citoplasma quísticos de *Laurentiella acuminata*.
- b)- Citoquímica, tests de solubilidad y tratamientos enzimáticos sobre las paredes quísticas aisladas y cortes semifinos.
- c)- Cinética de enquistamiento y etapas.
- d)- Estructura y cinética de aparición de los precursores quísticos durante el enquistamiento.
- e)- Efecto de la radiación UV (254 nm) sobre la cinética de enquistamiento y la pared quística.

MATERIALES Y METODOS

1. *Material vivo, condiciones y medios de cultivo e inducción del Enquistamiento.*

Laurentiella acuminata (FEDRIANI et al, 1976), ciliado hipotrico, fué aislado en 1971 de una muestra de agua recogida en el Parque de Maria Luisa (Sevilla).

El alga verde unicelular *Chlorogonium* sp. fué cedida amablemente por el Prof. AMMERMANN (Universidad de Tubingen).

Los cultivos de *L. acuminata* fueron mantenidos a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ en medio de Pringsheim (KUDO, 1969) y alimentados con *Chlorogonium* sp. El alga fué crecida autotróficamente bajo luz blanca (25 W x m^{-2}) a 20°C aireado con CO_2 al 5% (v/v) en medio mínimo (ARNON et al, 1974).

En los cultivos de *L. acuminata*, el enquistamiento ocurre cuando el alimento comienza a ser un factor límite. La inducción del enquistamiento se hizo colocando las células vegetativas en una solución Pringsheim sin adicionar *Chlorogonium*.

Para los experimentos relativos al efecto de la radiación UV se usaron células clonadas.

2. Aislamiento de paredes quísticas.

2.1. Estudios de rotura de los quistes.

El aislamiento de las paredes quísticas requería un estudio previo de rotura eficiente de los quistes, para lo cual se hicieron una serie de tratamientos químicos y/o físicos. Estos se recogen en el siguiente esquema:

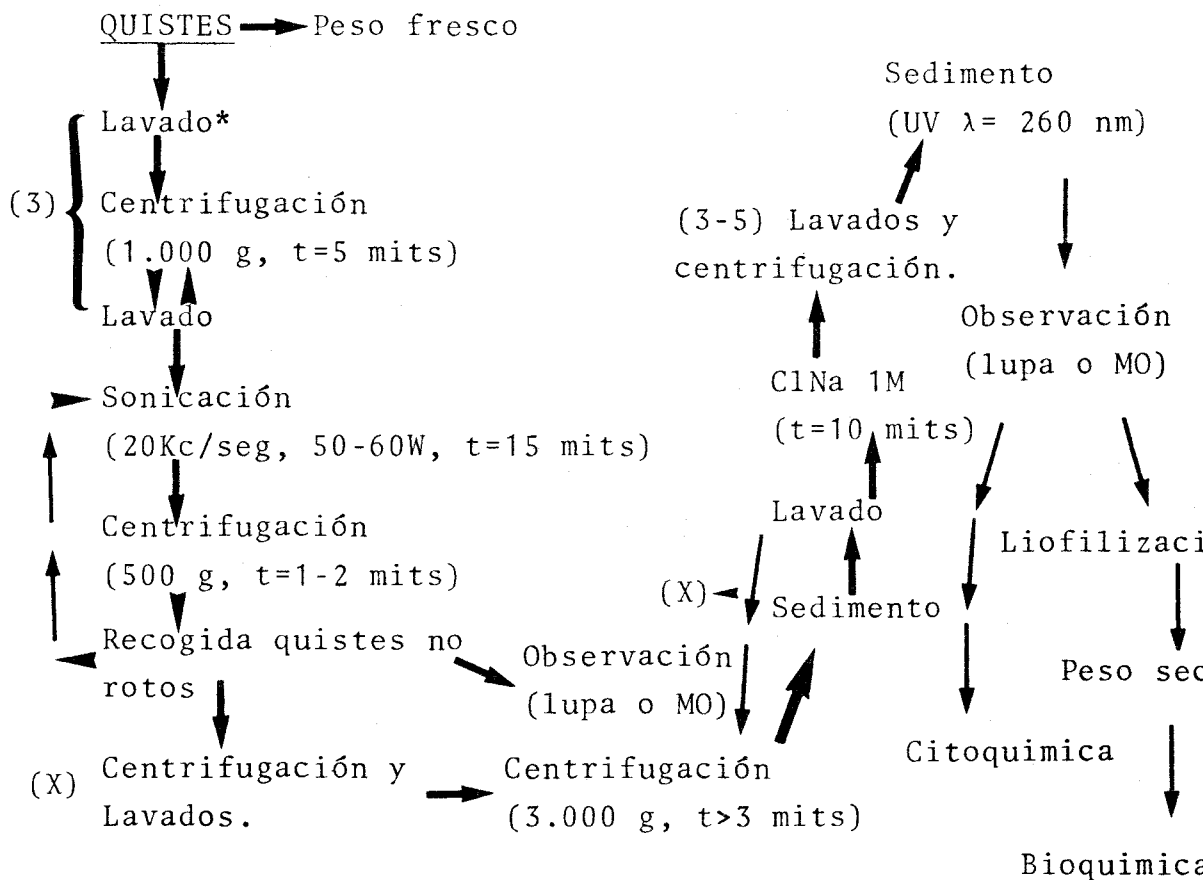
METODO	RESULTADO
Centrifugación (1.000 g)	No rotura
SDS (0,5%)	No rotura
SDS (0,5%) + Centrifugación (1.000 g)	No rotura
SDS (5%) + Centrifugación (1.000 g)	No rotura
EDTA (1%) + Centrifugación (1.000 g)	No rotura
Sonicación (20 Kc/seg, 20W, t=5 mits)	Desprendimiento parcial de ectoquiste.
Sonicación (20 Kc/seg, 30-40W, t=10 mits)	Desprendimiento parcial de ectoquiste.
Sonicación (20 Kc/seg, >50W, t=15 mits)	Rotura y desprendimiento de paredes quísticas.

Por lo que se desprende de los resultados anteriormente expuestos, el método idóneo de conseguir unidades estructurales de pared es por sonicación (20 Kc/seg, >50W, t=15 mits), siendo este el que se utilizó a partir de entonces.

No siempre, ya que depende de la cantidad de quistes tratados, se consigue una rotura de la totalidad de los quistes presentes, por lo que es conveniente la recogida de los no rotos, por una leve centrifugación (500 g) durante 1-2 mits y repetir el proceso de rotura volviendo a sonicar.

2.2. Diseño del método utilizado.

Atendiendo a los resultados anteriormente expuestos y basandonos en otros métodos de aislamiento y purificación de paredes celulares en general, hemos diseñado un método cuyo protocolo resumimos en el siguiente esquema:



(*): Todos los lavados fueron realizados con agua destilada.
(X): Número arbitrario de veces a repetir, según criterio del manipulador.

Como se aprecia en el esquema del método seguido hay algunos pasos que es conveniente repetir, señalados dentro de un parentesis, que aseguran el limpiado de las estructuras a obtener. Pasos que pueden y deben ser controlados visualmente colocando una muestra del lisado sobre un portaobjetos limpio y observar bajo lupa o microscopio óptico a bajos aumentos.

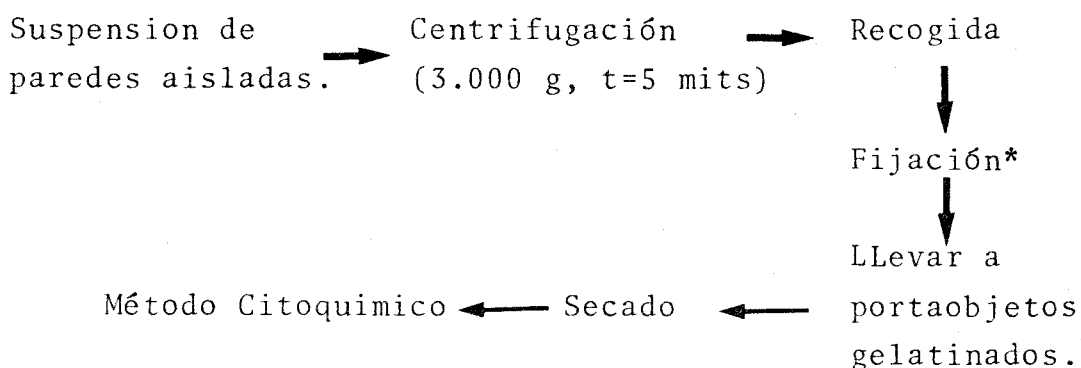
El tratamiento con ClNa 1M, durante aproximadamente, 10 mins, tiene la finalidad de retirar el material residual que absorbe a una $\lambda = 260$ nm, un paso de control de pureza por eliminación del componente citoplásmico.

Por último, las estructuras aisladas, tras una última observación de control al MO, pueden seguir dos caminos según el tipo de estudio a realizar; Citoquímico o Bioquímico. Si se trata del primero, se puede trabajar con las estructuras extraídas en el último paso, si se trata por el contrario, de estudios de tipo bioquímico, es necesario concentrar por liofilización, esta también sirve para su perfecta conservación.

A partir del peso fresco de los quistes conseguidos y el peso seco de las paredes aisladas y liofilizadas, se puede establecer el rendimiento obtenido en dicho proceso. De las varias veces en que se ha obtenido los "suficientes" quistes de resistencia para un intento de análisis bioquímico, el rendimiento obtenido ha oscilado entre 1-2%, es decir demasiado bajo para estudios bioquímicos, pero el suficiente para los citoquímicos.

3. Preparación de paredes para el estudio citoquímico por MO.

Para los diferentes métodos citoquímicos utilizados sobre las paredes aisladas se empleó una metodología común en todos los casos, que se esquematiza de la siguiente forma:



(*): La fijación varia atendiendo al tipo de tinción o prueba citoquímica a realizar.

Para una mayor adhesión de las paredes al vidrio se usaron, en todos los casos, portaobjetos gelatinados, seguido de un secado al aire. En el caso de las pruebas de las actividades enzimáticas sobre las paredes, estas antes de la fijación fueron tratadas sobre portaobjetos gelatinados con la solución enzimática en el tampon y temperatura convenientes, posteriormente lavadas y fijadas.

4. Metodos citoquímicos.

Con el fin de no extendernos en la descripción de los métodos citoquímicos utilizados en este trabajo, y para

ofrecer mayor brevedad a la exposición, especificaremos sólo la fuente bibliográfica de la cual se ha tomado la metodología seguida en los diferentes casos.

4.1. Carbohidratos.

PRUEBA	TECNICA	REFERENCIA
PAS	McManus & Mowry	PEARSE (1968)
Control PAS(acetilación)	Lillie	PEARSE (1968)
AA (azul alcian) pH 2,5	Mowry	GANTER & JOLLES (1969).
AA pH 1	Lev & Spicer	"
AA pH 0,5	Lev & Spicer	"
Metilación-AA pH 2,5	Fisher & Lillie	"
Met-Sap-AA pH 2,5	Spicer & Lillie	"
PAS-AA pH (2,5 ;1 ;0,5)	Mowry	PEARSE (1968)
AmA (amarillo alcian) pH 2,5	Mowry	"
AA (pH 1)-AmA (pH 2,5)	Mowry	"
AA (pH 0,5)-AmA (pH 2,5)	Mowry	"
AA- CCE	Scott & Dorling	SCOTT & DORLING (1965); PEARSE (1968).
AT (azul de toluidina) (pH 6 - 0,5)	Standard	PEARSE (1968)
AM (azul de metileno) Punto de extinción	Dempsey & Singer	"
Corifosfina (pH 4)	-	GANTER & JOLLES (1969).
Naranja de Acridina	-	"

4.2. *Proteínas.*

PRUEBA	TECNICA	REFERENCIA
Ninhidrina-Schiff	Yasuma & Itchikawa	PEARSE (1968)
Mercurio-Azul de Bromofenol.	Bonhag	"
Reacción DDD para grupos -SH libres	Barnett & Seligman	"

4.3. *Lípidos.*

PRUEBA	TECNICA	REFERENCIA
Sudan-III	McManus	PEARSE (1968)
Sudan-III para lípidos enmascarados	AcKerman	"

5. *Preparación de los quistes para estudios ultraestructurales y citoquímicos por ME.*5.1. *MEB (Microscopia Electronica de Barrido).*

Las muestras de los quistes de resistencia de *L. acuminata*, una vez bien lavadas con agua destilada fueron fijadas por el método de MALICK & WILSON (o método O.T.O.T.O) (MURPHY, 1978), adaptado a nuestro material.

La desecación se realizó sumergiendo previamente los quistes ya fijados en acetona, llevandolos luego al portaobjetos y dejandolos secar al aire. El material así tratado fué examinado en un microscopio electrónico de barrido HITACHI SSM-2A.

5.2. MET (*Microscopia Electronica de Transmisión*).

En los manuales de técnicas para Microscopia Electronica se suele recomendar que el Glutaraldehido comercial se redestile, se rediluya al 25% y se reparta en pequeñas dosis (5 ml) guardado en el congelador.

Para todos los casos en que se ha utilizado este fijador se empleó un glutaraldehido purificado a partir del comercial, siguiendo el método de HARDY et al (1969) (MERCER & BIRBECK, 1979). El glutaraldehido absorbe a 280 nm, mientras que las impurezas absorben a 235 nm, debiendo ser la razón $A_{235}:A_{280}$ menor de 0,2. En nuestro caso alcanzamos a eliminar aproximadamente un 42% de esas impurezas.

Dependiendo de que el material fueran células en estado enquistado (quistes de resistencia) o células en estado vegetativo o prequistico, se usaron diferentes métodos de fijación.

A)- Para quistes de resistencia:

- a)- Fijación con Glutaraldehido 1,5% (v/v) en tampon fosfato 0,05M (pH 7,4), durante 30 mits.
- b)- Lavado con tampon fosfato 0,05M (pH 7,4), durante 1h.
- c)- Postfijación con OsO_4 1% (p/v) en tampon fosfato 0,05(pH 7, durante 1h.

- d)- Lavado con tampon fosfato 0,05 M (pH 7,4), durante 1h.
- e)- El material fijado es embebido en Agar 1,5% (p/v).
- f)- Los bloques de agar son deshidratados a traves de soluciones de etanol de concentración creciente.
- g)- Embeber en resina Spurr (SPURR, 1968) o Epon (MERCER & BIRBECK, 1979), este último tipo de resina se utilizó preferentemente para los estudios citoquímicos.
- h)- Las secciones para semifino (1μ de grosor), controles (tinción con azul de toluidina) y citoquímica al MO, como ultrafino (500-600 Å) fueron realizadas indistintamente en un ultramicrotomo LKB III o un ultramicrotomo REICHER-JUNG
- i)- Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados con un microscopio electrónico de transmisión SIEMENS ELMISCOP 102.

B)- Para vegetativos y células en estado prequistico.

a)- Las células, tanto vegetativas como las que se presentaban en los diferentes estados prequisticos, previamente establecidos, para el estudio de la cinética de aparición de precursores quísticos, fueron fijadas en una mezcla 1:1 de las soluciones A y B, durante 1h.

Solución-A: Tampon fosfato pH 7

SO_4Mg 1 mM.

Sacarosa 0,1 M.

Glutaraldehido 25% (v/v).

Solución-B: Tampon fosfato pH 7.

OsO_4 2% (p/v).

Se procuró que la osmolaridad final fuera aproximadamente de 310 miliosmolar.

- b)- Lavado en el mismo tampon fosfato pH 7 más sacarosa 0,1 M.
 - c)- El material fijado fué embebido en Agar 1,5% (p/v) y deshidratado a traves de soluciones de etanol de concentraciones crecientes.
 - d)- Los siguientes pasos coinciden con los expuestos anteriormente (g, h, i).
- C)- Citoquimica de polisacaridos por ME.

Al tratarse de un método citoquimico, los pasos del protocolo antes descritos sufren cierta modificación.

Las células sólo fueron fijadas en la solución-A, antes descrita, incluidas en Epon (MERCER & BIRBECK, 1979), montadas en rejillas de oro y teñidas según el método de Thiery (THIERY, 1967).

6. *Técnica Microespectrofotométrica y Citoquímica cuantitativa.*

Para cualquier medida citofotométrica es necesario previamente determinar la longitud de onda en donde se obtiene el máximo de absorbancia, para luego realizar todas las medidas necesarias a esa misma longitud de onda.

Para lo cual, y a partir de una única unidad estructural aislada, se realizaron los espectros de absorción de los principales métodos citoquímicos empleados. Esto se hizo con una doble finalidad; encontrar la zona del visible en la cual presenta su máximo, con lo que nos objetiviza el verdadero color observado y obtener dicho máximo para las medidas sobre poblaciones de estructuras aisladas y estudiar las diferencias encontradas tras los distintos tratamientos.

Al no tratarse de orgánulos definidos con coloración uniforme, para un menor error en las medidas a tratar matemáticamente, se obtuvieron tanto la densidad integrada como el area barrida en cada medida, obteniendo la densidad al dividir la densidad integrada por el area barrida en cada medida.

Los datos así obtenidos fueron posteriormente tratados estadísticamente. Las medidas citofotométricas fueron realizadas utilizando un citofotómetro microdensitómetro VICKERS M85, con integrador de area.

7. Irradiación con luz UV.

Las células vegetativas y prequísticas fueron irradiadas en pequeñas gotas de medio de cultivo en placas de plástico o vidrio. La irradiación se realizó en una caja oscura con una lámpara germicida G.E. ($\lambda = 254 \text{ nm}$) con una dosis de 1.200 ergs/mm^2 en un minuto. La intensidad de dicha lámpara fué medida con una termopila Eppley.

La variación en la dosis de irradiación se conseguía aplicando diferentes tiempos de exposición.

Muestras de 20-30 células fueron sometidas a dosis de radiación UV dentro del rango de 6.000 a 9.600 ergs/mm^2 , dosis menores no producían ningún efecto sobre la cinética de enquistamiento.

Después de la irradiación las células fueron lavadas y transferidas a medio Pringsheim fresco sin alimento (medio de enquistamiento) en la oscuridad.

Al tiempo medio para la obtención del 50% de enquistamiento se llamó EN_{50} .

8. *Enzimas, colorantes y reactivos más importantes.*

Señalamos la fuente de procedencia (firma comercial) de los más importantes productos utilizados en éste trabajo:

SIGMA: Pectinasa, Celulasa, α -Glucosidasa, β -Glucosidasa, Quitinasa, Hialuronidasa, 2,2'-Dihidroxi-6,6'-dinaftil-disulfuro (DDD).

MERCK: Lisozima, α -Amilasa, Pepsina, Tripsina, Tiocarbohidracida, Ninhidrina, Corifosfina, Naranja de Acridina, Acido Periódico, Hidroquinona, Fucsina, Dodecil sulfato sódico (SDS), Tetra-acetato de etilendiamina (EDTA), Glutaraldehido, Tetróxido de osmio.

GURR: Azul Alcian 8GX, Azul de Bromofenol, Amarillo Alcian.

ANALEMA: Azul de toluidina, Azul de metileno.

DIFCO: Rojo Rápido RC, Sudan-III.

ROQUES: Proteinato de plata.

RESULTADOS

1. Descripción del quiste de resistencia de *Laurentiella acuminata*.

El quiste de resistencia de *Laurentiella acuminata* es esférico (Fig. 18), presentando un diámetro medio de $84,9 \pm 0,7 \mu$ ($n = 123$) (Fig. 19).

La superficie correspondiente a la capa más externa presenta protuberancias, en forma de espinas, que se reparten uniformemente por toda la superficie esférica del quiste. (Figs. 20, 21).

Las microelectrofotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) no revelan la presencia de ostiolos, poros o cualquier otra apertura (Figs. 20, 21) que facilite la emergencia celular al final del exquistamiento.

1.1. Pared quística.

La pared quística de *L. acuminata* presenta un espesor total aproximado de $8,4 \mu$, y está compuesta de cuatro capas (Fig. 22). La más externa o Ectoquiste tiene un espesor de aproximadamente $0,3 \mu$ y está constituida por pila de placas (Fig. 22A) de material osmiofílico. Las espinas que

Fig. 18. Micrografia *in vivo* de una población de quistes de resistencia de *Laurentiella acuminata*. 200x

Fig. 19. Poligono de frecuencias de los diámetros de una población de 123 quistes de *L. acuminata*.

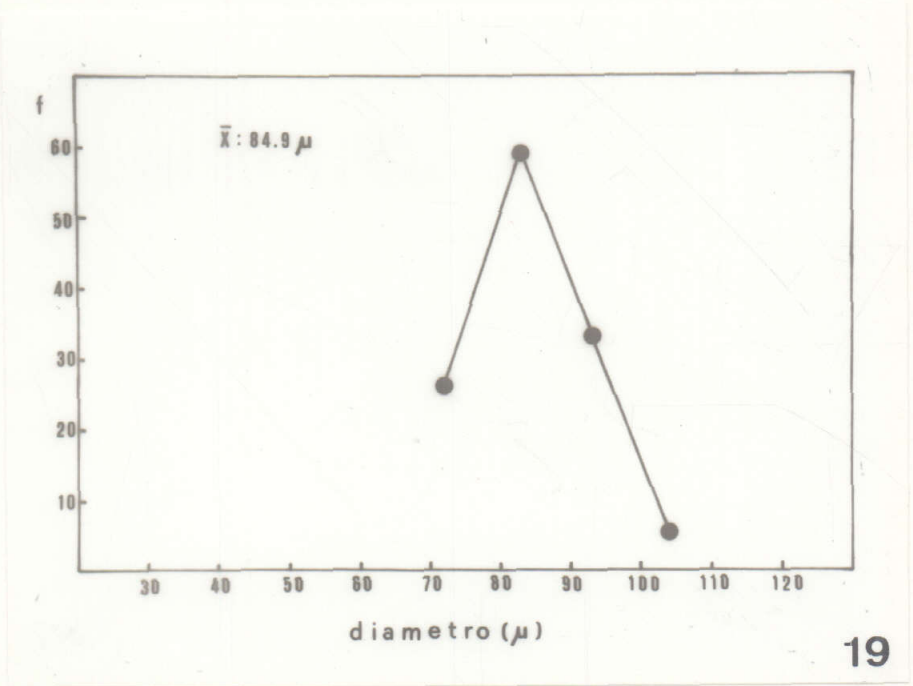
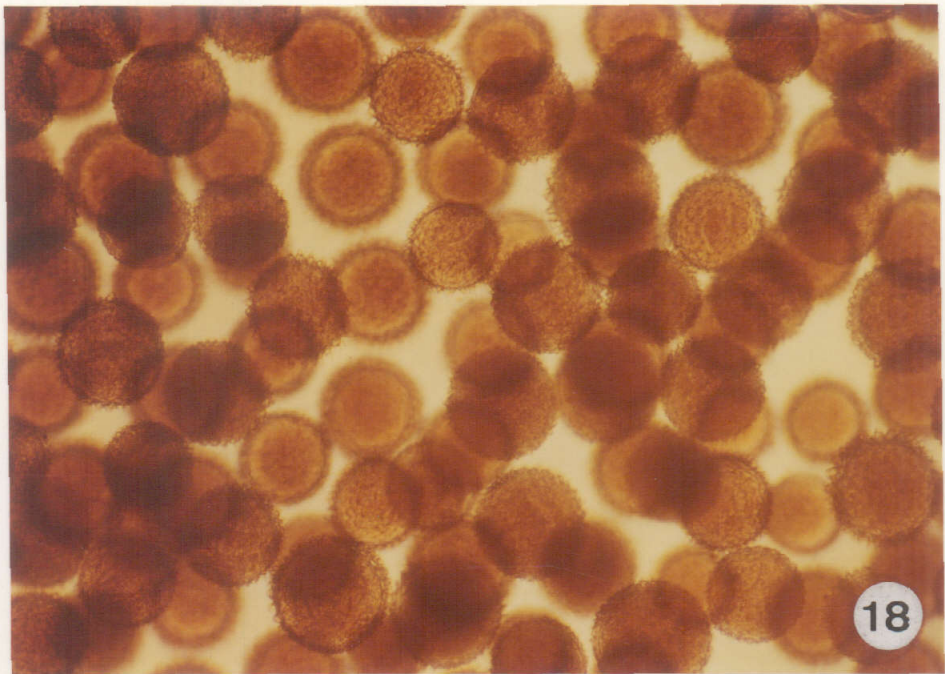


Fig. 20. Microelectrofotografía obtenida por MEB de quistes de resistencia de *L. acuminata*. 1.000x

Fig. 21. Detalle de la estructura del Ectoquiste vista por MEB en un quiste de resistencia de *L. acuminata*. 2.000x.

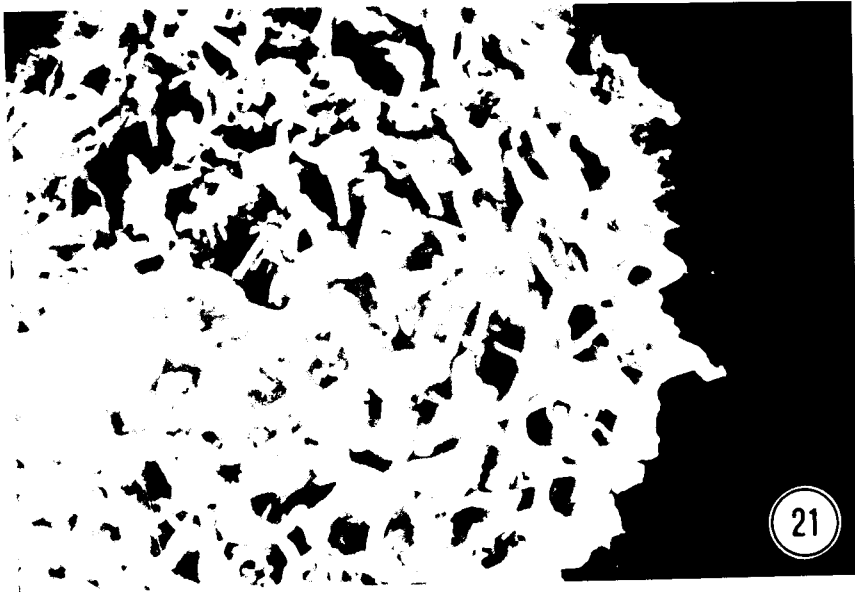
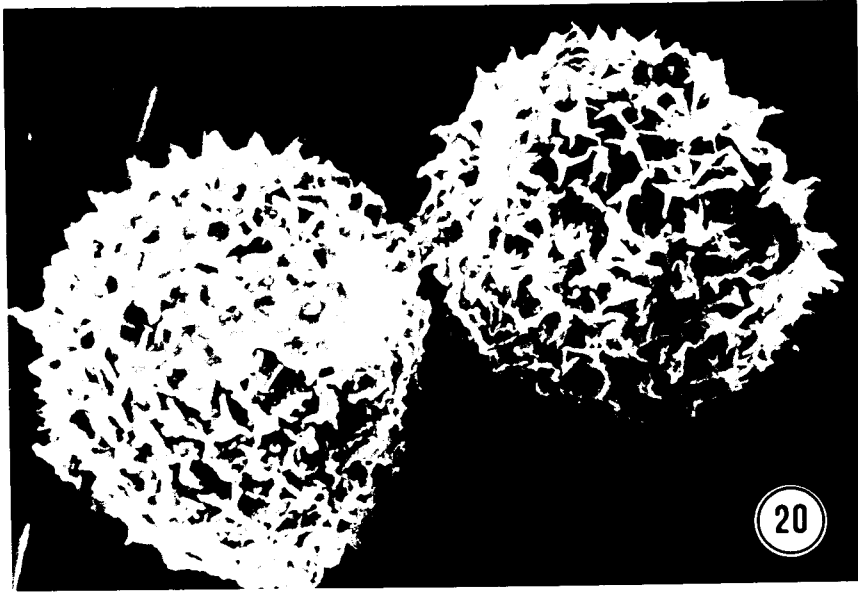
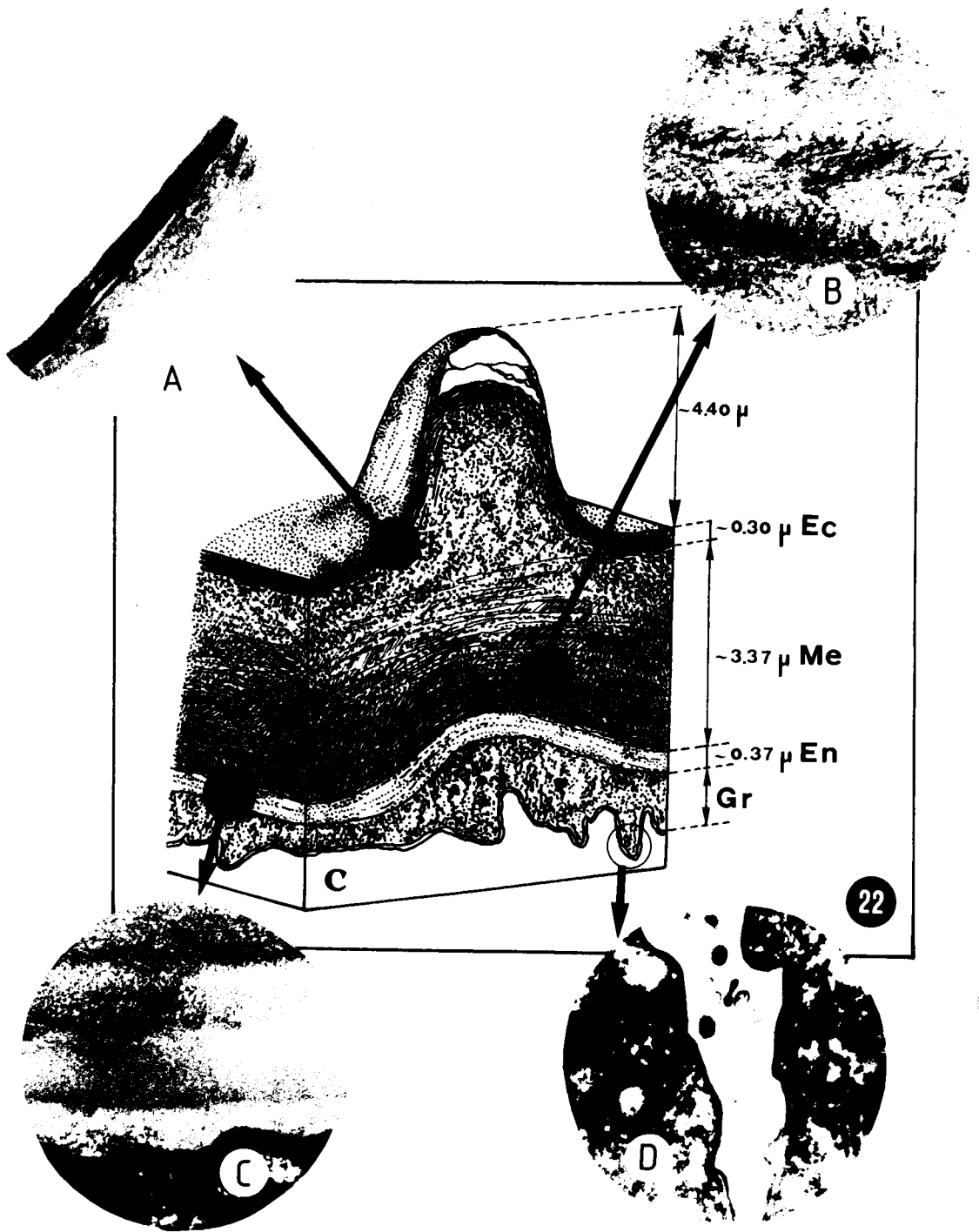


Fig. 22. Conjunto de esquema y micrografías que presentan la estructura de la pared quística de *L. acuminata*.
(A): Ectoquiste (Ec). 12.000x. (B): Mesoquiste (Me). 15.000x. (C): Endoquiste (En). 16.000x. (D): Capa Granulosa (Gr). 25.000x.



rodean todo el quiste estan formadas en parte por el ectoquiste, en ellas aparece frecuentemente un espacio vacio delimitado por placas del ectoquiste. Estas espinas tienen una longitud de aproximadamente $4,4 \mu$ (Fig. 22).

