

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 6 5 9 8 2 5 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

*ORGANIZACIÓN Y REORGANIZACIÓN DEL ADN Y CROMATINA
MACRONUCLEAR DURANTE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO
EN Colpoda Inflata*

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta
Dña. Gemma Palacios Hernández



Archivo

Vº Bº del Director

Fdo: Dr. Juan Carlos Gutiérrez Fernández

La Doctoranda

Fdo: Gemma Palacios Hernández

MADRID, 1996

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Gutiérrez, director de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Ana Martín González, por su ayuda en la elaboración del material fotográfico.

Al Dr. Luis Miguel Ruiz (Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada), por su amabilidad y ayuda con las electroforesis de Campo Pulsado.

Al Dr. Trendelenburg (DKFZ, Heidelberg, Alemania), que me permitió trabajar en su laboratorio durante tres meses y aprender varias técnicas de Microscopía Electrónica.

Al Director del Dpto. de Microbiología-III, Dr. José Martínez Peinado, por permitirme realizar este trabajo, y a todos los profesores del departamento, por sus palabras de interés y aliento. A la Dra. Josefina Rodríguez de Lecea, que fue mi profesora de Microbiología en la licenciatura y al Dr. Domingo Marquina, por su simpatía durante todos estos años y sus charlas.

A la Dra. Laura Benítez Rico, amiga y compañera desde el comienzo de este trabajo, a la que agradezco su ayuda y apoyo hasta el final de la Tesis Doctoral especialmente en la etapa de escritura. Así mismo, quiero dar las gracias a Jose Ramón Molina por su amistad y ánimo.

También deseo agradecer el ánimo que he recibido de todos mis compañeros del Dpto. De forma especial: a Alberto (Dr. Espinel), Javi, Manolo, Antonio, Carmelilla, Jose Luis, Nacho, Victor, Lucía y Merche.

A Belén, por su compañerismo y comprensión.

A Paco, por estar siempre dispuesto a escuchar y por su ayuda con el ordenador.

A Patricia, por facilitarme la búsqueda de separatas y por su amistad.

A todos los tesinandos y compañeros de los laboratorios 12 y 21: Adriana, Alvaro, Rosanna, Sergio, Silvia y Blanca. Por sus constantes ánimos, del que hago partícipe a Jose Manuel Malpartida y a Fernando.

A Pepe (Jose Manuel), quiero agradecerle el compartir durante estos años este trabajo, ya que has sido novio y marido de esta Tesis Doctoral y tu buen humor y apoyo me han servido de estímulo para poder afrontar la última etapa de este trabajo.

A Marta Gadea, por las horas que juntas hemos pasado ante el ordenador, por su disponibilidad y su paciencia infinita. Gracias.

A mi hermano Chiky por su comprensión, su ayuda informática y por estar siempre dispuesto a echar una mano.

A mi abuelo Dionisio, que con sus innumerables consejos, conseguía animarme en los momentos difíciles, haciendome ver que no existía "la cuesta arriba sin cuesta abajo", pero sobre todo, darle las gracias por quereme tanto.

El agradecimiento más especial, es para mis padres, por inculcarme siempre el hábito de estudio y por ser fuerte ante las dificultades. Así mismo, por su apoyo y ayuda en todo lo que he hecho en esta vida, por nuestras innumerables charlas y por darme optimismo ante la vida.

A mi familia de Soria y Alicante y a todos mis amigos, por su interés y ánimo en este trabajo.

A la Comunidad Autónoma de Madrid por concederme la beca Doctoral (Plán de Formación de Personal Investigador) para la realización de esta Tesis, así como la beca de estancia de tres meses en Alemania (DKFZ, Heidelberg).

Esta Tesis ha sido financiada por el Proyecto de Investigación: PB90-0244.

A mi abuelo Dionisio

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL AL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO (CRIPTOBIOSIS) EN CILIADOS	1
2. SISTEMA NUCLEAR EN CILIADOS. CARACTERÍSTICAS GENERALES	6
2.1. El Micronúcleo	6
2.2. El Macronúcleo	7
2.3. Estructura molecular y cromática del Micronúcleo y del Macronúcleo	8
3. NÚCLEOS Y ENQUISTAMIENTO	10
3.1. Cambios cromáticos	10
3.2. Cuerpos de Extrusión	11
4. LA METILACIÓN COMO MECANISMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS	12
4.1. Metilación en procesos de diferenciación microbiana eucariota	16

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO	20
1.1. Colpódidos	20
1.2. <i>Tetrahymena thermophila</i>	20
1.3. <i>Enterobacter aerogenes</i>	20
2. MEDIO DE CULTIVO Y PRINCIPALES TAMPONES UTILIZADOS	20
2.1. Medio y condiciones de cultivo para ciliados colpódidos	20
2.2. Principales tampones utilizados	21
2.3. Inducción de enquistamiento	22
3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ADN	22
3.1. Método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico	23
3.2. Aislamiento de ADN utilizando un Kit comercial	23

4. ELECTROFORESIS DE ADN	24
4.1. Marcadores de tamaño molecular utilizados	24
4.2. Electroforesis convencional	25
4.3. Electroforesis de campo pulsado	26
4.4. Preparación de las muestras para electroforesis de campo pulsado	26
5. DIGESTIÓN CON LA NUCLEASA Bal31 Y DIFERENTES ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	27
5.1. Digestión con la nucleasa Bal 31	27
5.2. Digestiones con endonucleasas de restricción	27
6. EXPERIMENTOS CON EL INHIBIDOR 5-AZACITIDINA	28
6.1. Durante el crecimiento	28
6.2. Durante el enquistamiento	29
7. OBTENCIÓN DE UNA SONDA DE ADN RIBOSÓMICO	29
7.1. Marcaje no radiactivo de la sonda	30
8. TRANSFERENCIA DE ADN (Southern blot), HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN	33
9. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	34
9.1. Procesamiento del material vivo para Microscopía Electrónica de transmisión estandar	34
9.2. Aislamiento y visualización de la cromatina macronuclear	34
9.2.1. Células vegetativas	35
9.2.2. Células prequísticas y quistes de resistencia	35
10. TÉCNICAS CITOLÓGICAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO DE ADN Y MICROSCOPIA CONFOCAL	36
10.1. Métodos citológicos	36
10.2. Citometría de flujo de ADN	36
10.3. Microscopía confocal	37

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL ADN MACRONUCLEAR VEGETATIVO Y QUÍSTICO DE <i>Colpoda inflata</i>	38
1.1. Electroforesis convencional y de campo pulsado	38
1.2. Análisis del gen ribosómico 17/18S en vegetativos y quistes maduros	44
1.2.1. Localización del gen ribosómico en electroforesis de campo pulsado	44
1.2.2. Digestión con la nucleasa Bal 31	47
2. CAMBIOS EN EL PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN-Ma TOTAL Y DE GENES RIBOSÓMICOS DURANTE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO EN <i>Colpoda inflata</i>	49
2.1. Estudio con endonucleasas de restricción del ADN total vegetativo y quístico	49
2.2. Estudio sobre el gen ribosómico 17/18S de <i>Colpoda inflata</i>	53
2.3. Experimentos con el agente desmetilante 5-azacitidina	56
2.3.1. Efecto de la 5-azacitidina sobre el crecimiento de <i>Colpoda inflata</i>	56
2.3.2. Efecto de la 5-azacitidina sobre el enquistamiento de <i>Colpoda inflata</i>	57
3. ESTUDIO MICROSCÓPICO DEL SISTEMA NUCLEAR DE <i>Colpoda inflata</i> DURANTE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO	59
3.1. Microscopía confocal	59
3.2. Microscopía electrónica de transmisión	62
3.3. Microscopía electrónica de transmisión de cromatina aislada de <i>Colpoda inflata</i>	63
3.3.1. Cromatina de células vegetativas	63
3.3.2. Cromatina de células prequísticas y quistes maduros	70
4. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL CONTENIDO DE ADN TOTAL DE POBLACIONES DE CÉLULAS VEGETATIVAS Y QUISTES MADUROS DE <i>Colpoda inflata</i>	72

DISCUSIÓN

1. ADN MACRONUCLEAR VEGETATIVO Y QUÍSTICO DE <i>Colpoda inflata</i>	75
2. CAMBIOS EN EL PATRÓN DE METILACIÓN DE ADN MACRONUCLEAR DE <i>Colpoda inflata</i> DURANTE EL ENQUISTAMIENTO	83
2.1. Estudio sobre el gen 17/18 de <i>Colpoda inflata</i>	90
3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DEL SISTEMA NUCLEAR Y DE LA CROMATINA MACRONUCLEAR DURANTE EL ENQUISTAMIENTO	93
3.1. Microscopía electrónica de transmisión del sistema nuclear durante el enquistamiento de <i>Colpoda inflata</i>	93
3.2. Microscopía electrónica de transmisión de cromatina aislada de vegetativos, prequísticos y quistes maduros	98
4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL Y CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS ESTADOS VEGETATIVO Y QUÍSTICO DE <i>Colpoda inflata</i>	105
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	112

ABREVIATURAS

- A : adenina
- A_{260} : absorbancia a 260 nm
- ADNbc : ADN bicatenario
- ADN-Ma : ADN macronuclear
- ADNmc : ADN monocatenario
- ADNr : ADN ribosómico
- 5-azaC : 5-azacitidina
- C : citosina
- CHEF : contour clamped homogeneous electric field
- DAPI : 4', 6-Diamidino-2-fenilindol
- DIG : digoxigenina
- EDTA : ácido etilén-diamino-tetracético
- EtBr : bromuro de etidio
- G: guanina
- Kb : kilobase
- Ma : macronúcleo
- MeA : 6-metiladenina
- MeC : 5-metilcitosina
- Mi : micronúcleo
- OFAGE : ortogonal field alternation gel electroforesis
- pb : pares de bases
- PCR : reacción en cadena de la polimerasa
- PTA : ácido fosfotúngstico
- RNasa : ribonucleasa
- rpm : revoluciones por minuto
- SDS : dodecil sulfato sódico
- T: timina
- TAE : tris-acetato-EDTA
- TBE : tris-borato-EDTA
- TE : Tris-EDTA
- TEM : microscopía electrónica de transmisión
- Tris : tris-hidroximetil-aminometano
- Tween : polioxietileno sorbitan monolaurato
- YP : yoduro de propidio

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN GENERAL AL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO (CRIPTOBIOSIS) EN CILIADOS

El término criptobiosis fue introducido por Keilin (1959), y con él se designa a aquellos organismos que no presentan signos visibles de vida y su metabolismo es prácticamente nulo. Entre los microorganismos eucariotas, un buen ejemplo de criptobiosis nos lo ofrecen muchos protozoos ciliados, que son capaces de formar quistes de resistencia, ya que cuando el microorganismo alcanza dicho estado, no presenta un metabolismo detectable y la célula puede permanecer en él durante largos periodos de tiempo de una forma estable. También son formas criptobioticas, las esporas de hongos. En microorganismos procariotas, podemos destacar las esporas bacterianas.

En el ciclo celular de muchos protozoos ciliados, existe un ciclo facultativo de diferenciación celular conocido como ciclo Enquistamiento-Exquistamiento (E-E). El proceso de diferenciación celular que conduce a la formación del quiste de resistencia (estado criptobiótico), se denomina Enquistamiento y al proceso contrario, Exquistamiento. Este ciclo presenta, por tanto, dos estados diferenciados: la célula vegetativa y el quiste de resistencia (Fig.1). Este ciclo facultativo está conectado al ciclo Crecimiento-División (C-D) del ciliado, y cuando surgen en el medio las condiciones inductoras del mismo, la célula puede pasar de un ciclo al otro de forma reversible. El paso hacia el estado criptobiótico involucra la apertura de un programa genético, silenciado durante el ciclo Crecimiento-División, que organiza y regula la biosíntesis macronuclear ligada a dicho proceso de diferenciación eucariota .

Durante el enquistamiento, la célula vegetativa experimenta numerosos cambios fisiológicos y morfológicos (Gutiérrez et al.,1990) que conducen a la formación del estado criptobiótico. Uno de los cambios más representativos es la formación de barreras permeables como la pared quística (Delgado et al., 1987; Gutiérrez et al., 1983a; Matsusaka, 1976; Tibbs, 1968; Walker and Hoffman, 1985). Ésta consiste en una serie de capas cuyo número varía entre 1 y 4, las cuales se designan como ectoquiste, mesoquiste, endoquiste y metaquiste (capa granular) (Delgado et al., 1987; Grimes, 1973; Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983; Gutiérrez et al., 1983a; Walker et al., 1975; 1980).

La composición de la pared es variada siendo las glucoproteínas, proteínas y carbohidratos los principales constituyentes (Bussers and Jeuniaux, 1974; Calvo et al., 1983; Gutiérrez et al., 1984; Matsusaka and Hongo, 1984; Tibbs, 1966). En *Colpoda inflata*, la pared quística está constituida únicamente por ectoquiste y endoquiste

(Martín-González et al., 1992), siendo los precursores de cada capa quística, vesículas elipsoidales y paquetes fibrilares respectivamente (Martín-Gonzalez et al., 1994). Estos precursores aparecen a lo largo del enquistamiento según una secuencia temporal (Gutiérrez et al., 1983b) y conllevan a la formación de las capas definitivas. En general, se piensa que los precursores de pared derivan del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático rugoso (Calvo et al., 1986).

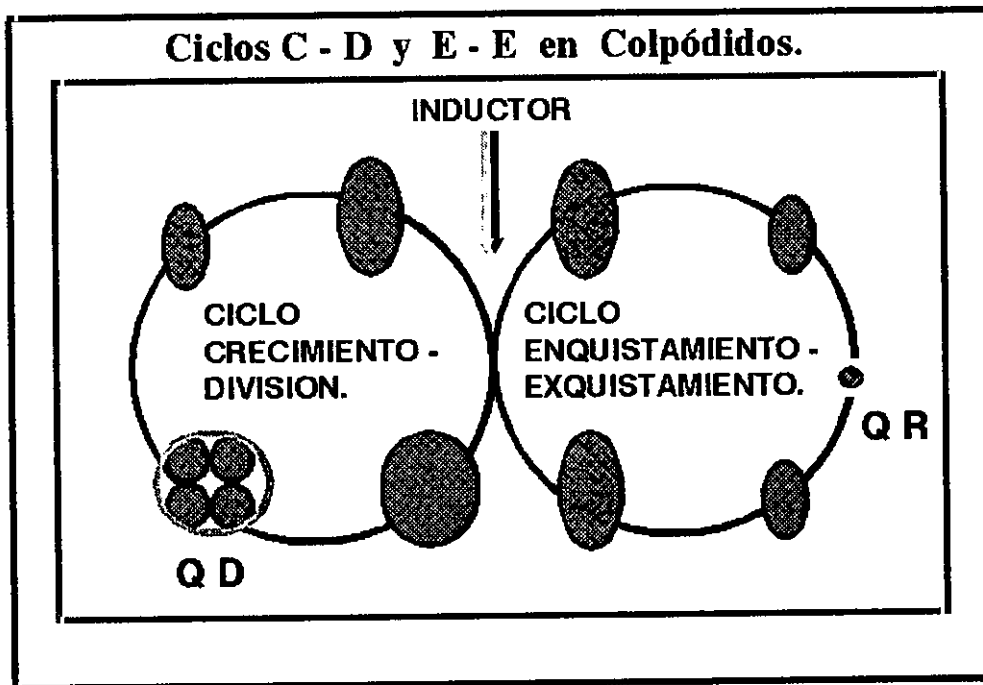


Fig.1: Ciclo de vida del ciliado *Colpoda inflata*. C-D: ciclo Crecimiento-División. E-E: ciclo Enquistamiento-Exquistamiento. QD: Quiste de división. QR: Quiste de resistencia.

En cuanto a los inductores de enquistamiento cabe citar entre otros a la temperatura y a la desecación del medio, pero el inductor exógeno más universal en protozoos ciliados es la falta de alimento o la deficiencia de un nutriente esencial en el medio de cultivo (Corliss and Esser, 1974 ; Wagtendonk, 1955).

Uno de los principales cambios que sufre la célula durante el enquistamiento, es la disminución de volumen celular, de un 60-80%, como consecuencia de la pérdida de agua intracelular (Ricci et al., 1985; Walker and Mangel, 1980; Walker et al., 1980), lo que supone un cambio en la densidad celular. La deshidratación citoplasmática se produce a través de su vacuola contractil, la cual se mantiene activa hasta estados prequísticos avanzados (Matsusaka, 1979). La deshidratación citoplasmática, tiene como finalidad el conseguir una de las principales características de todo estado

criptobiótico: el estado ametabólico. Como consecuencia de la pérdida de agua intracelular, ocurren una serie de cambios en los orgánulos celulares, así por ejemplo: empaquetamiento mitocondrial (Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983; Matsusaka, 1976; Walker and Hoffman, 1985; Walker and Maugel; 1980; Walker et al., 1975; 1980) lo que podría implicar una disminución de la actividad respiratoria (Giese, 1973; Pigon and Edsteöm, 1961). En otros casos, puede haber degeneración de una parte de la dotación mitocondrial, sin originarse empaquetamiento (Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983; Walker and Maugel, 1980). También los ribosomas, vacuolas y lisosomas están implicados en los cambios citoplasmáticos que sufre la célula en el enquistamiento (Gutiérrez et al., 1990).

El citoplasma prequístico suele ser rico en retículo endoplasmático rugoso y en ribosomas libres. En las primeras fases del enquistamiento, los ribosomas se encuentran en estado polisomal (Matsusaka, 1979), los cuales pasan a estado monosomal a medida que la célula va alcanzando el estado criptobiótico definitivo. Por otro lado, se han observado organizaciones paracristalinas de ribosomas en el citoplasma quístico (Grimes, 1973; Matsusaka, 1976; Walker et al., 1975), probablemente debido al elevado grado de deshidratación alcanzado durante el enquistamiento.

Otra característica a destacar son las vacuolas alimenticias, las cuales son numerosas en el estado vegetativo y desaparecen o disminuyen en el enquistamiento. Lo cual se ha observado en el ciliado *Colpoda steinii* (Tibbs, 1968).

En cuanto a la actividad lisosomal, cabe decir, que es muy elevada en este proceso de diferenciación. La actividad autofágica comienza en etapas tempranas del enquistamiento y va disminuyendo a medida que este avanza. El contenido que presentan estos autofagosomas es diverso: mitocondrias, ribosomas, membranas, porciones citoplasmáticas etc. (Grimes, 1973; Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983; Holt and Chapman, 1971; Matsusaka, 1976; Walker et al., 1980). La elevada actividad autofagosómica está en conexión con procesos líticos o degradativos que ocurren durante este proceso de diferenciación celular, lo cual puede proporcionar los elementos y la energía necesaria para la formación del quiste de resistencia, ya que el enquistamiento se desarrolla en condiciones de ausencia de alguna fuente nutricional exógena.

En células enquistándose, también es frecuente encontrar cuerpos de inclusión y materiales de reserva como glucógeno y lípidos (Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983; Janisch, 1980; Verni et al., 1984; Walker and Maugel, 1980). Estos materiales, podrían ser usados por la célula durante el exquistamiento para iniciar la actividad metabólica

antes de la ruptura de la pared quística. Otra consecuencia de la deshidratación celular es la presencia, a veces, de cuerpos paracristalinos, probablemente de naturaleza proteica, tanto libres en el citoplasma, como incluidos en el macronúcleo (Dallai et al., 1985; Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983).

En general, el citoplasma prequístico es rico en polirribosomas lo que podría suponer la existencia de transcripciones. El enquistamiento, de hecho, puede ser bloqueado utilizando inhibidores de la transcripción (actinomicina D), lo que indica la importancia de la síntesis de ARNm en este proceso de diferenciación (Benítez, 1990; Gutiérrez et al., 1981; Matsusaka and Kimura, 1981; Ruthmann and Kuck, 1985). En *Histiculus muscorum* (Matsusaka and Kimura, 1981), la inhibición por actinomicina D, solamente se produce en las primeras fases del enquistamiento y no en fases tardías. Por lo que, algunos autores (Matsusaka, 1979; Matsusaka and Kimura, 1981) señalan que las células prequísticas son transcripcionalmente activas, pero dicha actividad va disminuyendo hasta anularse completamente en etapas tardías del proceso de criptobiosis. En relación con esto, se han realizado estudios en *Colpoda inflata* (Gutiérrez et al., 1990) usando precursores radiactivos (Uridina- H^3) en experimentos de pulso y caza, con aislamiento posterior y detección electroforética-fluorográfica de los nuevos transcritos. Los resultados obtenidos, revelaron la aparición de nuevos transcritos en las fases tempranas del enquistamiento de dicho ciliado. Por tanto, la transcripción es necesaria para el enquistamiento, y principalmente ocurre en las primeras etapas del mismo. El primer estudio molecular, en relación con la identificación de transcritos específicos de enquistamiento, se ha realizado en *Colpoda inflata* (Benítez, 1995), y los principales resultados obtenidos, muestran que las poblaciones de ADNbc sintetizados a partir de diferentes estados prequísticos, de vegetativos y de quistes de resistencia muestran una elevada similitud, lo que podría indicar que se originan pocos transcritos específicos de enquistamiento.

La utilización de inhibidores de la biosíntesis proteica como la cicloheximida, puromicina, cloranfenicol y fluorofenilalanina, retrasan o bloquean igualmente el enquistamiento, aunque ello, a veces, depende del momento en que eran aplicados (Giese, 1973; Gutiérrez et al., 1981; Matsusaka, 1979; Ruthmann and Kuck, 1985; Yonezawa, 1985). Esta biosíntesis proteica parece ser esencial en las primeras fases del enquistamiento (Matsusaka, 1979). También se ha observado una disminución del contenido total proteico durante dicho proceso (Sendo and Matsusaka, 1982; Tibbs and Marshall, 1970), lo que puede estar en relación con la elevada actividad autofagosómica que existe en el enquistamiento. Se ha demostrado (Gutiérrez and

Martín-González, 1990) la existencia de un recambio proteico que proporcionaría los aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevos polipéptidos a partir de la lisis controlada de proteínas. Muchas de estas proteínas experimentan glucosilación, ya que dicho proceso tiene mucha importancia en la formación de los precursores de pared quística (Bussers and Jeuniaux, 1974; Calvo et al., 1983; Gutiérrez et al., 1984; Matsusaka and Hongo, 1984). En *Colpoda inflata* (Benítez et al., 1991), utilizando inhibidores de la glucosilación de proteínas como la tunicamicina, se bloquea el proceso de enquistamiento. Otros inhibidores del proceso de glucosilación como la 1-deoxynojirimicina, no bloquea el enquistamiento pero induce la formación de quistes estructuralmente anómalos.

La glucosilación proteica, por consiguiente, es un proceso biosintético esencial en el proceso de enquistamiento de muchos ciliados.

Respecto a la síntesis de ADN, podemos decir, que en general no está involucrada en el enquistamiento. Experimentos utilizando inhibidores de la síntesis de ADN (5 fluoro-desoxiuridina, hidroxiaurea), mostraron que el enquistamiento es independiente de síntesis de ADN (Gutiérrez et al., 1981; Ruthmann and Kuck, 1985).

A lo largo del enquistamiento, la célula experimenta cambios corticales y nucleares (Martín-González et al., 1991). Con respecto a los cambios en el corticotipo, la célula comienza a redondearse y la infraciliación oral puede ser reabsorbida. Los ciliados experimentan distintos grados de reabsorción o degeneración de las estructuras corticales (cirros o cilios) y en función de esto, se han establecido diferentes grupos. Walker y Mangel (1976), establecieron dos grupos: KR (Kinetosome resorbing cysts) o ciliados con quistes en donde la ciliación cortical e infraciliación es completamente reabsorbida y NKR (Non Kinetosome Resorbing Cysts) o ciliados con quistes en donde se mantiene completa la ciliación e infraciliación.

Se ha observado la existencia de quistes de resistencia con características intermedias, sin que por ello puedan incluirse en ninguno de los grupos citados anteriormente (Delgado et al., 1987; Grim and Manganaro, 1985; Rios et al., 1985; Walker and Hoffman, 1985). Este problema se ha solucionado con la inclusión de un nuevo grupo, denominado PKR (Partial Kinetosome Resorbing Cysts), que designa a los ciliados que experimentan una parcial reabsorción de su corticotipo, manteniendo en el quiste maduro algunos elementos de infraciliación (Martín-González et al., 1991; 1992). Tanto para los quistes de resistencia KR como los PKR, el ciliado debe de recuperar, durante el exquistamiento, su original corticotipo vegetativo que ha perdido totalmente (KR) o parcialmente (PKR).

El enquistamiento de ciliados, conduce a la apertura de genes específicos de

enquistamiento y al cierre de genes implicados en el ciclo crecimiento-división de la célula. La pérdida gradual de agua intracelular puede inactivar las principales vías metabólicas, incrementar la densidad e inducir empaquetamientos de orgánulos. Todo esto implica, que los procesos biosintéticos necesarios para la consecución del estado criptobiótico, tengan lugar en las primeras etapas del enquistamiento, antes de que la deshidratación celular conlleve a la inactividad metabólica (Gutiérrez et al., 1990).

El proceso de enquistamiento de ciliados es esencialmente un sistema endógeno o un sistema cerrado, el cual depende únicamente del material endógeno para la formación de todos los elementos necesarios para la formación del quiste de resistencia (Martín-González et al., 1991).

2. SISTEMA NUCLEAR EN CILIADOS. CARACTERÍSTICAS GENERALES

A nivel nuclear, la principal característica de los ciliados es su dualismo o dimorfismo nuclear. Lo cual consiste, en que en la misma célula se presentan dos tipos distintos de núcleos: uno grande (macronúcleo) y otro pequeño (micronúcleo). El número de cada uno de ellos puede variar según la especie.

2.1. El Micronúcleo

El micronúcleo, es el núcleo germinal de la célula. Es diploide y se divide mitóticamente durante el crecimiento vegetativo. La mitosis micronuclear en ciliados responde a una variante de la denominada ortomitosis intranuclear cerrada (Raikov, 1982), en la que se pueden presentar centros de organización microtubular intranucleares o no.

El número de micronúcleos en la célula puede variar; desde un mínimo de uno por célula (como en *Tetrahymena thermophila* o *Colpoda inflata*), hasta un máximo de 20 ó más (como en algunas especies del género *Urostyla*).

El micronúcleo, como núcleo germinal, sufre meiosis durante la conjugación. Al micronúcleo se le considera transcripcionalmente inactivo durante el crecimiento vegetativo, aunque algunos autores (Ammermann, 1970; Ng, 1986; 1988) consideran que algunos genes micronucleares puedan ser expresados durante el ciclo celular y algunos procesos de diferenciación.

Una pequeña cantidad de síntesis de ARN ha sido detectada autoradiográficamente en el micronúcleo de algunos ciliados: *Stylonychia mytilus*

(Ammermann, 1970), *Tetrahymena pyriformis* (Murti and Prescott, 1970) y *Paramecium caudatum* (Pasternak, 1967; Rao and Prescott, 1967). En *Paramecium sp.* y *Tetrahymena sp.*, la síntesis de ARN fué detectada solamente durante un corto periodo de la síntesis de ADN micronuclear (Prescott, 1994). En un estudio más extenso (Gorovsky and Woodard, 1969), no se llegó a encontrar evidencias de síntesis de ARN en el micronúcleo de *Tetrahymena pyriformis*. Algunos autores (Allito and Karrer, 1983; Kaney and Speare, 1983) creen que, el micronúcleo no presenta un silencio génico total, ya que la eliminación experimental del micronúcleo en varios ciliados, provocó una disminución de la tasa de reproducción, o rindió células incapaces para el crecimiento vegetativo, con la consiguiente mortalidad celular. Lo que, según estos autores, el micronúcleo podría contribuir, quizá expresando unos pocos genes específicos y ausentes en el macronúcleo, en el crecimiento vegetativo .

Esta idea, parece estar en contradicción con el hecho de que ciliados amiconucleados, creados experimentalmente, por eliminación micronuclear (Ammermann, 1970; Ng, 1986) pueden sobrevivir y proliferar en una tasa normal e incluso llevar a cabo el ciclo enquistamiento-exquistamiento. Algunos ejemplos, podemos encontrarlos en *Tetrahymena* (Elliot, 1973), *Stylonychia* (Ammermann et al., 1989), *Oxytricha*, *Paraurostyla* etc. (Prescott, 1994).

Según Ng (1986), quizá en las células viables amiconucleadas, unos pocos genes que están presentes normalmente en el micronúcleo, y sean necesarios para el crecimiento vegetativo, puedan estar presentes en el macronúcleo. Lo cual podría ocurrir durante el desarrollo del macronúcleo a partir del micronúcleo durante la conjugación.

2.2. El Macronúcleo

El macronúcleo de ciliados, es el núcleo somático de la célula y es poliploide o poligénico. Su número, puede variar. En la mayoría de las especies con múltiples macronúcleos, la fusión de los mismos, ocurre justo antes de la división macronuclear.

Los cromosomas no son visibles en el macronúcleo en división y el mecanismo de división nuclear que presenta este núcleo somático, se denomina amitosis. Éste es un mecanismo impreciso en lo que se refiere al reparto de material genético entre los macronúcleos hijos (Prescott, 1994).

2.3. Estructura molecular y cromatínica del Micronúcleo y del Macronúcleo

La cromatina del micronúcleo vegetativo, se encuentra organizada en uniformes y densos paquetes, asemejándose a la cromatina de una célula espermática (Prescott, 1994). La envuelta micronuclear, presenta los típicos poros de los núcleos eucarióticos.

La cromatina macronuclear, se presenta, frecuentemente, en forma de discretas agrupaciones de material condensado, las cuales son conocidas como "pequeños cuerpos". Son de forma irregular y tienen un tamaño promedio de 0,1-0,2 μm (Raikov, 1982; 1995).

A diferencia del micronúcleo, que no presenta nucleolos, el Ma puede tener numerosos nucleolos, un único nucleolo por masa macronuclear (como en *Dileptus anser*) o un nucleolo compuesto, como en especies del género *Colpoda* (Raikov, 1982; 1995). La membrana o envuelta macronuclear es la clásica estructura de doble membrana con poros complejos.

Como en la mayoría de los eucariotas el ADN macronuclear y micronuclear, está organizado en nucleosomas (Butler et al., 1984; Gorovsky and Keevert, 1975; Lawn et al, 1978; Lipps and Morris, 1977). La distancia internucleosomal es mayor en la cromatina macronuclear que en la micronuclear, lo que podría reflejar la mayor compactación cromatínica micronuclear y la ausencia de actividad transcripcional. El ADN que constituye la unidad nucleosomal, presenta una longitud típica de 143 pb (Giri and Gorovsky, 1980; Lawn et al, 1978; Lipps and Morris, 1977; Wada and Spear, 1980).