La segunda capa quistica (Mesoquiste), es la más gruesa, con $3,3 \mu$ de espesor. En ella se pueden reconocer dos zonas diferentes; la zona más externa, e inmediatamente debajo del ectoquiste, es de material fibroso azarosamente orientado embebido en una matriz relativamente electro-densa, y la zona interna, que constituye la mayor parte del mesoquiste, es también fibrosa pero estratificada (Fig. 22B). La electro-densidad del mesoquiste incrementa a medida que se aproxima a la tercera capa quistica o Endoquiste.

El Endoquiste tiene aproximadamente $0,4 \mu$ de espesor y está formado por un material electro-lúcido, altamente compacto y amorfo (Fig. 22C).

La cuarta y más interna de las capas quísticas es la llamada Capa Granulosa, la cual está constituida por un material granular disperso y fibrilar. El espesor de esta última capa quistica es muy variable ya que se forman invaginaciones o surcos de la pelicula del protozoo en donde se introduce material de esta capa (Fig. 22D). Su electro-densidad es variable.

1.2. *Citoplasma quístico.*

El quiste de resistencia es un estado diferenciado que se caracteriza por presentar un alto grado de deshidratación y una considerable reducción del volumen celular, concomitante con ello los orgánulos celulares sufren una serie de transformaciones durante el enquistamiento:

El quiste de *L. acuminata* presenta una sólo masa macronuclear con grandes cuerpos heterocromáticos (Fig. 23A, B), resultado del alto grado de condensación cromatínica que las, generalmente, cuatro masas macronucleares del vegetativo experimentan durante el enquistamiento.

Las mitocondrias no se agrupan en complejos mitocondriales, sino que existe una degeneración mitocondrial, al menos parcial, durante el enquistamiento (Fig. 24).

El citoplasma quístico es rico en RER (retículo endoplasmático rugoso), no observándose complejos ribosómicos cristalinos. Existen numerosas inclusiones lipídicas y de paraglucógeno (Fig. 25).

Al igual que en otros quistes de hipotricos se presentan numerosas vacuolas líticas, con diferentes orgánulos en su interior. A veces, aparecen estructuras paracrystalinas, posiblemente de naturaleza proteica, originadas por la deshidratación citoplasmica. (Fig. 26A, B).

2. *Citoquímica de las paredes quísticas.*

El análisis citoquímico de las paredes quísticas ha sido abordado a dos niveles; a nivel de pared aislada y al de corte semifino.

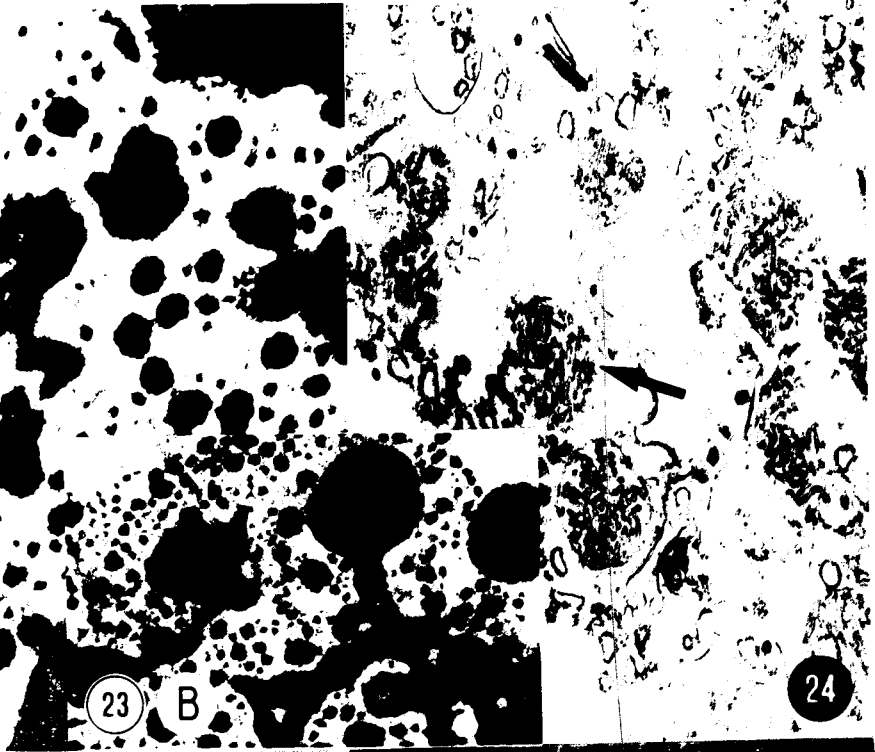
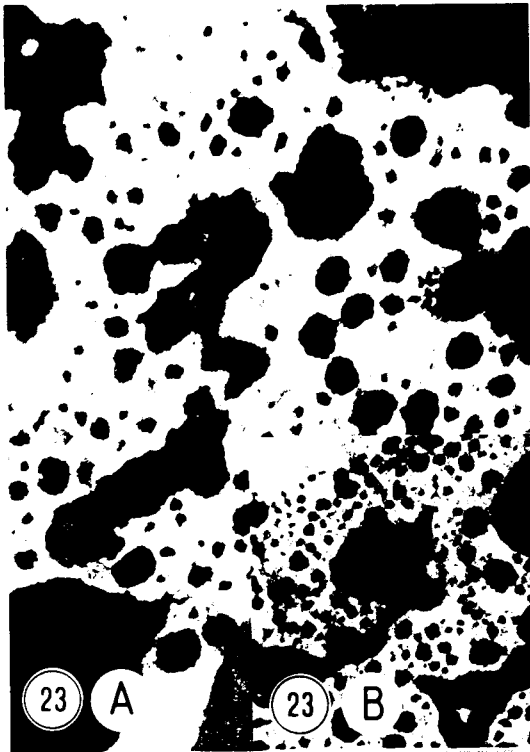
De la aplicación del método de aislamiento de paredes especificado dentro del apartado de Materiales y Métodos, se obtienen dos unidades estructurales diferentes, que presumiblemente se corresponden con el Ectoquiste y el Endoquiste. (Figs. 27, 28). Estas dos unidades han sido tratadas como se especifica, igualmente, en dicho apartado, y sometidas a

Fig. 23. Aspecto de la cromatina condensada del macronúcleo quítico. (A): 6.000x. (B): 4.000x.

Fig. 24. Lisis mitocondrial durante el Enquistamiento (flecha). 12.000x.

Fig. 25. Inclusiones de paraglucógeno. Reacción del PATAg. 8.000x.

Fig. 26. Estructura paracrystalina. (A): 20.000x. (B): Detalle. 40.000x.



24

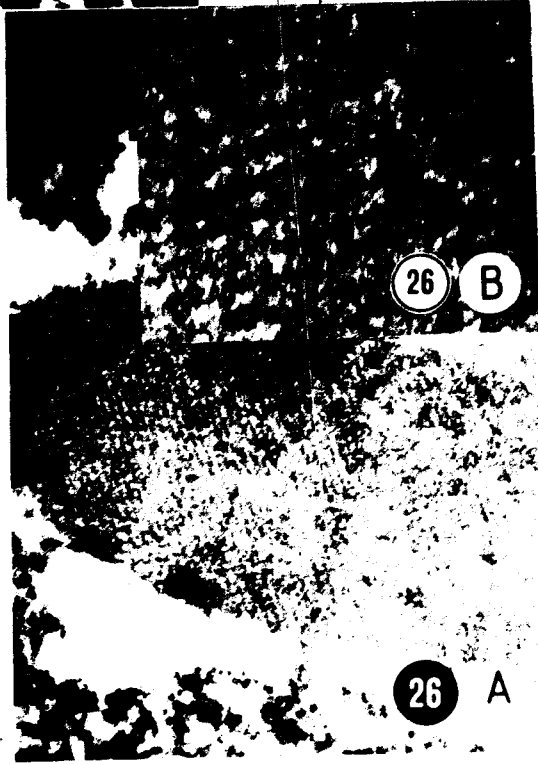
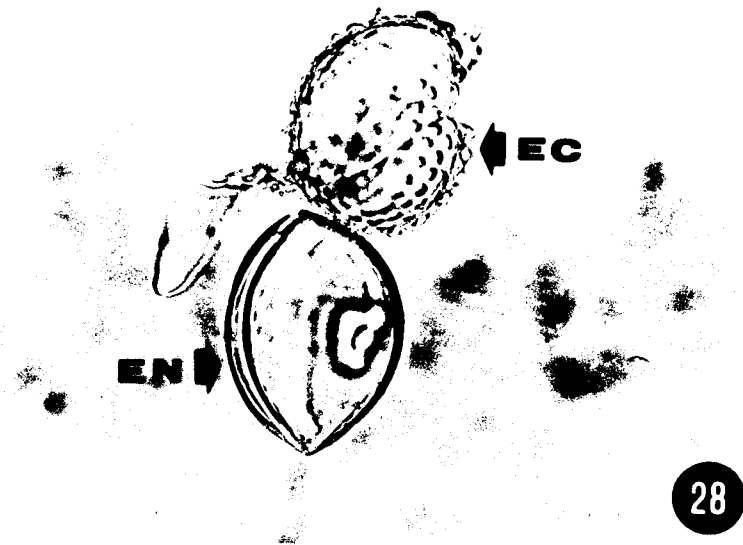
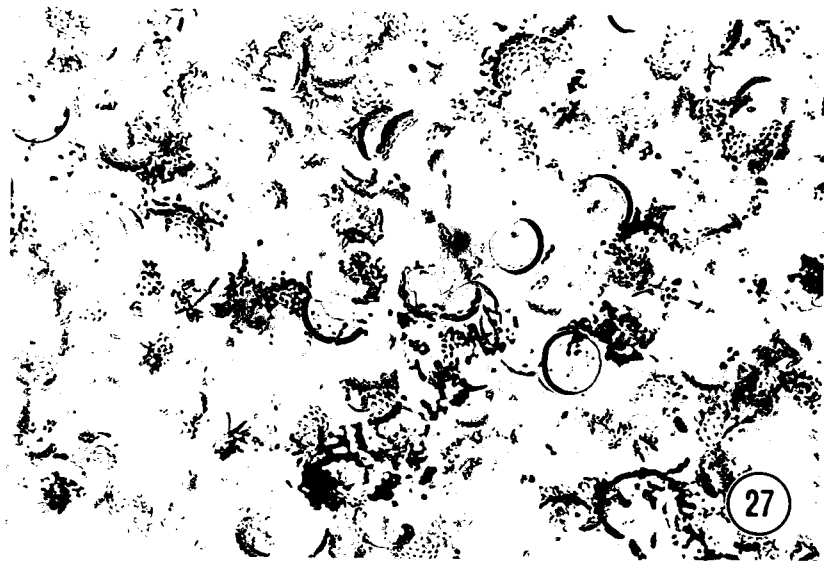


Fig. 27. Suspensión de paredes aisladas. 200x.

Fig. 28. Unidades estructurales aisladas correspondientes al Ectoquiste (Ec) y el Endoquiste (En). 400x.



diferentes métodos citoquímicos para detección de Carbohidratos, Proteínas y Lípidos.

El uso de estructuras aisladas nos ha facilitado el estudio microespectrofotométrico, complementario y cuantitativo, determinando la longitud de onda en donde se alcanzaba la máxima absorción, hecho que objetiviza el color observado y la posibilidad de cuantificar pérdidas o incrementos de coloración debido a diferentes tratamientos químicos o enzimáticos y sus comparaciones con los controles.

Por otro lado, el uso de cortes semifinos nos ha facilitado la identificación y localización correcta de los distintos componentes de la pared quística según su respuesta a determinadas pruebas citoquímicas.

2.1. *Citoquímica en paredes quísticas aisladas.*

2.1.1. *Carbohidratos.*

La reacción más conocida para la detección de mucosustancias neutras y algunas ácidas (PEARSE, 1968) es la reacción del PAS (Periodic Acid Schiff).

El espectro de absorción correspondiente al endoquiste aislado se muestra en la Fig. 29, en dicho espectro se obtiene un máximo a 525 nm, longitud de onda que se ha empleado posteriormente para todas las medidas que implicaban el método del PAS.

En la Tabla-XIII y Fig. 30 se muestran los resultados obtenidos, al realizar un control de especificidad. Este ensayo se realizó sólo en la estructura endoquística ya que el ectoquiste daba una absorbancia muy baja, por bloqueo de grupos hidroxilos en glicoles-1,2, usando la mezcla anhídrido acético-piridina.

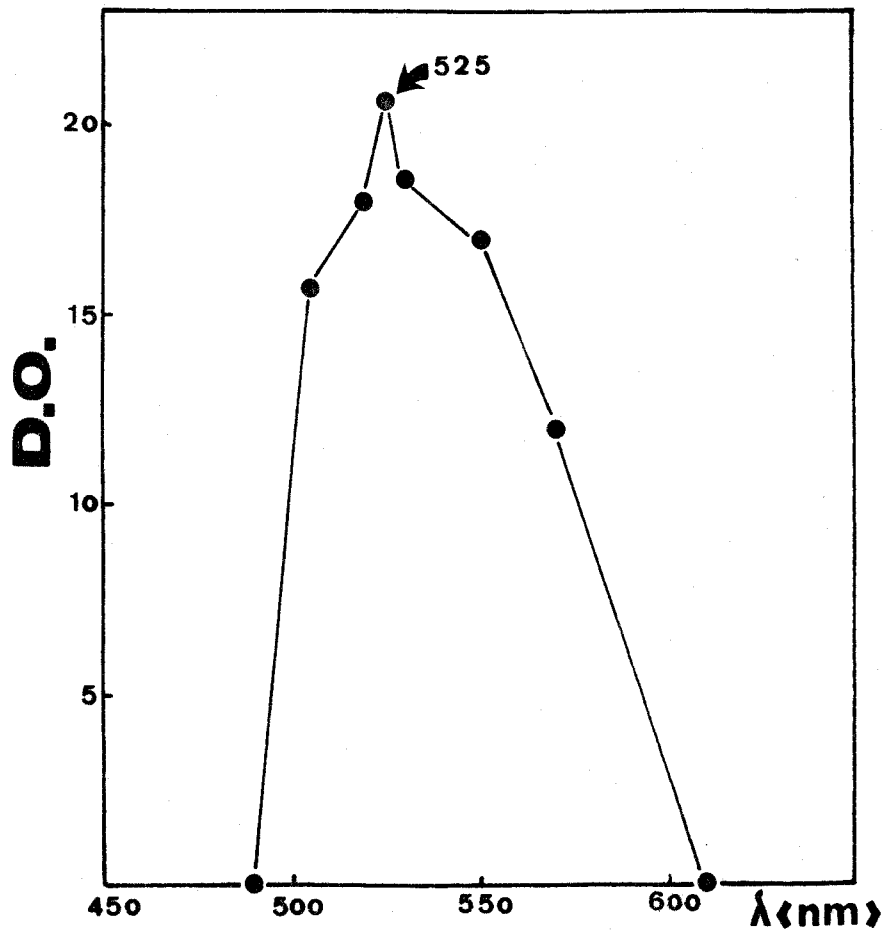


Fig. 29. Espectro de absorción del PAS medido sobre un elemento endoquistico. Máximo presentado: 525 nm (D.O.): en unidades arbitrarias.

TABLA-XIII. Prueba del PAS y control en paredes aisladas. Medidas citofotométricas ($\lambda:525$ nm).

PRUEBA	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
PAS	1M	5M
DO/Area	0,58 (n=32)	2,63 (n=32) (1)
σ_n	0,075	0,274

CONTROL DE ESPECIFICIDAD

	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
Acetilación		
DO/Area	-	1,13 (n=25) (2)
σ_n	-	0,364
Saponificación (KOH)		
DO/Area	-	1,76 (n=30) (3)
σ_n	-	0,288

El contraste de medias entre (1) y (2) dá un valor de $t=9,93$; $gl=55$ y $p \leq 0,01$. Siendo la diferencia significativa.

El contraste de medias entre (1) y (3) dá un valor de $t=5,61$; $gl=60$ y $p \leq 0,01$. Siendo la diferencia significativa.

Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

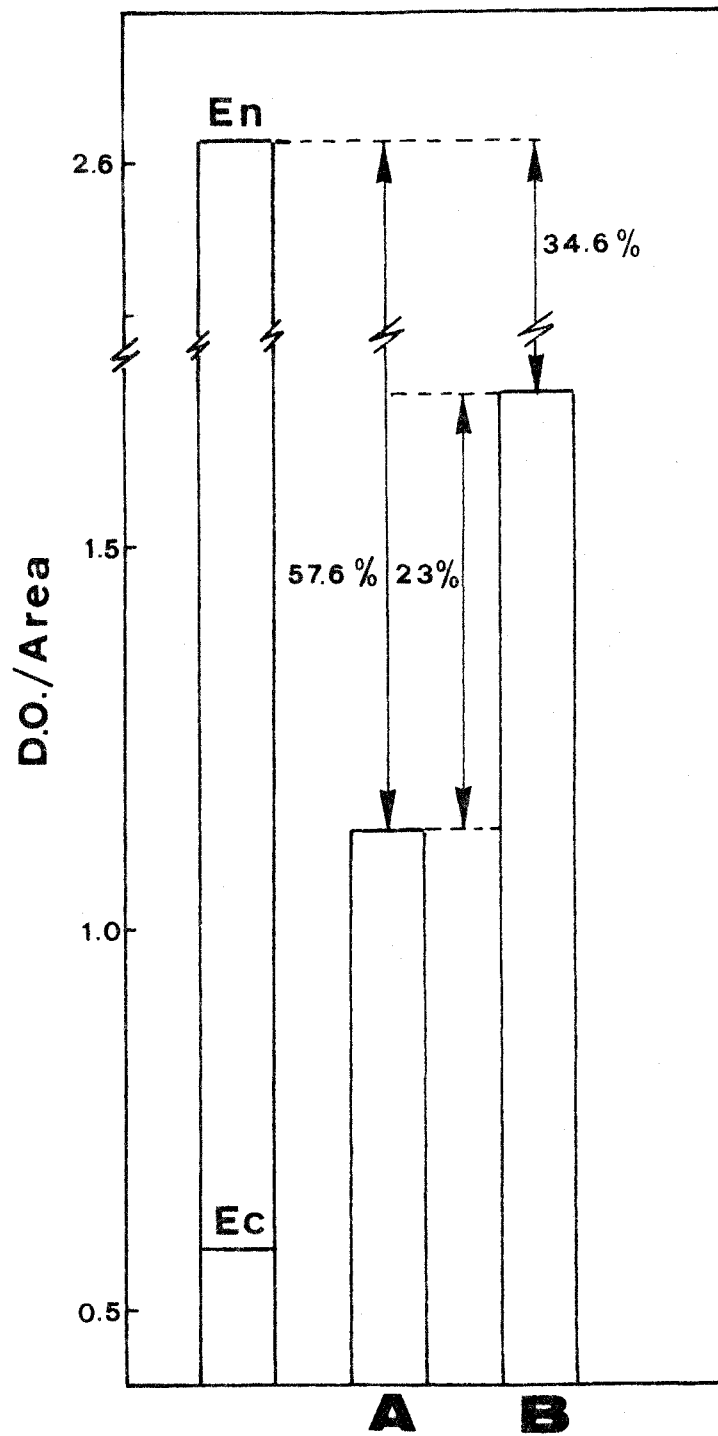


Fig. 30. Control de especificidad del PAS en elementos endoquísticos. A: acetilación; B: saponificación. En: endoquiste; Ec: ectoquiste.

Observandose una disminución en la coloración, que significa una pérdida del 57,6% respecto del control. La recuperación o reversibilidad del proceso se obtuvo tratando con KOH, obteniéndose un valor que recuperaba sólo el 23% del color perdido (Tabla-XIII).

Para la detección de mucopolisacáridos (MPS) ácidos y su diferenciación respecto a los neutros, se realizaron pruebas citoquímicas que abarcan tres puntos básicos:

- 1- Utilización simple de colorantes en solución y métodos de coloraciones combinadas.
- 2- Utilización de las propiedades metacromáticas de ciertos colorantes básicos.
- y 3- Investigación de las características de basofilia a diferentes pHs.

Dentro del primer y tercer grupo, se ha utilizado el método de coloración combinada PAS-AA (azul alcian) y AA-AmA (amarillo alcian) a diferentes pHs, y la coloración simple AA a diferentes pHs.

Como es importante diferenciar las distintas coloraciones, ya tomen uno de los dos colorantes empleados o ambos; se determinaron los espectros de absorción de las diferentes estructuras estudiadas y para las distintas pruebas. Los máximos obtenidos se muestran en la Fig. 31. Estos resultados se complementan con los expuestos en la Tabla-XIV.

Se ha realizado también, en el caso del AA, un estudio diferencial de MPS ácidos y control por bloqueo específico, utilizando la metilación que bloquea los grupos carboxílicos, y elimina los grupos sulfatos (desulfatación), seguida de saponificación con KOH.

En el estudio de las propiedades metacromáticas, se han seguido los dos criterios señalados por PEARSE (1968);

TABLA-XIV. *Otras pruebas citoquímicas para
MPS sobre paredes aisladas.*

PRUEBA	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
PAS-AA (pH 2,5)	A	P
PAS-AA (pH 1)	A	P
PAS-AA (pH 0,5)	M	P
AmA (pH 2,5)	Amp	Amp
AA(pH 1) - AmA(pH 2,5)	Vp	Vp
AA(pH 0,5) - AmA(pH 2,5)	Amv	Amv

AA(pH 2,5)	2A	3A
AA(pH 1)	±1A	2A
AA(pH 0,5)	±1A	2A
Metilación-AA(pH 2,5)	-	-
Met-Sap-AA(pH 2,5)	2A	3A

AA: azul alcian; AmA: amarillo alcian; A: azul; P: púrpura
M: magenta; Amp: amarillo pálido; Vp: verde pálido; Amv:
amarillo verdoso. (-): negativo.

Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

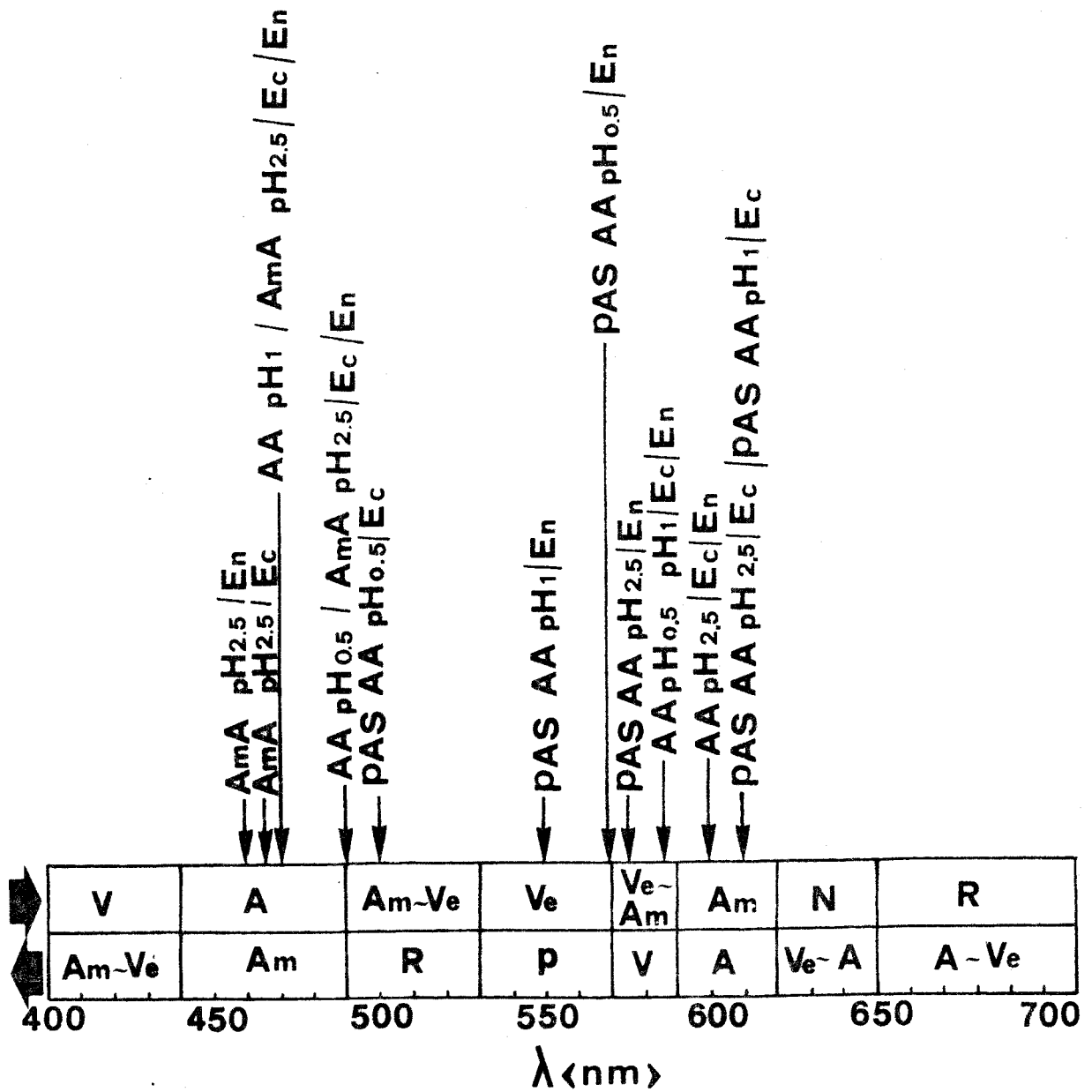


Fig. 31. Longitudes de onda de los máximos obtenidos de diferentes coloraciones combinadas. (▶): color absorbido (◀): color desprendido; AA: azul alcian; AmA: amarillo alcian; Ec: ectoquiste; En: endoquiste. V: violeta; Am: amarillo; A: azul; Ve: verde; R: rojo; P: púrpura; N: naranja.

a)- Un cambio del máximo de absorción del colorante hacia longitudes de onda más cortas, y b)- Una disminución en el coeficiente de extinción en el máximo de absorción.

Los resultados obtenidos de los espectros de absorción tanto del ectoquiste como del endoquiste y su comparación con la ortocromasia que presenta el citoplasma quístico se muestran en la Fig. 32. Se recorrió un rango de pHs de 6-0,5 (Tabla-XV), y se observó que a partir de un pH ≤ 3 se pierde el caracter metacromático. La clase de metacromasia presentada en los dos tipos estructurales estudiados es del tipo- β ya que la absorción del complejo "colorante-elemento celular" corresponde al violeta como color visible. En todos los casos esta metacromasia no resiste la deshidratación alcohólica (Tabla-XV).

Otro procedimiento para poder diferenciar distintos tipos de MPS ácidos e incluso de otras macromoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos, es la basofilia a diferentes pHs, obteniéndose lo que se llama el "punto de extinción del AM (azul de metileno)" (M.B.E.), los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla-XVI. En la que puede apreciarse que la coloración, en general, para todos los pHs utilizados es débil, pero el correspondiente a pH 4, MPS ácidos no sulfatados, es nula.

Hay ciertos fluorocromos que pueden ser útiles para detectar MPS ácidos, como son el Naranja de Acridina y las Fosfinas. El primero posee la propiedad de precipitar los MPS ácidos, mientras que la Corifosfina (pH 4) se fija sobre los MPS sulfatados. Los resultados del empleo de estos dos fluorocromos se muestran en la Tabla-XVII. En ambos casos la fluorescencia era bastante débil.

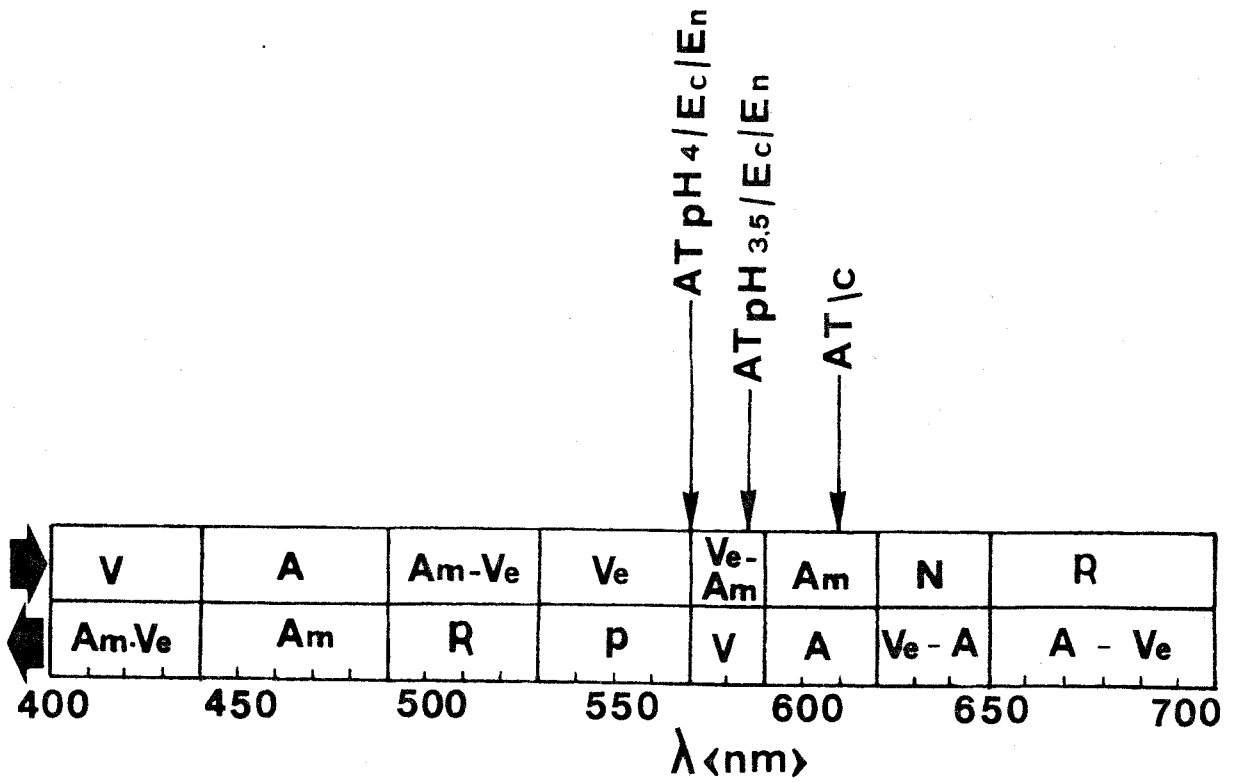


Fig. 32. Longitudes de onda de los máximos obtenidos en la Metacromasia. (▶): color absorbido; (◀): color desprendido. AT: azul de toluidina; C: citoplasma; Ec: ectoquiste; En: endoquiste; V: violeta; Am: amarillo; A: azul; Ve: verde; R: rojo; P: púrpura; N: naranja.

TABLA-XV. *Pruebas de Metacromasia en paredes aisladas.*

pH del AT	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
5-6*	β (V)	β (V)
4*	β (V)	β (V)
3,5*	β (V)	β (V)
3	-	-
2	-	-
1	-	-
0,5	-	-

(*) : No resistieron a la deshidratación alcohólica.

(-) : negativo; AT: azul de toluidina; V: violeta.

TABLA-XVI. *Pruebas del punto de extinción del AM (M.B.E).*

pH	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
5	±1A	±1A
4	-	-
2,9	1A	1A

AM: azul de metileno; A: azul; (-): negativo.

Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

TABLA-XVII. *Pruebas con fluorocromos
en paredes quísticas aisladas.*

<u>FLUOROCROMO</u>	<u>ECTOQUISTE</u>	<u>ENDOQUISTE</u>
Corifosfina (pH 4) Naranja de	fl. naranja	fl. naranja
Acridina.	fl. verde	fl. verde

fl: fluorescencia.

La última prueba realizada sobre paredes aisladas dentro del grupo de los Carbohidratos, que igualmente nos sirve para diferenciar mucosustancias con grupos aniónicos del tipo $-\text{COO}^-$, $-\text{OSO}_3^-$, y $=\text{PO}_4^-$, es la alcianofilia a concentración crítica de electrolitos (SCOTT & DORLING, 1965). La sal empleada fué el Cl_2Mg en un rango de molaridad de 0,0 a 1,0 M. En la Tabla-XVIII, se muestran los resultados obtenidos para el ectoquiste y el endoquiste. Para el ectoquiste, a partir de una molaridad de $\text{Cl}_2\text{Mg} \geq 0,4$ M no se observa coloración alguna, no ocurriendo así en el caso del endoquiste.

Debido al interes de esta prueba, se ha realizado una cuantificación citofotométrica de muestras de endoquiste en toda la escala de concentraciones de Cl_2Mg . Para ello, en primer lugar se obtuvo el espectro de absorción (Fig. 33) que presentó un máximo a 600 nm, estando dicha longitud de onda dentro del rango del azul como color visible.

Las medidas de la absorbancias de poblaciones endoquísticas cuyo tamaño oscilaban entre 14 y 35 unidades se muestran en la Fig. 34. Se hicieron controles de carboxilación, fosforilación y sulfatación artificiales para comparar sus absorbancias con las obtenidas de las muestras sin tratamiento previo de carboxilación, fosforilación o sulfatación. Con respecto a la primera, contrastando las medidas obtenidas para ambas poblaciones, se obtiene un valor para el test estadístico de la t de student; $t = 3,05$, con 51 grados de libertad, lo que permite concluir que existe diferencia significativa al nivel de $p \leq 0,01$. En el caso de la fosforilación, realizada a una concentración 0,1 M de Cl_2Mg , se obtiene un valor de $t = 0,5$, con 42 grados de libertad, siendo no significativa la diferencia al nivel de $p > 0,05$. Y por último, para el caso de la sulfatación, realizado a una concentración 1M de Cl_2Mg , se obtuvo un

TABLA-XVIII. Prueba de la alcianofilia a concentración crítica de electrolitos en paredes quísticas aisladas.

Cl_2Mg (M)	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
0,0	2A	5A
0,1	2A	3A
0,2	±2A	2A
0,3	±2A	2A
0,4	-	3A
0,5	-	2A
0,6	-	2A
0,7	-	2A
0,8	-	2A
0,9	-	1A
1,0	-	1A

A: azul; (-): negativo. Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

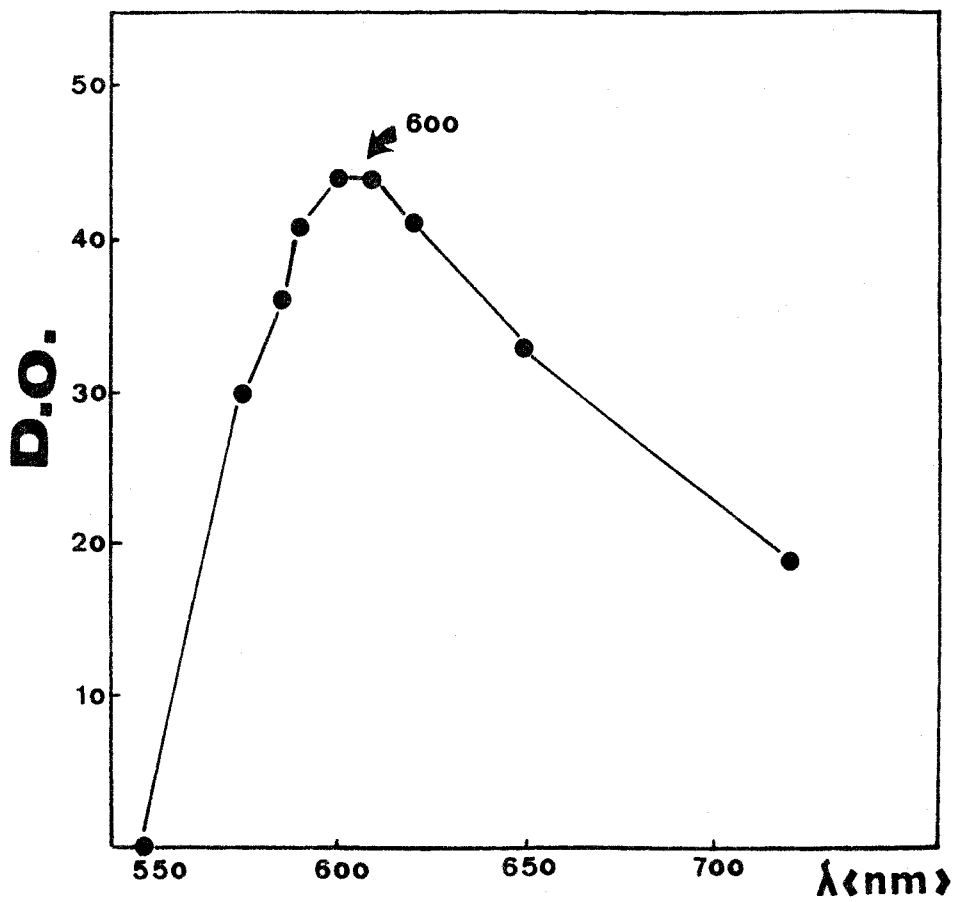
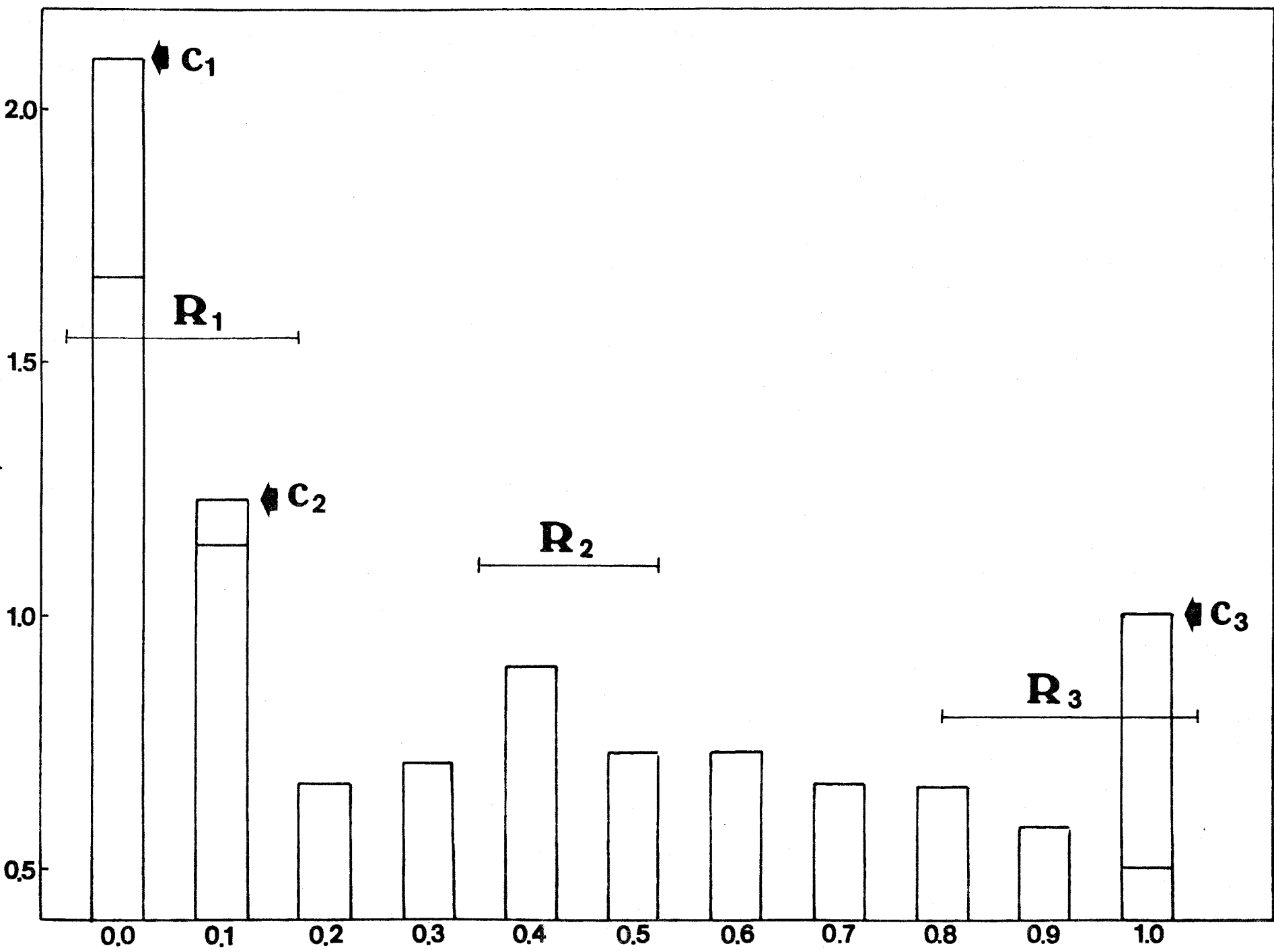


Fig. 33. Espectro de absorción del Azul Alcian (CCE) Máximo a 600 nm. (D.O.): en unidades arbitrarias.

Fig. 34. Alcianofilia del elemento endoquístico a C.C.E.

C₁: control de carboxilación; C₂: control de fosforilación

C₃: control de sulfatación.; R₁: rango de detección de grupos $-\text{COO}^-$ y $=\text{PO}_4^-$; R₂ y R₃: rango de detección de grupos $-\text{OSO}_3^-$.



valor de $t = 5,32$, con 62 grados de libertad, existiendo diferencia significativa al nivel de $p \leq 0,01$.

2.1.2. *Proteínas y Lípidos.*

Un método para identificación de grupos aminos en proteínas, es la desaminación oxidativa (Ninhidrina-Schiff) (PEARSE, 1968). Los resultados de la aplicación de éste método en las paredes quísticas aisladas se muestran en la Tabla-XIX. Igualmente, en dicha tabla, se muestran los resultados negativos de presencia de lípidos en ambas estructuras.

En las micrografías de las Figs. 35 a 42, se muestran algunas pruebas citoquímicas sobre paredes aisladas.

2.2. *Citoquímica sobre cortes semifinos.*

La citoquímica sobre cortes semifinos de quistes de resistencia nos facilita la identificación a nivel de capa quística de la presencia/ausencia de los diferentes grupos ya detectados sobre las paredes aisladas.

En el esquema de la Fig. 43 se resume los resultados obtenidos sobre la pared quística, junto con tres pruebas básicas de detección de proteína, carbohidrato y lípido en el citoplasma quístico.

En las Figs. 44 a 47 se ilustran algunos ejemplos de resultados citoquímicos sobre cortes semifinos.

TABLA-XIX. *Pruebas citoquímicas para proteínas y lípidos en paredes aisladas.*

<u>PRUEBA</u>	<u>ECTOQUISTE</u>	<u>ENDOQUISTE</u>
Ninhidrina-Schiff	1M	2M
Lípidos (Sudan-III)	-	-
Lípidos enmascarados (Sudan-III)	-	-

M: magenta; (-): negativo.

Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

Fig. 35. Reacción del PAS sobre paredes aisladas. 400x.

Fig. 36. Reacción del PAS-AA (pH 1) sobre paredes aisladas. 400x.

Fig. 37. Reacción del PAS-AA (pH 2,5) sobre paredes aisladas. 400x.

Fig. 38. Reacción de la Ninhidrina-Schiff sobre paredes aisladas. 400x.

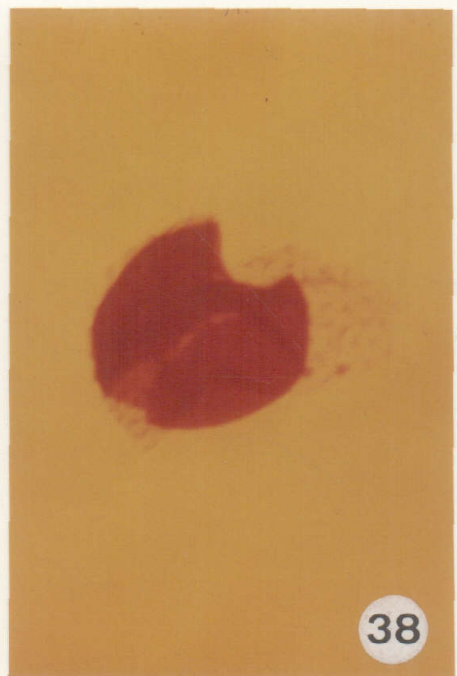
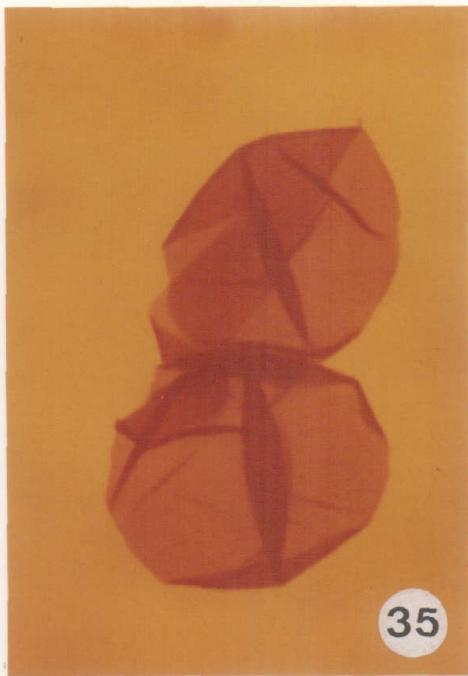


Fig. 39. Alcianofilia a concentración crítica de electrolitos (Cl_2Mg 0,1M), sobre endoquiste. 400x.

Fig. 40. Alcianofilia a concentración crítica de electrolitos (Cl_2Mg 0,3M), sobre endoquiste. 400x.

Fig. 41. Alcianofilia a concentración crítica de electrolitos (Cl_2Mg 0,7M), sobre endoquiste. 400x.

Fig. 42. Alcianofilia a concentración crítica de electrolitos (Cl_2Mg 1,0M), sobre endoquiste. 400x.

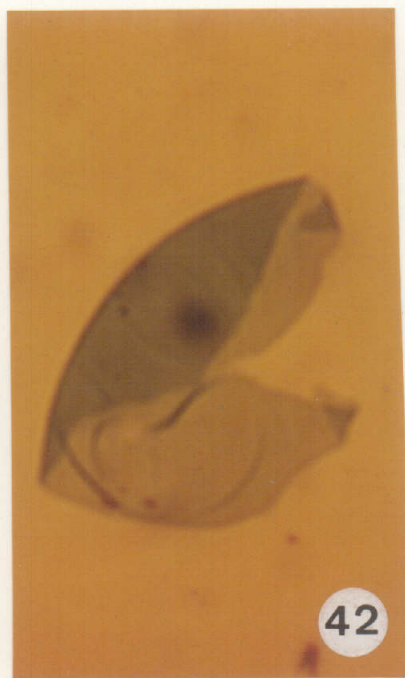
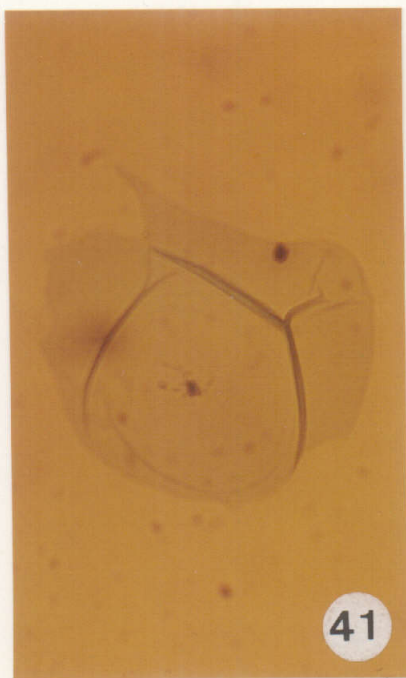
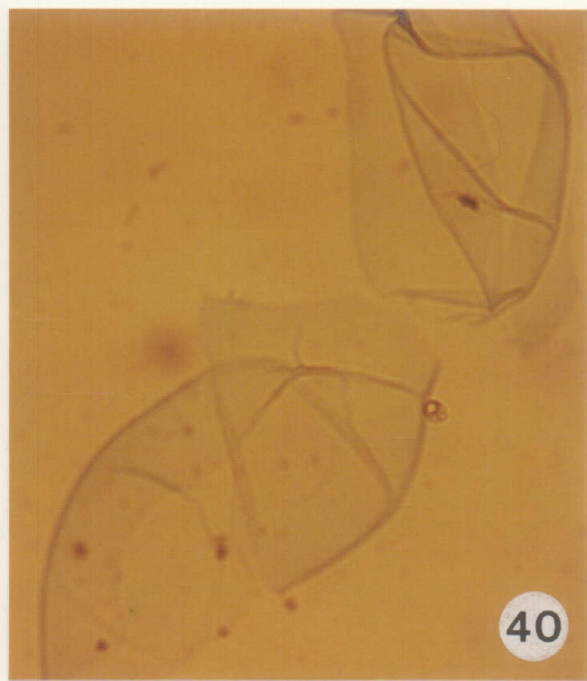


Fig. 43. Esquema resumen de las distintas pruebas citoquímicas realizadas sobre cortes semifinos de quistes de resistencia de *L. acuminata*.

	PRUEBA	RESULTADO
ECTOQUISTE	PAS	2M
	Acetilación-PAS	1M
	Acet-Sap-PAS	2M
	PAS-AA(pH 2,5)	A
	PAS-AA(pH 1)	M
	PAS-AA(pH 0,5)	M
	AT(pH 4)	βV
	AT(pH 3)	-
	Ninhidrina-Schiff	1M
	Cl ₂ Hg-AB	A oscuro
	Grupos-SH libres	1R
Lípidos (Sudan-III)	-	
MESOQUISTE	PAS	-
	PAS-AA(pH 2,5)	-
	PAS-AA(pH 1)	-
	PAS-AA(pH 0,5)	-
	AT(pH 4)	-
	AT(pH 3)	-
	Ninhidrina-Schiff	1M*
	Cl ₂ Hg-AB	A claro
	Grupos-SH libres	-
Lípidos (Sudan-III)	-	

M: magenta; A: azul; R: rojo; AB: azul de bromofenol;
 (*): gradiente de coloración hacia el interior.
 Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

	PRUEBA	RESULTADO
ENDOQUISTE	PAS	5M
	Acetilación-PAS	2M
	Acet-Sap-PAS	3M
	PAS-AA(pH 2,5)	P
	PAS-AA(pH 1)	P
	PAS-AA(pH 0,5)	P
	AT(pH 4)	βV
	AT(pH 3)	-
	Ninhidrina-Schiff	2M
	Cl ₂ Hg-AB	A oscuro
	Grupos-SH libres	2R
Lípidos (Sudan-III)	-	
GRANULOSA	PAS	5M
	Acetilación-PAS	2M
	Acet-Sap-PAS	3M
	PAS-AA(pH 2,5)	P
	PAS-AA(pH 1)	P
	PAS-AA(pH 0,5)	P
	AT(pH 4)	βV
	AT(pH 3)	-
	Ninhidrina-Schiff	1M
	Cl ₂ Hg-AB	A claro
	Grupos-SH libres	-
Lípidos (Sudan-III)	-	
CITOPLASMA QUISTICO	PAS	5M
	Ninhidrina-Schiff	3M
	Lípidos (Sudan-III)	Marrón-rojizo

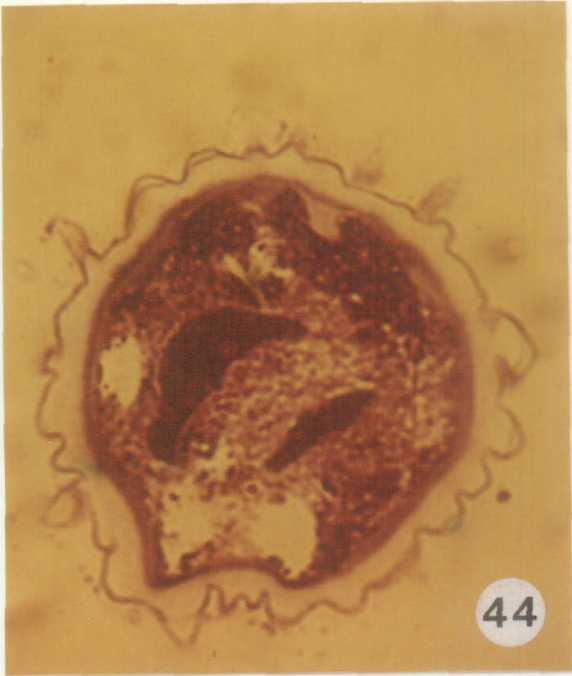
M: magenta; A: azul; P: púrpura; R: rojo; V: violeta.
Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

Fig. 44. Azul de toluidina. 400x.

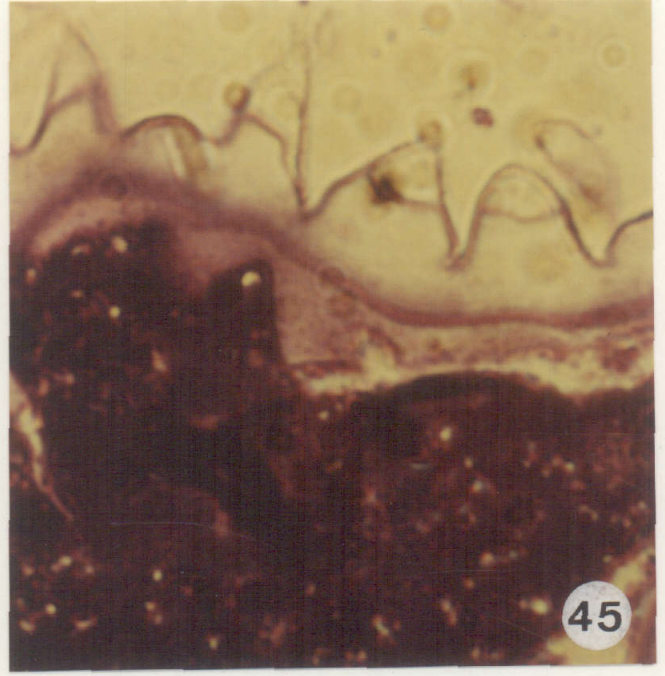
Fig. 45. Azul de toluidina. 1000x.

Fig. 46. Reacción del PAS. 1000x.