Al ser la estructura y función del macronúcleo y del micronúcleo diferentes, estas diferencias quedan igualmente reflejadas en su ADN genómico. Estudios genéticos en diferentes ciliados; *Tetrahymena* (Bruns, 1986), *Paramecium* (Preer, 1986) y *Euplotes crassus* (Baird and Klobutcher, 1988) han mostrado que los genes micronucleares están presentes como copias únicas por genoma haploide micronuclear. Así, por ejemplo; los genes micronucleares codificantes para ARNr, en *Tetrahymena*, están presentes, como una única copia (Yao and Gall, 1977; Yao et al., 1985).

El macronúcleo de ciliados, como ya se ha comentado antes es poliploide, si bien, este término no es del todo correcto, ya que el genoma macronuclear, no es una versión múltiple del genoma total micronuclear, por lo que también se puede denominar poligénico. En *Tetrahymena thermophila*, de un 10 al 20% de las secuencias micronucleares, son eliminadas en el esbozo macronuclear (Howard and Blackburn, 1985; Iwamura et al., 1979; Yao and Gall, 1979; Yao and Gorovsky, 1974). Su ADN

micronuclear tiene un elevado peso molecular. La fragmentación (en el esbozo macronuclear), produce más de 200 moléculas de ADN subcromosómicas, con intervalos de tamaño entre 100 y 1.800 Kb, con un tamaño medio molecular de 800 Kb (Altschuler and Yao, 1985; Conover and Brunk, 1986).

Durante la formación del Ma a partir del Mi, en la conjugación, la copia única micronuclear de ADN_r se excinde y se duplica originando un palíndromo (molécula lineal con dos copias invertidas que codifica para los distintos genes ribosómicos) de 21 Kb. (Karrer and Gall, 1976). Esta molécula así procesada se amplifica en el nuevo macronúcleo hasta alcanzar unas 9.000 copias de esta molécula o 18.000 copias de los genes ribosómicos (Karrer and Gall, 1976).

En *Paramecium*, las moléculas subcromosómicas, presentan un rango de tamaño entre 100 y 800 Kb, con un tamaño medio molecular de 450 Kb (Phan et al., 1989). El ADN_r no es palindrómico como en *Tetrahymena* y presenta una longitud variable (Findly and Gall, 1980).

En ciliados hipotricos, el micronúcleo, igualmente, presenta moléculas de elevado peso molecular y tamaño. Esto contrasta con el tamaño de las moléculas macronucleares que presenta este grupo de ciliados.

Comparativamente, el bajo peso molecular del ADN macronuclear en hipotricos, fue inicialmente descubierto en especies del género *Oxytricha* mediante microscopía electrónica (Prescott et al., 1994). Las moléculas observadas son lineales y la mayoría de ellas tienen un rango de tamaño entre 400 y 3.700 pb, con un tamaño medio de 2.200 pb para *Oxytricha* *sps* y *O. nova* y de 1.836 pb para *Euplotes aediculatus*. *Stylonychia pustulata*, presenta un tamaño medio de 2.514 pb (Prescott, 1994; Swanton et al., 1980). En *O. nova*, el ADN ribosómico está presente en 100.000 copias por macronúcleo en comparación con el presentado por otros genes macronucleares (950 copias de promedio) (Swanton et al., 1980). Como se ha especificado anteriormente, el genoma macronuclear de los hipotricos está constituido por moléculas de tamaño génico, y cada una de ellas constituye, por consiguiente, una unidad transcripcional (Prescott, 1994; Raikov, 1995).

Las características de las moléculas de ADN macronuclear en otros grupos de ciliados, que han sido estudiados son; en el heterotrico *Stentor coeruleus* (Pelvat and Haller, 1976), se compone de moléculas subcromosómicas de tamaño variable, su determinación por centrifugación en gradiente de sacarosa muestra un rango de 7,5 a 60 Kb, mientras que por microscopía electrónica este rango se ha estimado en 45 a 75 Kb. En dos ciliados cirtofóridos (*Trithymostoma* y *Chilodonella* *sps.*), el rango de tamaño de las moléculas macronucleares se ha estimado electroforéticamente en 0,35

a 75 Kb, con un tamaño promedio de 4 Kb. En esas dos especies el ADNr presenta un tamaño aproximado de 15,5 Kb (Lahlafi and Mètènier, 1991; Mètènier and Hufschmid, 1988).

3. NÚCLEOS Y ENQUISTAMIENTO

3.1. Cambios Cromatínicos

Los cambios nucleares más llamativos durante el enquistamiento, se refieren al macronúcleo. Muchos ciliados con varias masas macronucleares, se fusionan en una sola masa macronuclear quística, durante el proceso de enquistamiento (Grimes, 1973; Gutiérrez, 1985; Gutiérrez and Pérez-Silva, 1983; Matsusaka and Kimura, 1981; Walker et al., 1975; 1980; Weyer, 1930). En otros ciliados, como *Pleurotricha sp.* (Matsusaka, 1976) o *Diophrys scutum* (Walker and Maugel; 1980), por el contrario, no se ha observado fusión macronuclear durante el enquistamiento. La fusión macronuclear, implica la existencia de una elevada condensación cromatínica y probablemente inactividad génica.

El grado de condensación cromatínica, fue calculado por el método de bandeado C y posterior cuantificación microespectrofotométrica, en el ciliado *Gastrostyla steinii* (Gutiérrez, 1985). Los resultados obtenidos de este estudio, indican que la condensación macronuclear quística, es aproximadamente el doble que la existente en una única masa macronuclear vegetativa.

A nivel ultraestructural, esta condensación, implicaría la aparición de grandes cuerpos cromatínicos. Estudios en *Bursaria truncatella*, utilizando la técnica de dispersión cromatínica, mostraron que la cromatina macronuclear transcripcionalmente inactiva, estaba organizada en grandes gránulos cromáticos conectados por fibras nucleosomales (Martinkina et al., 1983). En la fase de crecimiento del ciliado, la mayor parte de la cromatina macronuclear se encuentra descompactada y dicha cromatina es transcripcionalmente activa. Por el contrario, en quistes de resistencia, la cromatina macronuclear quística, está constituyendo compactos agregados, los cuales pueden ser descondensados utilizando un tampón de baja fuerza iónica (Tikhonenko et al., 1984).

En *B. truncatella* y *B. ovata* (Sergejeva and Bobyleva, 1988), se observó que la cromatina macronuclear quística se compacta en formaciones poligonales (hexagonales) que fueron denominadas lamelas hexagonales. Estas formaciones cristalinas hexagonales,

representan a la cromatina transcripcionalmente inactiva, y por lo tanto, altamente condensada.

En *Bursaria ovata* (Sergejeva and Bobyleva, 1995) y *B. truncatella* (Sergejeva 1977), se han observado fenómenos de politenia en la cromatina macronuclear. Haces de fibras forman estructuras polinémicas locales a lo largo de la cromatina macronuclear. Sin embargo, estos autores consideran que no sería una politenia clásica, como la que presentan los hipotricos en el esbozo macronuclear (Prescott, 1994; Raikov., 1995) o la de los cromosomas politénicos de muchos dípteros, y tampoco similar a la oligotenia presente en los cromosomas de algunas plantas (Sergejeva and Bobyleva, 1995). La polinemia local encontrada en el macronúcleo de *B. ovata*, constituye el primer caso que se ha podido observar, en ciliados, por microscopía electrónica.

Respecto a los nucleolos macronucleares se puede observar en algunos ciliados, tanto una disminución en el tamaño como un cambio de forma durante el enquistamiento (Grimes, 1973; Matsusaka and Kimura, 1981; Walker et al., 1980). En *Paramecium*, sus múltiples nucleolos, se fusionan cuando el ciliado está en inanición, formando masas vacuolizadas (Raikov, 1982). Cuando el ciliado es alimentado diariamente, la ultraestructura de su macronúcleo, experimenta cambios cíclicos, debido a la fusión temporal de sus pequeños nucleolos, en complejos reticulares. La morfología del nucleolo puede cambiar debido al estado fisiológico del ciliado. En *Tetrahymena*, los pequeños nucleolos típicos de la fase exponencial, se fusionan para formar grandes agregados durante la fase estacionaria, cuando las condiciones del medio de cultivo son deficientes, y siempre durante un corto periodo de tiempo (Raikov, 1982).

3.2. Cuerpos de Extrusión

Durante la división y el enquistamiento de algunos ciliados, puede ocurrir una pérdida de ADN macronuclear en forma de cuerpos de extrusión (Frenkel, 1980; Martín-González et al., 1991; Morat et al., 1981;), así por ejemplo en los colpódidos: *Colpoda maupasi*, *C. inflata* (Martín-González et al., 1991), *C. steinii* (Frenkel, 1980), *Tillina magna* (Beers, 1946; Frenkel, 1992), *T. canalifera* y *Bresslaua sp.* (Burt et al., 1941).

La pérdida de ADN macronuclear, debe de estar altamente controlada por la célula, ya que el ciliado debe conservar, al menos, algunas copias intactas de su genoma poliploide para mantener la viabilidad y el fenotipo después del exquistamiento. Lo cual, se ha podido comprobar en *Dileptus anser* con respecto al tipo

sexual o conjugante que presenta el ciliado antes de enquistarse, que se mantiene intacto durante el ciclo enquistamiento-exquistamiento (Afon'kin and Skovorodkin, 1987).

En el quiste de división de *Colpoda inflata* (Martín-González et al., 1991), cada célula del mismo (2 ó 4 por quiste de división) sufre un proceso de extrusión cromatínica macronuclear, esta masa cromatínica macronuclear extruida es, generalmente, de menor tamaño que el propio macronúcleo de donde deriva. Estos cuerpos de extrusión condensan su cromatina y degeneran rápidamente. Todo este proceso suele ser sincrónico en todas las células del quiste de división.

En este mismo ciliado (Martín-González et al., 1991), al igual que en otros colpódidos (Beers, 1946; Burt et al., 1941; Frenkel, 1992; Kidder and Claff, 1938; Morat et al., 1981), también se da extrusión cromatínica durante el enquistamiento. Según la cinética de enquistamiento en este ciliado (Benítez et al., 1994; Martín-González et al., 1991), el cuerpo de extrusión aparece en la segunda fase prequística entre las 40 y 60 horas después de iniciado el enquistamiento. El cuerpo de extrusión representa aproximadamente 1/3 del volumen macronuclear en *C. inflata*, su cromatina macronuclear se condensa y posteriormente desaparece.

En *C. cucullus* (Morat et al., 1981) se ha observado la existencia de una relación entre el contenido de ADN del cuerpo de extrusión y el volumen de la célula prequística. Lo cual estaría en consonancia con la idea de que la pérdida de ADN macronuclear por este mecanismo (eliminación de cromatina por formación del cuerpo de extrusión), supone una forma de mantener constante el valor del cociente nucleocitoplasmático celular.

4. LA METILACIÓN COMO MECANISMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS.

En células eucariotas, la regulación de la expresión génica se puede ejercer a distintos niveles y por diferentes mecanismos. Algunos de los más importantes se resumen en la Tabla-I. En dicha tabla, se muestra que uno de los mecanismos que puede regular la expresión de un gen eucariota es la metilación de bases. Este será el único mecanismo que expondremos aquí, en la introducción, ya que es de todos ellos, el único que incide en el trabajo que se presenta sobre *Colpoda inflata*.

Tabla-I: Niveles y mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica de células eucariotas.

NIVEL DE CONTROL	MECANISMO
ESTRUCTURA DEL ADN	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recombinación de genes por transposición a nuevos promotores. 2. Metilación del ADN. 3. Amplificación génica. 4. Genes fusionados.
TRANSCRIPCIÓN	<ol style="list-style-type: none"> 1. Represión y activación de promotores. 2. Intensificadores. 3. Alternancia de promotores. 4. Utilización conjunta de los anteriores (1,2 y 3).
POSTRANSCRIPCIONAL (*)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control de la traducción en base a las características estructurales del ARNm . 2. Control de la abundancia del ARNm en base a las diferentes proporciones de degradación.
POSTRADUCCIONAL (*)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control de la actividad enzimática (mecanismos alostéricos). 2. Control de la abundancia de la proteína en base a los diferentes niveles de degradación.

(*): Estos mecanismos de control también están presentes en procariotas.

En microorganismos eucariotas las bases metilables pueden ser, tanto la adenina como la citosina, al igual que ocurre en procariotas y a diferencia de lo que ocurre en eucariotas multicelulares, en donde la citosina es la única base metilable (Chomet, 1991; Razin and Cedar, 1991; Salvini et al., 1984). En procariotas todos los lugares metilables suelen estar metilados, mientras que en eucariotas estos lugares pueden o no estar metilados. En células de mamíferos, del 3-6% de las citosinas están metiladas en las denominadas "islas" CpG, que son secuencias en donde estas dos pares de bases se repiten cierto número de veces (Chomet, 1991).

Algunas de las funciones que se han atribuido a la metilación del ADN son: el protegerlo de la acción de las endonucleasas de restricción (fundamentalmente en procariotas), intervenir en el comienzo de la replicación en el cromosoma bacteriano, en la latencia viral, en incrementar las posibilidades de mutación y recombinación de una secuencia, en los cambios de configuración del ADN, junto con las interacciones ADN-proteína. Pero de todas ellas, la que más ha atraído la atención de los investigadores es la función en la regulación de la expresión génica en células eucariotas (Bird, 1984; Cedar, 1988; Chomet, 1991; Doerfler, 1983; Doerfler et al., 1990; Razin and Cedar, 1991; Razin and Riggs, 1980).

En este apartado, comentaremos tanto la metilación como inductor de cambios estructurales en el ADN como su implicación en la apertura y cierre de genes.

Con respecto a la interacción de la metilación con la estructura del ADN, lo que, actualmente, se conoce lo podríamos resumir en los siguientes puntos:

- 1.- Un ADN metilado presenta una configuración que es más insensible a la actividad de la DNasa-I, mientras que un ADN no metilado se presenta como más sensible a la digestión con esta enzima (Chomet, 1991). Existe, igualmente, una correlación entre una mayor sensibilidad a la DNasa-I y la ausencia de la histona H1. Estos hechos, han servido para que se piense que la metilación del ADN podría favorecer la condensación cromatínica, y por lo tanto, incidir así en la expresión de los genes.
- 2.- La estabilización del cambio conformacional desde la forma B de ADN a otras formas, tales como; estructura cruciforme, ADN curvado, ADN trihelicoidal o la forma Z de ADN, parece que se establece por metilación de la citosina (Zacharias, 1993).
- 3.- Por otro lado, lugares hipersensibles a la DNasa-I que están libres de nucleosomas y que son transcripcionalmente activos, presentan configuración Z. Lo cual se ha podido detectar tanto en el macronúcleo del ciliado hipotrico *Stylonychia* como en los cromosomas politénicos de *Drosophila* (Hergersberg, 1991; Keshet et al., 1986).

Estos son algunos de los principales datos sobre cómo la metilación del ADN puede influenciar en su estructura, y de lo que se deduce la falta aún de información suficiente que nos revele el cómo una simple metilación de bases en determinadas secuencias puede alterar tan sustancialmente la configuración molecular del ADN y probablemente, su capacidad de ser transcrito.

El segundo aspecto que aquí nos interesa comentar, en torno a la metilación, es su capacidad de regular la expresión de un gen, o lo que es lo mismo, su transcripción. La idea general admitida actualmente se puede resumir, como la existencia de una correlación entre la metilación de determinadas secuencias y la inactivación de los genes posteriores a esa secuencia, y por otro lado, una desmetilación de esa secuencia implicaría la activación o apertura de esos genes

(Cedar, 1988; Chomet, 1991; Doerfler et al., 1990; Razin and Cedar, 1991). Generalmente, dentro de este modelo aceptado como explicación del binomio "metilación-expresión génica", las secuencias metilables se localizarían en el extremo 5' del gen afectado por la metilación, lo que correspondería a secuencias promotoras. Por consiguiente, sería posible pensar que ciertas proteínas reguladoras (factores de transcripción) podrían ver reducidas sus capacidades de interacción con la secuencia promotora, al estar ésta metilada. Es posible, por lo tanto, que cierta clase de proteínas reguladoras sean directamente afectadas por la metilación de la secuencia nucleotídica con la que interaccionan (Chomet, 1991). Existen diversos experimentos, en sistemas eucariotas, que avalan el modelo anteriormente expuesto (Razin and Cedar, 1991).

Todo lo anteriormente expresado se refiere exclusivamente a la metilación de residuos de citosina, que ocurre (en eucariotas) predominantemente en secuencias CpG. Estas secuencias, o grupos de ellas, se pueden encontrar en regiones cercanas al extremo 5', la secuencia promotora o la secuencia líder del gen (Cedar, 1988; Razin and Cedar, 1991).

El mecanismo de metilación del ADN, aún poco conocido, es una etapa postreplicativa temprana en la que interviene la ADN metiltransferasa; la hebra recién sintetizada es metilada, siguiendo el mismo patrón de metilación que las hebras parentales. De este modo, el patrón de metilación de un tipo celular concreto se transmite y mantiene de generación en generación. Así mismo, la replicación del ADN debería ser un requisito previo para modificar el patrón de metilación de una célula, aunque esto no siempre es así, fundamentalmente en lo relativo a la desmetilación de secuencias (Chomet, 1991; Doerfler et al., 1990).

¿Se podría dar metilación sin replicación previa del ADN? Esta pregunta aún no está completamente resuelta. Aunque existen metiltransferasas procariotas que podrían metilar ADNbc sin previa replicación (Noyer-Weidner and Tratner, 1993) y por lo tanto con un mecanismo diferente a las llamadas metiltransferasas de "mantenimiento". Además, existe un hecho experimental, sobre el gen de la timidina quinasa del virus Herpes simplex I (HSV-tk) (Graessmann and Graessmann, 1993), que demuestra la existencia de metilación antes de que ocurra la replicación del ADN.

Por consiguiente, y al igual que se ha pensado para el mecanismo de desmetilación, se podría distinguir dos posibles caminos de metilación de una secuencia de ADN; la pasiva o postreplicativa y la activa, que no involucra replicación de ADN. El mecanismo bioquímico de la desmetilación de una molécula de ADN, aún más desconocido que la metilación, se puede desarrollar tanto pasivamente, inhibiéndose la acción de la metiltransferasa postreplicativamente y obteniéndose, en

una primera vuelta, una molécula hemimetilada o semimetilada (una sólo hebra mantiene el patrón de metilación parental) y en una segunda vuelta, un ADN completamente desmetilado, cómo activamente sin replicación del ADN (Graessmann and Graessmann, 1993).

Existen una serie de drogas, análogos estructurales de bases, que han sido extensamente utilizadas en trabajos relativos a la dilucidación del binomio "metilación de citosina-expresión génica". Una de las más utilizadas ha sido la 5-azacitidina (5-azaC) (Razin and Cedar, 1991), que al incorporarse al ADN durante la replicación en lugar de la citosina, hace que la ADN-citosina-metiltransferasa no pueda metilar sobre el análogo ya que tiene una molécula de nitrógeno en lugar de un carbono en la posición -5. Este efecto es reversible y se mantiene siempre y cuando la droga esté presente y se incorpore al ADN replicándose. Una generación celular en presencia de la 5-azaC es suficiente para producir una considerable proporción de ADN hemimetilado o semimetilado (Razin and Cedar, 1991). Un esquema resumen del mecanismo de desmetilación por la 5-azaC se muestra en la Fig.2.

Pues bién, en diversos sistemas vivos eucariotas, este agente desmetilante (5-azaC) puede desbloquear la transcripción de algunos genes, que estaban silenciados por metilación (Cedar, 1988; Chomet, 1991; Doerfler, 1983; Hergersberg, 1991; Jones and Taylor, 1980; Santi et al., 1983; Taylor et al., 1984), lo cual, a veces, induce a que la célula pase de un estado diferenciado a otro.

4.1. Metilación en procesos de diferenciación microbiana eucariota

En el presente apartado nos limitaremos a procesos de diferenciación microbiana eucariota que involucran la formación de estados criptobióticos o similares, y su relación con la metilación del ADN.

Es igualmente necesario indicar, que son muy escasos los estudios en microorganismos eucariotas que analizan los cambios en el patrón de metilación del ADN genómico durante procesos de diferenciación, en general, y criptobióticos, en particular. Los datos existentes que podemos comentar se refieren básicamente a dos especies del género *Physarum* (hongo mixomiceto) durante el proceso denominado esporulación (enquistamiento) y/o esferulación.

En *P. flavicomum* (Zhu and Henney, 1990), se ha detectado desmetilación de residuos de citosina durante el enquistamiento, junto con un incremento de metilación en residuos de adenina durante el mismo proceso. El resto de la información publicada se refiere a la especie *P. polycephalum*. Por un lado, Hildebrandt (1986),

utilizando inhibidores de la metilación consigue bloquear el proceso de esporulación, y según este autor, el ADN debe ser metilado, a nivel de residuos de citosina, durante un periodo crítico una vez inducido el proceso.

Otro tipo de estudios, involucran genes específicos de esporulación y/o esferulación de *P. policephalum*. Así, por ejemplo, Magiera and Fronk (1994), piensan que existe una minoría de genes de esferulación que están sujetos a metilación diferencial. Analizando el gen concreto denominado esferulina-4, indican que la metilación de dicho gen lleva consigo su activación transcripcional. Telle and Hildebrandt (1992), trabajando en el mismo microorganismo, señalan la falta de evidencias que respalden la existencia de cambios en el patrón de metilación de genes específicos de esporulación.

De toda esta información, aunque en algunos aspectos contradictoria, podemos concluir que en el proceso de formación de esporas y/o esférulas del género *Physarum*, tanto se puede dar desmetilación como metilación de determinados genes durante el mismo proceso.

En protozoos ciliados, metilación/desmetilación y criptobiosis es un tema de estudio que aún no ha sido desarrollado en profundidad, y los únicos resultados que actualmente existen son los que se presentan en esta tesis. Sin embargo, sí que podemos describir algunos estudios relativos a la metilación, en otros procesos de diferenciación, realizados sobre ciliados.

En *Tetrahymena thermophila* (Harrison and Karrer, 1985; Karrer and Yao, 1988), se han estudiado los cambios en el patrón de metilación, a nivel de residuos de adenina, durante la conjugación de este ciliado en dos aspectos distintos; en la formación del nuevo macronúcleo (esbozo macronuclear) y sobre su posible influencia en la degradación del viejo macronúcleo o la protección contra degradación del nuevo.

En *Paramecium tetraurelia* y *P. jenningsi*, en donde no se ha podido detectar metilación en residuos de citosina por técnicas bioquímicas, pero usando agentes desmetilantes como la 5-azaC, se ha comprobado (Kwok and Ng, 1989; Ng, 1989) que la metilación de residuos de citosina es un proceso clave en el programa de expresión de genes macronucleares durante la estomatogénesis de estos ciliados.

Se conocen otros ejemplos, tanto en ciliados como en otros sistemas vivos eucariotas, en donde se ha estudiado la metilación de genes ribosómicos durante diferentes procesos de diferenciación. Así, por ejemplo, en el hongo basidiomiceto *Schizophyllum commune* (Buckner et al., 1988), el ADNr experimenta metilación durante el desarrollo del hongo.

En el ciliado *Tetrahymena thermophila* (Blackburn et al., 1983), se ha detectado metilación en genes ribosomales macronucleares, este patrón de metilación no cambia en diferentes estados fisiológicos de la célula, y se piensa que los residuos de N-6-metiladenina tienen la finalidad de diferenciar entre las formas moleculares de ADN, que se han mantenido en el macronúcleo maduro, de aquellas que van a ser degradadas o sufrirán un proceso de reorganización.

La metilación del ADNr podría tener la finalidad, al igual que el modelo que se acepta para cualquier otro gen, de impedir o bloquear su transcripción. En células vegetales, el ADNr no metilado o hemimetilado se encuentra en el nucleolo y está abierto a la transcripción, mientras que sus formas metiladas se encuentran condensadas formando la heterocromatina y no se transcriben (Finnegan et al., 1993).

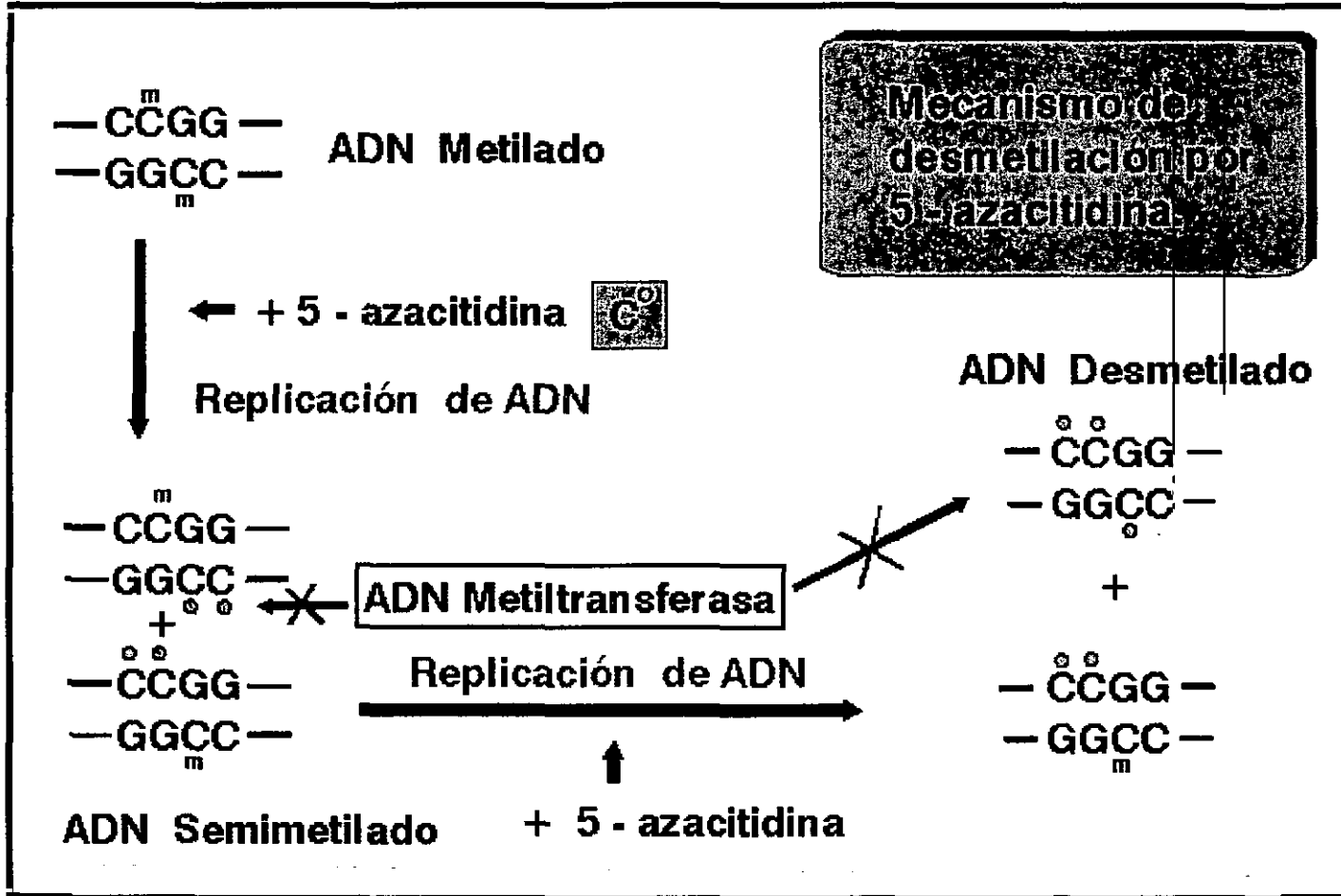


Fig.2

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Colpódidos

El ciliado *Colpoda inflata* (estirpe HSL-1; clon CI-143), fue amablemente suministrado por la doctora E. Simon (University of Illinois, Urbana-Champaign, USA). Se encuadra dentro del filo *Ciliophora*, clase *Colpodea* (Foissner, 1993), del cual *Colpoda* representa el género tipo.

Otros colpodidos utilizados en este estudio fueron:

-*Colpoda maupasi* ATCC 30918

-*Colpoda cucullus* ATCC 30916

-*Colpoda spiralis* ATCC 50031

1.2. *Tetrahymena thermophila*

El ciliado *Tetrahymena thermophila* (cepa CU 354), se incluye dentro del filo *Ciliophora*, orden *Hymenostomatida*, clase *Oligohymenophorea* (Small and Lynn, 1985).

1.3. *Enterobacter aerogenes*

Enterobacter aerogenes (CECT 684) procede de la colección española de cultivos tipo (CECT). Se utilizó como componente del medio monoaxénico para el crecimiento de *Colpoda inflata* y el resto de los colpódidos.

2. MEDIO DE CULTIVO Y PRINCIPALES TAMPONES UTILIZADOS

2.1. Medio y condiciones de cultivo para ciliados colpódidos

El medio de cultivo para el crecimiento de cualquier especie del género *Colpoda* fue el medio C0,25E1 el cual se prepara como una solución acuosa de Cerophyll (Sigma) al 0,25% (p/v) sometida a ebullición (5 minutos) y filtrada, tras lo cual se ajusta a pH 7,9 con 1g de $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Esta solución se autoclava a 121°C durante 20 minutos.

Antes de inocular el ciliado, se adiciona a este medio una suspensión bacteriana de *Enterobacter aerogenes* al 1% (v/v), a partir de un cultivo previamente crecido de

dicha bacteria a 32°C en Cerophyll y mantenido a 4°C hasta su utilización.

La temperatura óptima de crecimiento usada para cada especie de *Colpoda* fue de 32°C.

2.2. Principales tampones utilizados

- Tampón de enquistamiento

El tampón utilizado para la inducción de enquistamiento de *Colpoda inflata* fue Tris/HCl 10 mM (pH 6,8).

- Tampones de lisis de electroforesis

Tampón de lisis-I: 100 mM Tris/HCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS (pH 8), 1 mg/ml Proteínasa-K (PK)

Tampón de lisis-II: Mezcla de enzimas líticas de *Trichodermon harzianum* (Sigma) 10 mg/ml, *Cytophagia sp.* (Sigma) 2 mg/ml, Proteínasa-K 1 mg/ml en tampón Tris/HCl 10 mM (pH 6,8).

- Tampón de incubación-Campo pulsado

EDTA 0,5 M (pH 9); N-Lauroylsarcosina.Sal sódica 1% (Sigma); Proteínasa-K 1 mg/ml (Boehringer Mannheim).

- Tampón de lisis -Microscopía

Sacarosa 0,5 M; Tris/HCl 0,02 M; Ca⁺⁺ 0,012 M; Polivinil pirrolidón 4% (p/v); Tritón X-100 1% (v/v) (pH 7,2).

- Tampón Bal 31

Tris/HCl 20 mM; NaCl 600 mM; MgCl₂ 12,5 mM; CaCl₂ 12,5 mM; EDTA 1,5 mM (pH 7,2).

- Tampón de muestra

Tris/HCl 100 mM; EDTA 10 mM; Azul de Bromofenol 0,25%; Glicerol 50%.