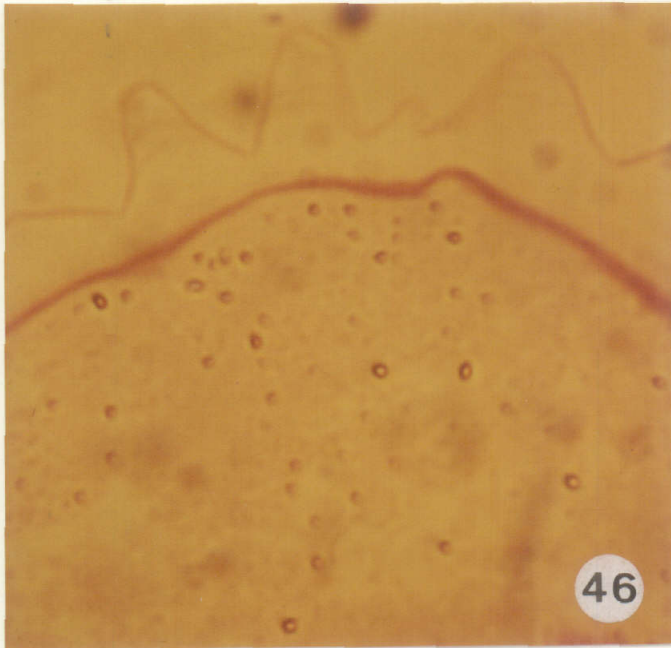
Fig. 47. Reacción del PAS-AA (pH 2,5). 1000x.



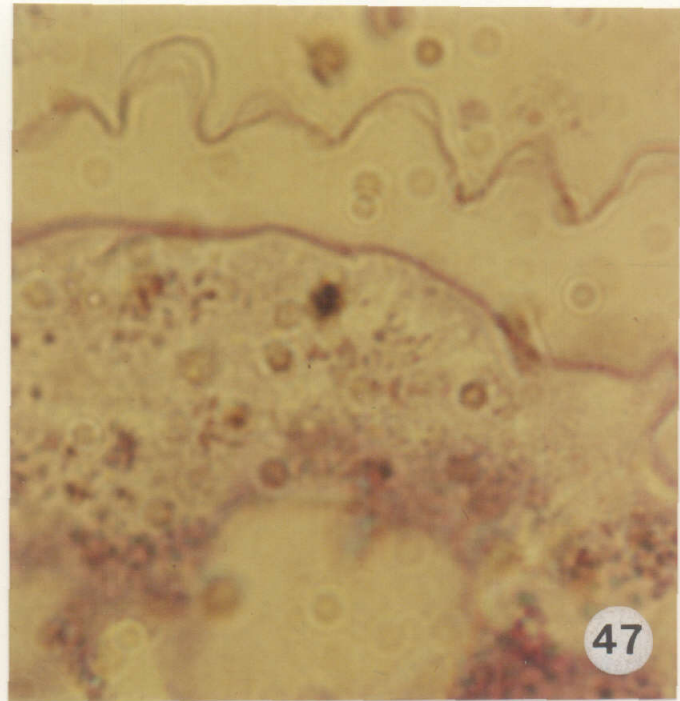
44



45



46



47

2.3. *Estudio diferencial de MPS y de otras macromoléculas por hidrólisis enzimática.*

Otra forma de abordar el estudio de la naturaleza de una estructura biológica es empleando reactivos o enzimas que se suponen pueden actuar sobre ella degradandola.

En este caso el estudio combinado de la citoquímica y la actividad enzimática, junto con la cuantificación citofotométrica, completa el estudio puramente citoquímico realizado anteriormente. El estudio se ha enfocado esencialmente hacia los carbohidratos, y sólo algunos han podido ser cuantificados atendiendo a sus variaciones en la coloración. En todos los casos se utilizaron paredes aisladas.

En la Tabla-XX, se muestran algunos resultados obtenidos del tratamiento con algunos enzimas sobre la tinción del PAS y el AA (pH 2,5). No se observan diferencias respecto del control, sin tratamiento, en ningún caso de las enzimas utilizadas. En lugar de la Neuraminidasa se usó el ClH 0,1 N que tiene el mismo efecto lítico. Se aprecian diferencias en los dos últimos casos de tratamientos previos con SDS (dodecil sulfato sódico) y EDTA (etilendiamina-tetraacetato).

En cuanto al estudio citofotométrico se han usado las siguientes enzimas glicósido hidrolasas; α - y β -Glucosidasa Celulasa, Quitinasa, Lisozima e Hialuronidasa. En la Fig. 48 se muestran los cambios en la absorbancia experimentados por los diferentes tratamientos enzimáticos, tanto en la estructura ectoquística como en la endoquística. En todos los casos se usó el PAS como tinción a medir, excepto para la Hialuronidasa que se utilizó el AA (pH 2,5).

TABLA-XX. *Diferentes pruebas de modificación citoquímica en paredes aisladas tras tratamiento con distintos enzimas y reactivos.*

PRUEBA	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
PAS	2M	5M
α -Amilasa-PAS	2M	5M
Pectinasa-PAS	2M	5M

AA(pH 2,5)	2A	3A
Hialuronidasa-AA(pH 2,5)	2A	3A
CLH 0,1N-AA (pH 2,5)	2A	3A
SDS(5%)-AA(pH 0,5)	\pm 1A	5A
EDTA(1%)-AA(pH 0,5)	\pm 1A	2A

M: magenta; A: azul; AA: azul alcian.

Intensidad: escala arbitraria de 1-5.

Fig. 48. Estudio de lisis enzimática por un conjunto de glucósido hidrolasas y su cuantificación citofotométrica. En: endoquiste; Ec: ectoquiste; C: control (PAS); L₁: Lisozima (2h); L₂: Lisozima (2h)+ClNa; L₃: Lisozima (>3h); L₄: Lisozima (>3h)+ClNa; α-G: α-Glucosidasa (2 y 4h); β-G: β-Glucosidasa; Cl: celulasa (2h); Q: quitinasa (1-23h).

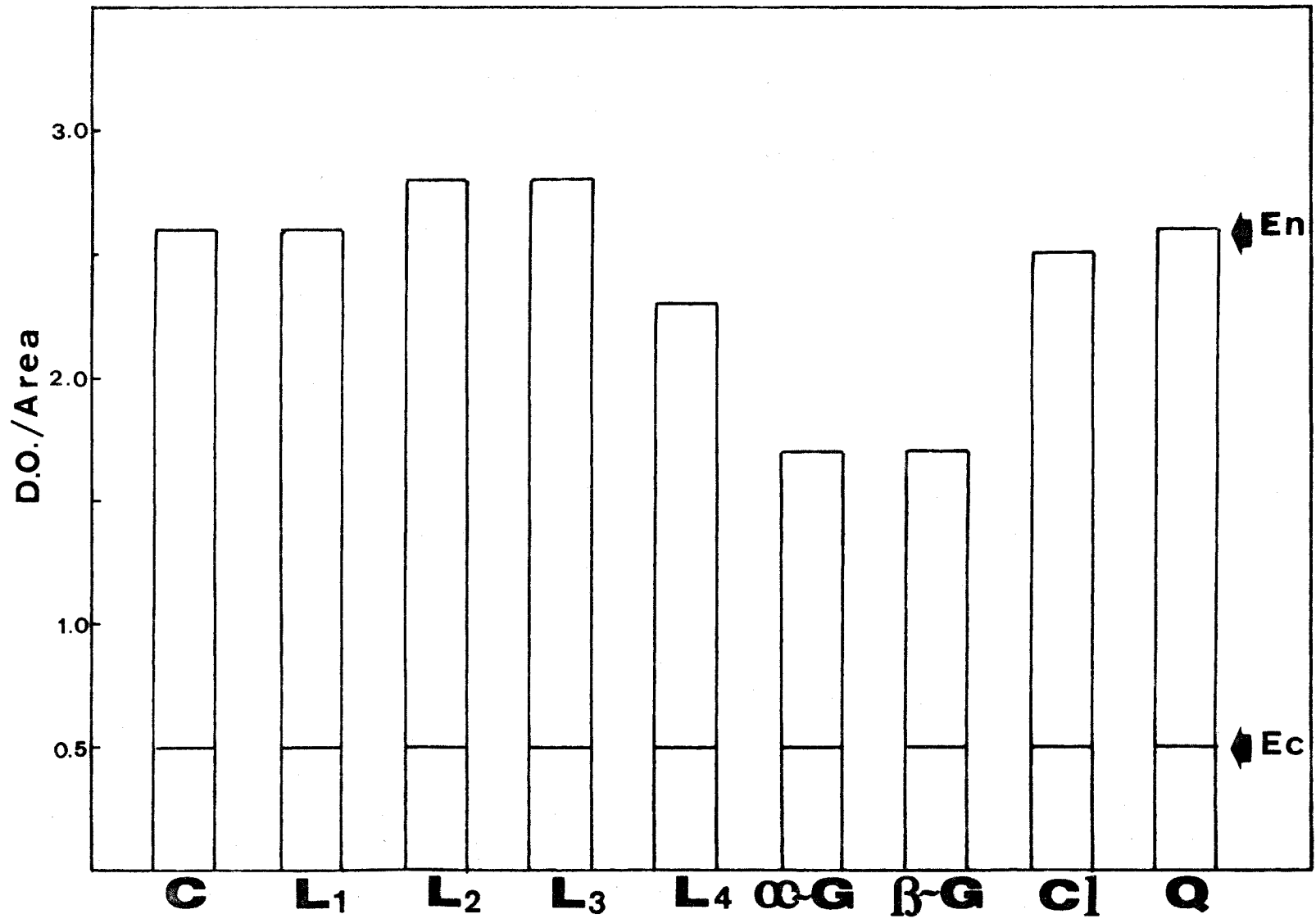
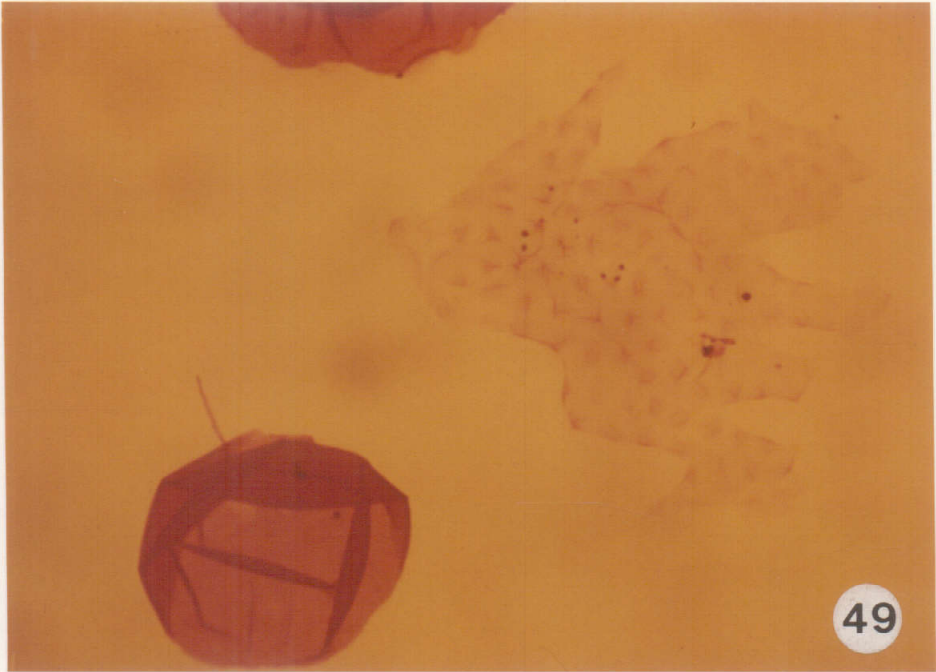
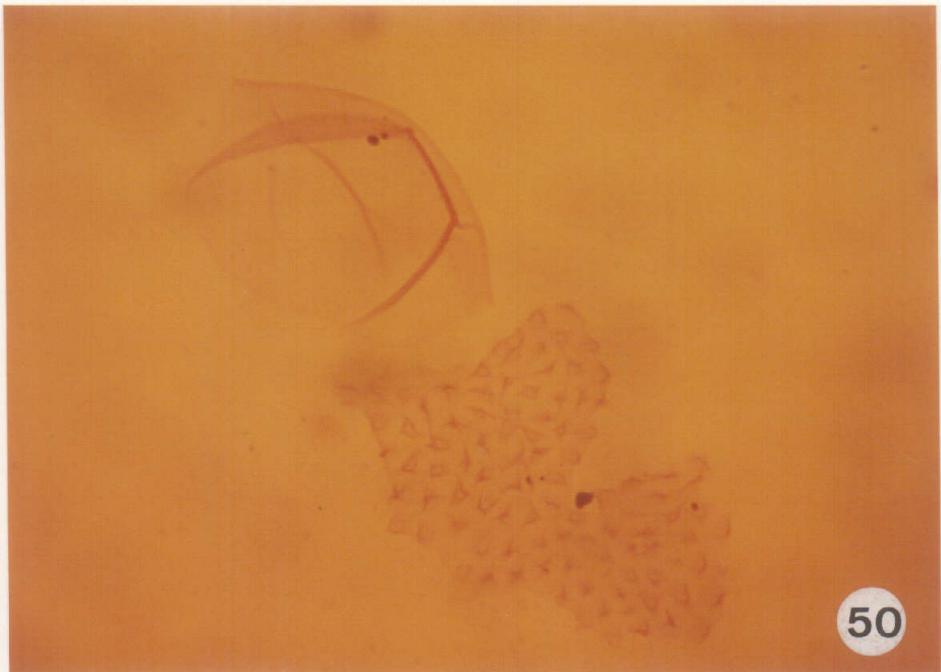


Fig. 49. Reacción del PAS (control). 400x.

Fig. 50. Acción de la α -glucosidasa.
Reacción del PAS. 400x.



49



50

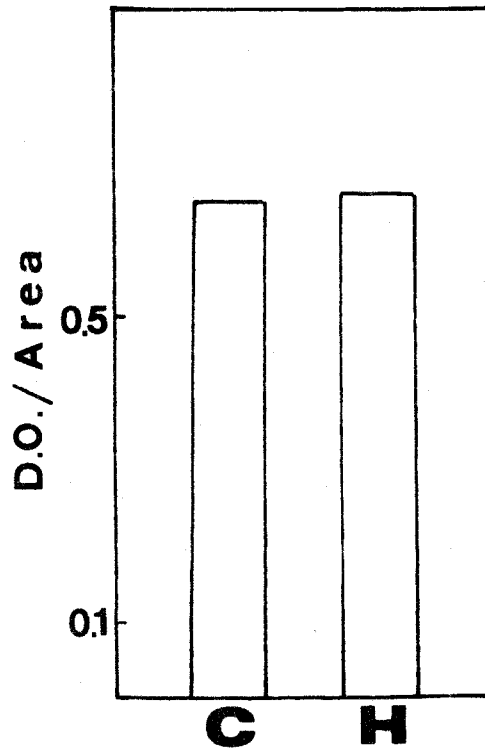


Fig. 51. Tratamiento con Hialuronidasa (H) de elementos endoquísticos. Medidas citofotométricas. C: control; H: hialuronidasa.

TABLA-XXI. *Diferentes tratamientos enzimáticos sobre paredes aisladas y su cuantificación citofotométrica.*

PRUEBA	n	ECTOQUISTE			Contrastes de \bar{X}	t	p
		\bar{X}	σ				
PAS (control) (1)	32	0,58	0,075	(1) - (2)	0,279	p > 0,05 (ND)	
Lisozima (2h) (2)	32	0,56	0,078	(1) - (3)	0,397	"	
Lisozima-ClNa (2h) (3)	32	0,55	0,079	(1) - (4)	0,438	"	
Lisozima (> 3h) (4)	28	0,55	0,078	(1) - (5)	0,268	"	
Lisozima-ClNa (> 3h) (5)	32	0,56	0,073				
ENDOQUISTE							
(1)	32	2,63	0,274	(1) - (2)	0,070	"	
(2)	32	2,62	0,378	(1) - (3)	1,118	"	
(3)	33	2,80	0,491	(1) - (4)	1,141	"	
(4)	22	2,84	0,557	(1) - (5)	1,971	p = 0,01-0,05	
(5)	33	2,35	0,387			(PD).	

ND: no diferencia significativa; PD: probable diferencia significativa.

p: nivel de significación.

TABLA-XXII. *Diferentes tratamientos enzimáticos sobre paredes aisladas y su cuantificación citofotométrica.*

PRUEBA	n	ECTOQUISTE			Contrastes de \bar{X}	t	p
		\bar{X}	σ				
PAS (control) (1)	32	0,58	0,075	(1) - (2)	0,210	p > 0,05 (ND)	
α -Glucosidasa (2h) (2)	32	0,55	0,072	(1) - (3)	0,287	"	
α -Glucosidasa (4h) (3)	32	0,56	0,077	(1) - (4)	0,321	"	
β -Glucosidasa (2h) (4)	30	0,51	0,073	(1) - (5)	0,224	"	
Celulasa (2h) (5)	28	0,56	0,078	(1) - (6)	0,312	"	
Quitinasa(1-23h) (6)	32	0,55	0,073				
		ENDOQUISTE					
(1)	32	2,63	0,274	(1) - (2)	7,063	p=0,01-0,05 (PD)	
(2)	36	1,74	0,277	(1) - (3)	7,120	"	
(3)	32	1,73	0,273	(1) - (4)	7,111	"	
(4)	32	1,73	0,270	(1) - (5)	1,230	p > 0,05 (ND)	
(5)	30	2,50	0,283	(1) - (6)	1,120	"	
(6)	32	2,62	0,360				
AApH 2,5 (control) (1)	32	0,65	0,170	(1) - (2)	0,009	"	
Hialuronidasa (2)	15	0,66	0,091				

ND: no diferencia significativa; PD: probable diferencia significativa; p: nivel de significación

La absorbancia obtenida por el ectoquiste se mantiene invariable en todos los procesos enzimáticos empleados, conservando una absorbancia media, en unidades arbitrarias, de 0,5.

La diferencia más clara mostrada en esta serie de tratamientos la ofrece la acción tanto de la α -Glucosidasa como la de la β -Glucosidasa a 2 y 4h de exposición. (Figs. 49, 50). Observándose una disminución de la DO (densidad optica) de aproximadamente 34% respecto del control. En el resto de los casos (Fig. 48) no se observan diferencias estadísticamente significativas, excepto quizás, la acción de la Lisozima en una exposición superior a 3h y en presencia de ClNa, que incrementa la actividad de dicha enzima, presentando un valor de $p = 0,01$ a $0,05$, diferencia probable respecto del control.

El tratamiento con Hialuronidasa no ofrece tampoco diferencia significativa respecto del control, resultado que coincide básicamente con el expuesto en la Tabla-XX y Fig. 51. En las Tablas-XXI y XXII, se muestran los datos estadísticos obtenidos del análisis de las poblaciones de estructuras de paredes aisladas, que han sufrido tratamientos enzimáticos.

3. Test de solubilidad y tratamientos enzimáticos realizados sobre quistes completos.

La observación de la lisis parcial y/o los cambios estructurales que puedan producirse, tras tratamientos tanto con reactivos inorgánicos como con enzimas sobre los quistes completos, puede darnos alguna información acerca de la función y naturaleza de las capas que forman la pared quística.

En la Tabla-XXIII se muestra el test de solubilidad sobre las paredes , ante diferentes reactivos inorgánicos a diferentes temperaturas de tratamiento. De igual forma (Tabla-XXIV), con distintos enzimas.

En el caso de los reactivos inorgánicos, no sólo se produce lisis de alguno de los componentes de la pared quística (Tabla-XXIII) sino cambios en el volumen celular quístico o de alguna de las paredes. Estos resultados, consecuencia, a veces, de la desaparición de una de las capas que envuelven al citoplasma quístico, se muestran en la Fig. 52.

Así, al tratar con NaOH 1N a 70°C y perder el componente endoquístico se distiende el citoplasma quístico y el ectoquiste incrementa su volumen en un aproximadamente 70%. Por el contrario, el tratamiento con el ClH 1N tanto en frío (20°C) como en caliente (100°C) hace que el citoplasma quístico sufra plasmolisis perdiendo volumen en ambos casos, dándose la diferencia, que en caliente se lisa el ectoquiste (Fig. 54) y el endoquiste acompaña al componente citoplásmico en su disminución de volumen, mientras que el tratamiento en frío (20°C) no provoca lisis ectoquística ni disminución de volumen endoquístico pero sí citoplásmico. (Fig. 52).

El tratamiento con la Urea 8M a 20°C provoca una gran dilatación del endoquiste, que sigue reteniendo al citoplasma en su interior, provocando la ruptura del ectoquiste (Fig. 52, 53). Esta dilatación se ha estimado en aproximadamente un 70%.

4. *Enquistamiento: Cinética y Etapas.*

En la Fig. 55, se presenta la cinética de enquistamiento obtenida a partir de una población heterogénea en

TABLA-XXIII. *Tests de solubilidad sobre quistes completos.*

REACTIVO**	t° (C°)*	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
NaOH 1N	20	-	-
NaOH 1N	70	-	+
NaOH 1N	100	-	+
ClH 1N	20	-	-
ClH 1N	70	-	-
ClH 1N	100	+	-
KOH 1N	20	-	-
KOH 1N	70	-	+
KOH 1N	100	-	+
ClONa (50%)	20	-	+
ClONa (50%)	70	+	+
ClONa (50%)	100	+	+
SO ₄ H ₂ 36N	20	-	+/-
SO ₄ H ₂ 36N	70	+	+
SO ₄ H ₂ 36N	100	+	+

(*): El tiempo de exposición al reactivo en todos los casos fué de 3h. (**): Concentraciones superiores de NaOH, ClH y KOH presentaban los mismos resultados.

(+): hidrólisis; (-): no hidrólisis.

TABLA-XXIV. *Acción de algunas
enzimas sobre quistes completos.*

ENZIMA	t° (C°)*	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
Pepsina (pH 1,8)	37	Sin espinas	-
Tripsina (pH 7,6)	37	Sin espinas	-
Hialuronidasa (pH 5)	20-37	-	-
Quitinasa (pH 5,3)	20-37	-	-

(*): El tiempo de exposición variaba indistintamente entre 1 y 23h, obteniendose en los diferentes tiempos los mismos resultados. (-): Ningún efecto.

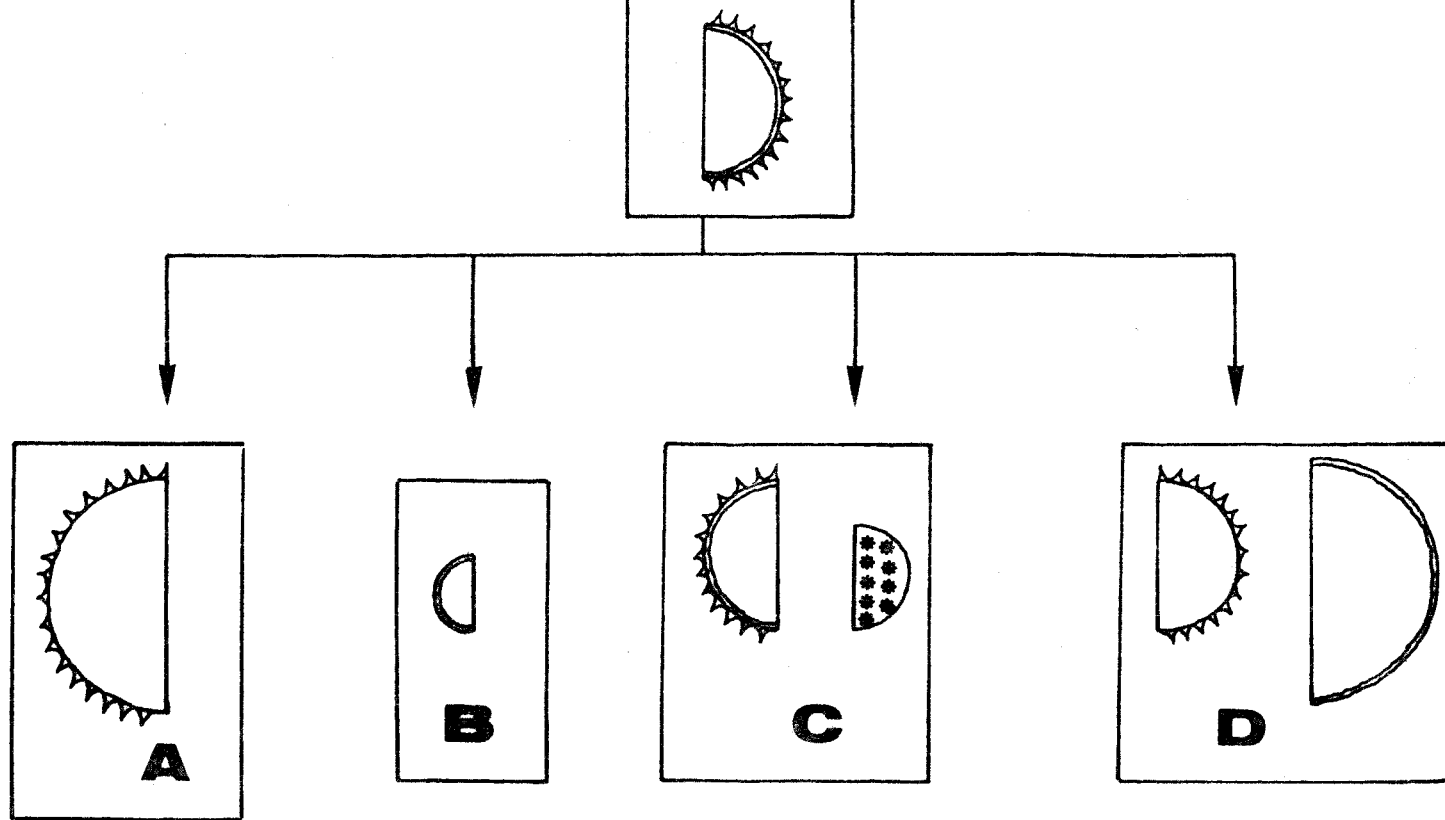


Fig. 52. Tratamientos sobre quistes completos.

A: NaOH 1N (70°C), Sin endoquiste. $\bar{X} = 134\mu$, $V > 70\%$.

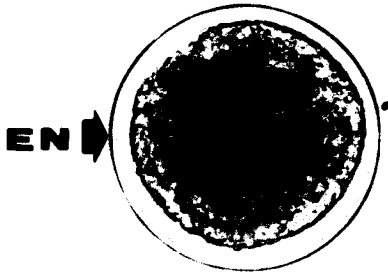
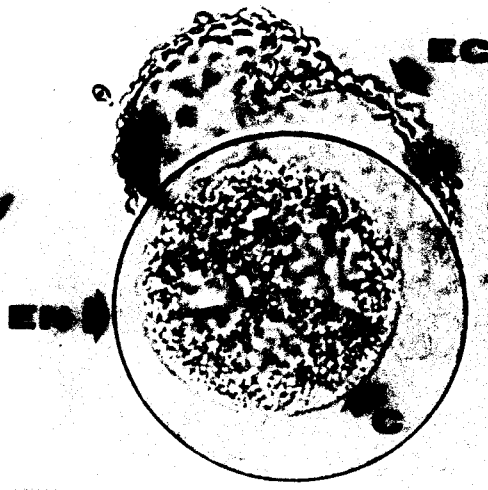
B: ClH 1N (100°C), Sin ectoquiste. $\bar{X} = 43,5\mu$, $V < 70\%$.

C: ClH 1N (20°C), Plasmolisis citoplasmica. $V_c < 58\%$.

D: Urea 8M. Dilatación del endoquiste. $\bar{X} = 142,2\mu$, $V_e > 70\%$.

Fig. 53. Tratamiento con Urea 8M. Ec: ectoquiste;
En: endoquiste; C: citoplasma. 400x.

Fig. 54. Tratamiento con ClH 1N en caliente.
En: endoquiste. 400x.