- Tampón de hibridación

Formamida desionizada 50% (Clontech); 5 x SSC; 0,02% SDS (p/v); N-Laurilsarcosina 0,1% (p/v); 2% agente bloqueante (Boehringer-Mannheim).

- Tampón PBS

Para 1 litro de tampón 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₂; 0,24 g KH₂PO₄ (pH 7,4).

- Tampón de aislamiento nuclear (5:1)

1 M KCl; 1 M NaCl; 0,65 M Na₂HPO₄; 0,35 M KH₂PO₄ (pH 7,2 en H₂O hervida).

- Tampón TE

10 mM Tris/HCl (pH 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0).

2.3. Inducción de enquistamiento

El proceso de enquistamiento en ciliados generalmente se induce por falta de nutrientes (Gutiérrez et al., 1990). El cultivo de células vegetativas se centrifuga a 1.500 rpm y se recogen así las células, las cuales son posteriormente lavadas al menos tres veces con el tampón de enquistamiento. Finalmente, se resuspenden en este mismo tampón y se mantienen a 28°C durante todo el proceso de enquistamiento.

3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ADN

Independientemente del protocolo de aislamiento utilizado y previo al mismo, la lisis de células vegetativas y quistes de resistencia de *Colpoda inflata* se realizó según el siguiente protocolo:

-Cultivos exponenciales (100-200 ml) de células vegetativas de *Colpoda inflata* fueron centrifugados a 1.500 rpm. Las células fueron lavadas en tampón de enquistamiento para retirar el medio de cultivo y las bacterias. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis-I y mantenidas en el mismo durante 24 horas a 37°C.

-Los quistes de resistencia se obtuvieron de cultivos de un volumen superior

(400-800 ml), los cuales, una vez en forma de quistes maduros, se centrifugaron a 2.500 rpm con la finalidad de recoger el material celular. Una vez centrifugado todo el cultivo, se lavaron los quistes tres veces con el tampón de enquistamiento y finalmente se resuspendieron en tampón de lisis-II y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente a este tratamiento químico, la ruptura celular definitiva se realizó en este mismo tampón con un homogenizador manual, en frío y controlando el grado de ruptura bajo el microscopio óptico.

Una vez lisadas las células (vegetativos o quistes) el ADN total de las mismas se aisló por el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico o utilizando un Kit comercial.

3.1. Método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

Al lisado celular se le adiciona el mismo volumen de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezclan. Las fases inmiscibles se separan por centrifugación en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se retira la fase acuosa superior y se repite la etapa de extracción volviendo a separar la fase acuosa. A ambas fases acuosas así obtenidas, se les adiciona un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se separan las fases por centrifugación, a la fase acuosa obtenida, se le añade dos volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 5,2.

La precipitación del ADN se consigue manteniendo esta mezcla a -20°C durante, al menos, una hora. Posteriormente, se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos retirándose la mezcla alcohólica. El ADN se seca al aire antes de disolverlo en agua nanopura estéril o en tampón TE. El ADN se disuelve a temperatura ambiente, al menos una hora y posteriormente se guarda a 4°C.

3.2. Aislamiento de ADN utilizando un Kit comercial

Para las extracciones de ADN se empleó el Kit comercial "Quick-Geno" de la casa comercial Clontech.

El protocolo que se siguió fue el que recomendaba este Kit comercial adecuándolo a nuestro material celular. El procedimiento de aislamiento de ADN consiste en dos pasos fundamentales:

- Desproteínización y lisado de la muestra
- Unión del ADN al Geno-Bind (Clontech)

En el primer paso, utilizamos el tampón de lisis I ó II, según se tratase de células vegetativas o de quistes de resistencia.

En el segundo paso, se añade a 0,2 ml del lisado celular, 0,25 ml de NaI 6 M. A esta mezcla se le adiciona 0,2 ml de la solución Geno-Bind y se incuba en hielo 10 minutos agitando (4-5 veces). Posteriormente se centrifuga a 6.000 rpm y al sobrenadante se le añade 0,5 ml de la solución de lavado (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10mM NaCl; 1mM EDTA) en etanol 70%. Después de centrifugar y lavar varias veces, el sedimento se resuspende en TE y se incuba en un baño a 50°C, durante 15 minutos. Centrifugamos de nuevo 1 minuto y con una pipeta-pasteur, se transfiere el sobrenadante (ADN) a un eppendorf. Estas últimas etapas se repiten sobre el sedimento que ha quedado, hasta reunir todo el sobrenadante que es el ADN aislado en un volumen aproximado de 0,5 ml.

Para retirar el ARN de las muestras, independientemente del método utilizado, se incubaron con RNasa 4 mg/ml (Boehringer-Mannheim), libre de DNasa, a 37°C durante al menos 3 horas.

El ADN extraído se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm, utilizando la siguiente ecuación:

$$F \times 50 \times A_{260} = \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})$$

(F=Factor de dilución; 50: Una solución con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADNbc tiene una absorbancia de 1 a 260 nm; A_{260} : Absorbancia a 260 nm).

Los valores promedios que se obtienen en términos generales están dentro de los siguientes rangos: para células vegetativas; de 16 a 26 μg para volúmenes de cultivo de 100 - 200 ml. Para quistes de resistencia; desde 25 a 62 μg para volúmenes de cultivo de 400 - 800 ml. Estos valores se refieren a *Colpoda inflata*.

4. ELECTROFORESIS DE ADN

4.1. Marcadores de tamaño molecular utilizados

-Marcador de tamaño M-I (Boehringer-Mannheim)

ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción Eco RI que rinde un patrón con 6 fragmentos, en electroforesis de agarosa, cuyo rango

oscila entre 21.226 y 3.500 pb.

-Marcador de tamaño M-II (Boehringer-Mannheim)

ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción Hind III que rinde un patrón con 8 fragmentos en electroforesis de agarosa, y cuyo rango oscila entre 23.130 y 125 pb.

-Marcador de tamaño M-II-Dig.(Boehringer-Mannheim)

ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción Hind III marcado con digoxigenina que rinde un patrón con 8 fragmentos, y cuyo rango oscila entre 23.130 y 125 pb.

-Marcador de tamaño M-VI (Boehringer-Mannheim)

Mezcla de fragmentos de la digestión del ADN del plásmido pBR328 con la endonucleasa de restricción Bgl I y de este mismo ADN con la endonucleasa de restricción Hind III que rinden un patrón de 15 fragmentos en electroforesis de agarosa, y cuyo rango oscila entre 2.176 y 154 pb.

-Marcador de tamaño S13

Cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe S13) que rinden un patrón de 12-13 fragmentos (dependiendo del tiempo de pulso) en electroforesis de campo pulsado, cuyo rango oscila entre 2.000 y 260 Kb.

4.1. Electroforesis convencional

Las electroforesis convencionales de ADN se realizaron en geles de agarosa (0,7-0,8%) en tampón TAE como se describe en Sambrook et al. (1989). Los geles se corrieron a voltaje constante (18 V ó 25 V) durante aproximadamente 15 horas y a temperatura ambiente. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (EtBr, 1 μ g/ml). Los marcadores de tamaño molecular utilizados fueron: M-I, M-II y M-II-Dig (Boehringer-Mannheim). Los geles fueron analizados bajo luz ultravioleta de 302 nm (transiluminador LKB 2011, Pharmacia) y se fotografiaron con un sistema Polaroid CU-5 (película Polaroid 667).

4.2. Electroforesis de campo pulsado

El sistema de electroforesis de campo pulsado utilizado fue el CHEF (Contour-Clamped-Homogeneous Electric Field) (Chu et al., 1986; Vollrath and Davis, 1987). En este modelo, el ángulo entre los campos eléctricos es de 120°. La configuración de electrodos, consiste en 8 electrodos puntuales como cátodo y otros 8 como ánodo colocados 4 en línea recta formando un ángulo de 120° con los otros 4, en cada campo. El sistema empleado es de contorno hexagonal (Pharmacia-LKB), de tal forma, que las dos caras opuestas del polígono son usadas para definir la orientación del campo eléctrico.

Las moléculas de ADN fueron fraccionadas en geles de agarosa (1%) (Seakem GTG), en tampón TBE 0,5 x a voltaje constante (120 V) y los tiempos de pulso utilizados, una vez que se optimizó la técnica, fueron de 100 segundos (20 horas) y 200 segundos (20 horas). La temperatura del proceso fue de 14°C, conseguida mediante sistema de refrigeración.

Como marcadores de tamaño se utilizaron los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* S13.

El gel fue teñido con EtBr (1 µg/ml) (Sambrook et al., 1989). Posteriormente fue analizado bajo luz ultravioleta de 302 nm y fotografiado.

4.3. Preparación de las muestras para electroforesis de campo pulsado

Las células, tanto vegetativas como quistes, fueron lavadas en tampón de enquistamiento y resuspendidas en dicho tampón.

Los quistes de resistencia fueron previamente tratados con una mezcla de enzimas (Tampon de lisis-II) en tampón de enquistamiento a 37°C durante 24 horas

Cada bloque se formó con 0,3 ml de suspensión celular y otros 0,3 ml de agarosa al 1,2% en el mismo tampón de enquistamiento. Estos bloques así formados se enfriaron a 4°C durante 10 minutos hasta su polimerización. Posteriormente, estos bloques se mantienen en el tampón de incubación (Campo pulsado), durante dos días a 50°C. Luego, se lavan tres veces (2 - 3 horas cada lavado) con EDTA 0,2 M, pH 8. Los bloques obtenidos se pueden mantener en esta última solución a 4°C durante más de un año antes de usarlo en la electroforesis.

5. DIGESTIÓN CON LA NUCLEASA Bal 31 Y DIFERENTES ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

5.1. Digestión con la nucleasa Bal 31

Los bloques de agarosa con las muestras a digerir por Bal 31 (Boehringer-Mannheim) para electroforesis de campo pulsado, se incubaron con 1-2 unidades de la enzima, en el tampón recomendado por la casa comercial. Los tiempos de incubación fueron diferentes (15 y 30 minutos) a una temperatura de 30°C. La interrupción o bloqueo de la reacción se realizó por enfriamiento a 4°C con EDTA 0,2 M, pH 8 .

5.2. Digestiones con endonucleasas de restricción

En la Tabla-II se muestran las endonucleasas de restricción que se han utilizado. Todas ellas obtenidas de la casa comercial *Boehringer-Mannheim*.

Tabla II: Endonucleasas de restricción utilizadas

ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO
Dpn I	G A ^m ↓ T C
Msp I	C ⁺ ↓ C ⁰ G G
Hpa II	C ⁺ ↓ C ⁺ G G
Hha I	G C ⁺ G ↓ C ⁺
Bgl I	G C ⁺ C ⁰ (N _d) ↓ N G C
Nde II	↓ G A ⁺ T C ⁰
Sau 3AI	↓ G A ⁰ T C ⁺

m: Residuos metilados que son necesarios para la actividad de la enzima; (+): Inhibición de la actividad de la endonucleasa de restricción por un residuo metil-adenina o metil-citosina en la secuencia de reconocimiento; (0): La actividad endonucleasica de la enzima no está del todo influenciada por la presencia de metil-adenina o metil-citosina; (↓): Lugar de corte en la secuencia de reconocimiento.

La digestión con las diferentes endonucleasas de restricción se realizaron en las siguientes condiciones:

La solución enzimática estaba constituida por 2 μ l del correspondiente tampón de la enzima (Boehringer-Mannheim), 20 μ l de agua bidestilada estéril y 4 μ l de la enzima de restricción. A 7,5 μ l de la solución de ADN se le adicionó otros 7,5 μ l de la solución enzimática y se incubó durante 4-6 horas a 37°C. Después de la incubación, a estos 15 μ l se les adicionó 5 μ l de tampón de muestra, el cual interrumpía la digestión y preparaba la muestra para la electroforesis.

6. EXPERIMENTOS CON EL INHIBIDOR 5-AZACITIDINA

6.1. Durante el crecimiento

Un cultivo de dos días de antigüedad de *Colpoda inflata*, crecido en medio C0,25E1, se distribuyó en tubos de 10 ml a razón de 2,5 ml por tubo. A partir de una solución stock 1.200 μ M de 5-azacitidina (5-azaC), recientemente preparada, se realizaron diferentes diluciones en medio C0,25E1 (a doble concentración respecto de la concentración final a ensayar) y 2,5 ml de estas diluciones se adicionaron a los 2,5 ml de cultivo, obteniéndose así la concentración final requerida. Se realizó un control, adicionando 2,5 ml de medio C0,25E1 sin la droga a los 2,5 ml de cultivo.

Los tubos fueron incubados a 32°C y mantenidos a esta temperatura durante todo el experimento. A diferentes tiempos, incluyendo cuando se le añade la droga (tiempo "cero"), se tomaron alícuotas (25 μ l) de cada tubo, control y tratados con 5-azacitidina, se fijaron las células con unas gotas de formaldehído 37% y se realizó un recuento celular de tres estados celulares, examinados bajo el microscopio óptico, (vegetativo, prequísticos o quistes de resistencia) para cada muestra tomada. Se tomaron tres muestras (75 μ l de volumen total estudiado) para cada tiempo considerado.

Aproximadamente a las 24 horas de comenzado el experimento, se adicionó a los tubos con la droga, 5 ml de una nueva solución de 5-azaC en medio C0,25E1, manteniendo la misma concentración final para cada tubo. Lo mismo se hizo con el tubo control, adicionando 5 ml de medio C0,25E1 sin la droga. El adicionar una cantidad extra de inhibidor tiene la finalidad de mantener la presencia de 5-azaC en el medio, ya que esta ha de incorporarse al ADN durante la replicación del mismo, para ejercer su acción inhibitoria (Ng, 1988). Igualmente, al estar analizándose su

efecto sobre una población creciendo, ha de incorporarse al medio de cultivo nuevo medio C0,25E1, para mantener el crecimiento y evitar que la población se enquiste por disminución de nutrientes.

6.2. Durante el enquistamiento

Para estudiar la acción de esta droga sobre el proceso de enquistamiento, una población creciendo exponencialmente fue inducida a enquistar en tampón de enquistamiento. Se distribuyeron 2,5 ml de la suspensión celular en dicho tampón, en los tubos de 10 ml. Las diluciones de 5-azaC se realizaron en tampón de enquistamiento (a doble concentración) y otros 2,5 ml de estas diluciones fueron añadidos a los 2,5 ml de la suspensión celular inducida a enquistar. El control fue realizado adicionando 2,5 ml del tampón de enquistamiento sin droga a los 2,5 ml de suspensión celular.

Todos los tubos, control y las diferentes concentraciones ensayadas, fueron mantenidos a 28°C. los recuentos se realizaron como se ha indicado en el apartado 6.1.

7. OBTENCIÓN DE UNA SONDA DE ADN RIBOSÓMICO

La obtención de una sonda de ADN ribosómico de *Colpoda inflata* se realizó por PCR usando dos cebadores universales (NS1/NS2) (Genosys-Biotechnologies), cuyas secuencias se muestran en la Tabla-III. Estos cebadores hibridan sobre secuencias conservadas del ADNr 17/18 S de muchos eucariotas y rinden un fragmento de 555 pb de dicho gen ribosómico (Fig.3). El ADN usado fue el extraído a partir de una población de células vegetativas de *Colpoda inflata*.

Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos Eppendorf siliconizados de 0,5 ml con un volumen total de reacción de 50 μ l, el cual contenía $MgCl_2$ (0,7 mM), desoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 0,2 mM cada uno, Perkin-Elmer Cetus), los cebadores NS1 y NS2 en una concentración de 200 pM, 1,25 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus, Boehringer-Mannheim) y el tampón estandar (concentrado diez veces) que era suministrado por la misma casa comercial que la polimerasa. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Precision Scientific GTC-2). El ADN de *Colpoda inflata* (5 μ l) se utilizó diluido (10^{-1}) en tampón TE. La evaporación en el interior de los tubos se redujo añadiendo 40 μ l de aceite mineral estéril (Perkin-Elmer Cetus).

El programa utilizado para la amplificación se indica en la Tabla-IV. Las temperaturas óptimas de reasociación para estos cebadores (NS1/NS2) se dedujeron a partir de la secuencia nucleotídica de cada uno de ellos, utilizando el programa de ordenador "REANNEAL" (cedido amablemente por su autor, Dr.E.Orias, Universidad de California).

7.1. Marcaje no radiactivo de la sonda

El marcaje no radiactivo (marcaje con digoxigenina-DIG) del fragmento de 555 pb del ADN_r 17/18 S de *Colpoda inflata* se realizó por amplificación (PCR) de dicho fragmento. Las condiciones de amplificación son las mismas que la amplificación estandar, pero con una diferencia fundamental en uno de los componentes de la reacción; la mezcla de nucleótidos (dATP : dGTP : dCTP : dTTP : DIG-dUTP; 1:1:1:0,33:0,66). La molaridad final de los nucleotidos dATP, dGTP y dCTP se aproxima a la usada en las reacciones estandar de PCR (0,19 mM), pero se altera la molaridad final de dTTP (0,13 mM) y se introduce el nucleótido marcador DIG-dUTP a una concentración final de 66 μ M (Lion and Haas, 1990).

La eficiencia del marcaje se determina comparando la movilidad del fragmento marcado, con un control (sin marcaje) en una electroforesis de agarosa estandar, puesto que la incorporación del nucleótido con digoxigenina a la molécula de ADN retarda su movilidad electroforética (Fig.4).

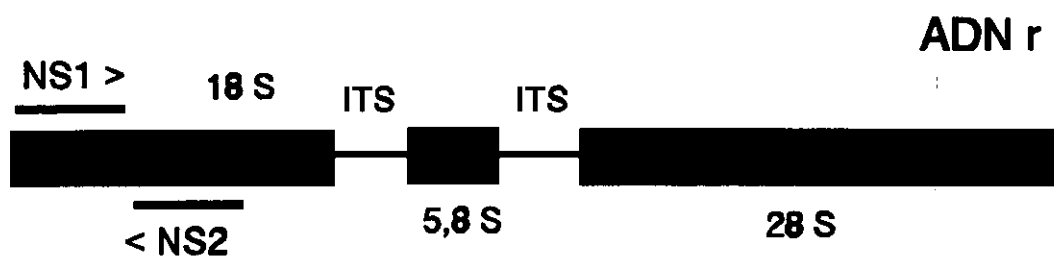


Fig.3: Localización de los cebadores (NS1/NS2), utilizados para la obtención por PCR de un fragmento de 555 pb del gen ribosómico 17/18 S de *Colpoda inflata*. ITS: Secuencia espaciadora.

Tabla III: Características de los cebadores NS1 y NS2.

CEBADOR	TAMAÑO (b)	SECUENCIA (5'→ 3')
NS1	19	GTAGTCATATGCTTGTCTC
NS2	21	GGCTCGTGGCACCAGACTTGC

Tabla IV: Condiciones del programa de PCR para los cebadores NS1/NS2.

ETAPAS DE AMPLIFICACIÓN	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min.)
<u>Primer ciclo</u>		
Desnaturalización	94	5
Reasociación	54	1
Polimerización	72	2
<u>Resto de ciclos (24)</u>		
Desnaturalización	94	1
Reasociación	54	1
Polimerización	72	2
Extensión final	72	5

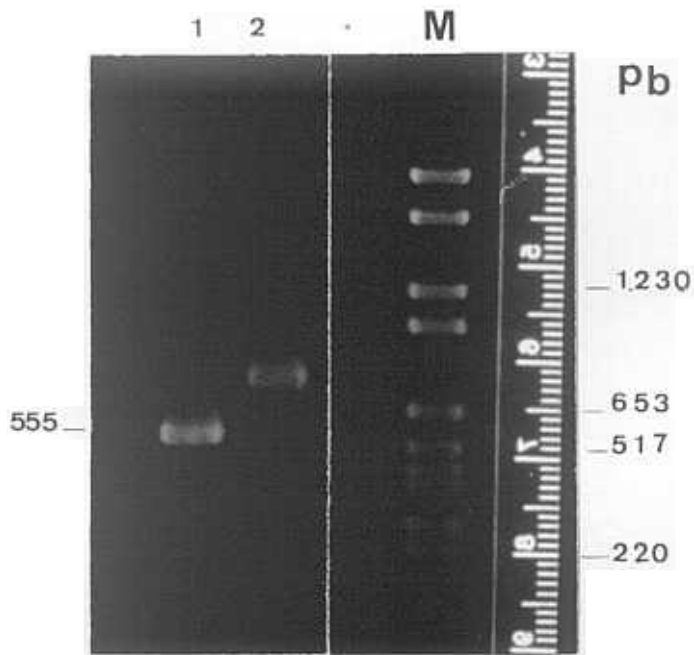


Fig.4: Electroforesis convencional de agarosa (1,5%) de la sonda de ADNr 17/18S (555 pb) de *Colpoda inflata*, obtenida por PCR (Carril 1). Carril 2 : el mismo fragmento marcado con digoxigenina por PCR. M: Marcador de tamaño M-VI

8. TRANSFERENCIA DE ADN (Southern blot), HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN

Tanto para las electroforesis convencionales como para las de campo pulsado, los geles de agarosa, después de ser teñidos con EtBr y fotografiados, fueron desnaturalizados y neutralizados (Sambrook et al., 1989).

La transferencia a filtros de Nylon⁺ se realizó según la técnica Southern (Sambrook et al., 1989), por capilaridad durante un tiempo aproximado de 24 horas. Posteriormente, los filtros fueron secados a 60-80°C durante 15-20 minutos y el ADN se fijó al filtro por luz ultravioleta durante 3 minutos (Spectrolinker XL 1000 UV., Spectronics corporation). Los filtros se guardaron en sequedad a 4°C hasta su utilización.

Las prehibridaciones de los filtros se realizaron a 42°C en tampón de hibridación durante 2-3 horas. Las hibridaciones se realizaron a la misma temperatura durante toda la noche usando el tampón de hibridación conteniendo la sonda (200 ng/ml) marcada con digoxigenina. La sonda, previamente, fue diluida en tampón TE conteniendo ADN de esperma de salmón (50 µg/ml, Boehringer-Mannheim) y desnaturalizada por calor (100°C) durante 10 minutos. Después de la incubación en presencia de la sonda marcada, esta fue retirada y guardada a -20°C para un posterior uso. De esta forma, la misma sonda puede ser reutilizada varias veces. Los filtros fueron lavados dos veces con 2 x SSC, 0,1% SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente y dos veces más (15 minutos cada una) en solución 0,1 x SSC, 0,1% SDS a 68°C. Una vez lavados los filtros, se procedió con la detección mediante una reacción quimioluminiscente, cuyo protocolo se puede resumir en tres pasos:

- Tratamiento de las membranas con el agente bloqueante para impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana.
- Incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfata alcalina.
- Reacción con la solución sustrato (Lumigen PPD) a 37°C durante aproximadamente 3 horas. La defosforilación del sustrato por la fosfatasa alcalina a pH básico origina un intermediario inestable quimioluminiscente, el cual es detectado, por su luminiscencia, por exposición a una película de rayos X (Kodak, X-Omat 100) entre 3 y 15 horas. La película es posteriormente revelada por un procedimiento fotográfico convencional.

Un protocolo más detallado de la reacción quimioluminiscente y del método de detección de moléculas marcadas con digoxigenina se muestra en la literatura

suministrada en el Kit de detección (Boehringer-Mannheim, 1993).

9. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

9.1. Procesamiento del material vivo para Microscopía Electrónica de transmisión estandar

Células vegetativas, prequísticas (de muestras tomadas a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento) y quistes de resistencia maduros de *Colpoda inflata* se fijaron durante 30 minutos con una solución de glutaraldehído al 2% en PBS (pH 7,4). Las células fueron postfijadas durante 1 hora en tetróxido de osmio al 1% (p/v). Posteriormente, las células fueron lavadas varias veces con tampón PBS y se concentraron en un pequeño volumen del mismo. Tras retirar casi completamente el tampón las células fueron agrupadas en pequeños montículos sobre un portaobjetos limpio, a los cuales se les añadió varias gotas de agarosa (2%) fundida templada. Tras dejar solidificar a la agarosa se cortaron bloques que contenían las células fijadas, estos bloques se pueden guardar en PBS a 4°C hasta su procesamiento definitivo para microscopía electrónica.

Después de una deshidratación de las muestras en una serie creciente de alcoholes (50-100 %), fueron embebidas en resina Spurr (Spurr, 1968). Las secciones ultrafinas obtenidas por ultramicrotomía fueron posteriormente contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (Solución de Reynolds) (Hayat, 1986).

La observación de estas secciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-300 a 75 KV. Ocasionalmente, también se ha utilizado un Jeoljem-1010 a 80-75 KV.

9.2. Aislamiento y visualización de la cromatina macronuclear

Para la visualización por microscopía electrónica de la cromatina macronuclear de *Colpoda inflata*, se utilizó una modificación del método original de dispersión cromatínica de Miller (Trendelenburg and Puvion-Dutilleul, 1987). Las rejillas para microscopía electrónica fueron previamente recubiertas con una fina película de carbón (15-30 nm) (Trendelenburg and Puvion-Dutilleul, 1987; Zentgraf et al., 1987).

Las células de *Colpoda inflata*, fueron tratadas de diferente forma dependiendo de su estado celular (vegetativo, prequístico o quiste de resistencia).

9.2.1. Células vegetativas

Un cultivo en fase exponencial de crecimiento centrifugado se mantuvo durante 5 minutos en hielo, con la finalidad de que las células se separaran de los desechos y productos de excrección celular originados durante su crecimiento. Las células se desplazan hacia la parte superior del tubo (no rodeada por el hielo) más templada y allí se mantienen, por lo que se pueden fácilmente separar limpias con una pipeta-pasteur.

Una vez separadas las células vegetativas de los productos de deshecho, la lisis celular se realizó siguiendo dos protocolos distintos:

a)-Las células fueron lavadas en medio de aislamiento de núcleos (Trendelenburg and Puvion-Dutilleul, 1987). La lisis celular y la dispersión cromatínica fue realizada en gotas de agua destilada, previamente ajustada a pH 9 con 0,1 mM de borato sódico, colocadas sobre portaobjetos siliconizados, a 4°C durante 20 minutos.

b)-Las células vegetativas fueron lisadas en tampón de lisis (Microscopía) (Isaack et al., 1973). A partir de este lisado celular se aislaron los macronúcleos por centrifugación y se lavaron en tampón de aislamiento nuclear. Posteriormente, se depositaron sobre gotas de agua destilada ajustadas a pH 9 con borato sódico, sobre portaobjetos siliconizados.

9.2.2. Células prequísticas y quistes de resistencia

Ambos tipos celulares fueron lisados en un homogenizador manual en presencia de tampón de lisis (Microscopía). Los quistes no rotos y las paredes quísticas fueron retiradas por centrifugación y los macronúcleos presentes en el sobrenadante, fueron lavados en medio de aislamiento de núcleos. La dispersión cromatínica macronuclear se realizó en gotas de agua bidestilada tamponada con borato sódico, a 4°C durante 20 minutos, 2 horas ó 16 horas (Martinkina et al., 1983).

A partir de la obtención de los lisados celulares (vegetativos, prequísticos y quistes), el protocolo fue el mismo para cualquier tipo celular utilizado.

La cromatina dispersa fue transferida a las cámaras de microcentrifugación y centrifugada en frío a través de un gradiente de sacarosa (0,1 M) que contenía formaldehído al 1%, a 4.000 rpm durante 15 minutos. Después de la centrifugación

las rejillas, con la cromatina macronuclear, fueron retiradas de las cámaras de microcentrifugación y sumergidas durante 30 segundos, en una solución de Photoflo al 0,4% (Photoflo 200, Kodak). Luego fueron secadas al aire.

La deshidratación y contrastado de las muestras se realizó sumergiendo las rejillas en una solución de ácido fosfotúngstico (PTA)(Merck) - etanol al 1% durante 1 minuto. La deshidratación se completó con etanol al 70% y con etanol 100% (30 segundos cada etapa), junto con un último paso en isopentanol (30 segundos). El sombreado metálico se realizó con Oro-Paladio en un ángulo de rotación de 8°. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión convencional Zeiss a 80 KV.

10. TÉCNICAS CITOLÓGICAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO DE ADN Y MICROSCOPIA CONFOCAL

10.1. Métodos citológicos

Los fluorocromos utilizados en este estudio fueron; 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y yoduro de propidio (YP) para citometría de flujo y microscopía confocal respectivamente.

El fluorocromo DAPI se une al ADN presentando una excitación máxima de 372 nm y una emisión máxima de 456 nm en el ultravioleta. El YP, es un fluorocromo que se intercala entre las bases de ácidos nucleicos de doble hebra. Puede ser excitado por luz ultravioleta o luz azul dando fluorescencia roja (excitación máxima a 495 ó 342 nm y emisión máxima a 639 nm). Como este fluorocromo también se une al ARN de doble hebra, fue necesario incubar las células con RNAsa (Boehringer-Mannheim) 4 mg/ml durante 24 horas, antes de añadir el fluorocromo, para evitar que el YP se uniera al ARN.

10.2. Citometría de flujo de ADN

Cultivos exponenciales de células vegetativas y cultivos de células en forma de quiste de resistencia maduro, fueron centrifugados y lavados en tampón de enquistamiento. Posteriormente, las células fueron fijadas en etanol (70%) y mantenidas a 4°C. El protocolo comienza retirando el fijador por centrifugación y resuspendiendo el sedimento en un volumen de la solución de pretratamiento (Ac.

Cítrico 0,2 M; Tween-20 0,5%) a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación suave. A continuación se adicionaron 9 volúmenes de la solución de tinción que contiene el fluorocromo DAPI : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M; DAPI 5 μM (Otto, 1990). El DAPI se utilizó a diferente concentración dependiendo del estado celular del cultivo inicial: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para células vegetativas y 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para quistes de resistencia.

La cuantificación de fluorescencia ligada a los núcleos, se realizó utilizando un citómetro de flujo Facstar Plus (Becton-Dickinson) con filtro BP 422/20 y láser ultravioleta (UV) del servicio de citometría de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.

10.3. Microscopía confocal

Cultivos exponenciales de células vegetativas fueron centrifugados y fijados en etanol, 70%. Las células fueron mantenidas a 4°C, al menos 30 minutos. Una vez eliminado el fijador, se resuspendió el sedimento celular en Tris/HCl 10mM (pH 6,8) y se añadió RNasa (4 mg/ml) a dicha solución. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 24 horas. El fluorocromo YP, se adicionó, posteriormente al tratamiento con la RNasa, en una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Cuando se trataba de quistes de resistencia, era necesario un tratamiento previo de las células con tampón de lisis-Microscopía electrónica sin Tritón X-100. Los quistes de resistencia maduros eran resuspendidos en un volumen de este tampón y eran sometidos a ruptura mecánica. El grado de ruptura se fue controlando bajo el microscopio óptico. La incubación con RNasa se realizó en las mismas condiciones que para células vegetativas así como el tratamiento con el YP (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert 135 sistema CONFOCAL MRC 1000 (Bio Rad) del servicio de microscopía y análisis de imagen del CIB (CSIC).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL ADN-MACRONUCLEAR VEGETATIVO Y QUÍSTICO DE *Colpoda inflata*.