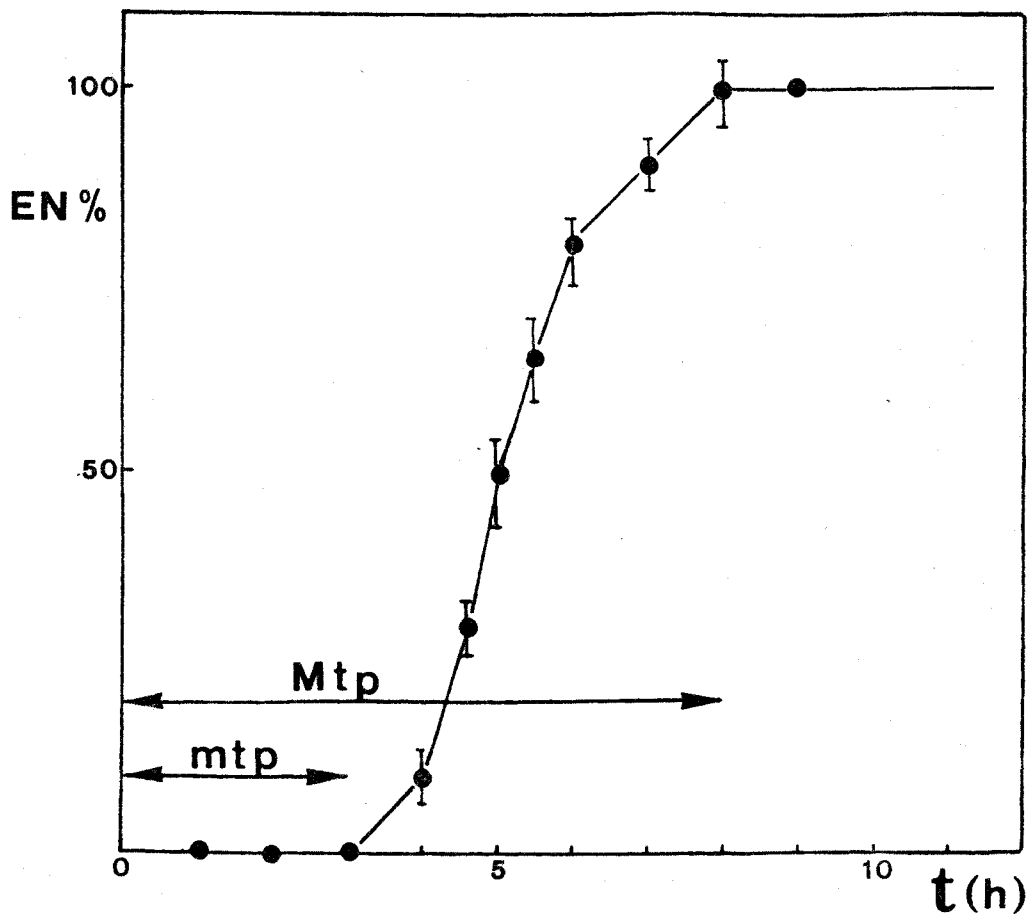
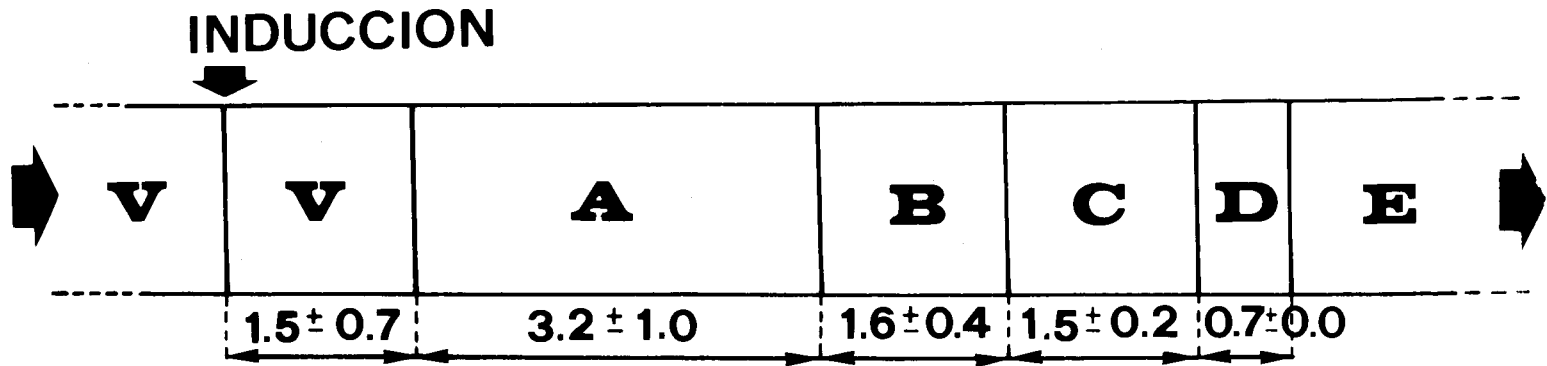
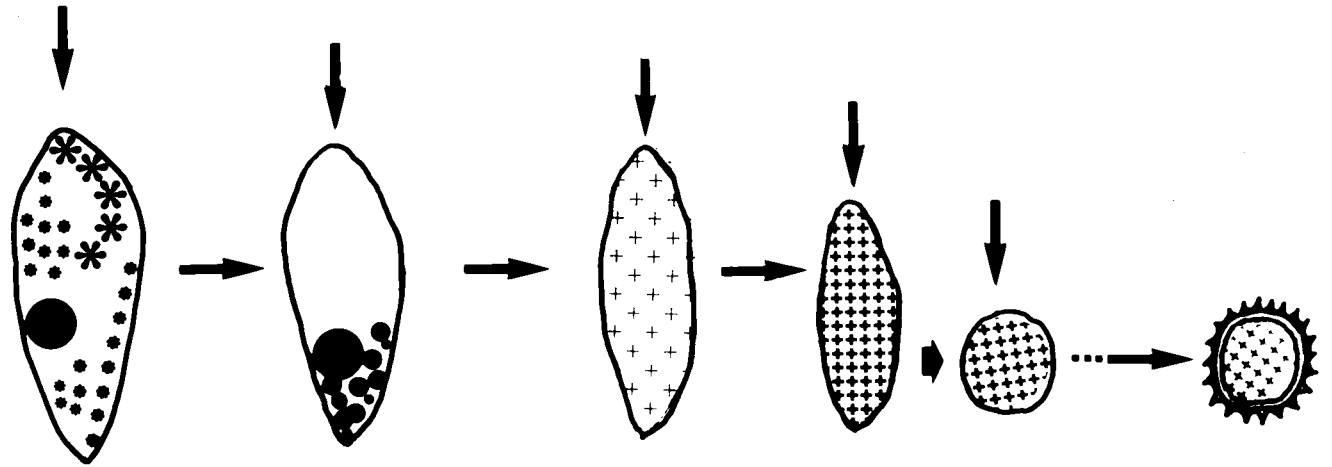


Fig. 55. Cinética de enquistamiento de *Laurentiella acuminata*. Ordenada: enquistamiento en %; Abscisa: tiempo en horas. Mtp: máximo tiempo prequístico; mtp: mínimo tiempo prequístico. Cada punto representa la media de tres medidas diferentes de poblaciones celulares en G_1 inducidas a enquistar y de un tamaño $n > 30$.

Fig. 56. Esquema de las seis etapas establecidas en el Enquistamiento. T (tiempo en horas). Vease el texto para explicación.



T(h)



fase G_1 inducida a enquistar. La cinética sigmoide obtenida presenta un $t_{50} = 5h$ y un $t_{100} = 8h$, un $mtp = 3h$ y un $Mtp = 8h$, con lo que el tiempo prequístico real es muy variable. El tiempo de inducción no es el mismo para todas las células de la población, siendo un proceso asincrónico.

Durante el proceso de enquistamiento *L. acuminata* sufre una serie de modificaciones morfológicas y pigmentarias (GUTIERREZ et al, 1981; GUTIERREZ et al, 1982) que nos han permitido dividir este proceso en varias etapas. (Fig. 56). Para establecer la duración de estos estados prequísticos, se partió de cultivos individuales, siendo los resultados que se muestran en la Fig. 56 la media de 10 cultivos individuales en los que la inducción del enquistamiento se efectuó en las mismas condiciones.

Desde la inducción de la célula vegetativa (estado-V) hasta el comienzo del primer estado prequístico apreciable (estado-A), la célula adquiere una mayor transparencia y aparecen algunos glóbulos oscuros en su zona posterior, y eso marca el comienzo del estado-A cuya duración es aproximadamente de 3h. En el siguiente estado prequístico (estado-B), la célula es aún más transparente y su tamaño es sensiblemente menor. El estado-C, de semejante duración que el estado-B, una hora y media aproximadamente, se caracteriza porque la célula presenta una intensa pigmentación de color naranja, y es más pequeña y redondeada que las anteriores. En el estado-D, la célula es de forma esférica y carece de ciliación. A partir del estado-E comienzan a visualizarse las diferentes capas de la pared quística, con lo que se completa la formación del quiste de resistencia.

5. Estructura de los precursores de la pared quística.

Cada una de las cuatro capas de la pared quística se origina a partir de diferentes precursores. Para el seguimiento de los mismos, y sabiendo que algunas capas quísticas son PAS positivo, se ha realizado la prueba citoquímica al ME del PATAg en dichos precursores, cuyas características estructurales son las siguientes:

5.1. Precursores Ectoquísticos.

Son pilas de placas (Fig. 57A, B) que tienen una longitud de $0,9 \mu$ y una altura de 60 nm aproximadamente, y que constan de 5-12 placas de unos 12 nm de grosor. Estos precursores se originan a partir de unas vesículas delimitadas por una fina membrana (Fig. 58A) y con un contenido granular, que da una reacción del PATAg fuertemente positiva. El contenido granular se encuentra, al principio, uniformemente repartido (Fig. 58A) y posteriormente presenta una mayor concentración en una zona de la vesícula (Fig. 58B), que es donde se inicia la formación de las pilas de placas ectoquísticas (Fig. 59), que van creciendo en longitud hasta llegar a deformar la envoltura de la vesícula (Fig. 60, 61). A lo largo de este proceso de formación de precursores ectoquísticos se vá perdiendo paulatinamente la reactividad por la reacción del PATAg, hasta el estado de más baja reactividad, correspondiente al de las pilas de placas ya formadas (Figs. 62 a 64).

5.2. Precursores Mesoquísticos.

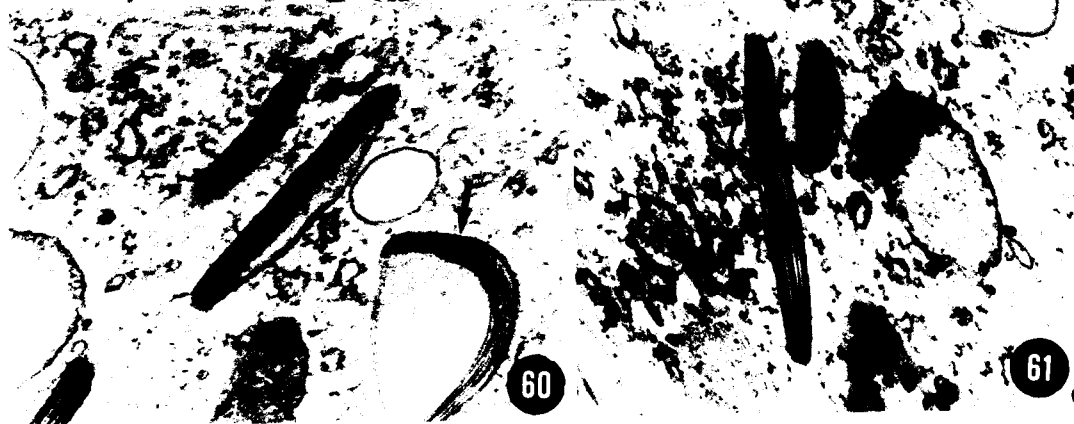
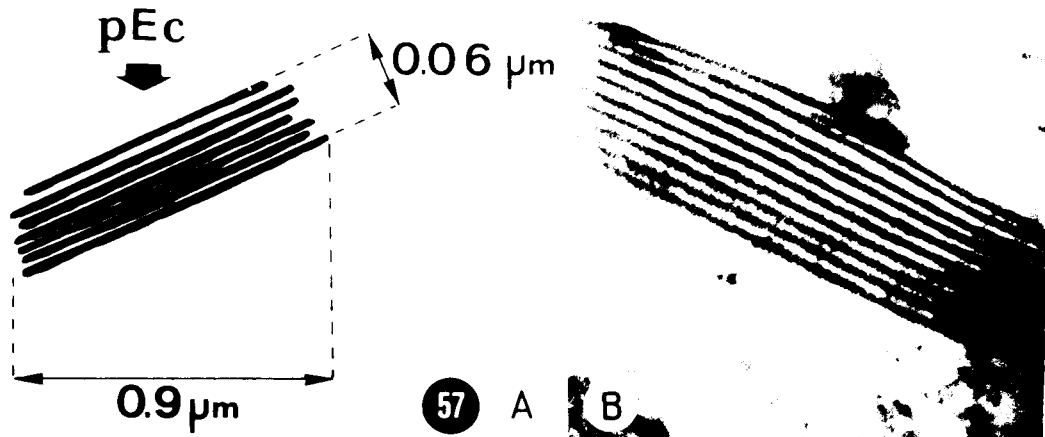
Los precursores del Mesoquiste son paquetes de fibras,

Fig. 57. (A): esquema de un precursor ectoquístico (pEc)
(B): microelectrografia de un precursos ectoquístico.
60.000x.

Fig. 58. Orgánulos a partir de los cuales se forman los
precursores ectoquísticos. Estados A y B. 25.000x.

Fig. 59. Formación de las placas ectoquísticas (flecha)
dentro del orgánulo precursor. 15.000x.

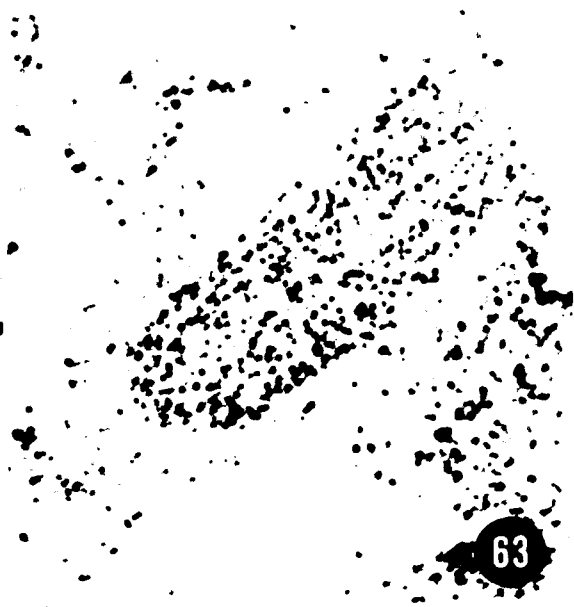
Fig. 60, 61. Crecimiento y deformación de la vesícula
por crecimiento de las placas ectoquísticas (flecha).
8.000x.



Figs.62-64. Reacción del PATAg. Distintas intensidades de reactividad a lo largo de la formación de las placas ectoquísticas. 20.000x; 15000x; 30.000x.



62



63



64

de forma, tamaño y empaquetamiento variables (Figs. 65, 66), siendo su longitud máxima de aproximadamente $2,4 \mu$ y su diámetro oscila entre $0,12 - 0,16 \mu$. Estos precursores, al igual que la capa que originan, son PATAg negativos.

5.3. *Precursores Endoquísticos.*

Los precursores de la tercera capa quística son vesículas elipsoidales rodeadas de una fina membrana, con un diámetro mayor de aproximadamente $0,4 \mu$ y un diámetro menor de $0,2 \mu$ (Figs. 67, 68). La reacción del PATAg, al igual que la pared que origina, es positiva. (Figs. 69, 70).

5.4. *Precursores de la Capa Granulosa.*

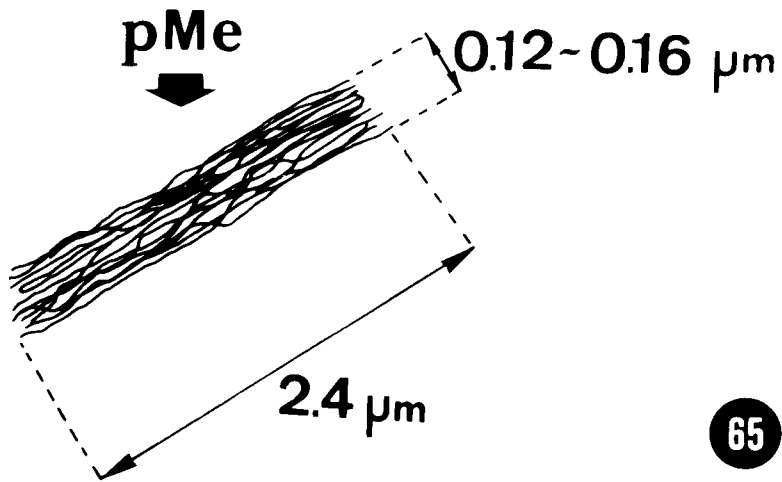
Los precursores de la capa granulosa son esféricos (Figs. 71A, B), de un diámetro comprendido entre $0,1 - 0,2 \mu$, envueltos por una doble membrana, que frecuentemente lleva ribosomas adosados a su cara externa. Presenta un contenido predominantemente fibrilar que dá una reacción PATAg positiva (Fig. 72).

6. *Cinética de aparición de los precursores.*

A partir de las células tomadas en los diferentes estados prequísticos establecidos anteriormente se pudo componer la cinética de aparición en el citoplasma prequístico de los distintos precursores antes descritos. Los resultados se muestran en la Fig. 73.

Fig. 65. Esquema de precursor mesoquístico. (pMe).

Fog. 66. Microelectrografia de un precursor mesoquístico (flecha). 25.000x.



65



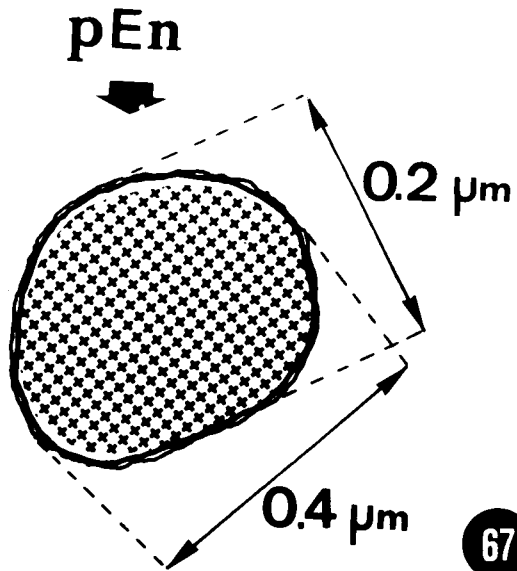
66

Fig. 67. Esquema de precursor endoquístico. (pEn).

Fig. 68. Microelectrografía de precursores endoquísticos.
25.000x.

Fig. 69. Reacción del PATAg sobre un precursor endoquístico
30.000x.

Fig. 70. Reacción del PATAg sobre el endoquiste (En).
15.000x.



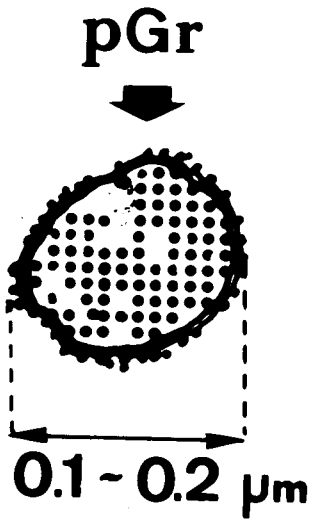
67



Fig. 71. Esquema y micrografia de un precursor de la capa granulosa. (pGr) (flecha) 40.000x.

Fig. 72. Reacción del PATAg en precursores de la capa granulosa (Gr). 30.000x.

A



B

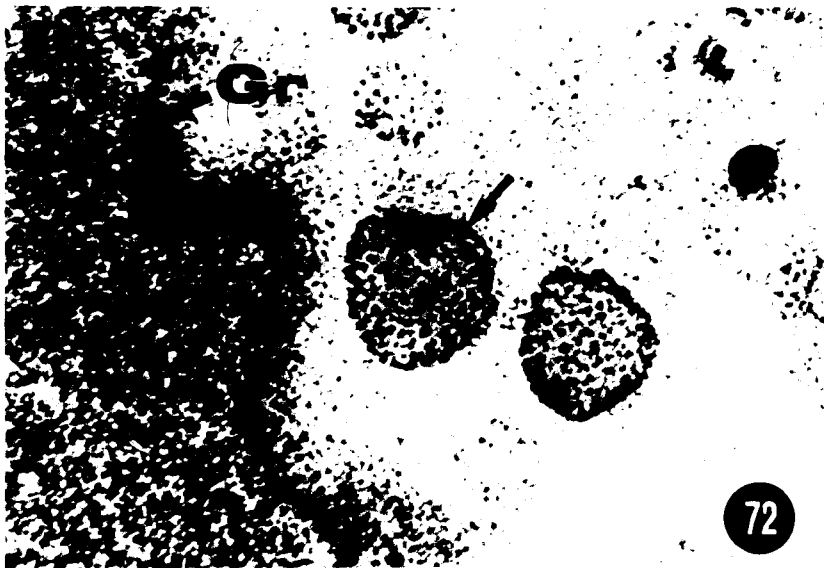
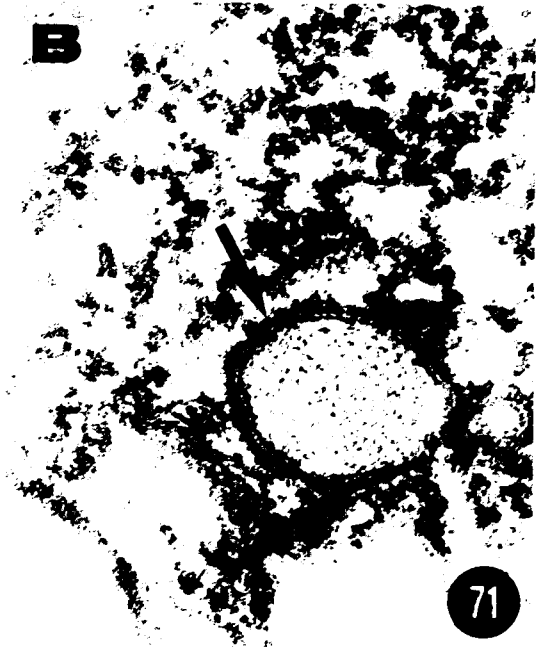
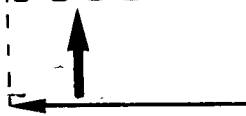
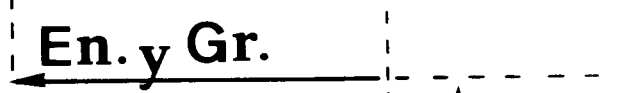
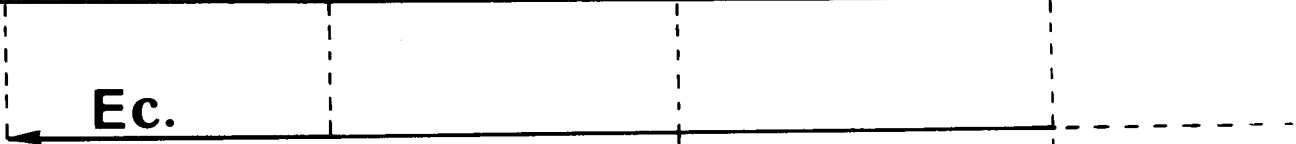
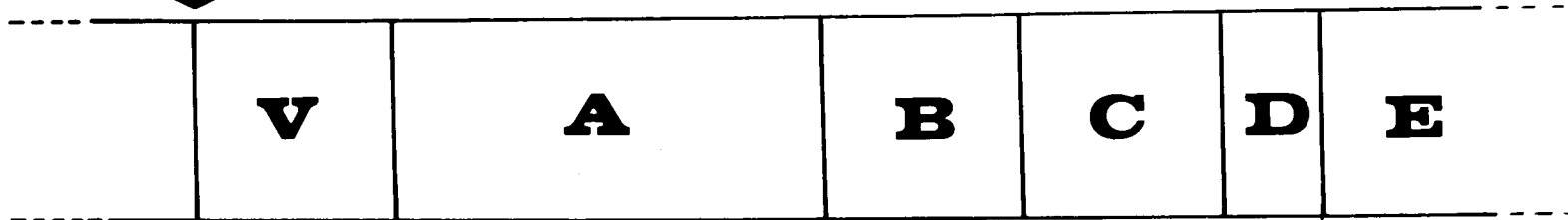


Fig. 73. Esquema de la cinética de aparición de los distintos precursores en las etapas establecidas durante el enquistamiento de *Laurentiella acuminata*. Ec: precursores ectoquísticos; Me: precursores mesoquísticos; En: precursores endoquísticos; Gr: precursores de la granulosa.

INDUCCION



Los precursores del ectoquiste aparecen poco despues de la inducción, y su presencia en el citoplasma prequistico se mantiene a lo largo del enquistamiento e incluso permanecen en el citoplasma del quiste maduro. Los precursores mesoquisticos aparecen en el estado-A de célula prequistica, prolongandose igualmente su presencia hasta el final. Los precursores del endoquiste y capa granulosa surgen simultaneamente hacia el estado-B y permanecen hasta el final. Sin embrago, la emigración de los distintos precursores hacia el cortex no comienza hasta el estado-E.

7. Modelo de formación de la pared quística.

Nuestras observaciones permiten elaborar un posible modelo del proceso de formación y crecimiento de la pared quística de *L. acuminata*, que se presenta esquemáticamente en la Fig. 74.

Los precursores del ectoquiste muestran inicialmente las placas muy empaquetadas, y a medida que se aproximan a la pelicula del protozoo las placas se separan. Estos precursores se ponen en contacto con la membrana interna de la pelicula (Figs. 74, 75), la atraviesan y se disponen entre la membranas interna y externa (Fig. 74). Posteriormente, se desplazan los precursores del mesoquiste (Figs. 74, 76) hasta atravesar la membrana interna, que se encuentra muy fragmentada. El mesoquiste crece por aposición de sus precursores y a medida que aumenta su espesor presiona sobre los precursores del ectoquiste provocando el desplazamiento y fusión de las placas ectoquisticas. El mesoquiste es la capa que presenta mayor crecimiento y origina protuberancias o espinas distribuidas uniformemente por toda la superficie esférica del

Fig. 74. Esquema del modelo propuesto de formación y crecimiento de las distintas capas quísticas de la pared del quiste de *L. acuminata*. P: película del protozoo. pEc: precursor ectoquístico; pMe: precursor mesoquístico; me: membrana externa; mi: membrana interna; Ec: ectoquiste; Me: mesoquiste; pEn: precursor endoquístico; pGr: precursor de la capa granulosa; n-me: nueva membrana externa; Ci: citoplasma quístico.

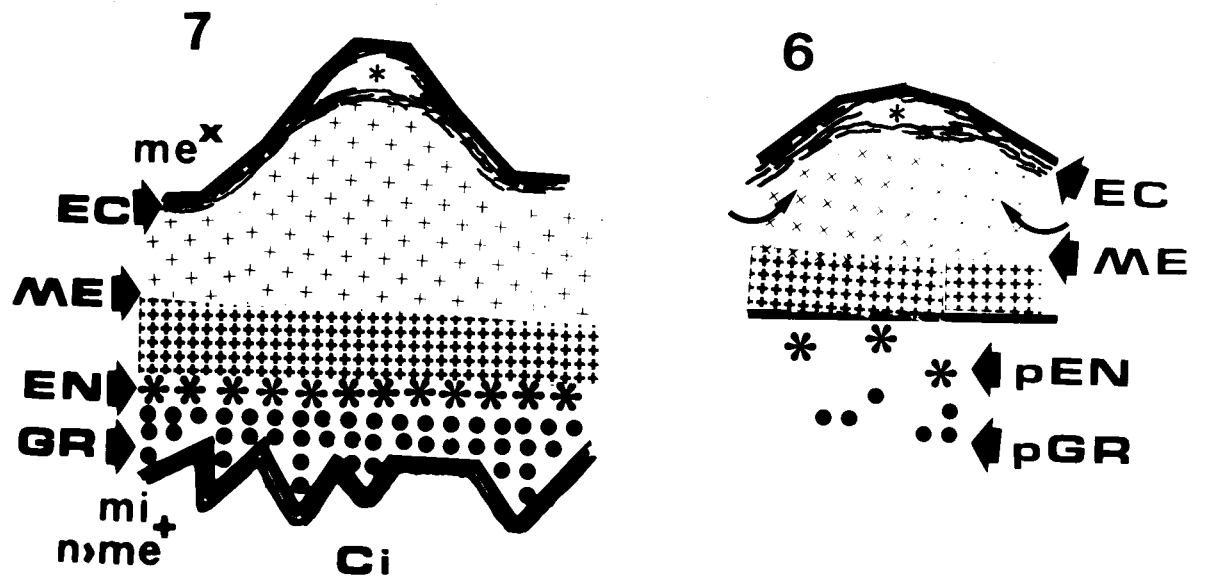
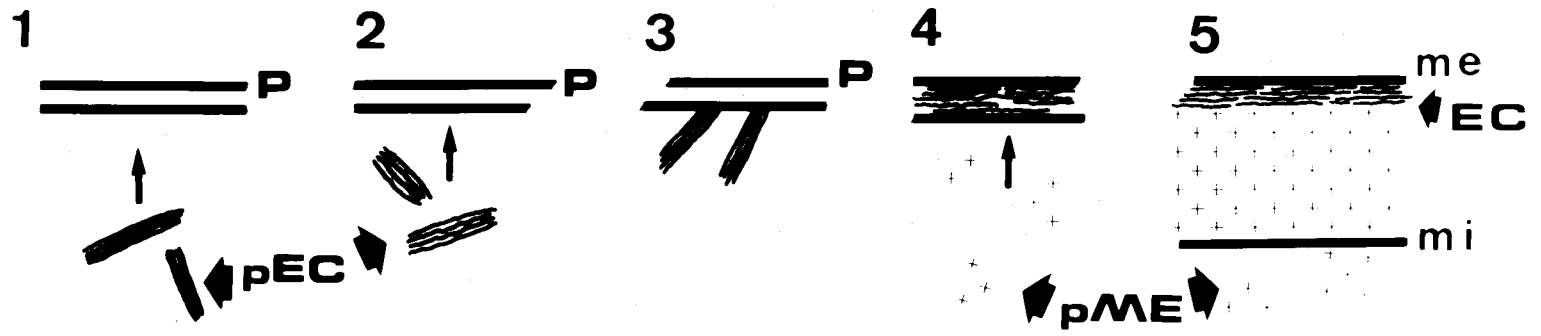


Fig. 75. Emergencia de precursores ectoquisticos (flechas)
P: pelicula del protozoo. 15.000x.