1.1. Electroforesis convencional y de campo pulsado

El análisis del ADN total (principalmente macronuclear; ADN-Ma) de una población de células vegetativas de *Colpoda inflata* (cepa CI-143) por electroforesis convencional, mostró una única banda en el límite de resolución electroforético, más allá del marcador de tamaño más alto (21 Kb) (Fig.5, carril 2).

A modo de análisis comparativo, se introdujo en la misma electroforesis ADN total de un ciliado conocido como *Tetrahymena thermophila*, y al igual que el ADN genómico de *C. inflata* se detecta una única banda en el límite de resolución electroforético (Fig.5, carril 1). En ningún caso se detectaron moléculas de ADN por debajo de 21 Kb. El ADN total aislado de los quistes de resistencia maduros, mostró resultados similares a los de células vegetativas de *C. inflata*.

La técnica de electroforesis de campo pulsado facilita la fraccionación de moléculas lineales de ADN con tamaños desde unas pocas pb hasta varios millones, por lo que resulta un método idóneo para el estudio de genomas eucariotas complejos. En la mayoría de los casos la movilidad es dependiente del pulso que se utilice, por lo que inicialmente se estudió el nivel de fraccionación del genoma macronuclear de *C. inflata* a diferentes tiempos de pulso (Fig.6). Los pulsos utilizados fueron 20, 40, 60 y 90 segundos manteniendo el mismo voltaje (150 V) durante 48 horas. Como se aprecia en la Fig.6A, un pulso de 20 segundos fracciona muy poco el genoma de *C. inflata*, al igual que el marcador de tamaño (cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* S13) que nos sirve de referencia. Prácticamente, el genoma completo queda incluido en un centímetro del gel. A medida que se incrementa el tiempo de pulso se resuelve mejor, tanto los marcadores de tamaño como el genoma de *C. inflata* (Fig.6B, C y D). A 90 segundos de pulso las 12-13 bandas cromosómicas de *S. cerevisiae* están completamente separadas, ocupando de 10-11 centímetros de gel, al igual que el genoma macronuclear de *C. inflata* que se muestra como una población continua de moléculas. No obstante, hay que destacar que una fracción de moléculas dentro de la población se mantiene invariable en su localización (aproximadamente 2,5 centímetros a partir del origen), independientemente del pulso utilizado. Esta banda (2.000 Kb), bastante conspicua, tras tinción con bromuro de etidio, representa una buena proporción del genoma de *C. inflata*.



Fig.5: Electroforesis convencional de ADN. Agarosa 0,8%. Carril 1: *Tetrahymena thermophila*. Carril 2: *Colpoda inflata*. M: Marcadores de tamaño (M-I).

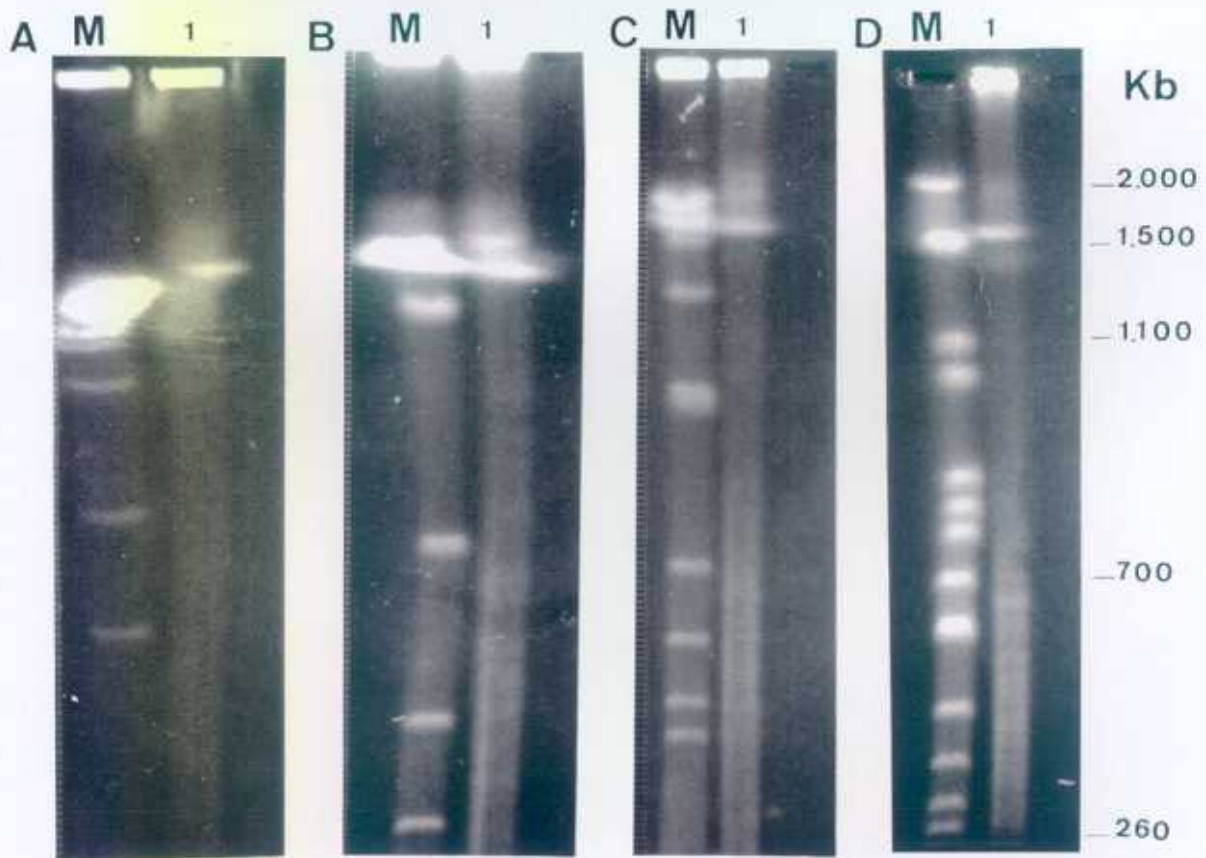


Fig.6: Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de muestras de *Colpoda inflata* (carril 1) probando distintos tiempos de pulso pero idénticas condiciones de voltaje (150 V) y tiempo total (48 horas). Tiempos de pulso (A): 20 segundos, (B): 40 segundos, (C): 60 segundos y (D): 90 segundos. M: Marcadores de tamaño (S13)

Una combinación de pulsos superiores a 90 segundos; un pulso de 100 segundos durante 20 horas y otro de 200 segundos durante otras 20 horas a un voltaje constante de 120 V, dió, igualmente, un resultado satisfactorio en cuanto a la fraccionación de moléculas de *C. inflata* y los cromosomas de *S. cerevisiae* (S13) (Fig.7).

Un análisis detallado de la electroforesis de la Fig.7 nos lleva a realizar las siguientes consideraciones:

1. En el patrón electroforético correspondiente al ADN genómico vegetativo de *Colpoda inflata* (Fig.7, carriles 1 y 2), se pueden distinguir dos regiones de macromoléculas bien definidas. La primera de ellas se localiza en el límite de resolución electroforético, coincidiendo con la banda cromosómica más alta de *Saccharomyces cerevisiae* (S13) de aproximadamente unas 2.000 Kb. En esta región se pueden, al menos, distinguir dos o tres bandas muy conspicuas, agrupadas en aproximadamente 0,5 cm. de gel. La segunda región de macromoléculas, esencialmente macronucleares, de *C. inflata* se extiende desde el tercer marcador cromosómico de *S. cerevisiae* (1.100 Kb) hasta más allá (2 cm. de gel) de uno de los últimos marcadores cromosómicos (260 Kb). Esta región (5,5 cm. del gel) está constituida por una población continua de moléculas, en la cual se puede a veces distinguir algunas discontinuidades o bandas discretas. Entre éstas, podemos señalar dos gruesas bandas que destacan sobre el resto, una que se localiza cerca del marcador cromosómico de 700 Kb y la otra casi en el límite inferior del patrón molecular, de unas 200 Kb aproximadamente.

2. El patrón electroforético de *C. inflata* en su fase quística (quiste de resistencia maduro) (Fig.7, carriles 3 y 4), es básicamente similar al mostrado en el estado vegetativo de este ciliado. Se distinguen también dos regiones de macromoléculas, siendo la primera de ellas similar a la descrita en el estado vegetativo de *C. inflata*. Pero en la segunda, que recorre una porción de gel muy parecida a la del vegetativo, ya no se pueden distinguir bien bandas definidas dentro del patrón, ni las dos más conspicuas que se señalaron en el estado vegetativo.

3. En la misma electroforesis (Fig.7, carril 5), a modo de comparación, se introdujo una muestra de *Tetrahymena thermophila* (cepa CU 354). El patrón molecular observado es bastante diferente respecto del de *C. inflata*; 25-26 bandas bien definidas componen dicho patrón a lo largo de unos 7,5 cm. de gel, desde el límite

superior de resolución electroforético (2.000 Kb) hasta más allá (0,7 cm.) del último marcador cromosómico considerado (260 Kb). Dentro de este patrón de bandas, constituyentes del genoma macronuclear de *Tetrahymena thermophila*, algunas, entre 9-10, aparecen más conspicuas, tras tinción con EtBr, indicando una diferencia cuantitativa respecto del resto. Nuestra estimación del rango de tamaños es desde aproximadamente 2.000 hasta unas 200 Kb, siendo el promedio de unas 1.100 Kb.

De la electroforesis de la Fig.7, se obtuvieron los densitogramas del carril 1 (marcadores de tamaño) (Fig.7A) y del carril 2 (ADN genómico vegetativo de *Colpoda inflata*) (Fig.7B). El rango de tamaños para *C. inflata* se estimó entre 2.000 y 90 Kb, siendo el tamaño promedio de 1.045 Kb. El perfil densitográfico de la Fig.7B, se dividió en tres áreas de barrido; Área-I que abarca un rango de tamaños desde 2.000 hasta unas 835 Kb aproximadamente, y que implica un 37,9% del área total barrida. El tamaño medio de moléculas en esta área es de 1.417 Kb aproximadamente. Área-II que comprende un rango de tamaños desde 800 hasta 400 Kb, con una media de 600 Kb y que implica un 27,8% del área total. Y, por último, el Área-III que incluye moléculas de tamaños comprendidos desde unas 370 Kb hasta 90 Kb aproximadamente, media de 230 Kb y un 28,5% del área total barrida.

A partir de estos datos podemos estimar el número de moléculas de ADN-Ma para cada intervalo o área considerada, si asumimos como ciertas las dos siguientes proposiciones aplicadas a *C. inflata*. La primera, es sobre el tamaño del genoma de *C. inflata*, el cual desconocemos, pero podríamos considerarlo en torno a los 220.000 Kb, que es el dato obtenido para *T. thermophila*. Y la segunda, es la suposición de que cada tipo celular de ADN-Ma de *C. inflata* esta presente en un número similar de copias, proposición muy dudosa, inclusive si descartamos el ADNr.

Pues bien, si esto fuera cierto, el Área-I considerada en el densitograma representa 0,379 veces el tamaño del genoma y si esta fracción se multiplica por el tamaño del genoma considerado (220.000 Kb) y lo dividimos por el tamaño promedio de moléculas que presenta esta área (1.417 Kb) nos dará el número de moléculas de ADN-Ma presente en este intervalo del densitograma (59 moléculas). Si aplicamos este mismo razonamiento a las otras dos áreas (II y III) consideradas, obtenemos valores de 102 y 272 moléculas respectivamente. La suma de las tres áreas, nos da un valor total de unas 433 moléculas macronucleares en *C. inflata*.

El análisis electroforético por campo pulsado (CHEF) de otras especies del género *Colpoda* (*C. cucullus*, *C. spiralis* y *C. maupasi*) nos mostró patrones moleculares similares al ya descrito para *Colpoda inflata* (Fig.9A).

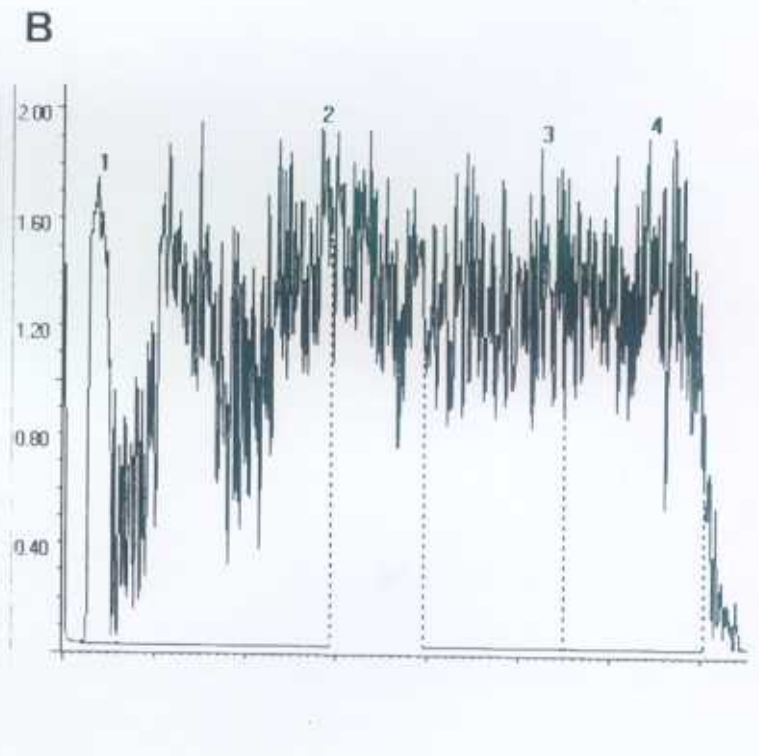
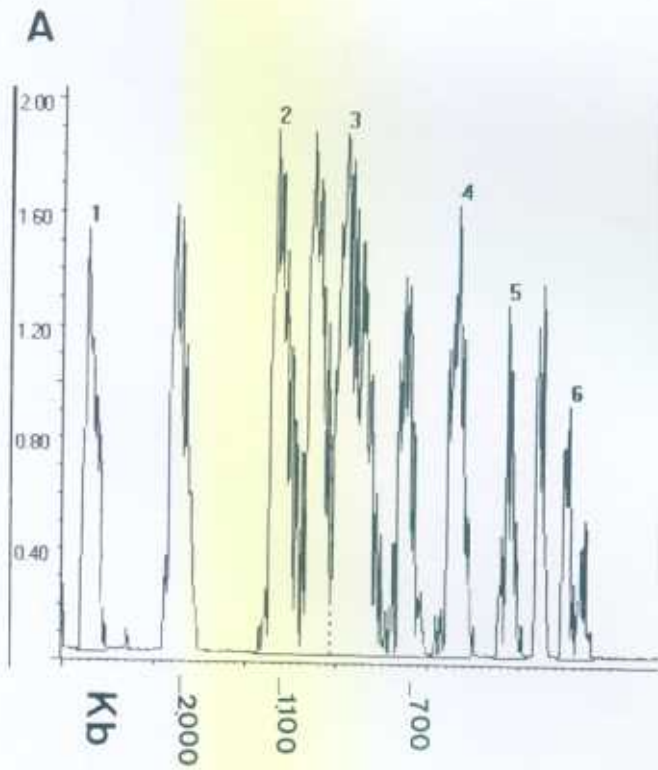
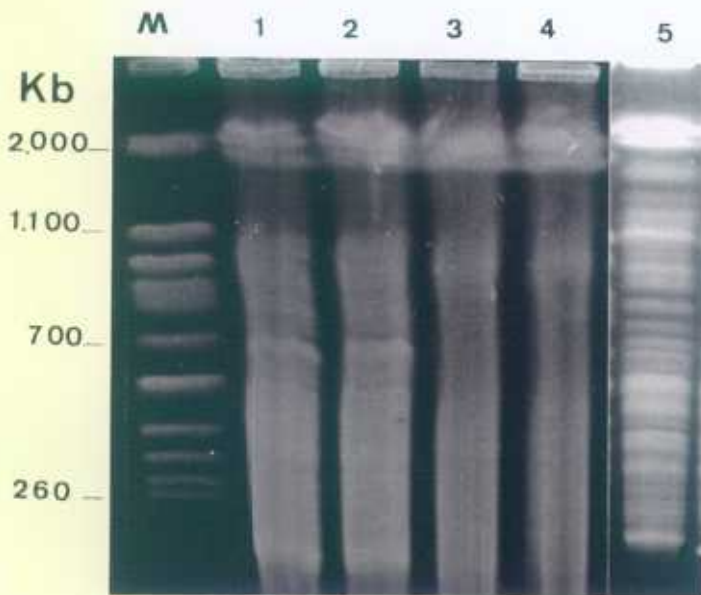


Fig.7: Electroforesis de campo pulsado. Tiempos de pulso: 100 segundos-20 horas, 200 segundos-20 horas. Carriles 1 y 2: *Colpoda inflata* vegetativo. Carriles 3 y 4: *Colpoda inflata* quiste de resistencia maduro. Carril 5: *Tetrahymena thermophila*. M: Marcadores de tamaño (S13).

A: Densitograma de los marcadores de tamaño, cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* S13 (carril 1 de la electroforesis de la Fig.7). Se indica el tamaño aproximado en Kb de las diferentes bandas registradas.

B: Densitograma del ADN genómico vegetativo de *Colpoda inflata* (carril 2 de la electroforesis de la Fig.7). La escala de tamaños (Kb) se determinó por extrapolación de los marcadores de tamaño del densitograma de la Fig.7A.

1.2. Análisis del gen ribosómico 17/18S en vegetativos y quistes maduros

Uno de los posibles caminos para estudiar la reorganización genómica que puede tener lugar en un proceso de diferenciación, como es el proceso de enquistamiento en ciliados, es utilizar sondas de genes conocidos y abundantes como son los ribosómicos.

1.2.1. Localización del gen ribosómico en electroforesis de campo pulsado

La localización del gen ribosómico 17/18S sobre el genoma de *C. inflata*, según se distribuye éste en una electroforesis de campo pulsado (CHEF), se realizó usando como sonda un fragmento (555 pb) del gen ribosómico 17/18S de *C. inflata* generado por PCR (apartado 7 de Materiales y Métodos).

La hibridación sobre la copia del gel de la Fig.8A (Transferencia Southern) usando esta sonda, reveló una fuerte hibridación positiva (carriles 1 y 2 de la Fig.8B) sobre las muestras de vegetativos de *C. inflata*, detectándose una única banda de aproximadamente 200 Kb de tamaño. Banda que corresponde a una de las dos bandas más conspicuas que se detectaron en el patrón electroforético del vegetativo de *C. inflata*. Igualmente, esta sonda ribosómica hibrida heterológamente con la banda cromosómica más alta (2.000 Kb) de *Saccharomyces cerevisiae* (S13), cuyos cromosomas han sido utilizados como marcadores de tamaño (carril M de la Fig.8B). Esta banda corresponde al cromosoma XII de *S. cerevisiae* (Schütz and Gatner, 1994).

Por el contrario, en las muestras correspondientes a los quistes maduros de *C. inflata* no se detectó hibridación positiva sobre el patrón electroforético obtenido, sino únicamente dentro del pocillo del gel (carriles 3 y 4 de la Fig.8B).

En la Fig.9A, se muestra una electroforesis de campo pulsado de cuatro especies diferentes del género *Colpoda* (*C. inflata*: carril 1; *C. cucullus*: carril 2; *C. spiralis*: carril 3 y *C. maupasi*: carril 4). En la Fig.9B, observamos el quimioluminograma correspondiente al Southern blot del gel de la Fig.9A, tras hibridación con la sonda ribosómica (555 pb) de *C. inflata*. De nuevo, apreciamos la hibridación positiva homóloga, en una banda de aproximadamente 200 Kb, en *C. inflata* e hibridación positiva heteróloga sobre el resto de las especies analizadas. Una banda de aproximadamente 200 kb también para *C. cucullus*, una de aproximadamente 260 Kb para *C. spiralis* y una de aproximadamente 450 Kb para *C. maupasi*.

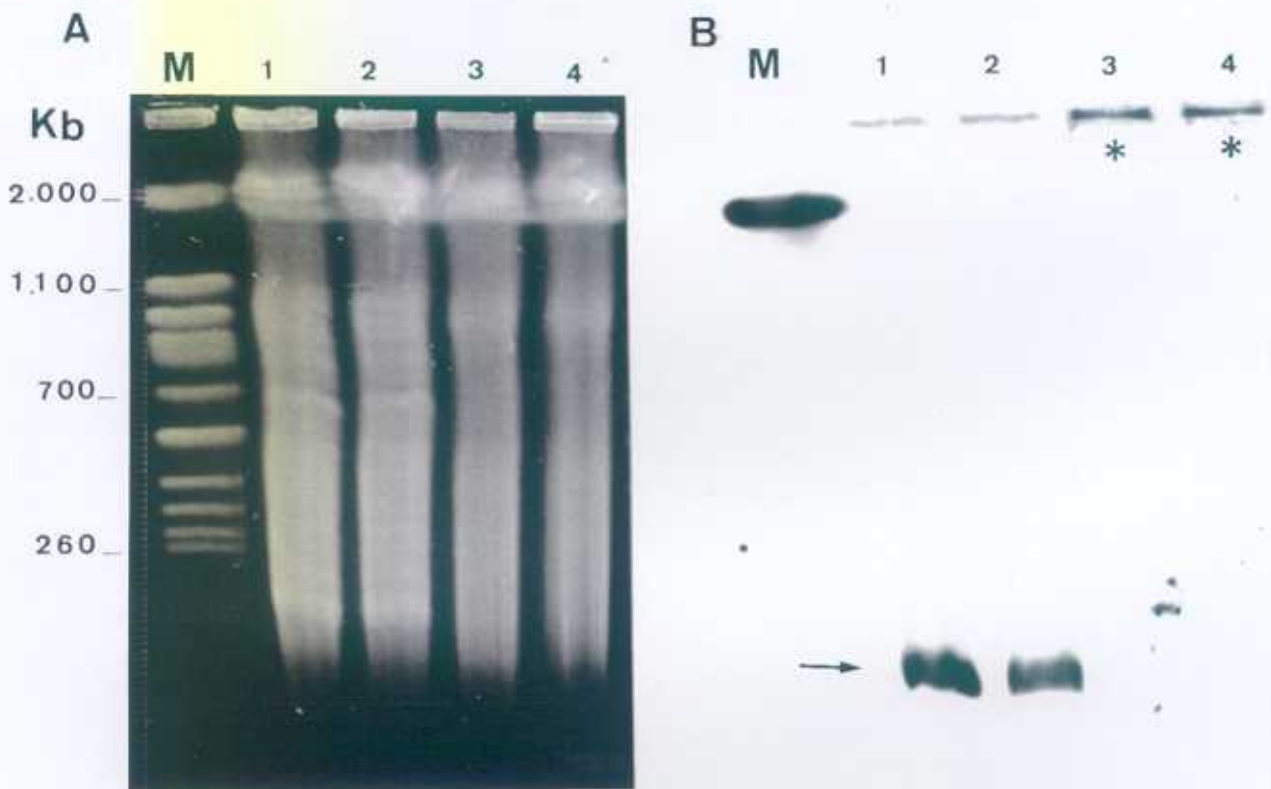


Fig.8: (A).Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de células vegetativas (carriles 1 y 2) y de quistes de resistencia (carriles 3 y 4). M: Marcadores de tamaño (S13). (Tiempos de pulso: 100 segundos -20 horas y 200 segundos-20 horas). (B). Southern blot de la Fig.8A e hibridación con la sonda de ADNr 17/18S. (→): Banda de hibridación positiva (200 Kb) en los carriles (1 y 2) de células vegetativas de *Colpoda inflata*. (*): Hibridación positiva en los pocillos de los carriles (3 y 4) de quistes maduros de *C. inflata*.

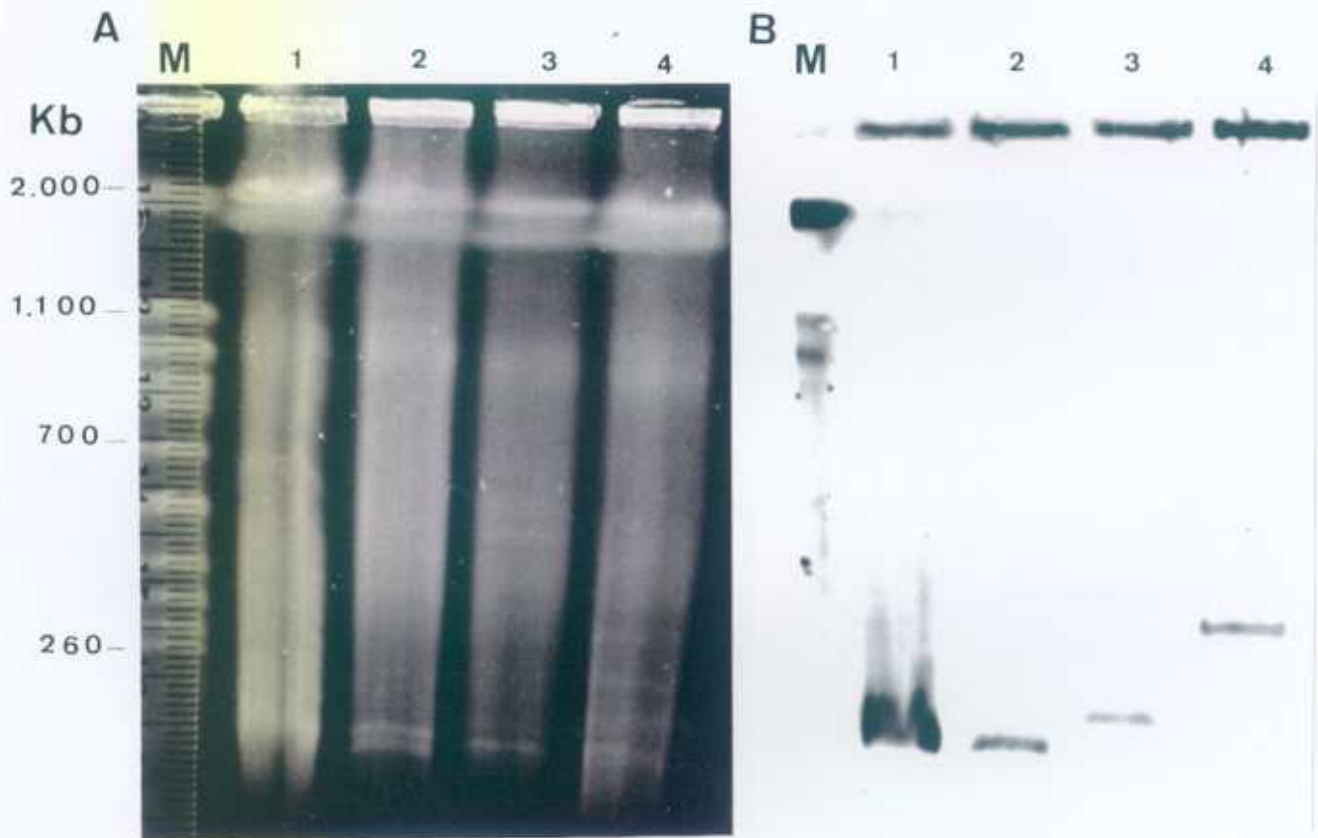


Fig.9: (A). Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de varias especies de colpódidos en estado vegetativo. Carril 1: *Colpoda inflata*, Carril 2: *Colpoda cucullus*, Carril 3: *Colpoda spiralis*, Carril 4: *Colpoda maupasi*. M: Marcadores de tamaño (S13). (Tiempos de pulso: 100 segundos-20 horas y 200 segundos-20 horas).
(B). Southern blot del gel (Fig.9A) e hibridación con la sonda de ADNr 17/18S. Carriles 1 y 2: Banda de hibridación positiva de aproximadamente 200 Kb. Carril 3: Banda de hibridación positiva de 260 Kb y carril 4: Banda de hibridación positiva de 450 Kb.

1.2.2. Digestión con la nucleasa Bal 31

La nucleasa Bal 31 presenta dos actividades; una actividad 3' exonucleásica sobre ADNbc (ADN bicatenario) lineal, siendo esta actividad la predominante de la enzima y una posible segunda actividad endonucleásica sobre el ADNmc (ADN monocatenario) generado por la primera actividad exonucleásica. Igualmente, la Bal 31 puede romper ADNbc superenrollado, el ADN circular superenrollado es especialmente sensible a su actividad endonucleásica (Phan et al ., 1989), y originar círculos relajados y posteriormente ADN lineal (Sambrook et al., 1989).

Con la finalidad de conocer más sobre la estructura del ADNr en el estado vegetativo y quístico de *Colpoda inflata*, se incubaron los bloques de agarosa para electroforesis de campo pulsado (CHEF) con la Bal 31 (1-2 unidades) durante 15 ó 30 minutos, tanto las muestras de vegetativos como de quistes maduros. Los resultados se muestran en la Fig.10A. El tratamiento con la Bal 31 durante 15 minutos revela que dicha enzima degrada inicialmente gran parte del ADN-Ma de elevado tamaño, por encima de las 1.000 Kb, en la muestra de vegetativos de *C. inflata* (Fig.10A, carril 2). Un tratamiento más prolongado (30 minutos) hace que la degradación de moléculas de elevado tamaño sea más intensa, por encima de aproximadamente 835 Kb, prácticamente todo el ADN-Ma ha sido digerido (Fig.10A, carril 3). Las muestras de quistes maduros (Fig.10A, carriles 5 y 6) con los mismos tiempos de incubación con la Bal 31, mostraron una más intensa degradación por la enzima; 15 minutos de incubación es suficiente para degradar casi todo el ADN-Ma superior a 580 Kb, mientras que en las muestras tratadas con 30 minutos, prácticamente casi todo el ADN está degradado quedando sólo un residuo, que se localiza en 1,5 cm. de gel más allá del último marcador (260 Kb). El Southern blot de este gel (Fig.10B) fue hibridado con la sonda ribosómica (555 pb) marcada con digoxigenina, encontrándose hibridación positiva únicamente sobre los carriles de muestras de vegetativos. En las tres muestras (carriles 1, 2 y 3 del gel de la Fig.10A) se detectó una señal de hibridación positiva localizadas al mismo nivel (200 Kb), tanto para la muestra no tratada, confirmando resultados anteriores, como las tratadas con la Bal 31 (15 y 30 minutos) (Fig.10B).

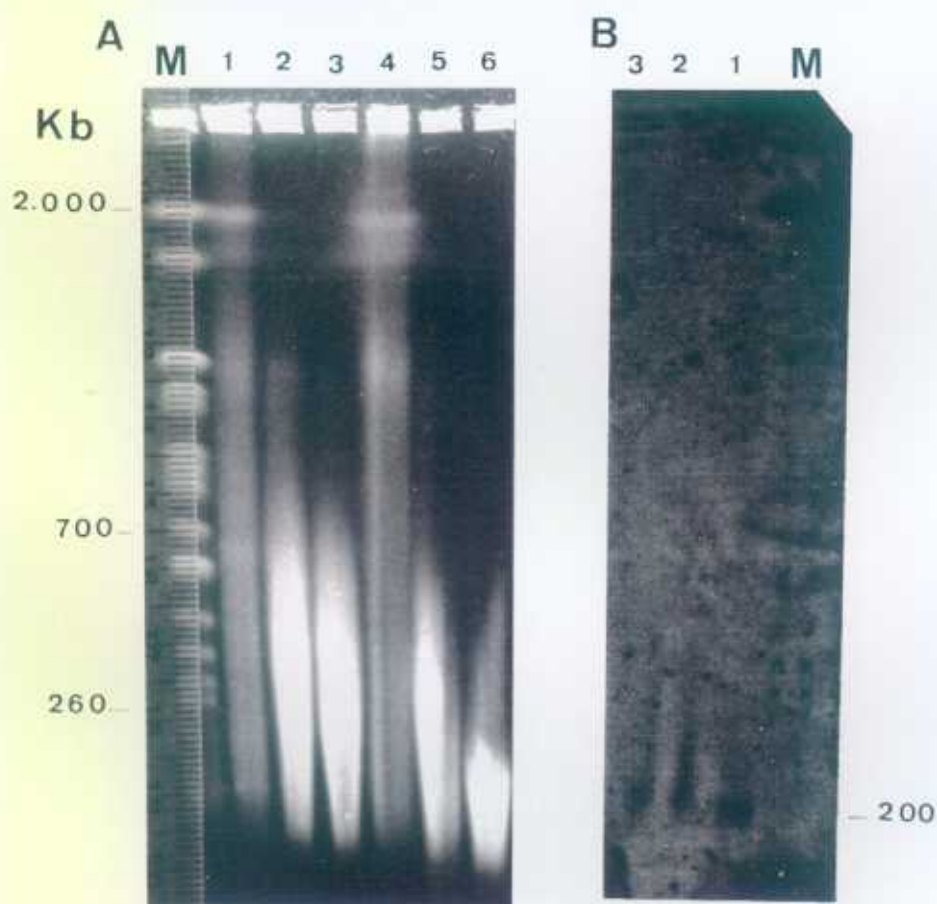


Fig.10:(A). Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de células vegetativas y quísticas tras la digestión parcial con Bal 31. Tiempos de pulso: 100 segundos-20 horas y 200 segundos-20 horas. Carril 1: muestra de vegetativos sin tratar. Carriles 2 y 3: ADN vegetativo digerido con Bal 31, 15 y 30 minutos respectivamente. Carril 4: muestra de quistes sin tratar. Carriles 5 y 6: ADN quístico digerido con Bal 31, 15 y 30 minutos respectivamente. M: Marcadores de tamaño (S13).

(B). Southern blot del gel (Fig.10A) e hibridación con la sonda ribosómica 17/18S. Carriles 1, 2 y 3 : banda de hibridación positiva de aproximadamente 200 Kb.

2. CAMBIOS EN EL PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN-Ma TOTAL Y DE GENES RIBOSÓMICOS DURANTE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO EN *Colpoda inflata*

Al ser el enquistamiento de ciliados un proceso de diferenciación celular eucariota, y conociendo que la expresión de ciertos genes en procesos de diferenciación y el mantenimiento del estado diferenciado están relacionados con el nivel de metilación del ADN (Chomet, 1991; Doerfler et al., 1990; Holliday, 1989; Razin and Cedar, 1991), nos propusimos saber si cambios en el patrón de metilación del ADN-Ma de *Colpoda inflata* podrían, igualmente, estar involucrados en el enquistamiento de este ciliado.

2.1. Estudio con endonucleasas de restricción del ADN total vegetativo y quístico

En primer lugar, y al igual que ocurre en otros protozoos ciliados (Ammermann et al., 1981; Cummings et al., 1974; Gorovsky et al., 1973; Hattman et al., 1978; Pratt and Hattman, 1981; Rae and Spear, 1978;), queríamos saber si es también la adenina la principal base metilada en el ADN-Ma de *C. inflata*.

Para lo cual, ADN total aislado de células vegetativas y de quistes de resistencia maduros fue incubado durante 4 horas a 37°C con tres endonucleasas de restricción (isoesquizómeros): Dpn I, Sau 3AI y Nde II. Las tres endonucleasas reconocen y cortan la secuencia 5'-GATC-3'. La Dpn I corta entre la A y la T siempre y cuando la A este metilada. La Nde II corta delante de la G siempre que la A de la secuencia no este metilada y la Sau 3AI corta, igualmente, delante de la G pero este corte no está influenciado totalmente por la presencia de MeA (6-metiladenina) en la secuencia. Sin embargo, esta última enzima puede tener inhibida su capacidad restrictiva si la C del extremo 3' de la secuencia está metilada (Sambrook et al., 1989). Como se aprecia en la Fig.11A y B, las endonucleasas Dpn I y Nde II no cortan o cortan muy poco el ADN vegetativo y quístico (carriles 2 y 4 de la Fig.11A y carriles 3 y 4 de la Fig.11B respectivamente). Por el contrario, la enzima Sau 3AI corta completamente el ADN genómico de *C. inflata* vegetativo y quístico (carril 3 de la Fig.11A y carril 2 de la Fig.11B). Estos resultados muestran que la A de esta secuencia probablemente no está metilada o existen pocas de estas secuencias en la que la A esté metilada. Igualmente, los resultados mostrados por vegetativos y quistes de resistencia son básicamente similares, no observandose diferencias significativas en los patrones de restricción de ambos para las tres enzimas utilizadas (Fig.11A y B).

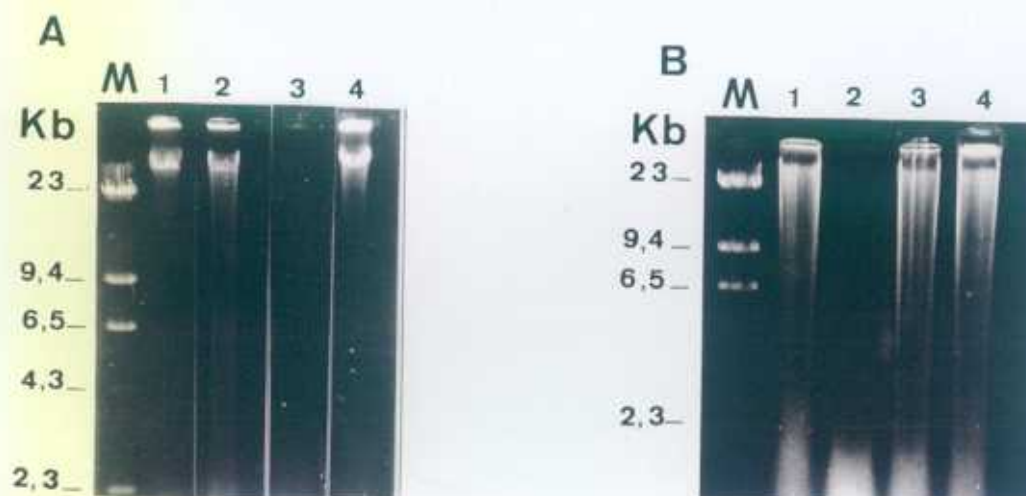


Fig.11: Electroforesis convencional de ADN total aislado de vegetativos y quistes de resistencia.

(A). Células vegetativas. Carril 1: ADN no tratado. Carril 2: ADN tratado con Dpn I. Carril 3: ADN tratado con Sau 3AI. Carril 4: ADN tratado con Nde II. M: Marcadores de tamaño (M-II).

(B). Quistes de resistencia. Carril 1: ADN no tratado. Carril 2: ADN tratado con Sau 3AI. Carril 3: ADN tratado con Dpn I. Carril 4: ADN tratado con Nde II. M: Marcadores de tamaño (M-II).

Otra posible base modificada en el macronúcleo de ciliados es la citosina (C), pudiéndose presentar en forma metilada como 5-metilcitosina (MeC). Para analizar este punto en el ADN-Ma de *Colpoda inflata* y estudiar los posibles cambios en el patrón de metilación de la citosina en vegetativos y quistes maduros, se usaron las siguientes endonucleasas de restricción: Msp I, Hpa II, Hha I y Bgl I (ver Materiales y Métodos, apartado 5.2.).

La endonucleasa Hha I que reconoce la secuencia 5'-GCGC-3', y corta entre la G y C del extremo 3' siempre y cuando las citosinas no se encuentren metiladas (Sambrook et al., 1989), mostró resultados distintos respecto a su capacidad de digerir ADN-Ma vegetativo y quístico (Fig.12, carriles 4 y 8). El ADN vegetativo no fue digerido mientras que el quístico fue completamente digerido, indicando que el ADN-Ma quístico se encuentra desmetilado en esta secuencia respecto al ADN-Ma vegetativo de *C. inflata*.

Los isoesquizómeros Msp I y Hpa II reconocen la misma secuencia 5'-CCGG-3', pero solo cortan dicha secuencia (entre las dos citosinas) cuando la citosina del extremo 5' no esta metilada, para Msp I, o cuando ambas citosinas no están metiladas para Hpa II (Sambrook et al., 1989). Es decir, la metilación de ambas citosinas o sólo una de ellas bloquea la acción restrictiva de ambas enzimas.

Los resultados (Fig.12, carriles 2, 3, 6 y 7) muestran que ambas enzimas cortan tanto el ADN-Ma vegetativo como quístico, aunque se detectan algunas ligeras diferencias respecto a la intensidad de la digestión. En el ADN-Ma vegetativo, la Hpa II origina fragmentos menores que la Msp I sobre el mismo ADN (Fig.12, carriles 2 y 3), lo que podría indicar la presencia de MeC en el extremo 5' en algunas secuencias 5'-CCGG-3' del ADN-Ma vegetativo. Muy diferentes son los resultados obtenidos con estas dos enzimas en el ADN-Ma quístico, donde la digestión es completa para ambas enzimas (Fig.12, carriles 6 y 7), indicando la total ausencia de MeC en esta secuencia.

Una cuarta endonucleasa de restricción utilizada en este estudio fue la Bgl I. Esta enzima reconoce la secuencia 5'-GCC(N₄)NGC-3' y corta la misma, entre el tercer y cuarto nucleótido comenzando por el extremo 3', siempre y cuando la C más cercana al extremo 5' no se encuentre metilada (Sambrook et al., 1989). Los resultados del tratamiento del ADN-Ma vegetativo y quístico con la Bgl I se muestran en la Fig.13. Como apreciamos en dicha electroforesis la Bgl I digiere tanto el ADN vegetativo como quístico de *C. inflata*, sin embargo apreciamos, de nuevo, diferencias en la intensidad de dicha digestión del vegetativo (Fig.13, carril 2) respecto del quístico (Fig.13, carril 4). La digestión del ADN quístico es superior a la del vegetativo, indicándonos, de nuevo, que la secuencia que reconoce la Bgl I, en estado

Fig. 12

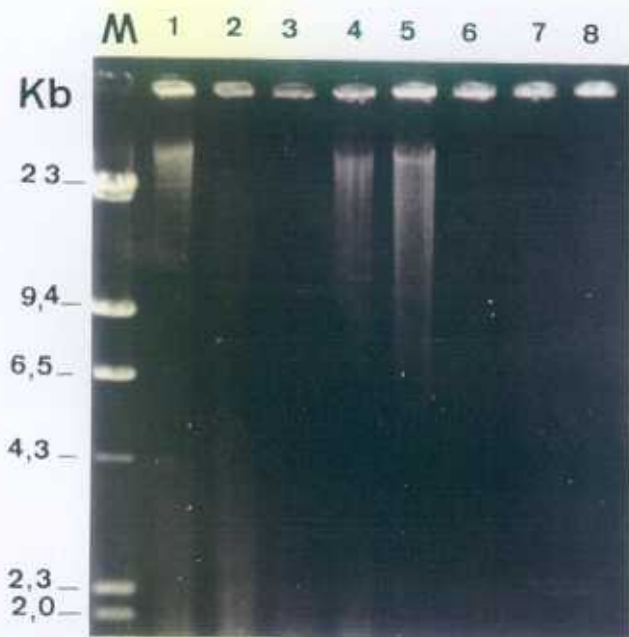


Fig. 13

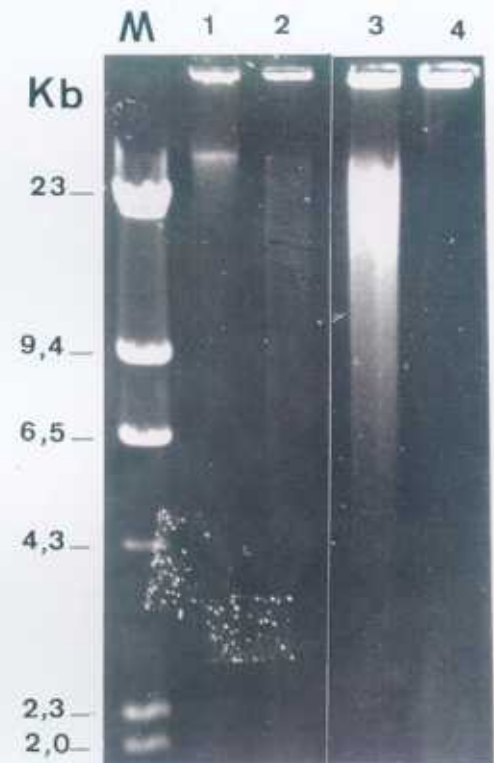


Fig.12: Electroforesis de ADN total aislado de vegetativos y quistes de resistencia tratados y no tratados con las endonucleasas de restricción Msp I, Hpa II y Hha I. Carril 1: ADN vegetativo no tratado. Carril 2: ADN vegetativo incubado con Msp I. Carril 3: ADN vegetativo tratado con Hpa II. Carril 4: ADN vegetativo tratado con Hha I. Carril 5: ADN quístico no tratado. Carril 6: ADN quístico tratado con Msp I. Carril 7: ADN quístico tratado con Hpa II. Carril 8: ADN quístico tratado con Hha I. M: Marcadores de tamaño (M-II).

Fig.13: Electroforesis de ADN total de vegetativos y quistes de resistencia de *Colpoda inflata*. Carril 1: ADN vegetativo no tratado con Bgl I. Carril 2: ADN vegetativo tratado con Bgl I. Carril 3: ADN quístico no tratado. Carril 4: ADN quístico tratado con Bgl I. M: Marcadores de tamaño (M-II).

metilado, es menos abundante en quistes de resistencia que en el vegetativo.

Como resumen del análisis de restricción realizado sobre ADN vegetativo y quístico, en la Tabla V, se muestran todos los resultados derivados de los tratamientos con dichas enzimas y la intensidad de digestión para cada caso.

Tabla V: Resumen de los resultados del análisis de restricción sobre ADN vegetativo y quístico de *Colpoda inflata*.

ADN-Ma ⁽¹⁾	Endonucleasas de restricción						
	Dpn I	Sau 3AI	Nde II	Msp I	Hpa II	HhaI	Bgl I
Vegetativo	-	+++	-	++	++	-	+
Quiste de resistencia	-	+++	-	+++	+++	+++	+++

(1)- El ADN analizado fué ADN total extraído y purificado de células vegetativas y quistes de resistencia de *Colpoda inflata*, pero desde un punto de vista cuantitativo consideramos que básicamente se trata de ADN-Ma. (-): No digestión. (+): Ligera digestión, con abundante rastro. (++) : Considerable digestión, con rastro de menor tamaño. (+++): Digestión completa, casi sin rastro apreciable.

2.2. Estudio sobre el gen ribosómico 17/18 S de *Colpoda inflata*

Al encontrar diferencias entre los patrones de restricción del ADN-Ma total de vegetativos y quistes de resistencia de *C. inflata*, respecto a la metilación de residuos de citosina, nos propusimos realizar un análisis similar sobre un gen macronuclear conocido, como el ribosómico 17/18S de este mismo ciliado.

Para este estudio se usaron las endonucleasas Msp I y Bgl I que digieren de manera diferente el ADN-Ma vegetativo y quístico de *C. inflata* (Tabla V). Una vez incubados ambos tipos de ADN con las endonucleasas, estos fueron fraccionados por electroforesis y transferidos a Nylon⁺ (Southern blot) e hibridados con la sonda (555 pb) del ADNr 17/18S de *C. inflata* marcada con digoxigenina por PCR (Materiales y Métodos, apartado 7.1.). En la Fig.14A y B se muestran los quimiolumigramas obtenidos de la hibridación sobre ADN-vegetativo (A) y ADN-quístico (B).

La hibridación de la sonda ribosómica con el ADN vegetativo en ambas digestiones (Msp I y Bgl I) rindió una única zona de hibridación positiva (Fig.14A, carriles 1 y 2) de aproximadamente 1.200 pb. Por el contrario, las mismas digestiones

con ADN quístico de *Colpoda inflata* rindieron fragmentos con hibridación positiva muy diferentes. La digestión con Msp I mostró tres bandas positivas (Fig.14B, carril 1) de aproximadamente 3.500, 1.900 y 1.500 pb, mientras que la digestión con Bgl I dos bandas de hibridación positiva (Fig.14B, carril 2) de aproximadamente 11.000 y 4.300 pb respectivamente. Igualmente, debemos destacar la existencia de diferencias cuantitativas entre las bandas de hibridación positiva obtenidas en el ADN quístico. De las tres bandas producidas por la digestión con la Msp I, la que muestra más cantidad de ADN por banda de hibridación positiva es la de 1.900 pb, en segundo lugar está la de 1.500 pb y en último lugar (banda más débil) la de mayor tamaño detectada (3.500 pb). Algo parecido ocurre en la digestión con la Bgl I, en donde la banda con mayor intensidad de hibridación es la de 4.300 pb y la de menor intensidad es la de 11.000 pb. Indicando así diferencias en la cantidad de cada uno de los fragmentos producidos en ambas digestiones. También es interesante indicar, para una posterior discusión, que la suma de los fragmentos menores, originados por la Msp I en el ADN quístico (Fig.14B, carril 1), de 1.900 y 1.500 pb es de 3.400 pb, cantidad similar a 3.500 pb del fragmento superior originado, por lo que los dos fragmentos menores probablemente se originen por escisión del primero.

Las diferencias encontradas entre la digestión del gen ribosómico 17/18S de *C. inflata* en el estado vegetativo y quístico (quiste maduro) posiblemente indican la presencia de metilación en residuos de citosina en algunas secuencias de las reconocidas por la Msp I y Bgl I.

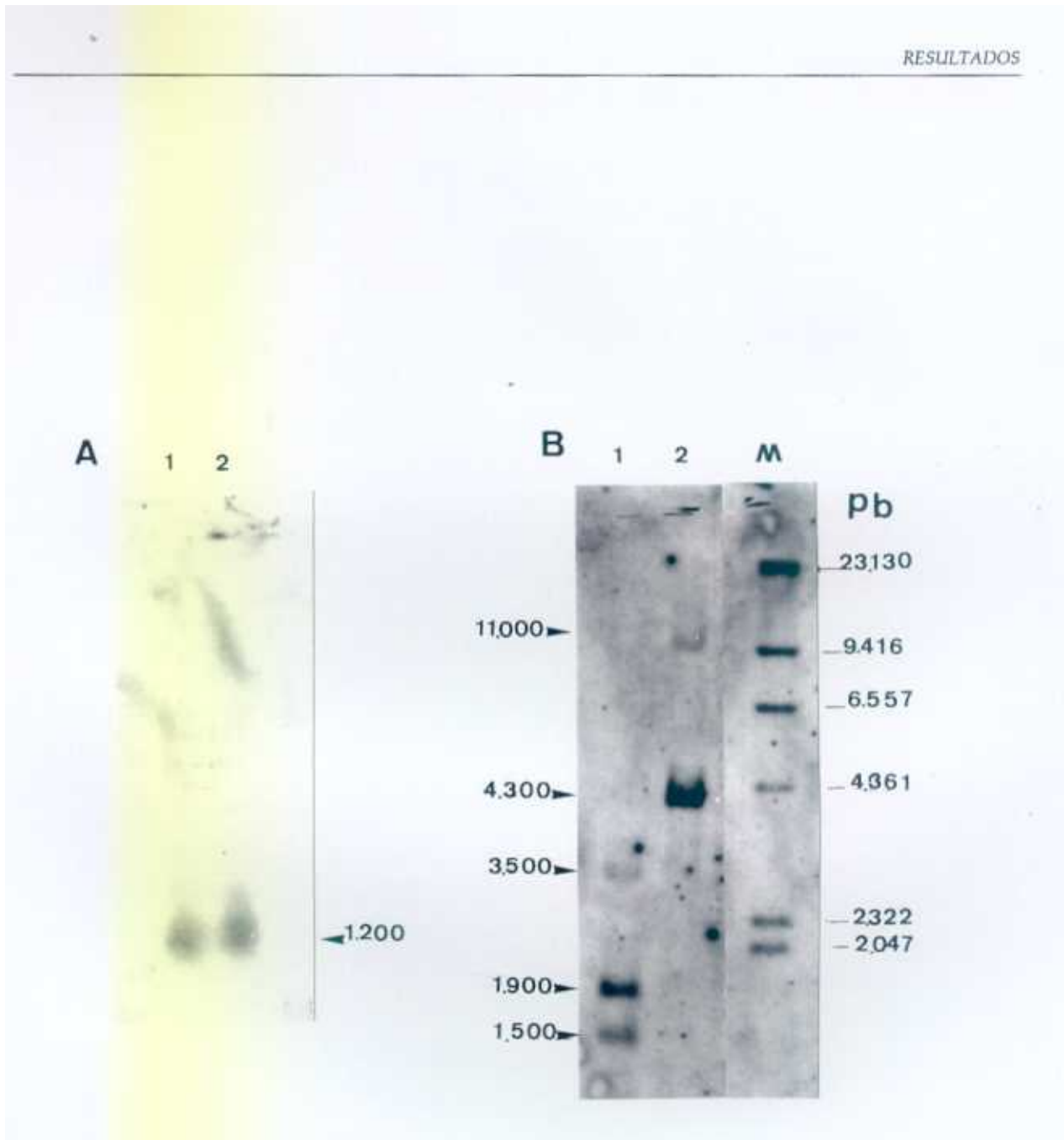


Fig.14: (A). Quimiolumigrama de muestras de ADN vegetativo digeridas con Msp I (carril 1) y Bgl I (carril 2). Se detecta hibridación positiva (flecha) en un fragmento de aproximadamente 1.200 pb.

(B). Quimiolumigrama de muestras de ADN quístico digeridas con Msp I (carril 1) y Bgl I (carril 2). Con flechas se indican las bandas de hibridación positiva para ambas muestras. M: Marcadores de tamaño (M-II-Dig.)

2.3. Experimentos con el agente desmetilante 5-azacitidina

El análisis de los patrones de restricción nos mostró diferencias en el grado de metilación, en residuos de citosina de determinadas secuencias, entre el ADN vegetativo y quístico de *Colpoda inflata*. Para confirmar o no estos datos moleculares se realizaron una serie de experimentos *in vivo* con uno de los más conocidos y utilizados agentes desmetilantes de ADN eucariota como es la 5-azacitidina (5-azaC) (Razin and Cedar, 1991). Este compuesto actúa como un análogo estructural de la citosina, incorporándose al ADN cuando este se replica. Una vez incorporado en el lugar de la citosina, su presencia inhibe la acción metilante de la ADN-metiltransferasa originando en un primer ciclo replicativo un ADN hemimetilado (manteniendo la hebra parental metilada) o completamente desmetilado en un segundo ciclo replicativo si sigue presente este análogo estructural en el medio (ver esquema de la Fig.2, en el apartado 4. de la Introducción).

2.3.1. Efecto de la 5-azacitidina sobre el crecimiento de *Colpoda inflata*

Una primera serie de experimentos con la 5-azaC se realizaron sobre poblaciones de *C. inflata* en crecimiento exponencial. El protocolo detallado de estos experimentos se ha descrito en el apartado 6.1 de la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la gráfica de la Fig.15. La 5-azaC, después de la incorporación en el ADN-Ma, induce enquistamiento aún en condiciones óptimas para el crecimiento vegetativo a concentraciones no menores de 400 μM . A ambas concentraciones utilizadas de 5-azaC (400 y 500 μM), se induce el proceso de enquistamiento en *C. inflata* y el rendimiento de formación de células prequísticas es proporcional a la concentración utilizada.

La población de células vegetativas en crecimiento sufrió dos exposiciones a la 5-azaC, una al comienzo del experimento (tiempo "cero") y otra a las 24 horas del inicio del mismo, ya que la 5-azaC para ejercer su efecto desmetilante ha de incorporarse al ADN replicándose, por lo que para mantener los niveles de 5-azaC necesarios para conseguir un ADN-Ma completamente desmetilado, era necesario añadir la droga una segunda vez. Como se aprecia en la gráfica de la Fig.15, en donde se representa el porcentaje de prequísticos que surgen a lo largo del tiempo, en la población de vegetativos control el porcentaje de aparición de prequísticos es prácticamente nulo, como sería de esperar. A las 24 horas, en las poblaciones tratadas con 400 y 500 μM de 5-azaC aparecen células prequísticas en porcentajes promedios

(media aritmética de tres recuentos independientes) de 13,6% de prequísticas (400 μM) y 16,3% (500 μM) respectivamente. A las 48 horas, y después de añadir nuevo 5-azaC junto con medio de cultivo (C0,25E1) para mantener así las condiciones óptimas de crecimiento, se detecta un considerable incremento de células prequísticas en las poblaciones tratadas con el agente desmetilante; un 54,7% (400 μM) y un 78,7% (500 μM) (Fig.15). Por tanto, en 24 horas, las poblaciones tratadas incrementaron los porcentajes de células prequísticas en un 41,1% (400 μM) y en un 62,4% (500 μM).

Igualmente, hay que indicar que el total de células en las poblaciones tratadas disminuye a lo largo del tiempo respecto a los totales presentes en los controles. Esta disminución representa, en porcentaje, un 47% (400 μM) y un 50% (500 μM) a las 24 horas respecto del control y un 67,8% (400 μM) ó un 90% (500 μM) a las 48 horas. Pero además, existe también una disminución del número total de células en cada muestra tratada a lo largo del tiempo. En porcentajes, esta pérdida representa un 49% en el caso de la población tratada con 400 μM de 5-azaC, entre el recuento realizado a las 24 horas y el realizado a las 48 horas. Una disminución más drástica es la experimentada por la muestra tratada con 500 μM del agente desmetilante, siendo de un 83,7% entre las dos medidas realizadas.

Entre las células que han permanecido viables no se detectó ninguna modificación o alteración estructural o morfológica detectables al microscopio óptico, ni en vegetativos ni en células prequísticas.

2.3.2. Efecto de la 5-azacitidina sobre el enquistamiento de *Colpoda inflata*

Ante los resultados obtenidos sobre poblaciones de vegetativos creciendo, y para determinar si la 5-azaC tiene algún efecto sobre el enquistamiento de este ciliado e igualmente, a modo de control de incorporación negativa, puesto que, teóricamente, para que la 5-azaC actúe desmetilando ha de incorporarse en el ADN replicándose y en el proceso de enquistamiento de *Colpoda inflata* no hay síntesis de ADN-Ma (Gutiérrez et al., 1990), se llevó a cabo un experimento similar al realizado sobre poblaciones creciendo, pero en una población inducida a enquistar. Se utilizó únicamente la concentración más alta, de las dos usadas sobre poblaciones creciendo; 500 μM . Los resultados se muestran en la gráfica de la Fig.16. Las poblaciones de vegetativos inducidos a enquistar (tiempo "cero"); control y tratado (500 μM) con la droga desmetilante muestran resultados muy similares, no existiendo ni aceleración ni inhibición del proceso de enquistamiento.

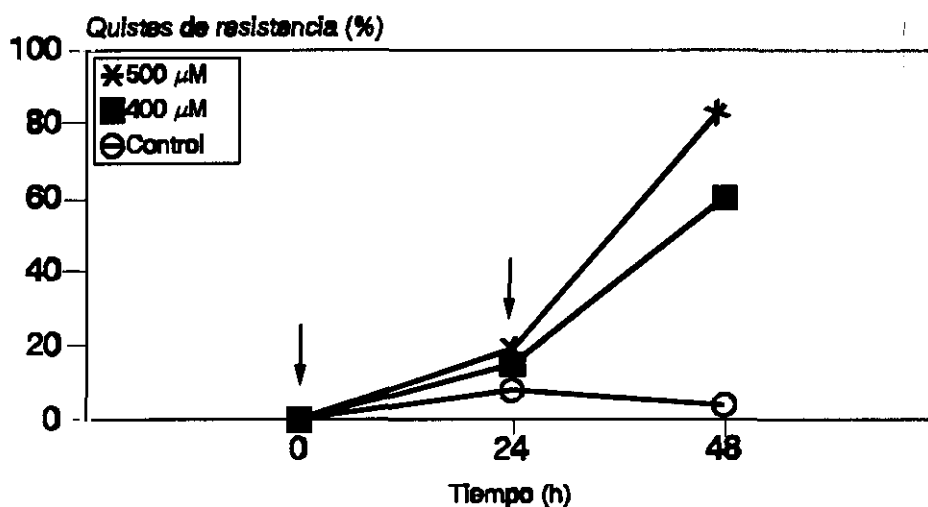


Fig.15: Gráfica que representa el efecto de la 5-azaC sobre células vegetativas en crecimiento. Se representan los porcentajes promedios, obtenidos de tres recuentos independientes de las células prequísticas (formando quistes de resistencia) de *Colpoda inflata*, frente al tiempo (horas). Las flechas indican los momentos en que se adiciona la 5-azaC disuelta en medio C0,25E1 al cultivo de vegetativos.