Fig. 76. Salida de precursores mesoquisticos (flecha).
20.000x.

Fig. 77. Emergencia de precursores endoquisticos (flechas).
Me: mesoquiste. 25.000x.



quiste, con lo que se incrementa la superficie de contacto con el medio. El crecimiento del mesoquiste provoca la elevación de la capa ectoquistica, y el consiguiente deslizamiento de las láminas de esta capa entre las cuales queda un espacio vacío en los ápices de las espinas (Figs. 74, 78).

A continuación emergen los precursores del endoquiste (Figs. 74, 77), que se fusionan entre sí originando una capa cuyo espesor se aproxima al diámetro mayor de estos precursores. Por último, surgen los precursores de la capa granulosa (Fig. 74) que vierten su contenido debajo del endoquiste originando una capa de espesor muy irregular. En la superficie del citoplasma quístico se forma, finalmente, una nueva película, la cual es observable en el quiste maduro (Figs. 74, 79).

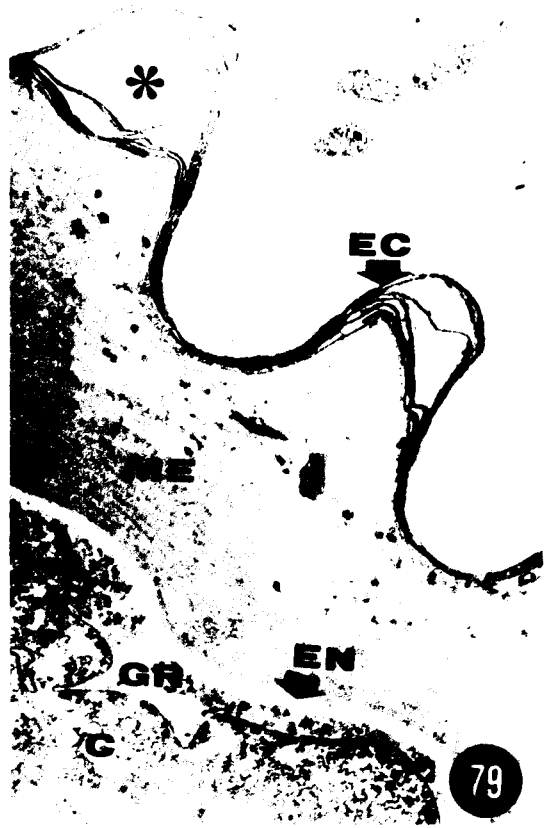
8. *Efecto de la radiación UV (254 nm) sobre la cinética de Enquistamiento.*

Otra forma de abordar el estudio de un proceso de diferenciación celular, consiste en inducir alteraciones en el mismo por medio de agentes exógenos, físicos o químicos.

En el caso del enquistamiento de *L. acuminata* consideramos interesante estudiar el efecto de la radiación UV sobre dicho proceso, ya que este efecto ha sido estudiado tanto en procesos de división celular (LOZINA-LOZINSKY & USPENSKAJA, 1968; CARATERO et al, 1980) como en la regeneración de protozoos (BURCHILL, 1968; BURCHILL & RUSTAD, 1969; BURCHILL, 1979; BURCHILL et al, 1979), pero nunca sobre otros procesos de diferenciación celular como el enquistamiento.

Fig. 78. Crecimiento de la pared quística. 3.000x.
Ec: ectoquiste ya formado; Me: mesoquiste en formación.
C: citoplasma quístico. (*): espacio vacío que dejan las
placas ectoquísticas al originarse las espinas.

Fig. 79. Pared quística totalmente formada. 4.000x.
Ec: ectoquiste; Me: mesoquiste; En: endoquiste; Gr:
capa granulosa; C: citoplasma; (*): espacio vacío que
dejan las placas ectoquísticas en los ápices de las
espinas.



Las células sometidas a irradiación UV fueron de dos tipos; c-elulas vegetativas (estado-G₁) y células prequísticas (estados A y B esencialmente). Las dosis empleadas estaban dentro del rango 6.000 a 9.600 ergs/mm². (Vease Materiales y Métodos).

En la Fig. 80, se muestran los resultados obtenidos referentes a las modificaciones experimentadas en la cinética de enquistamiento. Las células vegetativas irradiadas a 8.400 ergs/mm² mostraban una cinética muy similar a la observada en el control sin irradiar. Las células vegetativas irradiadas con otras dosis no mostraban diferencia considerable respecto del control, en lo referente a la cinética de enquistamiento. Estas células sufrían un enquistamiento normal y los quistes de resistencia obtenidos eran normales en todos los casos respecto del control. Sin embargo, la cinética de enquistamiento presentada por células prequísticas irradiadas era bastante diferente respecto del control (Fig. 80). Las células irradiadas con la menor dosis empleada (6.000 ergs/mm²) presentaban un EN₅₀ (tiempo medio para obtener el 50% de enquistamiento) de 3,8h, en comparación con las 5,3h del control. Dosis superiores (7.200 - 9.600 ergs/mm²) mostraban un EN₅₀ superior al control (Fig. 80), existiendo un retraso en la obtención del 100% del enquistamiento.

9. Efecto de la radiación UV sobre la pared quística.

Sólo dentro del rango 7.200 - 9.600 ergs/mm², a partir de células prequísticas irradiadas, se obtuvo quistes de resistencia que presentaban un aspecto diferente respecto

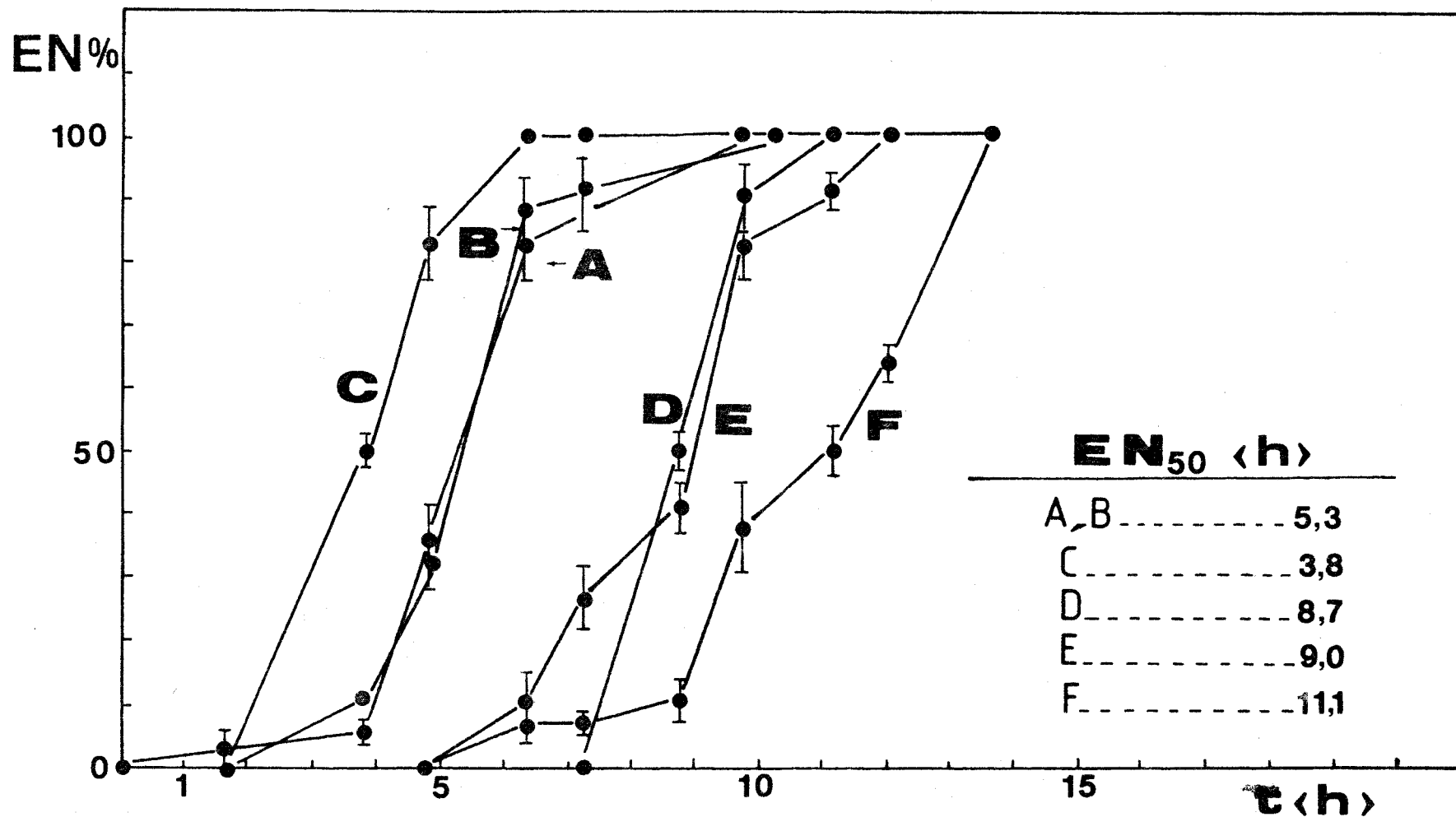


Fig. 80. Efecto de la radiación UV. sobre la cinética de enquistamiento de *L. acuminata*
 A: control; B: células vegetativas irradiadas a 8.400 ergs/mm^2 . C, D, E y F: células prequísticas irradiadas a ; 6.000 ; 7.200 ; 8.400 y 9.600 ergs/mm^2 respectivamente. Cada punto representa la media de tres medidas diferentes. Ordenada: enquistamiento en %; Abscisa: tiempo en horas.

de aquellos derivados de células no irradiadas. (Fig. 81).

La diferencia, básicamente, está restringida a una de las capas de la pared quística; el mesoquiste. Esta capa presenta, en estos quistes anormales, un espesor de aproximadamente $6,5 \mu$, casi el doble del valor obtenido en quistes normales; $3,7 \mu$. (Figs. 82, 84A, B). Otra característica de estas paredes quísticas anómalas es la falta de las típicas espinas o protuberancias que usualmente presentan los quistes de resistencia de *L. acuminata*. (Fig. 83).

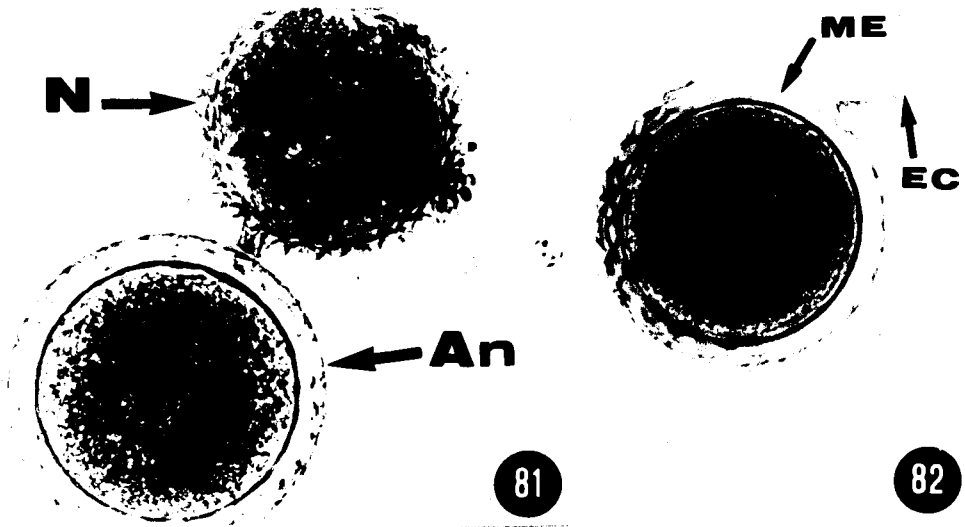
Los quistes anormales son viables y exquistan normalmente al transferirlos a medio fresco con alimento. Para conocer si esta característica persiste después de varias divisiones celulares, se diseñó el experimento que se esquematiza en la Fig. 85, en dicho esquema se muestran los porcentajes de quistes normales y anormales obtenidos a partir de 30 células prequísticas irradiadas con luz UV. Entre un exquistamiento y un nuevo enquistamiento se introdujo un ciclo de división celular. Existe una disminución de la proporción de quistes anormales durante las dos primeras generaciones, perdiéndose esta característica a partir de la tercera generación (Fig. 85), obteniéndose una población quística normal.

Fig. 81. Micrografia "in vivo" de un quiste normal(N) y uno anormal (An) obtenido tras irradiación UV. 400x.

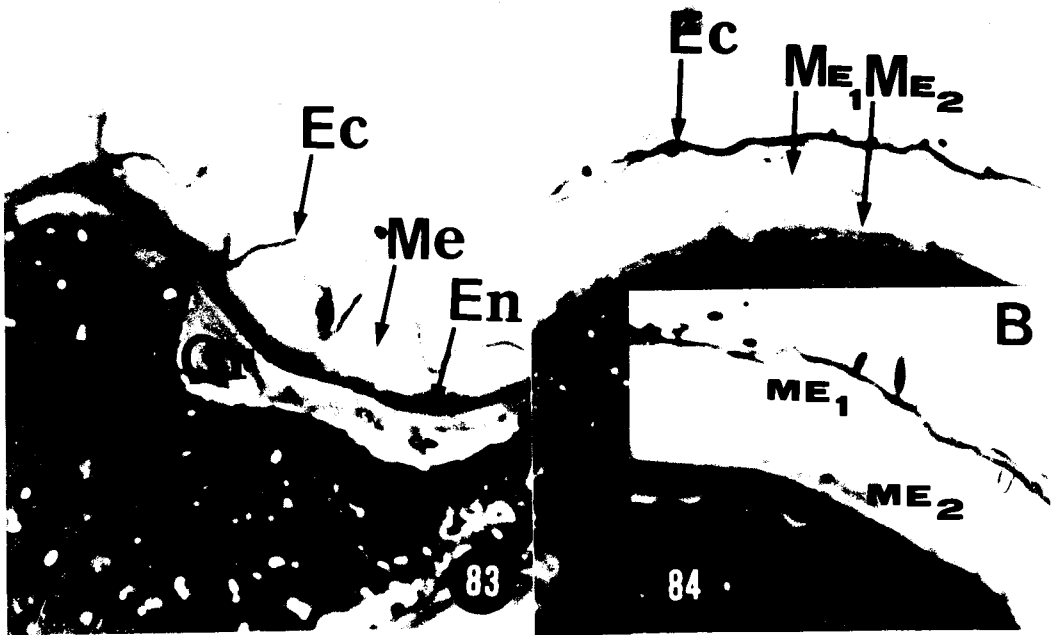
Fig. 82. Micrografia "in vivo" de un quiste con pared mesoquistica doble. (Me): mesoquiste; (Ec): ectoquiste. 400x.

Fig. 83. Corte semifino de pared quistica normal. (Azul de toluidina). 1.000x. Ec: ectoquiste; Me: mesoquiste; En: endoquiste; Gr: capa granulosa.

Fig. 84. (A): corte semifino de pared quistica con doble mesoquiste (Me_1 ; Me_2); Ec: ectoquiste. 1.000x.
(B): Ampliación de una región de la micrografia anterior.



A



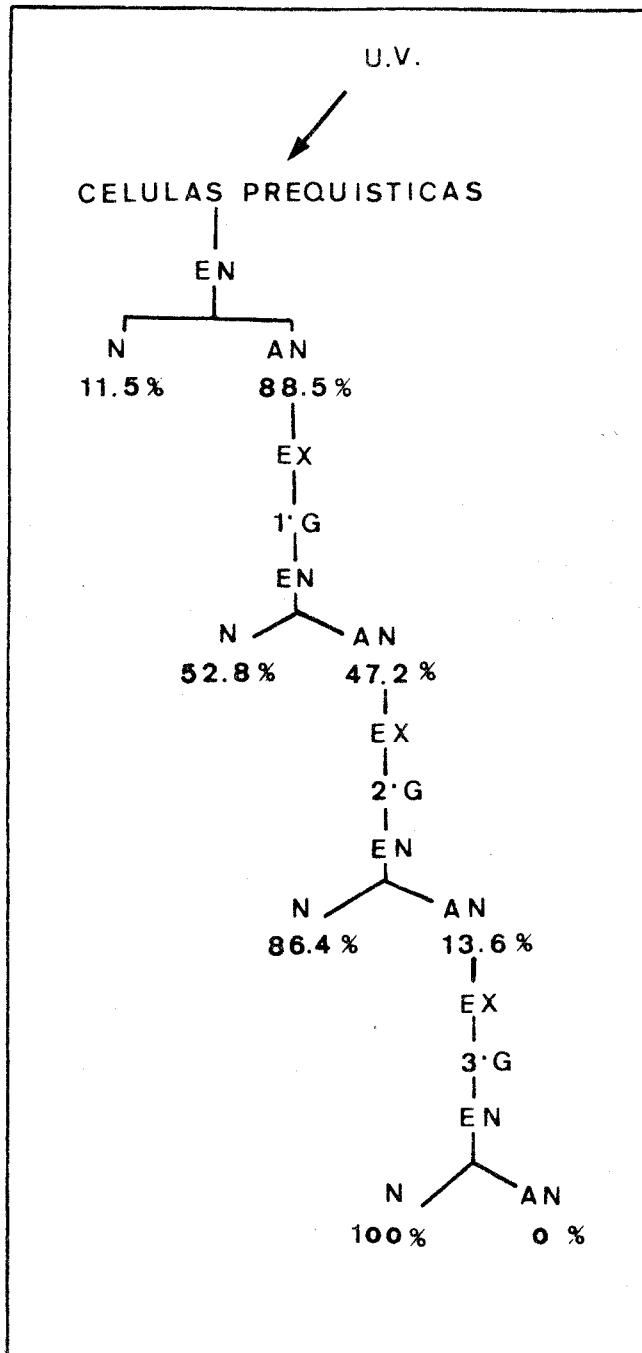


Fig. 85. Esquema de los experimentos realizados para conocer la persistencia de la anomalía experimentada en la pared quística. Se especifican los porcentajes de quistes normales (N) y anormales (AN) a lo largo de tres generaciones. Celulas prequísticas irradiadas (n = 30).

DISCUSION

1. *Estructura de la pared quística de Laurentiella acuminata.*

La pared del quiste de resistencia de *L. acuminata* muestra las características básicas descritas en otros ciliados hipotricos en donde se ha estudiado.

Como se ha detallado en el estudio-revisión que constituye la introducción de este trabajo, es la pared quística de los ciliados hipotricos la que muestra mayor número de capas, el 18,1% de los casos estudiados poseen paredes de cuatro envueltas (Fig. 7). También la pared quística de *L. acuminata* presenta cuatro diferentes envueltas quísticas. Dicha pared, al presentar un espesor total de aproximadamente 8,4 μ , constituye un 19,8% del diámetro medio del quiste ($84,9 \pm 0,7 \mu$).

La capa más externa o ectoquiste, de espesor 0,3 μ , se aproxima a la de *Pleurotricha sp.*, de 0,1-0,2 μ (MATSUSAKA, 1976), dentro del grupo de los ciliados hipotricos (Tabla-II). Y es morfológicamente similar a la de *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973), *Pleurotricha sp.* (MATSUSAKA, 1976), *Stylonychia mytilus* (WALKER et al, 1975) y *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980).

Las espinas o protuberancias en la que participan tanto el ectoquiste como el mesoquiste, son más conspicuas y están más regularmente distribuidas que en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976), el único hipotrico estudiado en donde se presentan con cierta regularidad; en el resto se dan irregularidades superficiales de otra morfología.

Como ocurre en los cuatro ciliados hipotricos estudiados (Tabla-III), el mesoquiste de *L. acuminata*, es la capa más gruesa y presenta una estructura esencialmente fibrilar.

En *L. acuminata*, al igual que en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976), la tercera envuelta o endoquiste es de grosor similar a la primera envuelta o ectoquiste, y además presenta una estructura básicamente amorfa al igual que el resto de los hipotricos estudiados (Tabla-IV).

La capa granulosa, de estructura y grosor muy variables, es muy semejante a la descrita en los hipotricos *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973), *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) y *Stylonychia mytilus* (WALKER et al, 1975), siendo estructuralmente diferente a la descrita en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) (Tabla-V).

2. Estructura del citoplasma quístico de *Laurentiella acuminata*.

Al igual que la pared quística, el citoplasma quístico de *L. acuminata* presenta características similares con las del resto de los ciliados hipotricos estudiados.

En la Tabla-XXV se expone y contrasta las características del citoplasma quístico de *L. acuminata* con los de los ciliados hipotricos que se han estudiado. La única diferencia encontrada reside en la falta de formación del llamado "empaquetamiento mitocondrial", dándose en *L. acuminata*, por

TABLA-XXV. Comparación de las características presentadas por el citoplasma quístico.

CILIADO	A	B	C	D	E	F	G
<i>Oxytricha fallax</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pleurotricha sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Gastrostyla steinii</i>	+	+	+	+	+	+	?
<i>Stylonychia mytilus</i>	+	+	+	+	?	?	+
<i>Laurentiella acuminata</i>	+	+	-	+	+	+	+

A: Quiste-KR; B: Fusión macronuclear; C: Empaquetamiento mitocondrial; D: Citoplasma rico en RER; E: Inclusiones de lípidos y glucógeno; F: Vacuolas líticas; G: Formas paracrystalinas.

el contrario, una degradación o lisis mitocondrial durante el enquistamiento, no observándose en ningún caso los paquetes mitocondriales. Probablemente esta degradación no es total, ya que durante el exquistamiento la célula necesita mitocondrias, por lo que cabe suponer quedarían algunas intactas en el citoplasma que luego proliferarían durante el exquistamiento.

Según la clasificación de WALKER & MAUGEL (1980) para los quistes de ciliados hipotricos, el quiste de resistencia de *L. acuminata* se puede incluir en el grupo KR, junto con el resto de ciliados hipotricos estudiados, todos ellos de la Fam. Oxytrichidae (CORLISS, 1979).

Presentando las características propias del grupo:

- Reabsorción total de estructuras corticales.
- Fusión macronuclear en una única masa macronuclear quística.
- Pared quística con cuatro capas.
- La razón volumen quiste/volumen célula vegetativa es aproximadamente de 0,30 (GUTIERREZ et al, 1981).
- La razón grosor pared quística/ radio quístico es aproximadamente de 0,09.

Por consiguiente, las características quísticas pueden servir de criterio taxonómico adicional en determinados grupos de ciliados.

3. Estudio de la composición de la pared quística.

3.1. Resultados Citoquímicos.

Hemos reunido en la Tabla-XXVI los resultados

TABLA-XXVI. Clases de sustancias o grupos químicos detectados en las diferentes pruebas citoquímicas sobre las capas quísticas de *L. acuminata*.

PRUEBA	ECTOQUISTE	MESOQUISTE	ENDOQUISTE	C.GRANULOSA
PAS	1,2-glicoles	-	1,2-glicoles	1,2-glicoles
AA(pH 2,5)	MPS (-COO ⁻)		MPS (-COO ⁻)	
AA(pH 1)	±MPS (-PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)		MPS (-PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)	
AA(pH 0,5)	±MPS (-SO ₄ ⁻²)		MPS (-SO ₄ ⁻²)	
PAS-AA(pH 2,5)	MPS (-COO ⁻)	-	MPSn y (-COO ⁻)	MPSn y (-COO ⁻)
PAS-AA(pH 1)	MPSn/MPS (-PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)	-	MPSn y (-PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)	MPSn y MPS(-PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)
PAS-AA(pH 0,5)	MPSn	-	MPSn y MPS (-SO ₄ ⁻²)	MPSn y MPS(-SO ₄ ⁻²)
AmA(pH 2,5)	MPS (-COO ⁻)		MPS(-COO ⁻)	
AA(pH 1)-AmA(pH 2,5)	±MPS(-COO ⁻ ; -PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)		±MPS(-COO ⁻ ; -PO ₄ ⁻³ ; -SO ₄ ⁻²)	
AA(pH 0,5)-AmA(pH 2,5)	±MPS(-COO ⁻ ; -SO ₄ ⁻²)		±MPS(-COO ⁻ ; -SO ₄ ⁻²)	
Met-Sap-AA(pH 2,5)	MPS(-COO ⁻)		MPS(-COO ⁻)	
AA(Cl ₂ Mg) M<0,3	MPS (-COO ⁻)		MPS(-COO ⁻)	
AA(Cl ₂ Mg) M>0,3	-		MPS(-SO ₄ ⁻²)	
AT (pH> 3)	MPSa	-	MPSa	MPSa
AT (pH< 3)	-	-	-	-
AM (pH 4)(MBE)	MPSa		MPSa	
Corifosfina (pH 4)	MPS (-SO ₄ ⁻²)		MPS (-SO ₄ ⁻²)	

MPSa: mucopolisacarido ácido; MPSn: mucopolisacarido neutro; (-): negativo.

referentes a carbohidratos encontrados indistintamente sobre paredes aisladas y cortes semifinos. En dicha tabla se muestra la sustancia o grupo detectado en la envuelta quística correspondiente.

Los resultados no siempre son coincidentes y claros, observándose contradicciones que pueden ser fruto, ya de la inespecificidad de la técnica, ya de la inexactitud de la metodología en general.

En lo que se refiere a la primera envuelta quística (ectoquiste), es clara la presencia tanto de MPS neutros como ácidos carboxílicos, por el contrario existen contradicciones en diferentes pruebas que intentan detectar los MPS ácidos sulfatados. Así, el PAS-AA (pH 1) en corte semifino detecta MPS neutros, mientras que la misma prueba sobre elementos aislados detecta MPS ácidos ($-\text{PO}_4^{-3}$; $-\text{SO}_4^{-2}$). La prueba de la metilación-saponificación-AA (pH 2,5) muestra que la reversibilidad de la coloración, al tratar con la potasa, no se puede atribuir a la presencia de MPS ácidos sulfatados sino sólo carboxílicos, ya que el metanol (durante la metilación) elimina dichos grupos, si existen.

Por otra parte, el fluorocromo Corifosfina, también detecta MPS sulfatados, pero, a parte de ofrecer una fluorescencia bastante débil, no es una prueba lo suficientemente específica. Quizás, la mejor prueba para corroborar la ausencia de MPS ácidos sulfatados en el ectoquiste es la ausencia de coloración a una concentración de Cl_2Mg superior a 0,3M en la prueba de la alcianofilia a concentración crítica de electrolitos.

La segunda envuelta quística (mesoquiste) no parece estar constituida por carbohidratos algunos.

Las dos últimas capas; endoquiste y granulosa se parecen en la presencia de determinados grupos, en ambos existen MPS neutros y ácidos carboxílicos y sulfatados. En el endoquiste se aprecia mejor la presencia de los MPS sulfatados debido a la alcianofilia positiva a concentraciones de CL_2Mg superiores a 0,3 M, aunque se mantiene la contradicción de la recuperación del color tras metilación-saponificación. Pero, por otra parte, esta prueba no ha sido cuantificada citofotométricamente, lo que hace que la evaluación de la intensidad de color recobrada no sea objetiva y podría ser diferente; algo menor, debida sólo a los grupos carboxílicos.

La prueba citoquímica de detección de proteínas nos indica que existen en todas las capas de la pared quística. Dándose en el mesoquiste un gradiente de coloración hacia el interior, que por otro lado, coincide con la topografía ultraestructural detectada por ME, observándose una zona más compacta o densa a medida que nos acercamos a la tercera capa quística o endoquiste.

En el componente proteico del ecto- y endoquiste se ha podido detectar grupos -SH libres pertenecientes probablemente a aminoácidos sulfatados (Cisteína); el hecho que se presente una coloración roja y no azul indica que están presentes en bajas concentraciones (PEARSE, 1968).

Ninguna de las capas o envueltas quísticas presentan elementos lipídicos.

3.2. *Hidrólisis enzimática y tests de solubilidad.*

Al utilizar estructuras complejas, como las paredes

quisticas, y no macromoléculas aisladas, los ensayos de hidrólisis enzimática no son fáciles de interpretar. En la Tabla-XXVII, se muestran los resultados conjuntos tanto obtenidos a partir de paredes aisladas como de quistes completos.

Se han usado ocho enzimas del grupo glicósido hidrolasas, de las cuales, concretandonos a las unidades ectoquisticas y endoquisticas, sólo dos; la α -Glucosidasa y β -Glucosidasa tienen efectos claramente positivos sobre el endoquiste, detectando así en el polisacárido que forma parte de esta capa quística- enlaces del tipo α y β -D-glucósido.

No podemos explicar por qué otros enzimas, utilizados aquí, que actúan sobre enlaces glucosídicos parecidos, no lo hacen. Quizás el enmascaramiento más o menos pronunciado de los carbohidratos de la pared puedan afectar en la intervención de las mismas. Aunque cabe la posibilidad de que exista hidrólisis no medible citofotometricamente, sólo se ha detectado actividad hidrolítica en el endoquiste, con estas dos enzimas glicolíticas, y alguna más débil con la Lisozima (N-acetil muramil hidrolasa) durante una acción prolongada y activada con ClNa. Mostrando así, tal vez, la presencia de enlaces β -1, 4 en un posible N-acetil murámico, o más probablemente sobre restos de 2-acetalamino-2-desoxi-D-glucosa de un glucopeptido.

La única carboxílico ester hidrolasa utilizada; la peptina peptidil hidrolasa no muestra actividad detectable alguna sobre las capas estudiadas.

Las dos peptidil péptido hidrolasas empleadas han dado resultados positivos en el ectoquiste, mostrando así la presencia de enlaces peptídicos en esta capa. Así mismo, al ser hidrolizada por la tripsina, se muestra la presencia de la L-Lisina y/o L-Arginina en dicho componente proteico.

TABLA-XXVII. *Tratamientos enzimáticos.*

ENZIMA	N° CLASIFICACION*	ECTO-	MESO-	ENDO-	C GRA-
α -1,4-glucan-4-glucano-hidrolasa.	E.C. 3.2.1.1.	-	-	-	?
β -1,4-glucan-4-glucano-hidrolasa.	E.C. 3.2.1.4.	-	?	-	?
poli- β -1,4-(2-acetamido-2-dexosi)-D-glucósido	E.C. 3.2.1.14	-	?	-	?
N-acetilmuramil-hidrolasa	E.C. 3.2.1.17	-	?	(\pm)**	?
Mucopolisacarido-N-acetilneuraminilhidrolasa	E.C. 3.2.1.18	-	-	-	?
α -D-glucosido-glucohidrolasa	E.C. 3.2.1.20	-	?	+	?
β -D-glucosido-glucohidrolasa	E.C. 3.2,1.21	-	?	+	?
Hialuronidasa glicanohidrolasa	E.C. 3.2.1.35/36	-	-	-	?
Peptina peptidil hidrolasa	E.C. 3.1.1.9	-	-	-	?
Pepsina	E.C. 3.4.4.1.	+	-	-	?
Tripsina	E.C. 3.4.4.4.	+	-	-	?

(*): Clasificación según IUB(1964); (**): Acción prolongada y activada con ClNa (consultar Tabla-XXI); (-): negativo; (+): positivo; (?): desconocido.

El incremento de coloración, AA (pH 0,5), que sufre el endoquiste despues de tratamiento con SDS (dodecil sulfato sódico), puede interpretarse como que dicho agente interaccionase con elementos proteicos (LEHNINGER, 1981), siendo estos rodeados por moléculas de SDS de tal forma que sus grupos sulfato cargados se hallasen expuestos al medio y luego interaccionasen con el colorante a este pH. Con EDTA (tetraacetato de etilendiamina), no hay incremento ni cambio alguno en la intensidad de coloración de ninguna de las estructuras estudiadas, este agente quelante se une a cationes divalentes que podian estar fijados a grupos aniónicos de la pared y ponerlos de manifiesto posteriormente, esto no ocurre ya que la reacción con el colorante es normal e igual que el control. También podria deberse a una baja mineralización de la pared.

Los tests de solubilidad (Tabla-XXIII) nos servia inicialmente para, apartir de la suspensión de elementos de pared aislados, quedarnos con uno sólo de ellos para poder analizarlo mejor por métodos bioquímicos. La gran escasez de material utilizable ha imposibilitado la realización de este análisis básico.

Al tratar con NaOH 1N o KOH 1N en caliente (70°- 100°C) eliminamos el elemento endoquistico, mientras que un tratamiento ácido, igualmente en caliente, puede eliminar el ectoquiste y quedarnos con el elemento endoquistico. Sabemos que los enlaces peptídicos pueden ser rotos por hidrólisis clorhídrica (NIEMEYER, 1971). Por otra parte, existen contradicciones, ya que el enlace glucosídico es estable a las bases pero se hidroliza por ebullición con ácido. En el caso del componente endoquistico, en donde se ha detectado este enlace, no se ha observado, por el contrario, hidrólisis visible al tratar con ClH en caliente y sí con NaOH.

El que no podamos apreciar esa hidrólisis de la capa en cuestión, no es, por otra parte, definitivo, ya que puede darse hidrólisis y no ser detectada. El problema pués estriba en la fiabilidad del método utilizado para detectar dicha posible hidrólisis.

El test de solubilidad con diferentes reactivos no sólo hace desaparecer alguna de las capas de la pared sino que, y como consecuencia de ello, existen cambios en el volumen de las paredes que se mantienen. El tratamiento con Urea 8M, agente desnaturizante de proteínas, hace que el endoquiste se dilate incrementando su volumen aproximadamente un 70%, indicando probablemente la existencia de un componente proteínico que en su presencia se desnaturaliza, provocando esa dilatación límite sin rotura de la estructura, y que llega a romper el ectoquiste.

También, por tratamiento con NaOH 1N en caliente, no sólo desaparece el endoquiste, sino que existe una dilatación ectoquistica, incrementando su volumen un 70% y conteniendo o manteniendo en su interior el citoplasma quístico. Es este otro fenómeno que no atribuimos en este caso a una desnaturalización, sino a lisis proteica.

El ClH 1N en frío origina una plasmolisis celular con una disminución del citoplasma quístico de un 58% aproximadamente, no sufriendo alteración alguna ninguna de las capas quísticas. Por el contrario, este mismo tratamiento ácido, pero en caliente, elimina el ectoquiste y disminuye el volumen endoquístico, que contiene el citoplasma celular, en un 86%. Es difícil la interpretación de estos cambios; contracciones y dilataciones, por la multiplicidad de causas que pueden provocarlo y la inespecificidad del tratamiento.

En la Tabla-XXVIII, como resumen de lo expuesto en relación a la composición o naturaleza de la pared, se expone la posible naturaleza química de las distintas envueltas quísticas en la pared del quiste de resistencia del ciliado hipotrico *Laurentiella acuminata*.

3.3. Estudio comparativo de la composición de la pared quística de *Laurentiella acuminata* con otros ciliados.

Los trabajos citoquímicos de las paredes de los quistes de resistencia de ciliados, son escasos y a veces superficiales, no señalando, en la mayoría de los casos, la envuelta de la pared en la que se detecta el grupo químico en cuestión.

En la Tabla-XXIX, se muestran los elementos identificados en las tres principales capas quísticas, en los que se ha realizado un estudio citoquímico, incluido *L. acuminata*.

Se presentan MPS de carácter ácido en las tres capas quísticas principales y en grupos diferentes de ciliados como los Holotricos: *Nassula picta*, *Pseudomicrotorax agilis* y *Didinium nasutum* (BUSSERS, 1976), los Heterotricos: *Fabrea salina* y *Bursaria truncatella* (BUSSERS, 1976) y el Hipotrico: *Laurentiella acuminata*.

Constituyentes proteicos son así mismos abundantes en todos los grupos y en todas las capas. *L. acuminata* sigue la característica común al grupo de los Hipotricos, al no presentar Quitina en su pared.

TABLA-XXVIII. *Posible composición química de las capas quísticas de la pared del quiste de resistencia de L. acuminata.*

CAPA QUISTICA	COMPOSICION
Ectoquiste	Carbohidrato*: CG-mps(Sap). A 2,5-AA(0,0 Cl ₂ Mg, 0,3 Cl ₂ Mg) Proteína pobre en grupos -SH libres, presencia de aminoácidos L-Lisina y/o L-arginina.
Mesoquiste	Proteína?
Endoquiste	Carbohidrato*: CSG-mps(Sap)- A 2,5-AA(0,0 Cl ₂ Mg, 1,0 Cl ₂ Mg) Proteína pobre en grupos -SH libres.
C. Granulosa	Carbohidrato*: CSG-mps-A 2,5. Proteína.

(*): Clasificación histológica de SPICER et al, (1965).

No existen diferencias demasiado drásticas en lo que se refiere a la composición de las distintas capas, para un mismo ciliado, aunque hay que tener en cuenta que con este tipo de estudios, citoquímicos, es poca la profundidad analítica que se alcanza. Y a veces, extremadamente superficial como en el caso de *Didinium nasutum* (RIEDER, 1973), en el resto de los estudios recogidos en la Tabla-XXIX se ha hecho un análisis un poco más profundo (BUSSERS, 1976).

En resumen, podemos decir que el componente proteico y los MPS ácidos son elementos muy comunes en las distintas envueltas quísticas de la pared de los quistes de resistencia de ciliados.

A diferencia de lo que ocurre en el test de solubilidad de *L. acuminata*, con respecto al NaOH a 100°C (3h), el ectoquiste es eliminado en *Nassula picta*, *Pseudomicrothorax agilis*, *Fabrea salina* y *Bursaria truncatella* (BUSSERS, 1976). Y en las tres primeras especies el mesoquiste y endoquiste resisten a este tratamiento, cosa que no ocurre en *L. acuminata*.

La resistencia de estas capas a dicho tratamiento en aquellos ciliados con Quitina, puede ser debida a la presencia de la misma. Lo que no es explicable es la no lisis del ectoquiste de *L. acuminata*, después de este tratamiento.

El endoquiste de *Bursaria truncatella* es lisado al incrementar la concentración de NaOH a 7,5N, 100°C (3h), estando desprovisto de Quitina (Tabla-XXIX) (BUSSERS, 1976). Al igual que en *L. acuminata*, el meso- y endoquiste de *Bursaria truncatella*, es excepcionalmente resistente al ClH 1N a 20°C, a SO₄H₂ 36N y a ácido nítrico concentrado.

TIBBS (1966), sobre *Colpoda steinii*, también ensaya la acción de diversos reactivos sobre las paredes quísticas de

TABLA-XXIX. Composición química de las paredes quísticas en diferentes ciliados estudiados citoquímicamente.

CAPA QUISTICA	<i>Nassula picta</i> (1)	<i>Pseudomicrothoras agilis</i> (2)	<i>Didinium nasutum</i> (3)	<i>Fabrea salina</i> (4)	<i>Bursaria truncatella</i> (5)	<i>Laurentiella acuminata</i> (6)
Ectoquiste	?	Proteína	MPSa	MPSa Proteína	?	MPSn y a carboxílicos Proteína pobre en-SH
Mesoquiste	Quitina MPSa	Quitina MPSa Proteína con -SH	Polisacaridos Proteína Lípidos	Quitina MPSa Proteína con -SH	Silice Quitina Proteína	Proteína ?
Endoquiste	Quitina MPSa Proteína	Quitina MPSa Proteína	MPSa	Quitina MPSa Proteína	Proteína con -SH	MPSn y a carboxílico y sulfatado Proteína pobre en-SH

MPSn: mucopolisacaridos neutros; MPSa : mucopolisacaridos ácidos;

(1),(2) y (3) : Ciliados Holotricos. (4) y (5): Ciliados Heterotricos. (6): Ciliado Hipotrico.

este ciliado. Observando que ninguno de los siguientes reactivos solubiliza o fracciona la pared; ClH 1N, NaOH 1N, Urea 8M, EDTA 0,1M + Urea 8M, ácido dicloroacético, m-cresol e isocianato de litio (5%).

3.4. *Función de las diferentes envueltas quísticas en la pared del quiste de resistencia.*

Atendiendo a los resultados obtenidos, no sólo en *L. acuminata*, sino los recogidos por otros autores, sobre las paredes quísticas, podemos establecer una serie de consideraciones acerca de la función que puede desempeñar cada envuelta quística en la pared del quiste de resistencia.

El ectoquiste no se diferencia demasiado en su composición química del resto de las capas, pero sí en su morfología. Al ser la capa más externa y presentar irregularidades o protuberancias, se le puede asignar la función de facilitación de transporte y fijación. Resolviendo así el problema de la dispersión ecológica o fijación a estructuras superiores que le faciliten mayor protección.

Acerca de su permeabilidad habría que decir que no sólo permea moléculas del tamaño de las del agua sino también mayores como la urea.

No se han encontrado, en *L. acuminata*, aperturas a modo de poros u operculos que faciliten la salida celular durante el exquistamiento, por lo que durante dicho proceso hay ruptura o lisis de dicha capa, demostrando así la capacidad de sintetizar las enzimas líticas para ello.

No es una capa que ofrezca demasiada resistencia o protección al citoplasma quístico durante la fase de reposo. Una sonicación leve provoca en algunos quistes la desaparición del ectoquiste sólo y parte del mesoquiste unido al primero, estos quistes presentan un tamaño normal y son viables e inducibles a exquistar, como los que poseen también ectoquiste. Demostrándose así que el ectoquiste no es absolutamente necesario para el mantenimiento y conservación de la viabilidad del quiste.

La segunda capa quística o mesoquiste, no presenta una composición química tan fácil de identificar citoquímicamente como las restantes, ya que su textura es dispersa o esponjosa en su mayor parte, no presentando un elemento estructuralmente tan compacto o denso como las restantes, a la cual se puedan fijar y acumular los diferentes reactivos. Nuestros resultados sólo indican cierta naturaleza proteica poco definida.

Esta envuelta, por su aspecto, se la puede atribuir una posible función de embeber o retener agua u otros elementos, que cumplirían una importante función durante la inducción a exquistar, es decir una envuelta-transito o intermediaria de "información molecular" para exquistar. Por su aspecto tampoco le podemos atribuir una seria función de resistencia o protección celular.

El endoquiste o tercera capa quística, muestra una serie de peculiaridades más interesantes que le hace jugar un importante papel tanto en la protección celular quística como en la captación de "información molecular" externa en el momento de la inducción a exquistar.

La observación, antes descrita, de la obtención de quistes, tras leve sonicación, con sólo endoquiste, y capaces de exquistamiento normal, nos indica que esta es la envuelta quística que ofrece real protección y contención al citoplasma quístico. A veces, de forma espontánea aparecen quistes que no presentan capa endoquística, ya porque no han logrado formarla durante el enquistamiento, ya porque la formaron y la perdieron por razones desconocidas. Estos quistes con sólo ectoquiste visible presentan un citoplasma vacuolizado y de mayor volumen que los normales, y no son capaces de exquistar. El verdadero elemento protector en estos quistes ha desaparecido o no se ha producido, haciendo inviable a la célula.

Es interesante, también, hacer notar la elasticidad de esta capa, que no sólo se manifiesta en el tratamiento con la Urea, manteniendo dicha cubierta en su máxima tensión, sino, igualmente, en la fase final del exquistamiento, en la que el protozoo, no sólo *L. acuminata* (GUTIERREZ et al, 1981) sino en casi todos los hipotricos estudiados, emerge rodeado por esta envuelta que ya se encuentra desligada de la película celular, la cual va dilatándose, quizás no sólo por el efecto mecánico del movimiento ciliar sino también de lisis enzimática, hasta que se rompe y deja libre a la célula.

El estudio citoquímico del endoquiste nos revela la presencia tanto de MPS ácidos carboxílicos y sulfatados como de proteína. Se sabe (LØVTRUP, 1974) que los MPS tienen gran afinidad con las llamadas "proteínas tensibles" (PT), semejantes a la actina y capaces de hacerse tensas y formar junto con los MPS una matriz que puede involucrar extensión y relajación de la estructura. La posibilidad de que estas proteínas o este tipo de asociación estructural polimérica se dé

en el endoquiste explicaria no sólo la elasticidad de esta envuelta sino su rigidez.

En cuanto a la otra posible importante función a desempeñar por el endoquiste, lo muestra la presencia de MPS ácidos carboxílicos y sulfatados. Los grupos cargados en los MPS pueden jugar una importante función anfotérica resultante de la presencia de estos grupos cargados positiva y negativamente (KOBAYASHI, 1971), y de reconocimiento y captación de información exógena al sistema, sobre todo por parte de los grupos carboxílicos, hidroxilos, sulfatos y sulfidrilos (NISHIHARA et al, 1981).

El endoquiste, no sólo por la presencia de estos grupos sino también por su proximidad a la película celular, a través de la capa granulosa, semejante químicamente al endoquiste, podría ser receptor de "información molecular" exógena y transmitirla, vía capa granulosa, a la película del protozoo.

Por lo que se refiere a la capa granulosa, envuelta que sólo aparece en hipotricos, no se la puede calificar de verdadera capa quística, tratándose más bien de una "zona-transito" de contenido diverso (elementos celulares, precursores de otras capas, inclusiones, etc), que hace de elemento cementante entre las verdaderas capas quísticas y la película del protozoo, o elemento de "anclaje", al presentar esas hendiduras o crestas que se introducen en el citoplasma quístico.

En resumen, mantenemos el siguiente modelo hipotético de funcionamiento de las distintas envueltas quísticas:

CAPA QUISTICA	POSIBLE FUNCION
Ectoquiste	Función ecológica, facilitando la dispersión y adhesión a estructuras superiores y manteniendo una primera protección.
Mesoquiste	Facilita la recepción de "información molecular exógena" al endoquiste, reteniendo determinados componentes y proporcionando hidratación.
Endoquiste	Protección y contención real del citoplasma quístico. Recepción de las señales exógenas inductoras de exquistamiento y envío de las mismas a la célula, via capa granulosa.

4. *Estructura y cinética de aparición de los precursores de la pared durante el enquistamiento.*

En la introducción de este trabajo ya se ha comentado la escasez de datos bibliográficos acerca de los precursores que originan las capas de la pared quística. Por ello sólo podemos confrontar nuestras observaciones con los pocos ciliados hipotricos en donde se ha realizado este tipo de estudio. El resumen de las características estructurales de estos se expone en la Tabla-XXX.

Uno de estos trabajos se refiere a *Diophrys scutum* (WALKER & MAUGEL, 1980), y en él se describen unas vesículas que los autores suponen ser precursores de alguna de las capas, no especificando cuál.

En cuanto al resto, existe una gran coincidencia estructural con respecto a los precursores ectoquisticos y mesoquisticos. En todas las especies se describe el endoquiste pero no se aportan datos acerca de sus precursores, por lo que no podemos confrontar resultados respecto a lo que aquí hemos descrito como precursores endoquisticos.

En cuanto a los precursores de la capa granulosa, existen notables diferencias entre *L. acuminata* y el resto de los descritos. Apoyando así, de nuevo, la idea de que no se trata de una verdadera capa quística de morfología constante. En *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) estos precursores aparecen como cuerpos esféricos de contenido amorfo. (Tabla-XXX), en *Oxytricha fallax* (GRIMES, 1973) se presentan como cuerpos pequeños y densos, y en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) se describen unos cuerpos de morfología irregular como probables precursores de dicha capa. Quizás los precursores más parecidos a los descritos en *L. acuminata* son los descritos en el género *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976).

Los precursores ectoquisticos de *L. acuminata* se muestran un poco más pequeños (0,9 μ de longitud) a los descritos en *Gastrostyla steinii* (WALKER et al, 1980) de 1,1 - 1,2 μ de longitud y en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) de 1,5-2,0 μ de longitud. Aunque esto es extremadamente variable, y el espesor o grosor del precursor depende del número de placas de que esté constituido, que está también variable.

Los precursores de la capa granulosa de *L. acuminata* son algo más pequeños (0,1-0,2 μ de diámetro) que los descritos en *Pleurotricha* sp. (MATSUSAKA, 1976) cuyo diámetro es de unos 0,5 μ .

TABLA-XXX. Comparación entre precursores quísticos de diferentes ciliados Hipotricos.

<u>CILIADO HIPOTRICO</u>	<u>ORGANULO PRECURSOR</u>	<u>CAPA QUE ORIGINA</u>	<u>REFERENCIA</u>
<i>Diophrys scutum*</i>	Vesiculas con gránulos	No se especifica	WALKER & MAUGEL (1980)
<i>Gastrostyla steinii</i>	Discos empaquetados	Ectoquiste	WALKER et al (1980)
	Elemento fibrilar	Mesoquiste	
	Cuerpos irregulares	C. Granulosa	
<i>Pleurotricha sp.</i>	Discos empaquetados	Ectoquiste	MATSUSAKA (1976)
	Cuerpos como cordones	Mesoquiste	
	Cuerpos esfericos con sustancia amorfa.	C. Granulosa	
<i>Oxytricha fallax</i>	Pilas de discos	Ectoquiste	GRIMES (1973)
	Cuerpos largos y fibrosos	Mesoquiste	
	Cuerpos pequeños y densos	C. Granulosa	
<i>Laurentiella acuminata</i>	Pilas de placas o discos	Ectoquiste	Este trabajo.
	Paquetes de fibras	Mesoquiste	
	Vesiculas elipsoidales	Endoquiste	
	Cuerpos esféricos con doble membrana.	C. Granulosa	

(*): Fam. Euplotidae, el resto pertenece a la Fam. Oxytrichidae.

No existen datos acerca de la génesis de los precursores quísticos, sin embargo, en *L. acuminata* hemos podido observar la formación de precursores ectoquísticos a partir de unos orgánulos rodeados por una membrana, de contenido granular disperso y que son comparables a los descritos por GRIMES (1973) en *Oxytricha fallax*. La pérdida sucesiva de afinidad por el PATAg puede ser debida a la disminución de grupos 1:2 glicol libres como consecuencia de la polimerización o incorporación de otros elementos en estos grupos, que tendría lugar en la formación de las placas.

La duración del estado prequístico desde la inducción hasta la aparición de una pared visible al MO, oscila entre 7 y 9 h. El estado-A es el de mayor duración (37,6% del total), los estados-B y C tienen aproximadamente la misma duración (17-18% del total) y el más breve es el estado-D (8,2% del total). Los estados en que hemos dividido el proceso de enquistamiento en *L. acuminata* coinciden en líneas generales con los propuestos por MATSUSAKA (1979) en *Histriculus sp.*, aunque la duración del proceso global es menor en *Histriculus sp.* (4-4,5h). Y la aparición de los precursores ectoquísticos es más temprana en *L. acuminata* que en *Histriculus sp.* (MATSUSAKA, 1979). La aparición temprana de precursores de pared quística ha sido también descrita en *Tetrahymena rostrata* (MCARDLE et al, 1980).

La génesis de la pared quística es un proceso secuencial a dos niveles:

- a)- Aparición sucesiva en el citoplasma de precursores, posiblemente determinada por una expresión génica igualmente secuencial.
- y b)- Secreción sucesiva de los distintos precursores que van a formar las capas de la pared.

Sobre el mecanismo de desplazamiento de estos precursores a través del citoplasma hasta alcanzar la superficie, WALKER et al, (1980), refiriéndose a los precursores ectoquisticos de *Gastrostyla steinii*, sugieren la intervención de un sistema microtubular asociado a dichos precursores, sin embargo nosotros no hemos observado en *L. acuminata* elementos microtubulares.

En cuanto a la citoquímica por ME realizada sobre los precursores, podemos decir que coinciden plenamente con la realizada tanto por ME como por MO sobre las capas quísticas ya formadas de las cuales son progenitores.

Y no hay ninguna información fiable acerca del origen celular de dichos precursores, especulándose entre el sistema de Golgi y el RER.

El modelo que se presenta acerca del crecimiento y formación de las distintas capas quísticas, es un modelo elaborado no sólo basándonos en nuestras observaciones sino también en la de otros autores. La salida de los precursores al exterior celular puede realizarse por rotura de la película del protozoo o fusión de las membranas peliculares con la vesícula portadora de elemento precursor. Los precursores del ectoquiste se fijan a la película y probablemente, como sugieren WALKER et al. (1980), se depositan entre las membranas peliculares.

Sugerimos que el mesoquiste crece por aposición de precursores y su crecimiento va presionando sobre los precursores ectoquisticos, que son contenidos inicialmente por la película más externa que ha quedado fuera. Probablemente, las dos zonas que se distinguen en la capa mesoquistica son consecuencia de un distinto grado de empaquetamiento de las fibras, y no son debidas a la existencia de dos tipos de precursores mesoquisticos.

5. *Cinética del enquistamiento y sus alteraciones por la luz UV.*

En todos los casos en que se ha estudiado la cinética de enquistamiento, tanto en amebas (RASTOGI et al, 1977 RUDICK, 1971) como en ciliados (MATSUSAKA, 1977), ésta se presenta como una cinética de tipo sigmoide.

En la introducción a este trabajo se ha analizado teóricamente los dos parámetros más importantes que pueden caracterizar una curva de enquistamiento; el tiempo medio de enquistamiento (tiempo en que se ha enquistado el 50%) y la desviación standard que viene a representar el grado de sincronía de la población enquistándose.

El único trabajo con que podemos hacer una mínima comparación es el referente al, también ciliado hipotrico, *Histriculus sp.* (MATSUSAKA, 1977), en el que se hace un estudio de la sincronía del enquistamiento y la importancia de la osmolaridad o fuerza iónica en la consecución de la misma, obteniéndose un óptimo de sincronía utilizando la solución Osterhout x 10. En este caso concreto, el t_{50} tiene un valor de 4h y el t_{100} es de 4,5h. En *L. acuminata*, sin embargo, no se alcanza una sincronía tan alta, ya que su t_{50} es de 5h y su t_{100} es de 8h.

Histriculus sp. en las condiciones óptimas de sincronía presenta un mtp de 3 - 3,5h y un Mtp de 4,5h, mientras que *L. acuminata* muestra unos valores de mtp = 3h y un Mtp de 8h. En el primer caso los tiempos prequísticos se limitan a aproximadamente una hora, en el segundo es de cerca de cinco horas. La sincronía alcanzada en el primero es mucho mayor.

Algo que, en principio, puede extrañar, es la diferencia observada en *L. acuminata* entre los tiempos prequísticos obtenidos sobre una población heterogénea para el estudio de su cinética y los obtenidos sobre individuos aislados para el estudio de las diferentes etapas. Caben dos explicaciones:

- 1)- Que los individuos elegidos al azar para el estudio de las etapas hayan coincidido en presentar unos tiempos prequísticos totales próximos al Mtp que muestra una población heterogénea o
- 2)- Que la diferencia estribe en haber tenido que usar individuos aislados y no poblaciones, y como se ha señalado para otros protozoos, la densidad celular sea un factor de comunicación intercelular durante el enquistamiento haciendo que la respuesta a la inducción sea más eficiente y rápida que en el caso de un cultivo individual. Nos inclinamos por esta segunda posibilidad.

El estado de célula prequística parece ser el único en que tras irradiación UV se obtiene variaciones en la cinética de enquistamiento, ya que las células vegetativas (estado-G₁) irradiadas con dosis semejantes presentan una cinética y un EN₅₀ no diferentes significativamente del presentado por el control, sin tratamiento.

A dosis más bajas, existe una aceleración del enquistamiento o acortamiento del Mtp necesario, obteniéndose un EN₅₀ aproximadamente 28,3% más bajo que el control. Esto también ha sido señalado para otros procesos celulares, tales como la división celular (LOZINA-LOZINSKY & USPENSKAJA, 1968). Dosis superiores muestran un retraso del enquistamiento y un incremento lineal de los valores de EN₅₀, también se ha señalado retraso en la división celular (CARATERO et al, 1980; LOZINA-LOZINSKY & USPENSKAJA, 1968) y en la regeneración celular

(BURCHILL, 1968) tras irradiación UV con dosis superiores a las que causaba la aceleración en el mismo proceso. Las curvas obtenidas con dosis de 8.400 y 9.600 ergs/mm² presentan una pendiente superior a la del control, sugiriendo una pérdida de sincronía y un incremento del tiempo prequistico.

Las diferencias obtenidas en cuanto al estado fisiológico celular; estado vegetativo (G₁) y estado prequistico temprano, referentes a la alteración o no de la cinética de enquistamiento, la podríamos explicar ciñendonos básicamente a las diferencias fisiológicas de ambos estados; el estado activo vegetativo presenta, al recibir la radiación, mayores posibilidades de reparación del daño causado y posterior normal entrada en el enquistamiento, tras su inducción, que aquellas presentadas por el estado prequistico, cuya maquinaria celular se encuentra "comprometida" a la obtención de un quiste de resistencia normal. En este estado de inicio de un proceso de diferenciación celular el sistema vivo se enfrenta con un doble problema a resolver; reparación de daños sufridos y continuación del proceso iniciado. Probablemente, esta sea la causa del retraso aparecido a dosis superiores o que causan mayor efecto letal.

Como se ha señalado para la división celular en algunos protozoos, la radiación UV (con una longitud de onda en que absorben nucleoproteínas) a bajas dosis provoca una estimulación de dicho proceso. Esa estimulación fisiológica, puede venir provocada por una activación enzimática, así en *Tetrahymena pyriformis* (WESTERGAARD & MARCKER, 1976) se ha detectado una superproducción de un tipo de ADN polimerasa, tras irradiación UV.

De una manera semejante, usando dosis bajas de radiación UV (dosis estimulativas), se podrían activar o sobre-estimular determinadas actividades enzimáticas que tienen lugar al inicio y durante el enquistamiento, resultando así la aceleración del mismo.

6. *Efectos de la radiación UV sobre la pared quística.*

Al igual que ocurre con las alteraciones experimentadas en la cinética de enquistamiento, sólo se aprecian cambios en los quistes formados cuando se irradia sobre el estado prequística temprano y no sobre el estado vegetativo activo.