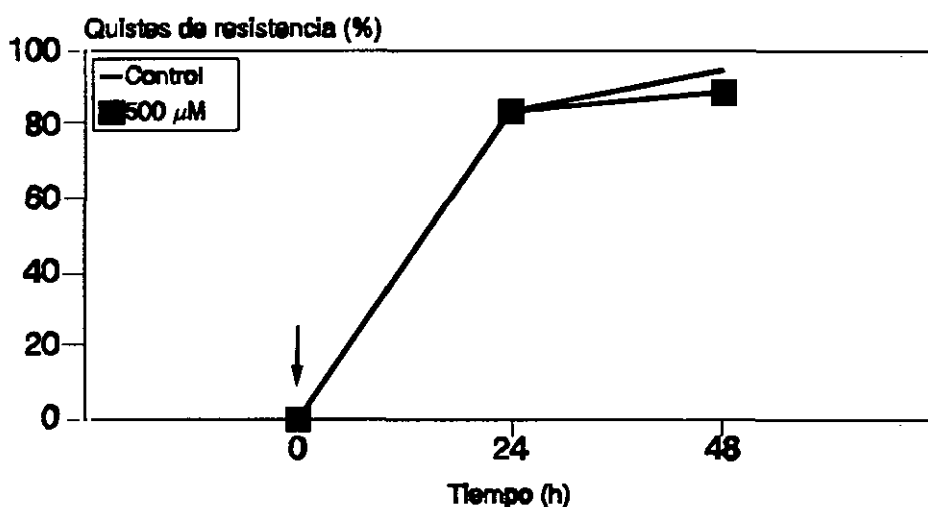


Fig.16: Gráfica que representa la cinética del proceso de enquistamiento bajo la presencia de 5-azaC (500 µM). Se muestran los porcentajes medios, obtenidos a partir de tres recuentos independientes, de las células prequísticas frente al tiempo (horas). La flecha indica el momento de la adición de la droga, disuelta en medio de enquistamiento.

A las 24 horas, se consigue unos porcentajes medios (media aritmética de tres recuentos independientes) de 85,8% para el control y de 86,2% para el tratado con la 5-azaC (500 μ M). Y a las 48 horas, los porcentajes de células prequísticas son de aproximadamente 95,6% para el control enquistándose y de 89,6% para el sometido a la droga. En ninguno de estos valores se aprecia diferencia significativa entre controles y tratados con la 5-azaC. Al contrario de lo sucedido en poblaciones creciendo, no se detectó una disminución significativa del total de células en las poblaciones tratadas respecto del control a lo largo del tiempo.

La 5-azaC no afectó a la cinética del proceso de enquistamiento, ni se observó, por microscopía óptica, ninguna diferencia morfológica entre los prequísticos del control y los tratados.

3. ESTUDIO MICROSCÓPICO DEL SISTEMA NUCLEAR DE *Colpoda inflata* DURANTE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO

El sistema nuclear de *Colpoda inflata* se compone de un macronúcleo y un micronúcleo, tanto en el estado vegetativo como quístico. La masa macronuclear vegetativa es esférica o elipsoidal, mientras el micronúcleo puede ser esférico o lenticular (Martín-González et al., 1991).

En este apartado, presentamos los resultados obtenidos del estudio del comportamiento nuclear durante el proceso de enquistamiento de *C. inflata* y de la cromatina macronuclear, usando diferentes métodos de microscopía óptica y electrónica.

3.1. Microscopía confocal.

Por microscopía confocal se puede estudiar imágenes tridimensionales producto de la integración de los diferentes planos de enfoque de dicho objeto, de esta manera esta metodología microscópica nos ofrece imágenes más reales y completas de la estructura u orgánulo que se desea estudiar (Wilson, 1990). Hemos aplicado esta técnica al estudio de la estructura nuclear de los dos estados diferenciados extremos; el vegetativo y el quiste maduro de *C. inflata*.

El fluorocromo utilizado ha sido el yoduro de propidio (YP), el cual se intercala en la doble hélice del ADN originando una fluorescencia roja cuando se excita con luz azul ($\lambda = 495$ nm), siendo esta proporcional al contenido en ácido nucleico bicatenario

(Carter, 1990). El protocolo utilizado para la tinción con YP en células vegetativas y quísticas, se muestra en el apartado 10.3 de la sección de Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en las micrografías de la Fig.17. El macronúcleo vegetativo (Fig.17A1) aparece con una cromatina distribuida en regiones más condensadas de tamaño muy variable incluidas en una región carioplásmica en donde la cromatina está más difusa, incluyendo espacios en donde hay ausencia de ADNbc (sin fluorocromo YP). A su vez, las regiones en donde la cromatina está más condensada, están organizadas por pequeños cuerpos cromatínicos de intensidad fluorescente variable (Fig.17A2).

De acuerdo con la escala que aparece en la micrografía, el macronúcleo vegetativo presenta un diámetro mayor de aproximadamente 11,6 μm y uno menor de 9,1 μm .

Muy diferente es el aspecto que muestra el macronúcleo en un quiste de resistencia maduro. Como se muestra en la micrografía (Fig.17B), la fluorescencia mostrada por el YP es homogénea en todo el cuerpo macronuclear, no existiendo zonas de menor intensidad o de no fluorescencia como se observaba en el macronúcleo vegetativo (Fig.17A). Igualmente, y de acuerdo con la escala de la micrografía, el macronúcleo quístico tiene un diámetro mayor de 8,6 μm y uno menor de 6,3 μm aproximadamente. En la micrografía de la Fig.17B se observa también el micronúcleo, de forma elipsoidal, junto al macronúcleo. La fluorescencia del mismo es completamente uniforme con un diámetro mayor de 3,3 μm y un diámetro menor de 1,3 μm aproximadamente.

Considerando que la forma del macronúcleo vegetativo y quístico es más o menos elipsoidal y teniendo en cuenta los valores obtenidos de los diámetros o ejes mayor y menor de ese elipsoide, podemos realizar un cálculo aproximado de los volúmenes de dichos cuerpos elipsoidales según la ecuación $V = 4\pi/3 \times a \times b^2$, donde a y b son los semiejes mayor y menor respectivamente. Los volúmenes resultantes son de 492,2 μm^3 para el macronúcleo vegetativo y de 169,4 μm^3 para el macronúcleo quístico. De ello se deduce que existe una pérdida de volumen macronuclear durante el proceso de enquistamiento de aproximadamente un 65%, respecto del volumen original vegetativo.

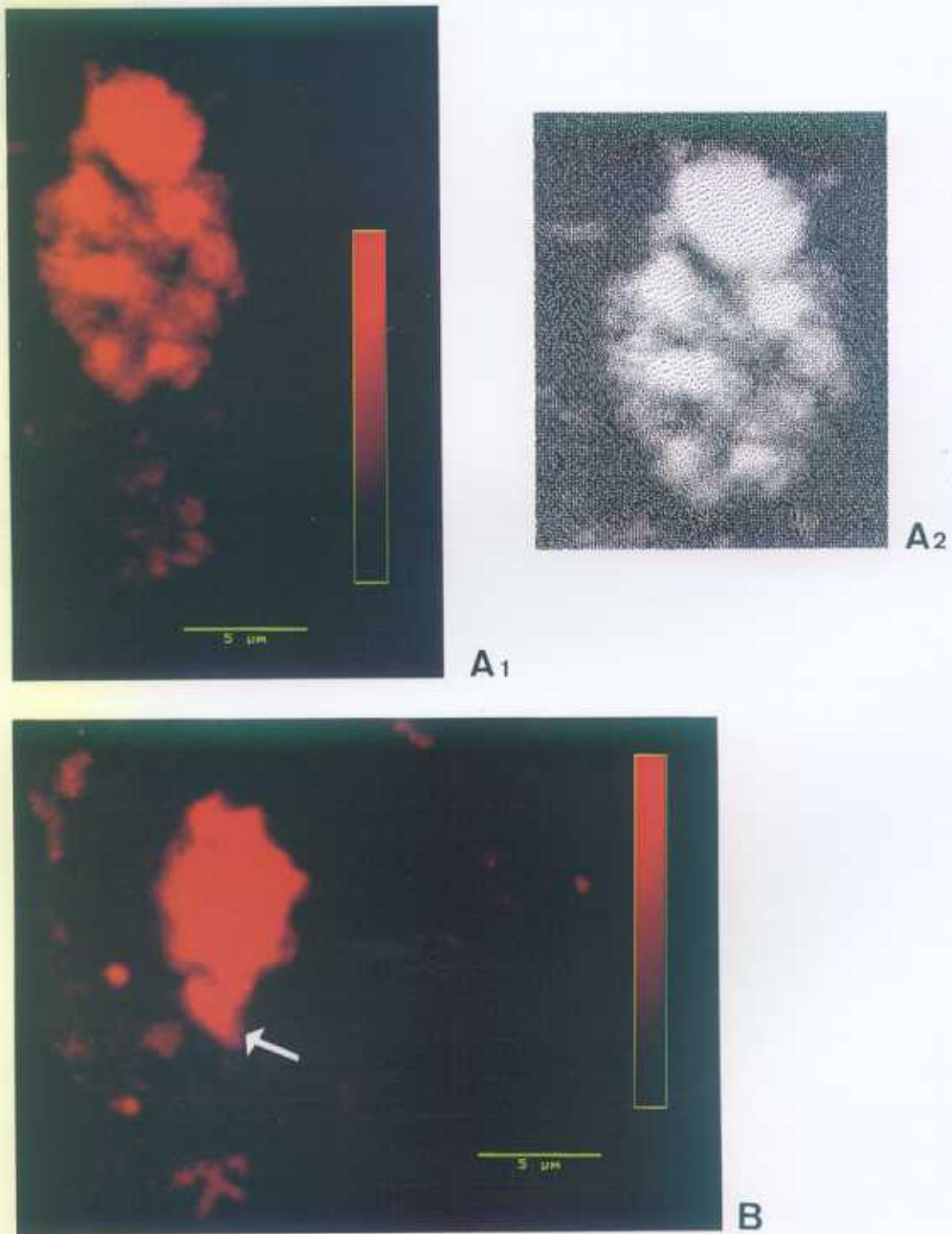


Fig.17: Micrografías obtenidas por microscopía confocal tras tinción con YP del sistema nuclear vegetativo y quístico de *Colpoda inflata*. **A1:** Imagen confocal del macronúcleo vegetativo. **A2:** Imagen obtenida por ordenador de una de las regiones cromatínicas de la micrografía A1. **B:** Sistema nuclear quístico, la flecha indica la presencia del micronúcleo. En la misma micrografía se muestra la escala de tamaño (5 µm) y la escala de intensidad de fluorescencia roja del YP.

3.2. Microscopía electrónica de transmisión

Haciendo uso de los conocimientos ya adquiridos sobre la cinética de enquistamiento de *Colpoda inflata*, la cual se estudió utilizando como marcador del nivel de enquistamiento un antisuero contra pared quística (Benítez et al., 1994), hemos estudiado los cambios ultraestructurales del sistema nuclear, en este ciliado, durante el proceso de enquistamiento.

En el estado vegetativo activo el macronúcleo ovoide está constituido por una cromatina organizada en numerosos pequeños cuerpos cromatínicos altamente osmiófilos que se encuentran incluidos en un carioplasma fibrilar y/o granular mucho menos electrodensos (Fig.18). El macronúcleo vegetativo de *C. inflata* también presenta numerosas masas nucleolares de aspecto homogéneo y agrupadas originando un nucleolo compuesto que ocupa gran parte del recinto macronuclear. Muchas de estas masas nucleolares llevan asociado un pequeño cuerpo cromatínico más electrodensos que constituye el llamado organizador nucleolar (Fig.18A).

El micronúcleo de la célula vegetativa es elipsoidal o lenticular con cuerpos cromatínicos asociados en forma de estructura continua. Generalmente, y como se muestra en la micrografía electrónica de la Fig.18, el micronúcleo se encuentra localizado en una oquedad o entrante del macronúcleo, sin que exista fusión de membranas nucleares entre ambos sistemas.

Una vez inducido el proceso de enquistamiento, ya en las células prequísticas tempranas (20 horas después de la inducción), el micronúcleo se separa del macronúcleo como se puede observar en la micrografía de la Fig.19A y comienzan a fusionarse las masas nucleolares originando unas masas nucleolares mayores y más irregulares (Figs.19A y B). Los pequeños cuerpos cromatínicos que caracterizan la cromatina macronuclear vegetativa son ligeramente mayores en los prequísticos de 20 horas. Esta fusión paulatina de masas nucleolares durante las primeras etapas del enquistamiento de *C. inflata*, se hace más patente en estadios prequísticos más avanzados como se muestra en la micrografía de la Fig.20, en donde se observa un macronúcleo prequístico de 30 horas con tres grandes masas nucleolares fruto de la fusión de las numerosas masas nucleolares características del estado vegetativo (Fig.18).

Entre las 25 y 36 horas del proceso de enquistamiento de *C. inflata* tiene lugar la extrusión macronuclear, la cual consiste en la pérdida de aproximadamente 1/3 del volumen del macronúcleo por la formación del denominado cuerpo de extrusión. En la micrografía de la Fig.21, observamos un prequístico de aproximadamente 36 horas en el que ya se aprecia una pared quística bastante formada, un corte, probablemente

transversal del macronúcleo que presenta un contorno bastante irregular, junto con lo que posiblemente es un cuerpo de extrusión (Fig.21, flecha).

En la Fig.22, se muestra una micrografía de un prequístico de 36 horas en donde se observa un corte igualmente transversal del macronúcleo y micronúcleo. El micronúcleo presenta la típica forma lenticular, que normalmente tiene en el quiste maduro y, de nuevo, aparece cercano a la superficie macronuclear. El macronúcleo presenta una única masa nucleolar, fruto de la fusión de todas las masas nucleolares del nucleolo compuesto que tiene este ciliado. Igualmente, el citoplasma se muestra bastante deshidratado con acinamiento de organelas y material membranoso (Fig.22).

Finalmente, en la micrografía de la Fig.23 se contempla el sistema nuclear de un quiste maduro (2 meses). Probablemente se trata de un corte transversal anterior en donde se observa el micronúcleo acomodado, de nuevo, en una oquedad del macronúcleo, al igual que ocurría en la célula vegetativa (Fig.18). La cromatina de ambos núcleos es muy similar, mostrando una típica estructura condensada. También se puede destacar la elevada deshidratación citoplasmática del quiste maduro, con empaquetamiento mitocondrial, residuos de autofagosomas y numerosos residuos membranosos.

3.3. Microscopía electrónica de transmisión de cromatina aislada de *Colpoda inflata*

Una de las técnicas de microscopía electrónica que más han ayudado al análisis macromolecular de la cromatina eucariota ha sido la que podemos denominar como "dispersión cromatínica" (chromatin spreading). Mediante esta técnica microscópica se ha podido dilucidar la estructura macromolecular y la organización de la cromatina transcripcionalmente activa o inactiva de diversos sistemas vivos (Miller and Beatty, 1969; Trendelenburg and Puvion-Dutilleul, 1987).

Para completar el estudio realizado sobre cortes ultrafinos de los cambios nucleares experimentados durante el enquistamiento de *Colpoda inflata*, hemos aplicado dicha técnica sobre células en fase vegetativa, prequísticos y quistes de resistencia maduros.

3.3.1. Cromatina de células vegetativas

Una vez preparadas las células, según el protocolo descrito en el apartado 9.2.1. de Materiales y Métodos, se procedió a la dispersión de la cromatina, básicamente macronuclear, tanto a partir del material nuclear aislado (Fig.24) como a partir de

células completas, en presencia de tampón borato 0,1 mM (pH 9) durante 20 minutos. En la micrografía de la Fig.25A se observa una visión general del aspecto que muestra una masa macronuclear vegetativa después de realizar la dispersión cromatínica. Este cuerpo macronuclear se deshace en una red o malla de fibras entrelazadas, que se agrupan formando cordones polinémicos (Fig.25B). Estos cordones polinémicos pueden estar constituidos por numerosas fibras de 50-70 nm de espesor de configuración supranucleosomal.

A veces, entre las fibras o cordones fibrilares, aparecen cuerpos poligonales, generalmente de seis caras (hexagonales), de cromatina condensada (Fig.26). Estas formas no son muy abundantes en el estado vegetativo, presentando tamaños muy diversos. Además, en esta misma micrografía de la Fig.26, podemos apreciar dos formas de dispersión de las fibras que componen los cordones de cromatina macronuclear de *C. inflata* en estado vegetativo; haces de fibras lineales que divergen a lo largo de diferentes puntos que forman los cordones polinémicos y haces en donde las fibras no se dispersan linealmente sino de forma festoneada (Fig.26, flecha).

Cómo se muestra en la micrografía de la Fig.27, la cromatina completamente dispersada se muestra, como la típica cromatina eucariota, constituida por fibras uniformemente organizadas en cadenas nucleosomales. Aunque la cromatina de la célula vegetativa es una cromatina transcripcionalmente activa, no hemos podido detectar o identificar complejos de transcripción entre las micrografías obtenidas. En algunas de las micrografías analizadas podríamos interpretar las divergencias entre fibras como horquillas de replicación, pero esta consideración debería de dilucidarse aplicando algún método de marcaje.

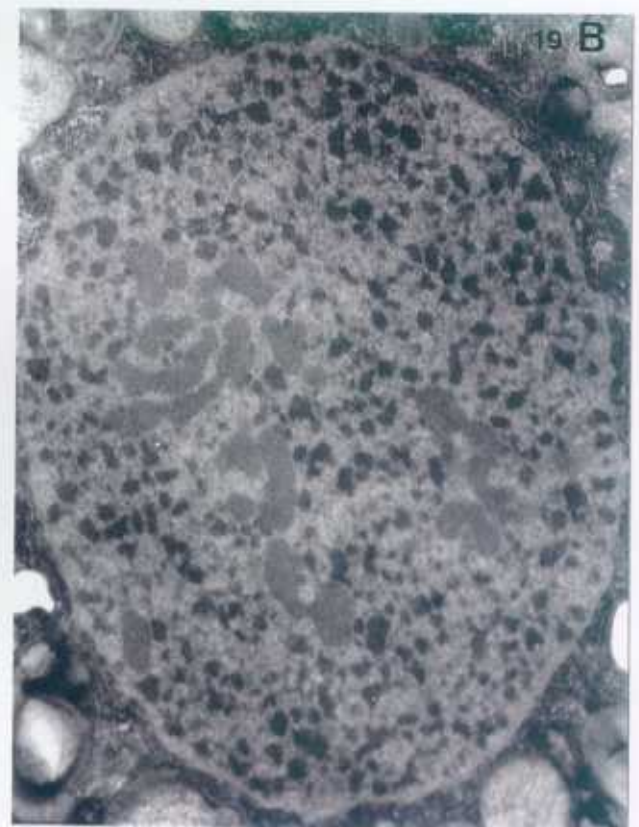
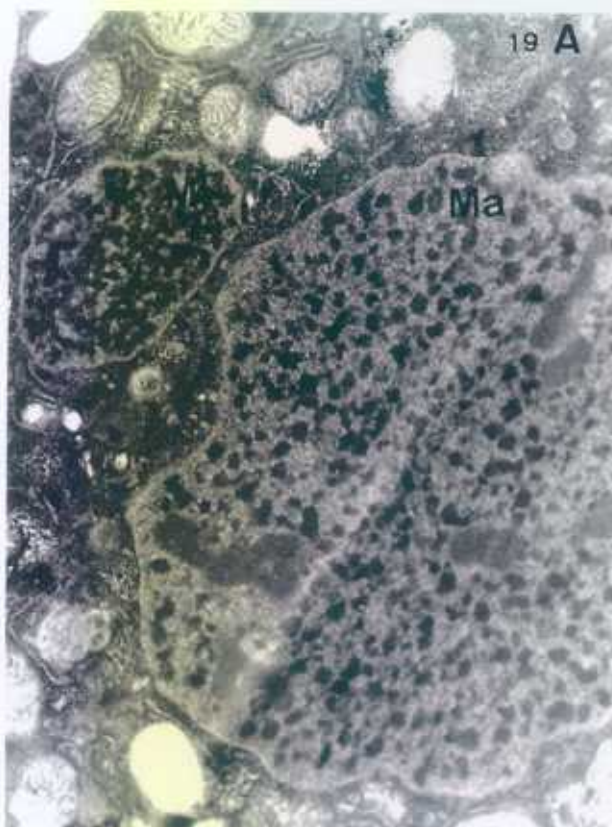
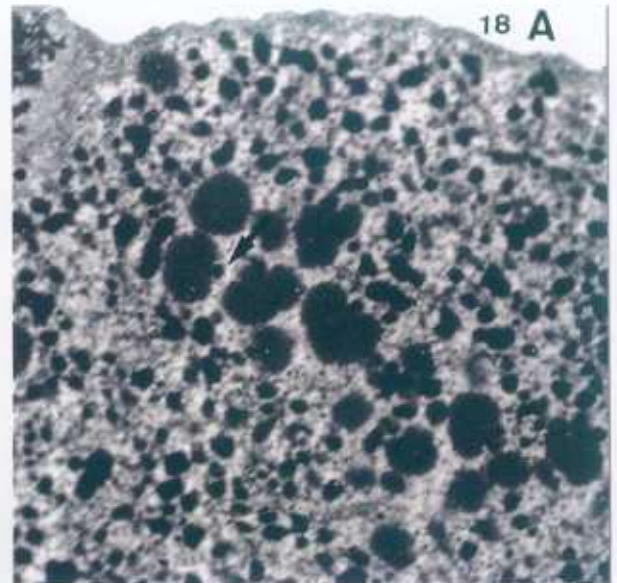
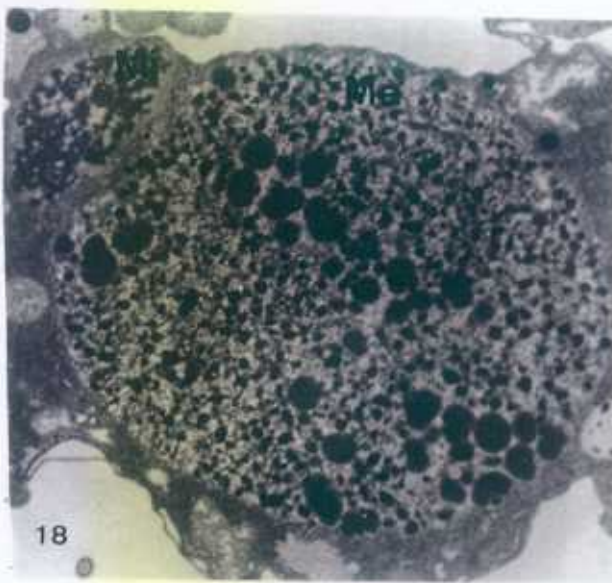


Fig.18: Micrografía por microscopía electrónica de transmisión del sistema nuclear vegetativo de *Colpoda inflata*. Ma= Macronúcleo, Mi= Micronúcleo (19.121 x). **18A:** Detalle de la micrografía de la Fig.18 de masas nucleolares con su cuerpo cromatínico asociado (flecha) (38.250 x)

Fig.19: Micrografías de células prequísticas de 20 horas. En ambas micrografías (A y B) se observa la paulatina fusión de las masas nucleolares. Igualmente, se observa la separación del micronúcleo (Mi) respecto del macronúcleo (Ma)(Fig.19A) (20.625 x para ambas figuras).

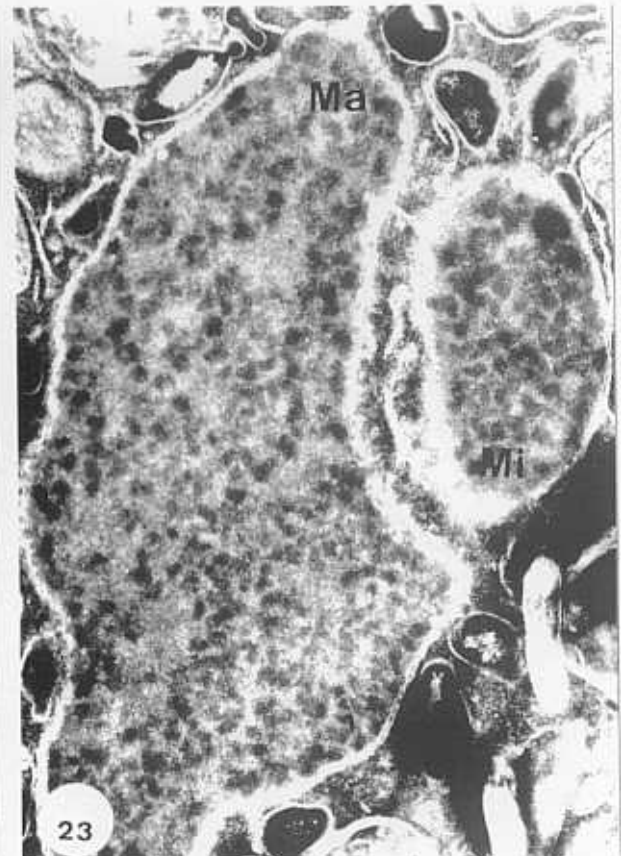
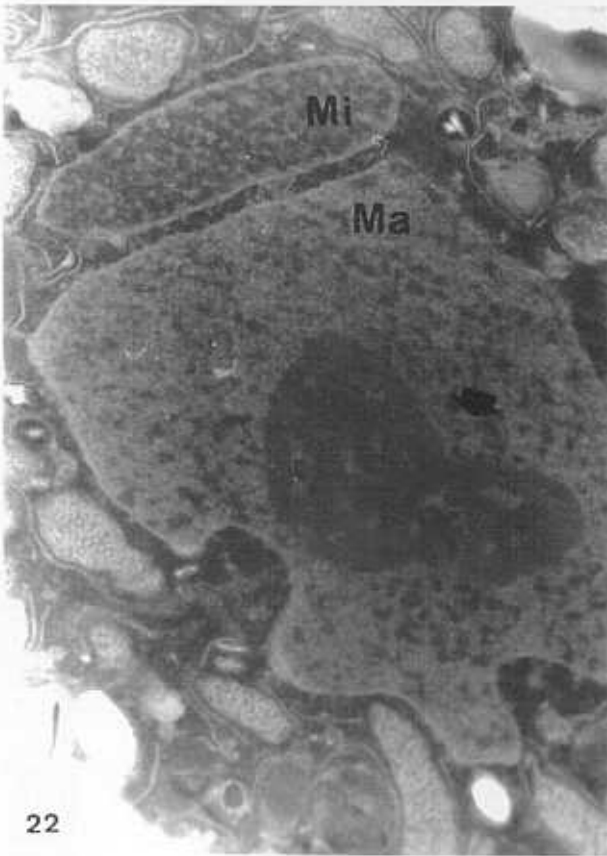
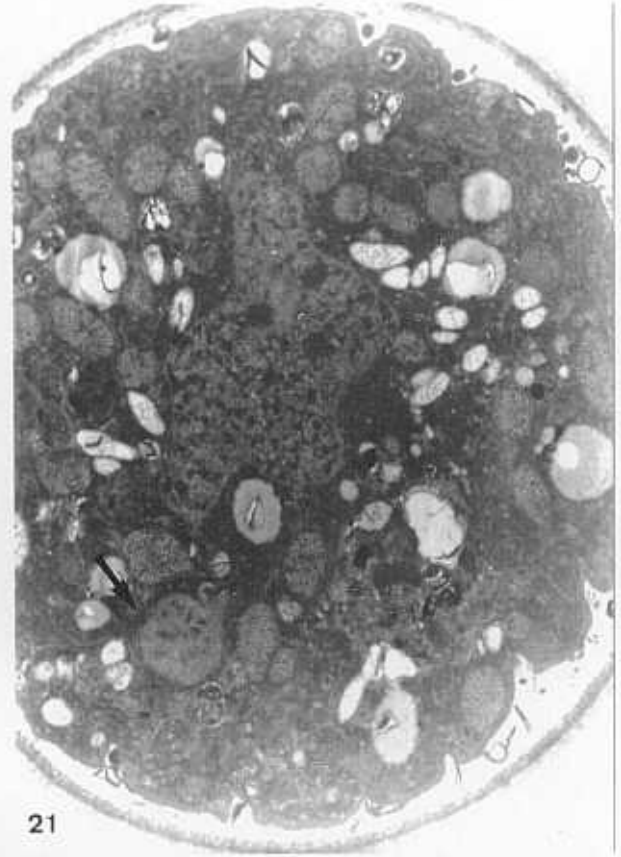


Fig.20: Micrografía de macronúcleo prequístico de 30 horas. Las masas nucleolares se encuentran fusionadas en tres únicas masas nucleolares (flechas) (27.500 x)

Fig.21: Micrografía de una célula prequística de 36 horas. La flecha indica la presencia de un posible cuerpo de extrusión. (14.850 x)

Fig.22: Detalle del sistema nuclear de un prequístico de 36 horas. Las masas nucleolares aparecen fusionadas en una única masa nucleolar (flecha). El micronúcleo (Mi) adquiere la forma lenticular. Ma= macronúcleo. (24.750 x).

Fig.23: Micrografía de un quiste de resistencia maduro (2 meses). Las cromatinas macronuclear y micronuclear presentan una estructura similar. Mi= micronúcleo, Ma= macronúcleo. El citoplasma está altamente deshidratado mostrando empaquetamiento mitocondrial y residuos de autofagosomas. (28.500 x).

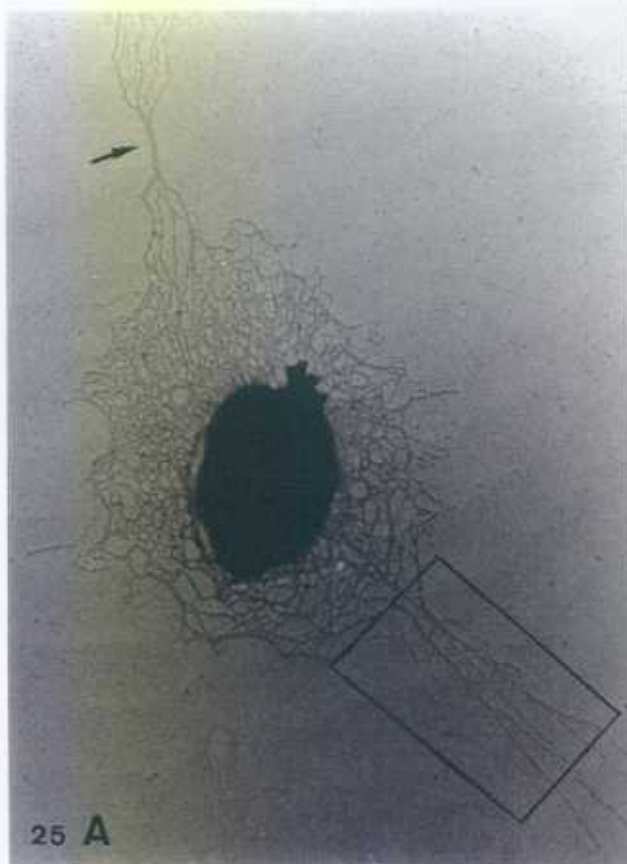


Fig.24:Micrografía del sistema nuclear de *Colpoda inflata* por video microscopio de contraste de fases. Ma= macronúcleo. Mi= micronúcleo.

Fig.25: Cromatina macronuclear aislada de vegetativos de *Colpoda inflata*, después de la incubación en tampón borato 0,1 mM (pH 9) durante 20 minutos. **A:** Visión general de una masa macronuclear con la cromatina dispersa (26.000 x). La flecha indica un cordón supranucleosomal que se compone de múltiples fibras entrelazadas. **B:** Ampliación de la región encuadrada en A (versión negativa para incrementar el contraste).

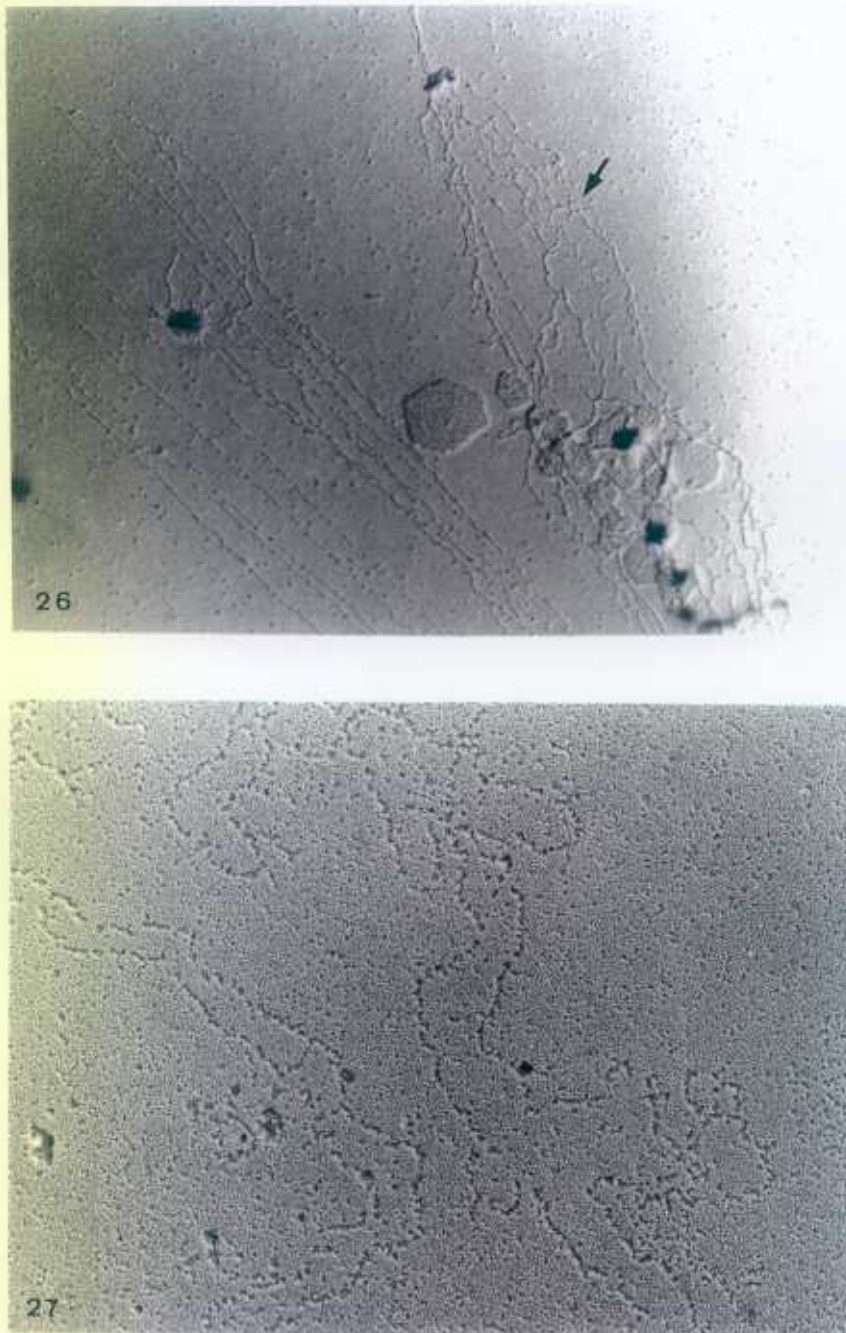


Fig.26: Cromatina macronuclear aislada de vegetativos, tras someter la muestra al mismo tratamiento que en la Fig.25. Se observan cuerpos poligonales de cromatina condensada entre los haces de fibras. Flecha: fibras festoneadas. (31.250 x)

Fig.27: Cromatina macronuclear vegetativa completamente dispersa (mismo tratamiento que las anteriores). Fibras organizadas en cadenas nucleosomales. (60.000 x).

3.3.2. Cromatina de células prequísticas y quistes maduros

Aplicando la misma metodología a los quistes de resistencia maduros (2 meses) de *Colpoda inflata*, se obtuvieron los resultados que se muestran en las micrografías de la Fig.28. La mayor parte de la cromatina macronuclear quística está constituida por cuerpos poligonales, semejantes a los observados en la cromatina vegetativa, pero en mucha mayor cantidad (Fig.28A). La superficie media, ya que el tamaño es muy variable, de estas láminas poligonales de cromatina es de $0,2-0,04 \mu\text{m}^2$. La mayoría de estas formas poligonales son hexagonales, de lados desiguales. Estos hexágonos de cromatina están formados por fibras de organización nucleosomal empaquetadas o compactadas (Fig.28B). Por lo tanto, estas estructuras poligonales son el resultado de una organización supranucleosomal fruto de la agregación de las fibras nucleosomales.

Con la finalidad de intentar disgregar el contenido cromatínico de estas estructuras, se incubaron los macronúcleos quísticos en tampón borato $0,1 \text{ mM}$ (pH 9) durante 2 horas, en lugar de los 20 minutos utilizados en los vegetativos. Los resultados no se diferenciaron de los obtenidos tras la incubación estandar (20 minutos), apareciendo, de nuevo, los cuerpos o láminas poligonales. Se consiguió una parcial disgregación de estas configuraciones cromatínicas, después de someterlos, durante una noche, a la acción del tampón borato $0,1 \text{ mM}$ (pH 9). Estos resultados se aprecian en la micrografía de la Fig.29, en donde las flechas señalan la presencia de fibras extendidas que surgen del cuerpo o agregado cromatínico.

Este mismo estudio llevado a cabo sobre células prequísticas, nos reveló la presencia de lo que podríamos considerar estados intermedios de agregación cromatínica. En la micrografía de la Fig.30, se muestra una preparación de cromatina macronuclear prequística (células prequísticas de 84 horas), tratada de la misma forma que los vegetativos (incubación estandar), en donde se aprecia (indicados por flechas) pequeños grumos o agregaciones irregulares de cromatina que podrían constituir los centros iniciales de agregación a partir de los cuales se originarán los cuerpos poligonales quísticos. Estas observaciones pueden servirnos para elaborar un posible modelo que explique la formación de los cuerpos poligonales (hexagonales) característicos de la cromatina quística, cosa que haremos en el apartado correspondiente de la Discusión.

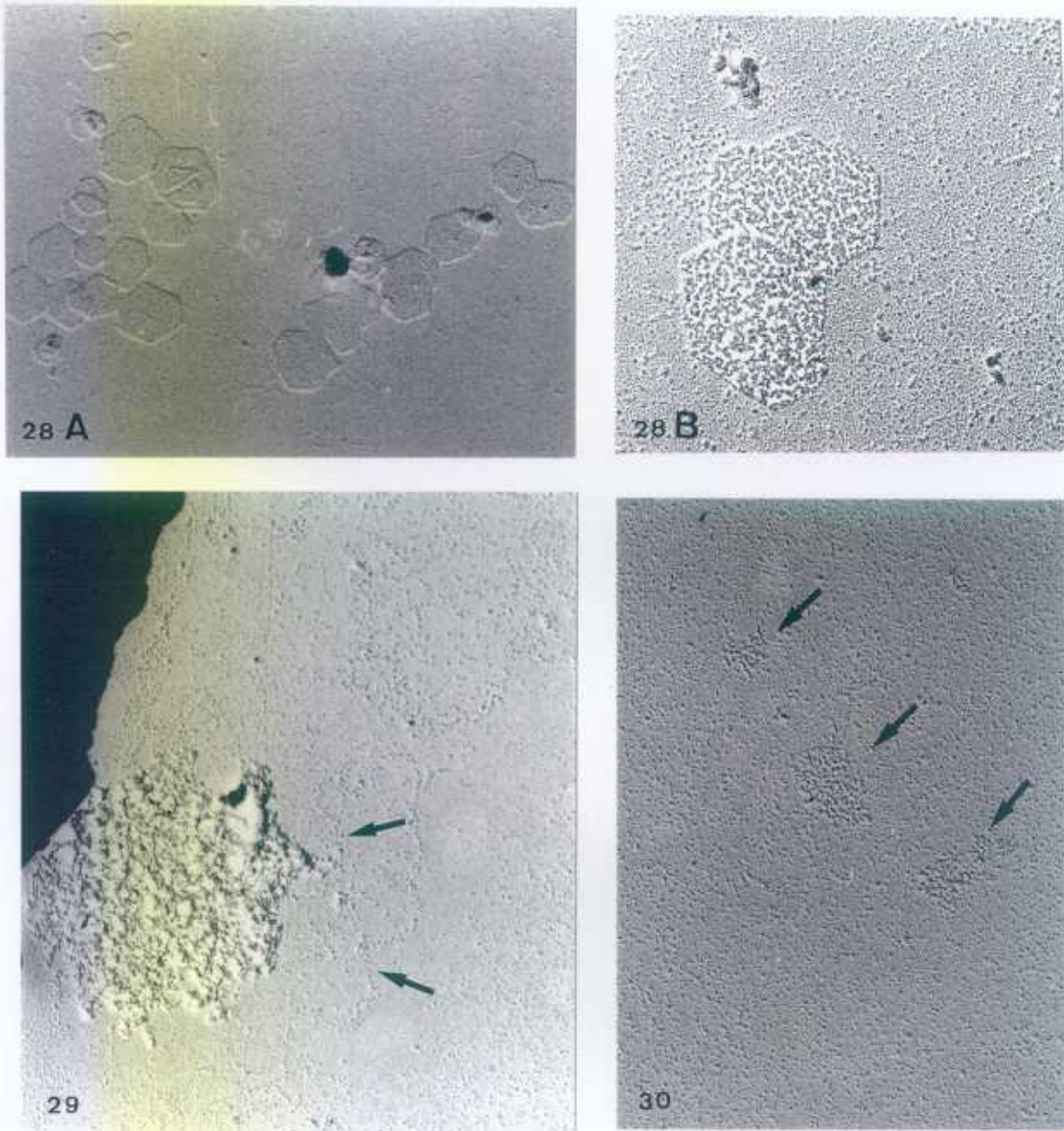


Fig.28: Cromatina macronuclear quística de *Colpoda inflata* (mismo tratamiento que en las anteriores micrografías). **A:** Se observa un total de 22 cuerpos poligonales, la mayoría hexagonales (28.000 x). **B:** Visión ampliada de dos cuerpos hexagonales solapados, se observa la organización supranucleosomal de los mismos.

Fig.29: Cromatina macronuclear quística sometida a una incubación prolongada (durante toda la noche) en tampón borato 0,1 mM (pH 9). Observamos la disgregación de los agregados cromatínicos en fibras nucleosomales extendidas (flechas). (31.250 x).

Fig.30: Cromatina macronuclear de prequísticos de 84 horas. Las flechas señalan la presencia de agregados cromatínicos irregulares que pueden ser los centros o núcleos de formación de los cuerpos poligonales quísticos. (31.250 x).

4. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL CONTENIDO DE ADN TOTAL DE POBLACIONES DE CÉLULAS VEGETATIVAS Y QUISTES MADUROS DE *Colpoda inflata*

Una de las técnicas más utilizadas para estudiar el contenido de ADN en poblaciones microbianas es la citometría de flujo usando fluorocromos específicos para ADN (Ormerod, 1990). Hemos aplicado esta tecnología al estudio de las variaciones en el contenido de ADN total (básicamente macronuclear) durante el enquistamiento de *Colpoda inflata*, empleando las poblaciones celulares diferenciadas de dicho proceso; vegetativos y quistes maduros.

El fluorocromo utilizado fue el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) aplicando el protocolo especificado en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos.

Las mediciones se realizaron sobre poblaciones de vegetativos y de quistes maduros (2 meses), obteniéndose los histogramas de amplificación lineal que se muestran en la Fig.31. Estos histogramas representan la distribución de frecuencias de contenidos de ADN total en las poblaciones de vegetativos (Fig.31A) y quistes de resistencia (Fig.31B).

El histograma de la Fig.31A, muestra la distribución de contenido de ADN total (en el eje horizontal o abscisa) frente al número de células vegetativas registradas (en el eje vertical u ordenada). En este histograma se aprecia una distribución bastante homogénea de las frecuencias de los contenidos de ADN total, con una media de fluorescencia de ADN (307) que coincide con el valor de la mediana de la curva (307), indicando una alta simetría de la distribución de frecuencias de la población de células vegetativas de *C. inflata*. El pequeño pico que aparece en la izquierda, solapado con los valores menores de la curva principal, probablemente corresponde a elementos contaminantes de muy bajo contenido en ADN o de fluorescencia de DAPI (Fig.31A).

El histograma de la Fig.31B nos muestra la distribución de contenido de ADN total frente al número de quistes maduros registrados. Esta distribución ya no es tan homogénea y simétrica como la mostrada en el histograma de vegetativos (Fig.31A), el valor de la media de fluorescencia (162) no coincide con el valor de la mediana (152), indicándonos cierta asimetría en la distribución de frecuencias en la población quística de *C. inflata*. Al igual que en el histograma de vegetativos, aparece un pequeño pico de baja intensidad fluorescente, que asumimos debido a contaminantes de la muestra (Fig.31B).

Histogramas de Citometría de Flujo (ADN).

VEGETATIVOS $\xrightarrow{-47\%}$ QUISTES

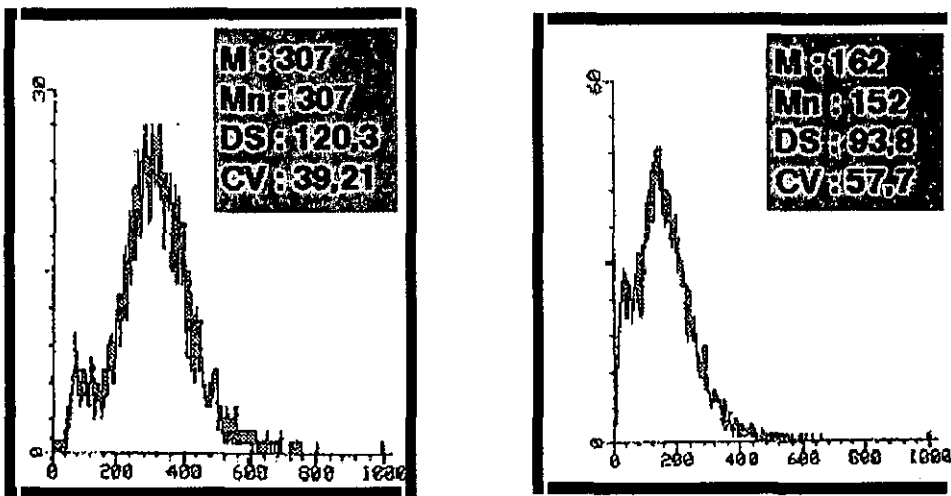


Fig.31: Histogramas de las distribuciones de frecuencias de los contenidos de ADN total obtenidos por citometría de flujo, tras tinción con DAPI, de poblaciones de células vegetativas y quistes maduros de *Colpoda inflata*. El eje horizontal indica el contenido de ADN y el vertical muestra el número de células. **A:** Histograma de una población de células vegetativas. **B:** Histograma de una población de quistes maduros. En ambos se incluyen los principales datos estadísticos obtenidos de los histogramas (M= media, Mn= mediana, DS= desviación estandar, CV= coeficiente de variación).

El análisis comparativo de ambos histogramas (Fig.31) y sus datos estadísticos nos lleva a realizar las siguientes consideraciones:

1- Los coeficientes de variación (CV) de ambos histogramas se diferencian en aproximadamente un 18,2%, siendo el de la población de quistes sustancialmente superior respecto de aquel que representa la población de células vegetativas. El CV, que se calcula a partir de la desviación estandar (Ormerod, 1990), nos da una idea de la calidad del histograma de ADN obtenido, siendo esta mayor cuando la CV tiene valores bajos. A pesar de que ambos histogramas alcanzan valores de CV altos; 39,2% para vegetativos y un 57,7% para quistes (Fig.31), existe una diferencia importante entre ambos, lo cual confirma la dificultad de realizar mejores mediciones en las poblaciones quísticas, con mayor posibilidad de existencia de elementos contaminantes, respecto de los vegetativos.

2- Los valores de ADN para ambas poblaciones son muy amplios, lo que nos indica la gran heterogeneidad en los valores de ploidia macronuclear y más exactamente del contenido total de ADN de los vegetativos y quistes de *Colpoda inflata*.

3- Existe una diferencia sustancial entre los valores medios obtenidos del contenido de ADN total de ambas poblaciones (Fig.31). Esta diferencia representa una pérdida de aproximadamente un 47% del ADN total durante el proceso de enquistamiento, o en otras palabras; los quistes de *C. inflata* contienen, aproximadamente, un 47% menos de ADN que los vegetativos.

DISCUSIÓN

1. ADN MACRONUCLEAR VEGETATIVO Y QUÍSTICO DE *Colpoda inflata*

Tanto el ADN total (aunque básicamente macronuclear) de vegetativos como de quistes de resistencia maduros de *Colpoda inflata* mostró un comportamiento electroforético, en electroforesis convencional, similar al mostrado por himenostómidos como *Tetrahymena thermopila*, *Glaucoma chattoni* (Katzen et al., 1981), en peniculinos como *Paramecium* (Steinbrück et al., 1981) y en el heterotrico *Blepharisma japonicum* (Salvini et al., 1983), lo que nos indica que el genoma macronuclear de *C. inflata* no está constituido por moléculas de tamaño génico (0,4 a 20 Kb de tamaño promedio) como ocurre en ciliados hipotricos (Prescott, 1994; Raikov, 1995) o en algunos ciliados cirtofóridos (con macronúcleo heteromérico) (Lahlafi and Métenier, 1991; Steinbrück et al., 1995), sino que está organizado en elementos moleculares de tamaño muy superior, como lo demuestran los resultados obtenidos en las electroforesis de campo pulsado.

En protozoos ciliados se han distinguido al menos dos tipos de moléculas de ADN constituyentes del macronúcleo (Raikov, 1995); moléculas de tamaño génico que se pueden fraccionar en una electroforesis convencional (como es el caso de los hipotricos) y moléculas de tamaño subcromosómico (referido al tamaño de los cromosomas del micronúcleo), que lo presentan especialmente himenostómidos entre otros ciliados y que no pueden ser fraccionadas por una electroforesis convencional.

Los resultados muestran que el ADN-Ma de *C. inflata* se puede incluir en el segundo grupo antes mencionado, es decir; moléculas macronucleares de tamaño muy superior al tamaño génico. El análisis del genoma macronuclear de *C. inflata*, por electroforesis de campo pulsado (modalidad CHEF) mostró que las moléculas macronucleares se distribuyen dentro de un rango de tamaños desde 90 hasta unas 2.000 Kb aproximadamente, presentando una media de 1.100 Kb.

Cuando nos disponemos a realizar un estudio comparativo con los escasos datos publicados, sobre análisis de genomas de protozoos ciliados por el sistema de campo pulsado, nos encontramos con el problema de las diferentes modalidades de campo pulsado utilizadas. Básicamente, las dos modalidades utilizadas en trabajos sobre ciliados han sido OFAGE (Orthogonal-field-alternation-gel-electrophoresis), aplicada sobre *Tetrahymena thermophila* (Altschuler and Yao, 1985), *Paramecium tetraurelia* (Phan et al., 1989) y *P. primaurelia* (Caron and Meyer, 1989) y la modalidad CHEF aplicada en *Blepharisma japonicum* (Ballarini et al., 1992; Piras et al., 1989), *Paramecium primaurelia* (Caron, 1992) y *T. thermophila* (Lahlafi and Métenier, 1991).

Sabemos (Amils y Abad, 1990) que el sistema OFAGE de campo pulsado,

produce bandas que por ser curvadas dificultan la medida de tamaños al compararlas con marcadores, a diferencia de la modalidad CHEF, que a pesar de que pierde algo de resolución, las bandas son rectas por lo que garantiza una mejor comparación con los marcadores de tamaño.

Si comenzamos nuestro estudio comparativo por el tipo de ciliado, tenemos que en *Tetrahymena thermophila* se han utilizado, indistintamente las modalidades de OFAGE y CHEF, junto con la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa para determinar el rango de tamaño del genoma macronuclear de este ciliado.

Por OFAGE se han obtenido rangos de tamaño que van desde 21 a valores superiores de 1.100 Kb (Altschuler and Yao, 1985) y de menores de 100 Kb a superiores de 1.800 Kb, presentando una media de aproximadamente 800 Kb (Raikov, 1995). Usando la modalidad CHEF se han obtenido rangos desde 100 Kb hasta valores superiores a 1.100 Kb (Lahlafi and Meterier, 1991).

Tanto en el presente trabajo como usando cuatro especies diferentes del género *Tetrahymena* (Palacios et al., 1992), el rango obtenido fue algo superior; desde 200 a unas 2.000 Kb, con un valor promedio de 1.000 a 1.100 Kb. Por el contrario, la estimación por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa subestima el valor promedio del ADN-Ma, dando un valor de aproximadamente 600 Kb para *T. thermophila* (Preer and Preer, 1979). Creemos que la estimación del tamaño de moléculas macronucleares usando la técnica electroforética de campo pulsado es más segura y menos agresiva que los métodos de ultracentrifugación, que conllevan ruptura de moléculas, de aquí la subestimación que se consigue (Raikov, 1995). Además en este tipo de electroforesis se analizan las macromoléculas intactas o nativas tal y como están en el macronúcleo, por lo que la estimación del tamaño se acerca más a la realidad si asumimos que la mayoría del ADN-Ma está en forma de moléculas lineales y que cualquier proteína residual que aún esté unida al ADN no afecta sustancialmente la migración de las moléculas.

Al contrario de lo obtenido en *T. thermophila*, las dos especies de *Paramecium* estudiadas usando campo pulsado, muestran valores promedio de tamaño del ADN-Ma similares a los obtenidos por el método de gradiente de sacarosa. Así, *P. tetraurelia* (Phan et al., 1989) muestra, por OFAGE, un rango de 100 a 500 Kb con un promedio de 450 Kb. Esta misma especie analizada en gradiente de sacarosa dió un tamaño medio molecular de 300 Kb (Preer and Preer, 1979), valor este que coincide bastante con el mostrado en campo pulsado. Otra especie de este mismo género, *P. primaurelia*, analizada por OFAGE (Caron and Meyer, 1989) y CHEF (Caron, 1992) mostró un rango de 50 a 800 Kb con un promedio de 300 Kb, coincidiendo completamente con

el valor dado en gradiente de sacarosa para la especie de *P. tetraurelia*.

Al ser las moléculas constituyentes del genoma macronuclear de *Paramecium*, sustancialmente de menor tamaño que las mostradas por *Tetrahymena*, menor es la probabilidad de ruptura de las mismas, haciendo que los datos obtenidos por ambos sistemas coincidan bastante.

Las moléculas de ADN-Ma de *Colpoda inflata* junto con otras especies del mismo género (*C. cucullus*, *C. spiralis* y *C. maupasi*) muestran un tamaño promedio de unas 1.000 Kb (1.045 Kb para *C. inflata*), tamaño molecular que se asemeja más al de *Tetrahymena thermophila* (promedio de 800 Kb) y se aleja respecto al presentado por otros ciliados cuyo ADN-Ma no se fracciona en una electroforesis convencional, tales como *Paramecium* (promedio de 300/450 Kb), *Glaucoma chattoni* (100-300 Kb) (Katzen et al., 1981) o *Blepharisma japonicum* (Ballarini et al., 1992) con 100 a 170 Kb.

Otro punto que también podemos discutir aquí, es sobre la utilización del término "cromosómico" o "subcromosómico" para definir el tamaño de las bandas de ADN-Ma obtenidas en las electroforesis de campo pulsado. El término "subcromosómico" se debería de utilizar al comparar el ADN-Ma respecto del ADN-Mi (cromosómico) del ciliado en cuestión, ya que durante la formación del Ma a partir del Mi, en la conjugación, existe una pérdida de ADN-Mi, por ejemplo de un 10 a un 20% en *T. thermophila* (Prescott, 1994). Por el contrario, cuando se utiliza, a modo de marcadores de tamaño, los cromosomas de otro microorganismo eucariota como *Saccharomyces cerevisiae*, existe coincidencia de tamaños de las moléculas macronucleares de ciliados como *T. thermophyla* y *C. inflata* con los cromosomas de la cepa de levadura utilizada. Por lo que, se pueden considerar ciertamente como moléculas de tamaño cromosómico, al compararlas con el genoma de otro eucariota. En este mismo sentido, Caron (1992), hace referencia a verdaderos cromosomas al referirse al ADN-Ma de *Paramecium primaurelia*.

El patrón electroforético (CHEF) del ADN-Ma vegetativo de *C. inflata* se compone de dos regiones bien delimitadas. La primera, constituida por dos o tres bandas definidas se localizan en el límite de resolutorio electroforético, coincidiendo con las bandas cromosómicas mayores de *S. cerevisiae*. La segunda región, es mucho más amplia y esta constituida por una población prácticamente continua de moléculas macronucleares, en la cual se pueden distinguir algunas bandas discretas más conspicuas. Hay dos gruesas bandas que destacan sobre el resto de 700 y 200 Kb aproximadamente.

Este tipo de patrón es similar al mostrado por *Paramecium tetraurelia* (Phan et al, 1989) y *P. primaurelia* (Caron, 1992), es decir; bandas discretas de elevado tamaño

en el límite de resolución electroforético y una segunda región formada por una población heterogénea y continua de moléculas de menor tamaño.

Estos patrones se diferencian notablemente del mostrado habitualmente por diferentes especies de *Tetrahymena* (Palacios et al., 1992), incluyendo *T. thermophila* (Altschuler and Yao, 1985), en los cuales prácticamente todo su ADN-Ma se organiza en bandas discretas bien definidas en un patrón discontinuo. Esta evidente discontinuidad en el patrón de moléculas de ADN-Ma nos puede indicar que estas moléculas macronucleares se organizan en grupos de tamaños bien definidos, mientras que patrones casi continuos, como el mostrado por *C. inflata* y otras especies del mismo género, nos indicarían que el macronúcleo estaría constituido por una población de moléculas de tamaño heterogéneo e intermedio entre aquellas que formen grupos de tamaño bien definidos.

Si este espectro de moléculas macronucleares resultara de la ruptura al azar del ADN-Ma, la hibridación con una sonda (gen) específica se detectaría simultáneamente en una amplia variedad de fragmentos. Nuestros resultados, tras hibridación con una sonda ribosómica, que discutiremos más adelante, nos indican que esta última consideración no es cierta, por lo que debemos considerar que este patrón continuo de moléculas macronucleares es la forma en que ciertamente se encuentran en el Ma de *C. inflata*.

El patrón electroforético del ADN-Ma quístico de *C. inflata* no se diferencia mucho del mostrado por la forma vegetativa de este ciliado, salvo que en este patrón ya no se pueden distinguir bandas definidas dentro del mismo, ni las dos más conspicuas (700 y 200 Kb) que se observaban en el vegetativo. Esto se podría atribuir a dos posibles causas, que pueden no excluirse mutuamente y por lo tanto sumarse sus efectos. Así, podría deberse a la existencia de una pérdida sustancial de ADN-Ma que tiene lugar durante el enquistamiento y que hace que el quiste maduro posea menos ADN-Ma respecto del vegetativo. A esta realidad, que discutiremos en un apartado posterior, se le puede sumar el efecto de la presencia en el bloque de agar, donde esta la muestra, de restos de paredes quísticas que podrían retener o bloquear la correcta migración de las moléculas a través del gel.

Del análisis del densitograma del ADN-Ma vegetativo de *C. inflata* en electroforesis de campo pulsado se ha estimado el número promedio de moléculas que pueden constituir el Ma de este ciliado. El valor obtenido (aproximadamente 433 moléculas macronucleares) sería el correcto, siempre y cuando consideremos probables o ciertas dos proposiciones: que el tamaño del genoma de *C. inflata* sea similar al valor obtenido para *T. thermophila* (220.000 Kb) y que cada tipo molecular

macronuclear estuviera presente en un número similar de copias, excluyendo el ADNr. El resultado obtenido para *C. inflata* (unas 433 moléculas macronucleares) se acerca más al valor obtenido, en base a la distribución de tamaños, para *T. thermohyla* (270 moléculas macronucleares) que a los valores obtenidos en ciliados hipotricos, como *Oxytricha nova* (46×10^6 moléculas/Ma) (Prescott, 1994), los cuales presentan masas macronucleares constituidas por moléculas mucho más pequeñas que las de colpódidos o himenostómidos, pero muchísimo más abundantes.

La hibridación con la sonda ribosómica (17/18S) sobre el patrón electroforético (CHEF) de células vegetativas mostró la localización de dicho gen en una banda definida de 200 Kb, que coincide con una de las bandas más gruesas (detectada por tinción con EtBr) de la segunda región en que se dividió el patrón de moléculas de ADN-Ma de *C. inflata*. Al tratarse de un gen ribosómico, es lógico que hibride con una de las bandas más conspicuas del patrón, indicando la amplificación diferencial de dicho gen macronuclear frente al resto, lo que, en general, coincide con los datos obtenidos para el resto de los ciliados estudiados respecto a genes macronucleares ribosómicos (Prescott, 1994).

Los estudios, en ciliados, que utilizan la electroforesis de campo pulsado son escasos y aún lo son más aquellos que realizan hibridación con sondas específicas sobre copias de estas electroforesis. Por ello, el estudio comparativo con otros ciliados esta extraordinariamente limitado. En nuestro caso concreto (sonda ribosómica) estaría limitado a sólo dos casos publicados; *T. thermophila* (Altschuler and Yao, 1985) y *Paramecium tetraurelia* (Phan et al., 1989), en ambos casos se utilizó la modalidad OFAGE. En *T. thermophila*, los autores utilizan una sonda ribosómica no especificada que hibrida positivamente con una de las bandas más pequeñas del patrón electroforético, con una estimación de tamaño de aproximadamente 350 Kb. Los resultados obtenidos en *P. tetraurelia* (Phan et al., 1989) son completamente diferentes, ya que se obtiene hibridación positiva, con una sonda ribosómica, en el límite de movilidad electroforético, sobre moléculas con un tamaño superior a 500 Kb. Los autores afirman que sus resultados coinciden con los obtenidos por Findly and Gall (1978), confirmando que esencialmente casi todo el ADNr-Ma de este ciliado esta formado por moléculas circulares, y, puesto que, en el sistema OFAGE las moléculas circulares migran más lentamente que lineales del mismo tamaño, y su movilidad es independiente del pulso utilizado, los autores proponen que prácticamente todo el ADNr-Ma de *P. tetraurelia* es de naturaleza circular.