La anormalidad de la pared quística consiste en la presencia de una capa supernumeraria; un doble mesoquiste, junto con la ausencia de las típicas espinas o protuberancias formadas conjuntamente por el ectoquiste y mesoquiste. Esta alteración del patrón normal de formación de la pared quística parece ser específico de la regulación de la cantidad de precursores mesoquísticos formados, junto con una probable alteración de la cinética de aparición de estos precursores.

Las dos zonas identificadas en el mesoquiste normal están así mismo repetidas en los quistes anormales, corroborando así la existencia de dos mesoquistes completos haciendo que el espesor total sea también doble. La pérdida de las típicas espinas, se puede deber al mayor y anormal crecimiento de la doble capa mesoquística.

En el ciliado marino *Fabrea salina*, DEMAR-GERVAIS (comunicación personal) ha observado una espontánea y similar

alteración de la pared quística en los quistes de resistencia de este ciliado. Y se puede postular que cambios en la concentración iónica del medio puedan ser la causa de esta alteración, sin embargo, en el caso de *L. acuminata* no hemos observado en ninguna ocasión alteraciones espontaneas de la pared quística despues de realizar cambios en la concentración iónica del medio por evaporación.

La interpretación de los experimentos concernientes a la persistencia de esta anomalía no es fácil. En primer término, la cantidad obtenida de quistes de resistencia con pared quística anormal es muy alta, mostrandose así la sensibilidad de estas células a la alteración directa o indirecta provocada por la irradiación UV. Posteriormente, se aprecia que esta característica se "diluye" de generación en generación hasta que se pierde finalmente. Esta anomalía no afecta a la viabilidad celular, ya que son capaces de realizar normalmente división celular y nuevos ciclos E-E.

Se pueden proponer dos posibles interpretaciones;
a)- Que esta anomalía sea un carácter contra-seleccionado.
o b)- Que se trate de una desregulación a nivel citoplásmico y las proteínas alteradas por la radiación UV se pierdan de generación en generación.

Somos conscientes de la necesidad de una mayor y más intensa investigación de estas alteraciones no sólo para identificar la causa real de la anomalía sino para intentar la estabilización de esta característica. Al no darse en este protozoo algún proceso sexual en su ciclo biológico, se nos imposibilita cualquier tipo de trabajo genético en torno a este problema.

7. *Perspectivas en la investigación sobre quistes y el ciclo E-E.*

A la vista de todo lo expuesto anteriormente, y concretándonos al campo de la Ciliatología, hacemos destacar la dramática falta de estudio en lo que concierne a lo que en el principio llamamos Quistología.

El problema más crucial que se presenta, es la versatilidad y domesticación del material vivo empleado. Pensamos que dicho material debe presentar básicamente tres características si deseamos realizar estudios bioquímicos y genéticos en torno al ciclo E-E:

- 1)- Facilidad de cultivo, preferentemente axénico, obteniéndose una buena densidad celular en un tiempo prudencial.
- 2)- Que se dé el ciclo E-E, con fácil inducción.
- y 3)- Que presente en su ciclo biológico alguna actividad sexual (conjugación u otras), que faciliten los estudios genéticos.

¿Existe algún candidato que presente estas tres características?. Aquí vamos a proponer sólo dos, con sus ventajas e inconvenientes. El primero de ellos son los individuos del complejo *Tetrahymena rostrata*. Su ficha de ventajas y desventajas es la siguiente:

- Ventajas:
- Cultivo axénico, fácil control del mismo, tanto en medio sólido como en medio líquido. Tiempo de generación medio de 15 h a 20°C (DOBRA et al, 1980).
 - Fácil inducción del ciclo E-E. Obteniéndose quistes estables.
 - En las últimas etapas de dicho proceso (McARDLE et al, 1980) suele darse autogamia (fenómeno sexual que implica homocigosis).

Desventajas: - No se conoce en él la Conjugación, pero no se excluye la posibilidad de inducirla en el laboratorio. (CORLISS, 1973).

El segundo candidato es el hipotrico *Oxytricha fallax*, su ficha de ventajas y desventajas es la siguiente:

Ventajas: - Fácil inducción del ciclo E-E, obteniéndose quistes estables.

- Se conocen tipos conjugantes.

Desventajas: - Cultivo no axénico, no fácil control del mismo, crecimiento sólo en medio líquido.

Ante estos hechos, y considerando que la metodología genética está mucho más desarrollada en el género *Tetrahymena* que en *Oxytricha*, en el momento de elegir mejor candidato nos inclinamos por los individuos del complejo *Tetrahymena rostrata*. Y sobre este hymenostómido han de centrarse los futuros estudios bioquímicos y genéticos en relación al ciclo E-E.

Una vez elegido el material vivo sobre el cual trabajar, es importante plantearse las cuestiones y problemas más urgentes e interesantes que pueden derivarse del estudio del ciclo E-E. A modo de potencial futuro programa de trabajo, podemos indicar algunas de las que consideramos más importantes cuestiones a resolver respecto a este tema:

Bioquímicos y Fisiológicos:

- Estudio en profundidad de los biopolímeros que constituyen la pared quística, obtención de un modelo de estructura macromolecular de la misma.

- Estudio de las nuevas proteínas que surgen durante el ciclo E-E, determinación de sus propiedades bioquímicas, ya sean enzimáticas o estructurales.

- Cinética del enquistamiento, modificaciones de la misma, cues tiones de reversibilidad en el ciclo E-E.

- Características bioquímicas del estado criptobiótico (quiste) y diferencias respecto al estado activo (vegetativo).
- Inductores de enquistamiento, receptores peliculares.

Genéticos y Morfogenéticos:

- Obtención de mutantes a lo largo del ciclo E-E, identificación génica de los mismos.
- Aislamiento y estudio de los posibles diferentes tipos de ARNs que surgen en el ciclo E-E
- Estudio de los cambios histónicos y cromatínicos durante el ciclo E-E.
- Regulación de la expresión génica macronuclear en el ciclo E-E.
- Estudio de los procesos sexuales ligados al ciclo E-E.
- Cambios peliculares que implican desaparición o aparición de estructuras corticales, formación *de novo* de dichas estructuras.

Por supuesto, estos son a grandes rasgos algunas de las propuestas temáticas futuras en torno al ciclo E-E. Cada una de ellas puede, por sí, constituir una línea a extender todo lo que se quiera.

De la revisión realizada junto con nuestra experiencia nos llevan a concluir, por último, la necesidad que tiene la Ciliatología, y en general la Protozoología, de la intensificación y proliferación de estos estudios.

CONCLUSIONES

Los resultados y su discusión expuestos en este trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

A)- *Sobre la estructura de la pared quística y características del citoplasma quístico.*

- 1- La estructura de la pared quística del ciliado hipotrico *Laurentiella acuminata* se acomoda básicamente al modelo presentado por el resto de los ciliados hipotricos estudiados y más estrechamente con los pertenecientes a la Familia Oxytrichidae.
- 2- Las características estructurales del citoplasma quístico coinciden en líneas generales con las presentadas por otros ciliados pertenecientes al grupo KR, pudiéndose así incluir a *L. acuminata* dentro de este mismo grupo.

B)- *Sobre la naturaleza química y función de las diferentes capas quísticas.*

- 1- Los principales componentes identificados en las diferentes envueltas quísticas del quiste de *L. acuminata* son: MPS neutros, ácidos carboxílicos y sulfatados, y un componente proteico pobre en grupos sulfidrilos.

2- Como aquellos ciliados que pertenecen al grupo más filogenéticamente avanzado (los Hipotricos), *L. acuminata* no presenta Quitina en ninguna de sus capas quísticas.

3- A las principales capas quísticas de la pared se le pueden atribuir el siguiente modelo hipotético funcional:

Ectoquiste: Función esencialmente ecológica, que facilita la dispersión y adhesión a otras estructuras, suponiendo una primera barrera protectora.

Mesoquiste: Facilitar la recepción de información molecular exógena y retención de determinados componentes proporcionada por la fácil hidratación de dicha capa.

Endoquiste: Protección y contención real del citoplasma quístico. Recepción de las señales exógenas inductoras de exquistamiento y envío de las mismas a la célula, vía capa granulosa.

C)- *Sobre los precursores quísticos y su cinética durante el enquistamiento.*

1- Los precursores quísticos de *L. acuminata* referentes a las envueltas ectoquística y mesoquística, coinciden morfológicamente con aquellos descritos en otros ciliados hipotricos de la Familia Oxytrichidae. Pudiendo presentar el estudio de sus características cierto valor taxonómico.

2- La génesis de la pared quística es un proceso secuencial a dos niveles:

a)- Aparición sucesiva en el citoplasma quístico de precursores de pared, posiblemente determinado por una expresión génica igualmente secuencial.

b)- Secreción sucesiva de los distintos precursores que van

a formar las capas de la pared.

D)- *Sobre las alteraciones provocadas por la irradiación UV en la cinética de enquistamiento y la pared quística.*

- 1- Las alteraciones experimentadas por la cinética de enquistamiento, tras irradiación UV sobre el estado prequístico temprano, coinciden con aquellas experimentadas en otros procesos celulares tales como la división celular y la regeneración celular.
- 2- La aparición de una doble capa mesoquística y los estudios de la persistencia de la misma nos hacen proponer dos posibles interpretaciones:
 - a)- Que esta anomalía sea un carácter contra-seleccionado.
 - o b)- Que se trate de una desregulación a nivel citoplásmico y las proteínas alteradas por la radiación UV se "diluyan" de generación en generación.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- ARNON, D.I., McSWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.Y. & KEISHIVO, W. *Biochim. Biophys. Acta.* 357, 231-245, 1974.
- ASENSIO, C. & del VALLE, J.A. *Genetica Microbiana, Ed. Alhambra*, 264-297, 1977.
- BALASSA, G. *Current topics in Microbiology and Immunology.* 56, 99-192, 1971.
- BANCHETTI, R., NOBILI, R. RICCI, N. & ESPOSITO, F. J. *Protozool.* 27, 459-466, 1980.
- BENEZECH, C. *El agua base estructural de los seres vivos. Ed. Labor, S.A.* 1973.
- BORROR, A.C. *Biota Acuatica de Sudamerica Austral.* 55-56, 1977.
- BOULIGAND, Y., GIRAUD, M.M, & MEUNIER, F.J. *La morphogenése de la biologie aux mathématiques. Ed. Maloine S.A.* 117-119, 1980.
- BURCHILL, B.R. *J. Exp. Zool.* 169, 471-480, 1968.
- BURCHILL, B.R. & RUSTAND, R.C. *J. Protozool.* 16, 303-306, 1969.
- BURCHILL, B.R. *Europeam J. Cell Biol.* 20, 7-11, 1979.

- BURCHILL, B.R., BORDY, M. & GRENE, R.B. *European J. Cell Biol.* 20, 1-6, 1979.
- BUSSERS, J.C. *Protistologica.* XII, 87-100, 1976.
- BUSSERS, J.C. & JEUNIAUX, Ch. *Protistologica.* X, 43-46, 1974.
- BUTZEL, H.M.Jr, & BOLTEN, A.B. *J. Protozool.* 15, 256-258, 1968.
- BUVAT, R. *La célula vegetal. Introducción a la Citología.* Ed. Guadarrama, S.A. 1969.
- BYCHENKOVA, U.N, LOZINA-LOZINSKY, L. K. & MANALOV, T. *Zool. Zh.* 48, 1772-1779, 1969.
- BYERS, T.J. *International Review of Cytology.* 16, 283-337, 1979.
- BYERS, T.J., KUHNS, M.C., KING, L.E., SEILHAMER, J.J. & NIES, E.A. *Regulatory Biology.* Ohio State University Press. 348-349. 1977.
- BYERS, T.J., AKINS, R.A., MAYNARD, B.J., LEFKEN, R.A. & MARTIN, S.M. *J. Protozool.* 27, 216-219, 1980.
- CALKINS, G.N. *Protozoa in Biological Research.* Columbia university Press. 3-42, 1941.
- CARATERO, C., CARATERO, A. & PLANEL, H. *Arch. Biol.* 91, 21-36, 1980.
- CAVALIER-SMITH, T. *Molecular and Cellular aspects of Microbial Evolution.* Cambridge University Press. 33-84. 1981.

- CHABAS LOPEZ, J. *Enzimologia. Ed. Cientifico-Medica.* 1969.
- CORLISS, J.O. *Biology of Tetrahymena.* Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. 1-55, 1973.
- CORLISS, J.O. *The Ciliated Protozoa. Characterization, Classification and guide to the Literature.* Pergamon Press. 311, 1979.
- CORLISS, J.O. & ESSER, S.C. *Trams. Amer. Micros. Soc.* 93, 578-593. 1974.
- DAGGETT, P.M., KRICHEVSKY, M.I., ROGOSA, M. CORLISS, J.O. & GIROLAMI, J.P. *J. Protozool.* 27, 353-361, 1980.
- DAWES, I.W. *Molecular and Cellular aspects of Microbial Evolution.* Cambridge University Press. 85-130. 1981.
- DESLAURIERS, R., JARRELL, H.C., BYRD, R.A. & SMITH, I.C.P. *FEBS Letters.* 118. 185-190. 1980.
- DOBRA, K.W., McARDLE, E.W. & EHRET, C.F. *J. Protozool.* 27, 226-230, 1980.
- FAURE-FREMIET, E., GAUCHERY, M. & TUFFRAU, M. *Bull. Biol.* 88, 154-167. 1954.
- FEDRIANI, C. MARTIN, J. & PEREZ-SILVA, J. *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol).* 74, 67-74, 1976.
- FILOSA, M.F. *J. Exp. Zool.* 207. 491-495, 1979.
- FILOSA, M.F. & DENGLER, R.E. *Develop. Biol.* 29, 1-16, 1972.
- FINLEY, H.E. & LEWIS, A.C. *J. Protozool.* 7, 347-351, 1960.

- FREESE, E. *Current Topics in Develop. Biol.* 7, 85-124, 1972.
- GANDER, J.E. *Annual Review of Microbiology.* 28, 103-119, 1974.
- GANTER, P. & JOLLES, G. *Histochemie Normale et Pathologique.*
Ed. Gauthiers-Villars. Paris. T II. 1969.
- GARNJOBST, L. *Arch. F. Protist.* 89, 317-381, 1937.
- GIESE, A.C. *Blepharisma, the biology of a light-sensitive protozoan.* Stanford University Press. 1973.
- GIESE, A.C. *J. Protozool.* 25A, 1979.
- GONZALEZ, J. *Protistologica.* XV, 487-493, 1979.
- GOODAY, G.W. & TRINCI, A.P.J. *The Eukaryotic Microbial Cell.*
Cambridge University Press. 207-251, 1980.
- GOODEY, T. *Proc. Roy. Soc. London.* 86, 427-439, 1913.
- GRELL, K.G. *Protozoology.* Springer-Verlag, Berlin. 1973.
- GRIMES, G.W. *Genet. Res. Camb.* 21, 57-66, 1973.
- GRIMES, G.W. *J. Protozool.* 20, 92-104, 1973.
- GRIMES, G.W. *Genet. Res. Camb.* 27, 213-226, 1976.
- GRIMES, G.W. *Amer. Zool.* 22, 35-46, 1982.
- GRIMES, G.W. & HAMMERSMITH, R.L. *J. Embryol. exp. Morph.* 59,
19-26, 1980.
- GRIFFITHS, A.J. *Adv. Microb. Physiol.* 4. 105-129. 1970.
- GRIFFITHS, A.J. & BOWEN, S.M. *J. Gen. Microbiol.* 59, 239-245,
1969.
- GUTIERREZ, J.C. *Medicamenta.* 318, 23-26. 1975.

- GUTIERREZ, J.C. & TORRES, A. *Congreso Nacional de Microbiologia. Micro 54. COO L 31. (Cadiz). 1979.*
- GUTIERREZ, J.C. & PEREZ-SILVA, J. *J. Protozool. 27, 82A, 1980.*
- GUTIERREZ, J.C. & PEREZ-SILVA, J. *FESBE-2, 488, 1981.*
- GUTIERREZ, J.C. & PEREZ-SILVA, J. *VI International Congress of Protozoology. Polonia. 1981.*
- GUTIERREZ, J.C., TORRES, A. & PEREZ-SILVA, J. *VIII-Congreso Nacional de Microbiologia. Madrid. 1981.*
- GUTIERREZ, J.C., TORRES, A. & PEREZ-SILVA, J. *VIII-Congreso Nacional de Microbiologia. Madrid. 1981.*
- GUTIERREZ, J.C., TORRES, A. & PEREZ-SILVA., J. *Acta Protozool. 20, 145-152. 1981.*
- GUTIERREZ, J.C., SERRANO, A. & PARRA, F. *Acta Protozool. (en prensa). 1982.*
- GUTIERREZ, J.C., TORRES, A. & PEREZ-SILVA, J. *XXIéme Reunion Annuelle du GPLF. Toulouse. 1982.*
- HAMMERSMITH, R.L. *J. Cell Sci. 22, 563-573, 1976.*
- HAMMERSMITH, R.L. & GRIMES, G.W. *J. Embryol. exp. Morph. 63, 17-27, 1981.*
- HANSON, E.D. *The origin and early evolution of Animals. Wesleyan Pitman. 1977.*
- HASHIMOTO, K. *J. Protozool. 10, 156-166, 1963.*

- HASHIMOTO, K. *J. Protozool.* 11, 75-84, 1964.
- HASHIMOTO, K. *J. Protozool.* 13, 383-390. 1967.
- HOLT, P.A. & CHAPMAN, G.B. *J. Protozool.* 18, 604-614. 1971.
- HURLEY, L.S. *Molecular basis of Biological degradative processes.* Academic Press. 1-24, 1978.
- ILOWAISKI, S. *Arch. Protist.* 54. 92-136, 1926.
- JANISCH, R. *Acta Protozool.* 19, 239-246, 1980.
- JEFFRIES, W.B. *J. Protozool.* 3, 136-144, 1956.
- JEUNIAUX, Ch. *Bull. Soc. Chimie Biol.* XLVII, 2267-2278, 1965.
- JEUNIAUX, Ch. *Biochemical Evolution and the origin of life.* North-Holland Publishing Company. 304-313, 1971.
- KAY, M.W. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 64, 267-282, 1945.
- KINK, J. *Acta Protozool.* 17, 31-45, 1978.
- KOBAYASHI, S. *International Review of Cytology.* Academic Press. 30, 257-237. 1971.
- KRISHNA MURTI, C.R. *Current Science.* 20, 589-593, 1971.
- KUDO, R.R. *Protozoologia.* CECSA. 1969.
- LASMAN, M. *J. Protozool.* 24, 244-248, 1977.
- LASMAN, M. & SHAFRAN, A. *J. Protozool.* 25, 489-491, 1978.
- LEHNINGER, A.L. *Bioquímica.* Ed. Omega, S.A. 1981.

- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G. , DEROUX, G.,
GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R.,
LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY,
G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. *J. Protozool.*
21, 37-58, 1980.
- LIPPS.,H.J. & MORRIS, N.R. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 74,
230-234, 1977.
- LØVTRUP, S. *Epigenetics. An treative on theoretical Biology.*
John Wiley and Sons. 1974.
- LOZINA-LOZINSKY, L.K. & USPENSKAJA, Z.I. *Acta Protozool.* VI,
297-307, 1968.
- LOZINA-LOZINSKY, L.K., BYCHENKOVA, V.N., ZAAR, E.I., LEVIN,
V.L. & RUMYANTSEVA, V.M. *Life Sciences and Space Research IX*
Akademie Verlag Berlin. 159-165, 1971.
- MAJTRA, S.C., SAGAR, P. & AGARWALA, S.C. *J. Protozool.* 21, 507-511
1974.
- MANWELL, R. *Biol. Bull.* 54., 417-463, 1928.
- MARGULIS, L. *Origin of Eukariotic Cells.* *Yale University Press.*
1970.
- MATSUSAKA, T. *Kumamoto J. Science Biol.* 13, 13-26, 1976.
- MATSUSAKA, T. *Exp. Cell Res.* 110, 459-462, 1977.
- MATSUSAKA, T. *J. Protozool.* 26, 619-625, 1979.
- MAUGEL, T.K. & WALKER, G.K. *29th A.M. Soc. Protozoologists.*
1976.

- MAUPAS, E. *Arch. Zool. exp. gen. ser*, 2, 149-517, 1888.
- MAZUR, P. *Limits of Life*. Reidel Publishing Company. 1-23, 1978.
- McARDLE, E.W., BERGQUIST, B. L. & EHRET, C.F. *J. Protozool.* 27, 388-397, 1980.
- MCCARTY, K.S. *Cell cycle regulation*. Academic Press. INC. 9-30, 1978.
- MELLO, M.L.S. *Ciencia e Cultura*. 30, 290-303. 1978.
- MERCER, E.H. & BIRBECK, M.S. C. *Manual de Microscopia Electronica para Biologos*. Ed. Blume. Madrid. 1979.
- MIGNOT, J.P. & BRUGEROLLE, G. *J. Protozool.* 21, 649-658, 1974.
- MORAT, G., CHESA, M.G. & CRIPPA-FRANCHESCHI, T. *Protistologica*. XVII, 313-329, 1981.
- MURPHY, J.A. *Scanning Electron Microscopy*. 11, 175-194, 1978.
- NANNEY, D.L. *Experimental Ciliatology. An introduction to Genetic and Developmental Analysis in Ciliates*. Wiley-Interscience Publication. John Wiley and sons. New York. 1980.
- NEFF, R.J. & NEFF, R.H. *Synp. Soc. exp. Biol.* 23, 51-81, 1969.
- NIEMEYER, H. *Bioquímica. Inter-Médica, SAICI*. 1971.
- NISHIHARA, T., ICHIKAWA, T. & KONDO, M. *Sporulation and Germination*. American Society for Microbiology Washington, D.C. 237-239, 1981.

- PAGE, F.C. *Protistologica*. XI, 195-204, 1975.
- PASTERNAK, J.J., THOMPSON, J.E., SCHULTZ, T.M.G. & ZACHARIAH, K. *Exp. Cell Research*. 60, 290-298, 1970.
- PATTERSON, D.J. & THOMPSON, D.W. *J. Protozool.* 28, 188-192, 1981.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Vol-I. A.Churchill Ltd. London. 1968.
- PHILIPPI, M.L. & PARISH, R.W. *Planta*. 152, 59-69, 1981.
- PIGON, A. *Acta Biol. Cracov.* IV, 123-142, 1961.
- PIGON, A. & EDSTROM, J.E. *J. Protozool.* 8, 257-260, 1961.
- PLANEL, H., TIXADOR, R., NEFEDOV, Yu., GRETCHKO, G., RICHAILLEY, G., BASSLER, R. & MONROZIES, E. *Adv. Space Res.* 1, 95-100, 1981.
- PUISEUX-DAO, S. *La Morphogenése de la biologie aux mathématiques* Ed, Maloine. Paris. 159-164. 1980.
- PUSSARD, M. & PONS, R. *Protistologica*. XIII, 557-598, 1977.
- RAIZADA, M.K. & KRISHNA MURTI, C.R. *J. Cell Biol.* 52, 743-748, 1972.
- RAIZADA, M.K. & KRISHNA MURTI, C.R. *J. Protozool.* 19, 691-695, 1972.
- RASTOGI, A.K., SAGAR, P. & AGARWALA, S.C. *J. gen. Microbiol.* 56, 289-292, 1969.
- RASTOGI, A.K., SAGAR, P. & AGARWALA, S.C. *J. Protozool.* 24, 294-296, 1977.

- RASTOGI, A.K., SHIPSTONE, A.C. & AGARWALA, S.C. *J. Protozool.* 18, 176-179, 1971.
- REIBENBACH, Z. & REICH, K. *J. Protozool.* 15, 259-262, 1968.
- REPAK, A.J. & PFISTER, R.M. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 86, 417-421, 1967.
- RIEDER, N. *Arch. Protistenk. Bd.* 115, 125-131, 1973.
- RUBIN, R.W., HILL, M.C., HEPWORTH, P. & BOEHMER, J. *J. Cell Biol.* 68, 740-751, 1976.
- RUDICK, V.L. & WEISMAN, R.A. *Biochem et Biophys Acta.* 299, 91-102, 1973.
- SANDGREN, C.D. *Protostologica.* XVI, 259-276, 1980.
- SANDGREN, C.D. *Protistologica.* XVI, 289-303, 1980.
- SCHLICHTING, H.E. Jr. & SIDES, S.L. *J. Ecol.* 57, 759-764, 1969.
- SHUSTER, F.L. *Biochemistry and Physiology of Protozoa. Vol-I,* 216-276, 1979.
- SCOTT, J.E. & DORLING, J. *Histochemie.* 5, 221-233, 1965.
- SERRANO, A. & TORRES, A. *Ingrasa.* 1979.
- SLEPECKY, R.A. *Essays in Microbiology. John Wiley and sons.* 1-31, 1978.
- SNEATH, P.H.A. *Life Sciences and Space Research XIII. Akademie-Verlag. Berlin.* 1975.
- SPURR, A.R. *J. Ultrastruc. Res.* 26, 31-43, 1968.
- SYKES, D.E. & BAND, R.N. *J. Protozool.* 11A, 1980.

- TAYLOR, I.E.P. & CAMERON, D.S. *Annual Review of Microbiology*. 27; 243-259, 1973.
- TAYLOR, C.V. & STRICKLAND, A.G.R. *Physiol. Zool.* 9, 15-26, 1936.
- THIERY, J.P. *J. Microsc.* 6, 987-1018, 1967.
- THOM, R. *Hacia una Biología Teórica. Alianza Editorial*. 181-212, 1969.
- TIBBS, J. *J. Biochem.* 98, 645-651, 1966.
- TIBBS, J. *J. Protozool.* 15, 725-732, 1968.
- TIBBS, J. & MARSCHALL, D. *Biochim. Biophys. Acta.* 172, 382-388, 1969.
- TIBBS, J. & MARSCHALL, B.J. *J. Protozool.* 17, 125-128, 1970.
- TIXADOR, R., PLANEL, H. RICHAILLEY, G., BASSLEER, A., MONROZIES, E., MOATTI, J.P., LEPOINT, A. & De PARMENTIER, F. *Bull. de L'association des Anatomistes.* 63, 171-180, 1979.
- TOMLINSON, G. *J. Tennessee Academy of Sci.* 56, 107-108, 1981.
- WADA, R.K. & SPEAR, B.B. *Cell Differentiation.* 9, 261-268, 1980.
- WADDINGTON, C.H. *Hacia una Biología Teórica. Alianza Editorial*, 17-65, 1970.
- Van WAGTENDONK, W.J. *Biochemistry and Physiology of Protozoa. Academic Press INC. Vol-II*, 1955.
- WALSH, A.W. & ISQUITH, I.R. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 98, 261-264, 1979.

- WALKER, G.K. & MAUGEL, T.K. *Protistologica*. XVI, 525-531, 1980.
- WALKER, G.K., MAUGEL, T.K. & GOODE, D. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 94, 147-154, 1975.
- WALKER, G.K., MAUGEL, T.K. & GOODE, D. *Protistologica*. XVI, 511-524, 1980.
- WARHURST, D.C. & THOMAS, S.C. *Protistologica*. XIV, 87-89, 1978.
- WEISMAN, R.A. *Ann. Rev. Microbiol.* 30, 189-219, 1976.
- WERZ, G. *Inhibitors tools in cell research*. Ed. Th. Bucher and H.Sies. 1969.
- WESTERGAARD, O. & MARCKER, K.A. *Radiation and Cellular Control Processes*. Springer-Verlag. Berlin. 162-169, 1976.
- WEYER, G. *Arch. Protist.* 71, 139-228, 1930.
- WRIGHT, B.E. *Archiv fur Mikrobiologie*. 59, 335-344, 1967.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA


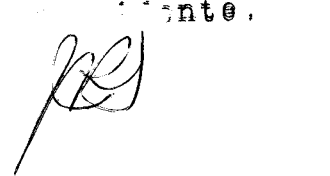
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

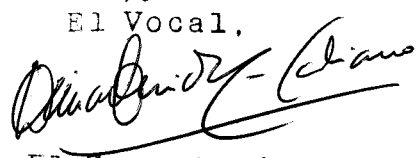

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de

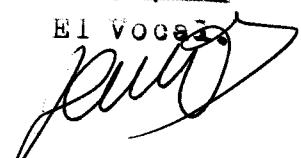
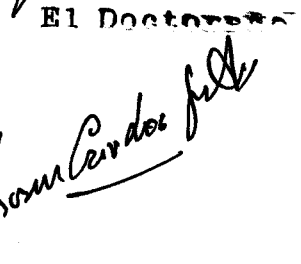
D. Juan Carlos Gutiérrez Fernández
titulada "Estructura, Campocencia y Cuestión
de formación de la parte quística del celidato
Myriophaco stauranthella communata

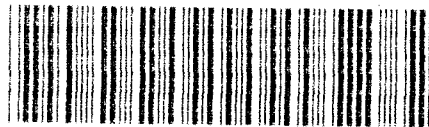
se le otorga la calificación de Sobresaliente
cum laude

Sevilla, 12 de Noviembre de 1982

El Vocal,

Presidente.


El Vocal,

El Secretario,


El Vocal,

El Doctorado




500292973

ISSN 0204-070

892973