Nuestros resultados se aproximan más a los obtenidos en *T. thermophila*, es

decir; los genes ribosómicos, independientemente de su organización, estarían presentes en los fragmentos subcromosomales macronucleares de menor tamaño dentro del patrón molecular obtenido por electroforesis de campo pulsado. Muy probablemente, estas moléculas sean lineales en *C. inflata*, al igual que lo son en *T. thermophila* (Altschuler and Yao, 1985) y a diferencia de lo obtenido en *P. tetraurelia* (Findly and Gall, 1978; Phan et al., 1989).

Cómo se describe en los resultados (apartado 1.2.1.), la sonda ribosómica (17/18S) de *C. inflata* hibrida heterológamente con la banda cromosómica (cromosoma XII) más alta (aproximadamente de 2.000 Kb) de la cepa S13 de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que confirma los resultados previamente obtenidos sobre este microorganismo eucariota (Carle and Olson, 1985), en donde se detectó, en esta banda cromosómica, los genes para los ARNr. Por lo tanto, y como era de esperar por el tipo de cebadores utilizados, nuestra sonda ribosómica contempla una secuencia ribosómica 17/18S universal para eucariotas, puesto que reconoce genes ribosómicos de una levadura y los localiza en el denominado cromosoma XII, como ya se había descrito previamente (Carle and Olson, 1985). Todo ello, ratifica la fiabilidad de nuestros resultados y la utilidad de la sonda obtenida.

Los resultados obtenidos sobre muestras de quistes maduros de *C. inflata*, mostraron ser muy diferentes respecto a los obtenidos en vegetativos. A pesar de que el patrón electroforético no fue muy distinto del mostrado por las células vegetativas, no se detectó ninguna banda de hibridación positiva sobre alguna banda de dicho patrón, sino únicamente dentro del pocillo del gel. Estos resultados pueden tener dos interpretaciones diferentes: la primera se podría basar en el hecho de que en el bloque de agarosa hay quistes de resistencia, lo que quiere decir que la liberación del ADN-Ma y el paso del bloque (pocillo) al gel de resolución podría verse dificultado por la presencia de paredes quísticas y/o de quistes completos no digeridos dentro del bloque. Esta hipótesis se ve un tanto impugnada por el hecho de que moléculas mucho mayores del mismo patrón penetran en una cantidad, que creemos, lo suficientemente alta para poder detectar hibridación positiva si existiera. La segunda interpretación posible sería la que contempla la posibilidad de que estas moléculas, en el estado quístico, se encontraran acomplejadas o asociadas a elementos nucleolares, que podrían dificultar su liberación y entrada al gel. Si esto es así, esta segunda hipótesis se vería ratificada por nuestras observaciones usando microscopía electrónica de transmisión (que serán discutidas en el apartado 3.1.), de que las masas nucleolares vegetativas se fusionan en una única masa nucleolar quística, durante el proceso de enquistamiento. Esta fusión puede llevar consigo una extensa

reorganización de estas moléculas, junto con la compactación por proteínas de la región nucleolar, de lo que resultaría una cromatina nucleolar altamente modificada y deshidratada que impediría la entrada de estas moléculas, relativamente pequeñas, en el gel de agarosa.

Otro aspecto interesante del análisis realizado por electroforesis de campo pulsado, es el que nos muestra el quimiolumigrama que reúne, en un mismo gel, diferentes especies del género *Colpoda* (Fig.9). Las cuatro especies diferentes del género *Colpoda* estudiadas, mostraron diferencias en cuanto a la localización del gen ribosómico 17/18S en el patrón electroforético de moléculas de ADN-Ma. *C. cucullus* y *C. inflata* mostraron la misma localización (banda de unas 200 Kb aproximadamente), mientras que *C. spiralis* y *C. maupasi* presentaban una localización de dicho gen ribosómico en fragmentos subcromosómicos-macronucleares de mayor tamaño (260 y 450 Kb respectivamente). En todos los casos, siempre fue una única banda definida la que dio hibridación positiva heteróloga con la sonda ribosómica, corroborando, por un lado y de nuevo, la veracidad del patrón electroforético obtenido del ADN-Ma intacto y por otro lado, mostrando cierto poliformismo macronuclear en la localización de la banda que contiene el gen ribosómico. Esta última peculiaridad, que hemos descubierto por primera vez en ciliados usando esta técnica electroforética, podría ser de gran utilidad para estudios de polimorfismos genómicos de ciliados colpódidos, y su identificación a nivel de especie, sin pasar por el análisis del corticotipo. Igualmente, la técnica en si misma pudiera ser útil para otros protozoos ciliados con genoma macronuclear constituido por moléculas de tamaño subcromosómico.

Como ya indicamos en los resultados (apartado 1.2.2.), la nucleasa Bal 31 suele presentar dos actividades. Una actividad mayoritaria 3'-exonucleásica que actúa sobre ADN_{bc} lineal y otra actividad secundaria endonucleásica sobre el ADN_{mc} originado por la principal actividad exonucleásica (Sambrook et al., 1989). Además, la Bal 31 puede romper ADN_{bc} superenrollado, siendo el ADN circular superenrollado especialmente sensible a su actividad endonucleásica y así originar círculos relajados y posteriormente ADN lineal.

Debido a estas peculiares características que presenta esta enzima, algunos autores la han utilizado para acortar o retirar secuencias terminales (telómeros) de moléculas genómicas (Altschuler and Yao, 1985) o estudiar la circularidad o linealidad de determinadas moléculas macronucleares (Phan et al., 1989). En cualquier caso, los posibles resultados derivados de la utilización de dicha enzima suelen ser de difícil

interpretación y están sujetos a otros factores como el tiempo de incubación del ADN en presencia de la enzima.

Para completar nuestro estudio sobre el ADN-Ma vegetativo y quístico de *C. inflata*, se utilizó esta enzima en términos semejantes a los mostrados en un trabajo sobre ADN-Ma de *Paramecium tetraurelia*, usando igualmente, electroforesis de campo pulsado (Phan et al., 1989). Los resultados muestran que exposiciones de 15 y 30 minutos degradan prácticamente todo el ADN-Ma vegetativo del patrón electroforético localizado por encima de los 835 Kb. En ADN-Ma quístico la degradación, con los mismos tiempos de incubación, es bastante más intensa que la mostrada en las muestras de células vegetativas. Esta diferencia se podría atribuir, por un lado, a la menor cantidad de ADN-Ma presente en el quiste maduro y por lo tanto un mejor acceso de la enzima al ADN y una digestión más rápida e intensa, y por otro lado, a la posibilidad de un mayor superenrollamiento del ADN-Ma quístico.

Al igual que en *Paramecium tetraurelia* (Phan et al., 1989), la Bal 31 eventualmente comienza a digerir el ADN-Ma de mayor tamaño, ya sea porque este ADN-Ma, de tamaño promedio de 1.045 Kb, sea mayoritariamente ADNbc lineal o ADNbc superenrollado circular. Esta última posibilidad parece ser que se da en el ADN ribosómico de *P. tetraurelia*, el cual se localiza en el límite de resolución electroforético (modalidad OFAGE) con un tamaño superior a 500 Kb, de aquí que los autores (Phan et al., 1989) lo interpreten como que esencialmente todo el ADNr-Ma de *P. tetraurelia* este formado por moléculas circulares.

En nuestro caso, para *C. inflata*, no podemos asumir con certeza que estas moléculas de elevado tamaño sean moléculas circulares, por otra parte, el ADNr-Ma de *C. inflata* se localiza en una banda de 200 Kb al final del patrón electroforético y esta localización se mantiene en las muestras de vegetativos tras digestión con la Bal 31. Esto nos indica, que estas moléculas, de tamaño relativamente pequeño, no son fundamentalmente afectadas por la Bal 31 en estas condiciones y que muy probablemente sean moléculas lineales.

En los carriles con ADN-Ma quístico digerido con la Bal 31, no se detectó hibridación positiva con la sonda ribosómica, a lo largo del patrón molecular macronuclear obtenido por CHEF, al igual que ocurría en muestras no digeridas por dicha enzima. Pero, a diferencia de lo mostrado en las electroforesis de muestras de quistes de *C. inflata*, no se detectó hibridación positiva en el interior del bloque de agarosa o pocillo, lo que podemos interpretar como que la Bal 31 ha digerido sustancialmente dicho ADNr-Ma a fragmentos menores de 200 Kb e indetectables por la sonda. El significado de estos resultados, sobre el ADNr-Ma de los quistes de

resistencia de *C. inflata*, se hace difícil por lo que sería necesario un estudio adicional sobre el estado en que se encuentran estas moléculas en el macronúcleo quístico de este ciliado.

2. CAMBIOS EN EL PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN MACRONUCLEAR DE *Colpoda inflata* DURANTE EL ENQUISTAMIENTO

Existen numerosos resultados, en organismos eucariotas, que muestran que el control de la expresión de ciertos genes en procesos de diferenciación y desarrollo, al igual que el mantenimiento de la forma celular diferenciada, están relacionados con los cambios en el patrón de metilación de residuos de citosina en el ADN genómico (Bird, 1984; Cedar, 1988; Chomet, 1991; Doerfler, 1983; Doerfler et al., 1990; Razin and Cedar, 1991; Razin and Riggs, 1980).

Al ser el proceso de enquistamiento en protozoos ciliados un mecanismo de diferenciación que lleva consigo apertura de genes específicos, nos preguntamos si, y al igual que ocurre en otros procesos criptobióticos microbianos (Zhu and Henney, 1990), pudieran existir cambios en el patrón de metilación del ADN-Ma, ligados al enquistamiento.

En primer lugar, el análisis de restricción con diversas endonucleasas (isoesquizómeros) nos mostró la ausencia de metilación en residuos de adenina, al menos en las adeninas de las secuencias analizadas, en el ADN-Ma de este ciliado. Los resultados fueron similares tanto para el ADN-Ma vegetativo como quístico. Estos resultados nos indican que *Colpoda inflata*, al igual que *Blepharisma japonicum* (Salvini et al., 1984), es uno de los pocos ciliados que no presenta 6-metiladenina (6-meA) en su ADN-Ma. Como se aprecia en la Tabla-VI, la mayoría de los pocos ciliados estudiados tienen como única base metilada a la adenina (6-meA), lo que ya contrasta, con lo que ocurre en los eucariotas multicelulares y muchos unicelulares, en donde la base metilada de su ADN genómico es casi exclusivamente la 5-metilcitosina (5-meC), aunque, a veces, pueden coexistir ambas como en algunos fitoflagelados (Salvini et al., 1984) y mixomicetos (Zhu and Henney, 1990).

Tabla-VI: Bases metiladas en el ADN-Ma de ciliados

Ciliado	6-meA	5-meC	Referencia
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	+	-	Hattman et al., 1978
<i>Tetrahymena thermophila</i>	+	-	Pratt & Hattman, 1981 Capowski et al., 1989 Karrer & Stein-Gavens, 1990
<i>Paramecium aurelia</i>	+	-	Cummings et al., 1974
<i>Stylonychia mytilus</i>	+	-	Ammermann et al., 1981
<i>Oxytricha fallax</i>	+	-	Rae & Spear, 1978
<i>Blepharisma japonicum</i>	-	+	Salvini et al., 1984
<i>Colpoda inflata</i>	-	+	Palacios et al., 1994

(+): Presencia. (-): Ausencia.

Respecto de los datos de la Tabla-VI, debemos hacer algunas puntualizaciones. Debido al nivel de resolución de las técnicas utilizadas en la detección de bases metiladas (6-meA y 5-meC), es posible que en determinados casos, la cantidad presente de la misma no sea suficiente para poder ser detectada por estas técnicas. De tal forma, que a veces, se puedan dar resultados contradictorios. Un ejemplo de lo que queremos indicar aquí, nos lo muestra el género *Paramecium*, el cual, según los resultados de Cummings et al., (1974), no presenta 5-meC detectable por métodos bioquímicos, pero sin embargo, experimentos realizados con el agente desmetilante 5-azacitidina (5-azaC) mostró la posibilidad de presencia de 5-meC en el ADN-Ma de dos especies de este ciliado (Ng, 1989).

Esto podría indicarnos que en algunos ciliados pudieran existir ambos tipos de bases metiladas, como ocurre en algunos eucariotas inferiores, presentándose una de ellas en mayor proporción respecto de la otra. Además, en protozoos ciliados se presenta el típico dualismo nuclear, de tal forma que el ADN-Ma puede presentar una diferente proporción de una determinada base metilada respecto del ADN-Mi, e incluso una base metilada diferente. El ADN-Mi de *T. thermophila* prácticamente no presenta 6-meA, a diferencia del ADN-Ma que contiene un 0,8% de 6-meA (Blackburn et al., 1983).

En cualquier caso, es necesario incrementar sustancialmente el análisis de la

presencia de bases metiladas en el ADN-Ma y ADN-Mi de muy diferentes protozoos ciliados, para que se puedan realizar conclusiones generales sobre este punto y establecer posibles relaciones entre los diferentes grupos.

Como revelan los resultados de la utilización de diferentes endonucleasas de restricción (Tabla-V), es la 5-meC la única base metilada que presenta el ADN-Ma de *Colpoda inflata*. Sin embargo, al contrastar los patrones de digestión del ADN-Ma vegetativo y quístico, los dos estados diferenciados extremos del proceso de enquistamiento, se observaron diferencias, indicando cambios en el patrón de metilación, a nivel de citosina, para ambos ADNs. El resultado más revelador lo mostró la enzima HhaI, que no mostró digestión alguna sobre el ADN-Ma vegetativo, mientras que mostró un elevado nivel de digestión sobre el ADN-Ma quístico. De este resultado se puede deducir que las secuencias 5'-GCGC-3' presentes en el ADN-Ma quístico están intensamente desmetiladas respecto a las presentes en el ADN-Ma vegetativo. Igualmente, se puede pensar que estas secuencias son realmente abundantes en el ADN-Ma quístico ya que la digestión es intensa, originando fragmentos pequeños. En general, la intensa degradación detectable sobre el ADN-Ma quístico, independientemente de la endonucleasa utilizada (Tabla V), también se puede interpretar como la suma de dos efectos independientes; por una parte la digestión existente y positiva debida a la acción de la distintas enzimas, esto es completamente cierto si comparamos el control no digerido con las muestras tratadas (Fig.12), y por otra parte una fraccionación preexistente (observable en el control de ADN-Ma quístico) del ADN-Ma que aparece durante la extracción del ADN de los quistes de resistencia de *C. inflata*. En la extracción del ADN quístico, inevitablemente se aplica un método mecánico (sonicación) para la ruptura celular, ya que ninguno de los métodos químicos (enzimáticos) utilizados rinden una ruptura quística completa, debido a ello existe una fraccionación inespecífica más o menos intensa del ADN-Ma previa a cualquier tratamiento de digestión (vease el carril control de ADN quístico de la Fig.12). De aquí que la digestión con cualquier enzima rinda fragmentos más pequeños que los obtenidos a partir del ADN-Ma vegetativo. Todo ello, no afecta, en principio, las interpretaciones de digestión positiva o negativa con las endonucleasas utilizadas en este estudio. Lo único en que puede afectar este efecto, es en la interpretación de la intensidad de la digestión, estando sobredimensionada para el caso de ADN quístico.

De estos resultados, se puede inferir, independientemente del efecto de la sonicación sobre el ADN-Ma quístico, la existencia de una desmetilación en algunas secuencias del ADN-Ma durante el tránsito desde vegetativos a quistes de resistencia

(enquistamiento).

Los resultados del análisis con endonucleasas de restricción fueron confirmados por los experimentos realizados con el agente desmetilante de ADN eucariota; 5-azacitidina (5-azaC) (Razin and Cedar, 1991).

Cómo ya se indicó en los Resultados e Introducción, la 5-azaC actúa como un análogo estructural de la citosina, por lo que, si está presente, se incorpora al ADN replicándose en su lugar. Su presencia en el ADN inhibe la acción metiladora de la ADN-metil-transferasa, originando, en un primer ciclo de replicación, un ADN hemimetilado (solo la hebra parental se mantiene metilada), o completamente desmetilado (ambas hebras) después de un segundo ciclo replicativo y si continúa presente este análogo estructural en el medio (Doerfler, 1983; Hergersberg, 1991; Jones and Taylor, 1980; Santi et al., 1983; Taylor et al., 1984). De esto, se deduce que para ejercer su acción desmetilante, el ADN ha de estar replicándose.

Los experimentos realizados sobre *Colpoda inflata* en crecimiento exponencial, mostraron que dicho análogo de la citosina se incorpora al ADN-Ma, y que su incorporación al genoma macronuclear induce enquistamiento aún cuando la célula se encuentra en condiciones óptimas para el ciclo crecimiento-división, y que por lo tanto los genes implicados en el enquistamiento están reprimidos. Esto ocurre a concentraciones de 5-azaC no menores de 400 μM y el rendimiento en la formación de células prequísticas es proporcional a la concentración utilizada de la droga (400 y 500 μM). Estas concentraciones de 5-azaC son elevadas respecto a las utilizadas en otros sistemas vivos eucariotas (Jones and Taylor, 1980). Se ha descrito que la 5-azaC puede presentar múltiples efectos sobre las células tratadas (Jones and Taylor, 1980; Taylor et al., 1984), cuando se utiliza a elevadas concentraciones. La droga interfiere en la metilación tanto de ADN como de ARN, en el procesamiento de ARN y metilación de ARNt (Jones and Taylor, 1980).

En *C. inflata*, concentraciones menores a 400 μM no muestran ningún efecto aparente sobre el crecimiento, por lo que para que se induzca enquistamiento es necesario una elevada concentración de 5-azaC. También es cierto que esta elevada concentración provoca en la población celular cierto nivel de mortandad, probablemente debido a otras interacciones de la 5-azaC con el metabolismo celular. Para una concentración de 400 μM de 5-azaC, casi la mitad de la población (49%) se pierde y la otra mitad se enquista aún en presencia de condiciones óptimas para el crecimiento. Por lo tanto, la pregunta clave podría ser; las células que son inducidas a enquistar, ¿lo hacen para librarse de la mortandad celular provocada por la 5-azaC o es porqué se inducen los genes específicos de enquistamiento?

Debemos tener en cuenta que la población no es sincrónica, y por lo tanto podría darse la posibilidad de que una fracción de la población se viera bloqueada por cualquier efecto secundario de la 5-azaC, antes de la fase-S (replicación del ADN-Ma), por lo que la 5-azaC no se incorporaría al ADN ejerciendo su acción como agente desmetilante, estas células no se dividen y mueren. Por el contrario, la parte de la población que alcanzara la fase replicativa e incorporara en su genoma la 5-azaC se vería inducida a enquistar por desmetilación de su ADN. Aún parte de esta población, podría quedar bloqueada en el siguiente ciclo celular, reduciéndose más aún las células que efectivamente llegan a enquistarse. Esta interpretación podría satisfacer la disminución paulatina de células en los cultivos tratados.

A las 24 horas de iniciado el tratamiento solo se obtienen porcentajes bajos de células prequísticas (13,6 y 16,3% para 400 y 500 μM respectivamente), siendo necesarias otras 24 horas y más 5-azaC para obtener porcentajes más elevados (54,7 y 78,7%, respectivamente) de prequísticos. Esto se puede deber a la necesidad de más de dos divisiones celulares para la expresión de genes de enquistamiento inducida por la desmetilación causada por la 5-azaC. Algo similar ocurre en células 10T1/2 tratadas con esta droga, para que expresen el fenotipo muscular es necesario más de dos divisiones celulares (Taylor et al., 1984).

En medio de enquistamiento y en presencia de la 5-azaC, *Colpoda inflata* se enquista normalmente. La cinética de enquistamiento es normal si la comparamos con la que muestra el control (sin la droga), y a las 24 horas se alcanzan porcentajes similares de células prequísticas (85,8% para el control y 86,2% para el tratado con 500 μM de 5-azaC).

Sabemos que durante el enquistamiento de *C. inflata* no existe síntesis de ADN-Ma (Gutiérrez et al., 1990), por lo que la 5-azaC no ha podido incorporarse en el ADN-Ma y ejercer su acción desmetilante, pero si podría haber bloqueado el proceso de formación del quiste de resistencia por alteración de algún proceso metabólico implicado en el mismo (el enquistamiento de *C. inflata* es dependiente de síntesis de ARN, proteínas y glucoproteínas) (Benítez et al., 1991; Gutiérrez and Martín-González, 1990), al igual que sucede durante el crecimiento celular provocando mortandad, sobre todo a una concentración de 500 μM . Al igual que en el ciclo crecimiento-división del ciliado, también existe síntesis de ARN y proteínas durante el enquistamiento, por lo que igualmente debería de bloquearse su metabolismo y morir la célula. Pero no se detectó ninguna disminución en el número de células de la población inducida a enquistar y en presencia de la droga. La diferencia fundamental del proceso de enquistamiento respecto del ciclo crecimiento-división, es la existencia

en este último de replicación del ADN y división celular. No podemos conocer, en base a estos datos experimentales, si la mortalidad celular deriva de la incorporación de la 5-azaC al ADN-Ma, o si se debe a un efecto secundario de la droga, que en células vegetativas creciendo ejercería dicho efecto al presentar un metabolismo más activo que una célula prequística.

Los resultados del efecto de la 5-azaC sobre el crecimiento de *C. inflata*, como inductor de enquistamiento, aunque conflictivos en algunos aspectos, nos muestran que probablemente la desmetilación de algunas regiones del ADN-Ma podrían abrir los genes implicados en el enquistamiento.

Existe una amplia información bibliográfica que analiza como la metilación de residuos de citosina puede ser un mecanismo indirecto de inactivación de la expresión génica (mecanismo de silencio génico), y una serie de resultados experimentales que así lo confirman (Bird, 1984; Chomet, 1991; Counts and Goodman, 1995; Doerfler, 1983; Razin and Cedar, 1991). Igualmente, existe una gran polémica y conflictividad en torno al mecanismo anteriormente comentado (Bird, 1992; Doerfler et al., 1990).

Son muy escasos los estudios sobre microorganismos eucariotas que involucran análisis del patrón de metilación del ADN genómico en procesos que conllevan diferenciación. Esta escasez, es mucho mayor entre los protozoos ciliados, a pesar de ello realizaremos un análisis comparativo con los pocos datos existentes y nuestros resultados en *Colpoda inflata*. El análisis comparativo lo podemos realizar con procesos microbianos semejantes al enquistamiento de ciliados y, por otro lado, con todos los procesos de diferenciación en microorganismos eucariotas. Si comenzamos con los propiamente criptobióticos, debemos apuntar que en protozoos ciliados esta es la primera vez que se estudia la metilación en el enquistamiento, por lo que, de momento, no se pueden establecer comparaciones con otros cilados, pero si podemos hacerlo con otros microorganismos eucariotas. Los datos existentes con los que podemos comparar se reducen a dos especies del género *Physarum* (hongo mixomiceto) durante el proceso denominado esporulación (enquistamiento) y/o esferulación. En *P. flavicomum* (Zhu and Henney, 1990), durante el proceso de enquistamiento se detecta una desmetilación de residuos de citosina de aproximadamente 4 veces respecto del grado de metilación observado en la célula vegetativa. Por el contrario, se detecta un incremento de la metilación en residuos de adenina en el mismo microorganismo y durante el mismo proceso (Zhu and Henney, 1990).

El resto de la información bibliográfica existente se refiere a la especie *P. polycephalum*. Por una parte, Hildebrandt (1986), usando diferentes inhibidores de la metilación bloquea el proceso de esporulación, y según este autor, el ADN debe ser metilado a nivel de citosina durante un periodo crítico después de la inducción del proceso. Sobre genes específicos involucrados en la esporulación y/o esferulación de *P. polycephalum* existen datos diversos y contradictorios. Según Magiera and Fronk (1994), existe una minoría de genes implicados en la esferulación que están sujetos a metilación diferencial. Estos mismos autores (Fronk and Magiera, 1994), estudiando el gen específico esferulina-4 apuntan que la metilación del gen acompaña su activación transcripcional. Por el contrario, Telle and Hildebrandt (1992) indican la falta de evidencias sobre cambios en el patrón de metilación de genes específicos de esporulación en *P. polycephalum*.

Respecto a la metilación del ADN, ligada a otros procesos no criptobióticos en protozoos ciliados, igualmente, existe una muy escasa bibliografía. En *Tetrahymena thermophila* se ha estudiado la metilación de residuos de adenina durante la conjugación en dos aspectos diferentes; durante la formación del nuevo macronúcleo (esbozo macronuclear) y su influencia en la degradación del viejo macronúcleo o la protección contra la degradación del nuevo (Harrison and Karrer, 1985; Karrer and Yao, 1988).

En *Paramecium tetraurelia* y *P. jenningsi* (Kwok and Ng, 1989; Ng, 1989), a pesar de que en este ciliado no se ha detectado metilación en residuos de citosina por métodos bioquímicos (el límite de sensibilidad de detección bioquímica de la 5-metilcitosina en varios ciliados es de 0,01 mol% de citosina, y teniendo en cuenta el tamaño del genoma y el contenido en GC de *P. tetraurelia*, se deduce que una cantidad menor de 800 bases de 5-metilcitosina podría no ser detectable), la metilación de la citosina parece ser clave en el programa de expresión de los genes macronucleares involucrados en la estomatogénesis de estos ciliados. La 5-azacitidina (200 μ M) altera la represión de las secuencias estomatogénicas al desmetilarlas y esta alteración se mantiene durante la siguiente propagación sexual (Kwok and Ng, 1989).

P. tetraurelia, al igual que *Colpoda inflata*, tolera dosis relativamente elevadas de la droga 5-azacitidina, lo cual podría indicar un bajo contenido en 5-metilcitosina en ambos genomas. Este contenido podría ser suficiente para regular la expresión de unos pocos genes, entre ellos los de la estomatogénesis en *Paramecium tetraurelia* y los del enquistamiento en *C. inflata*.

Como hemos podido apreciar, después del análisis comparativo realizado, los estudios en microorganismos eucariotas relativos a la metilación del ADN son

realmente escasos y a veces contradictorios. Estas contradicciones o problemática ligada al tema de la metilación y expresión génica, no son debidos tanto a la metodología utilizada, bastante limitada y común en muchos trabajos, como a la dificultad del tema en si mismo.

En resumen, podríamos decir que en el enquistamiento de *Colpoda inflata* se presentan evidencias experimentales de que la desmetilación de determinadas secuencias macronucleares podrían abrir o inducir la expresión de los genes iniciales y esenciales del proceso de enquistamiento. Esta desmetilación sería un proceso discreto y localizado en las secuencias promotoras de algunos pocos genes, y según un mecanismo activo que no involucra replicación del ADN. La desmetilación presente en el enquistamiento no invalida la existencia de metilación de otras secuencias o genes que deben ser silenciados, como se discutirá en el siguiente apartado.

2.1. Estudio sobre el gen 17/18 S de *Colpoda inflata*

Existen estudios de cambios en el patrón de metilación que, en lugar de referirse a todo el genoma sin especificación de gen alguno, se concretan en algún gen determinado, restringiendo dicho análisis al mismo.

De forma similar, se ha realizado en *C. inflata* sobre el gen ribosómico 17/18 S, utilizando las endonucleasas de restricción MspI y BglI, que como ya se describió, digieren de manera diferente el ADN-Ma vegetativo y quístico de este ciliado.

Las diferencias mostradas respecto de los fragmentos obtenidos, tras digestión con estas enzimas, nos indican, en primer lugar, que el gen ribosómico se podría encontrar metilado en el estado quístico en algunas de las secuencias reconocidas por estas enzimas. La MspI corta la secuencia 5'-CCGG-3' siempre y cuando la citosina del extremo 5' no este metilada, por lo que en células vegetativas de *C. inflata* la digestión es completa originando un fragmento detectable de 1.200 pb. Se conoce la secuencia completa y tamaño del gen ribosómico 17/18 S de *C. inflata* (Greenwood et al., 1991), siendo ésta de aproximadamente 1.786 pb de longitud, por lo que, el gen completo quedaría digerido por la MspI en dos fragmentos; uno de 1.200 pb detectable y otro de 586 pb indetectable en la electroforesis debido a su pequeño tamaño.

Igualmente, la BglI cortaría la secuencia 5'-GCC(N₄)NGC-3', cuando no está metilada en la citosina del extremo 5' en el gen ribosómico vegetativo, muy cerca de la secuencia que reconoce la MspI, ya que el fragmento originado es similar.

Este gen ribosómico en el estado criptobiótico (quiste de resistencia) podría encontrarse metilado en algunas de las secuencias reconocidas por estas enzimas. Esto explicaría los patrones de restricción observados; tres fragmentos de hibridación positiva (3.500, 1.900 y 1.500 pb) para la MspI. El fragmento más numeroso producido, según la intensidad quimioluminiscente del quimioluminograma, es de 1.900 pb, tamaño algo superior a la secuencia codificante completa. El segundo fragmento originado en mayor cantidad es el de 1.500 pb, y la suma de ambos; $1.900+1.500$ equivale a 3.400 una cifra próxima a 3.500, el tamaño estimado para la banda de hibridación positiva más alta encontrada tras la digestión con MspI.

El que siempre se obtengan fragmentos superiores a 1.200 pb nos puede indicar que existen secuencias no metiladas reconocibles por la enzima, localizadas fuera de la secuencia codificante del gen ribosómico 17/18 S. Lo que no podemos conocer es en donde están localizadas; en secuencias espaciadoras o en una secuencia codificante de otro gen ribosómico, como el 26/28 S, ya que sólo hibridamos con la sonda derivada del gen 17/18 S de *C. inflata*.

El fragmento mayor observado (3.500 pb), curiosamente equivale aproximadamente a 3 veces la longitud del fragmento obtenido en los vegetativos (1.200 pb). Esto se puede interpretar como la existencia de una secuencia no metilada, y por lo tanto digerible por MspI, a unos 2.400 pb del lugar de restricción situado en la secuencia codificante del gen 17/18 S, y que origina el fragmento de 1.200 pb en el estado vegetativo.

Los resultados con la BglI muestran, igualmente, la existencia de una metilación en dicha secuencia, y por consiguiente no originando el fragmento único de 1.200 pb sino fragmentos muy superiores (11.000 y 4.300 pb). El fragmento cuantitativamente superior es el de 4.300 pb, posiblemente derivado del fragmento mayor, al igual que puede ocurrir con los fragmentos menores originados por MspI, y cuya suma reproducen el fragmento mayor.

Ambos patrones de restricción apuntan hacia la idea de metilación del gen ribosomal 17/18 S en el estado quístico.

Estos resultados no contradicen los anteriormente presentados y discutidos sobre la posibilidad de desmetilación de algunos genes durante el enquistamiento, pudiendo coexistir ambos procesos en el mismo genoma macronuclear. Algo similar se ha propuesto en la esferulación de *Physarum polycephalum* (Fronk and Magiera, 1994; Magiera and Fronk, 1994).

Se conocen varios ejemplos de metilación selectiva de genes ribosomales, tanto en ciliados como en otros sistemas vivos eucariotas. En vegetales, el ADN_r no

metilado o hipometilado se encuentra en el nucleolo mientras sus formas metiladas se encuentran condensadas en forma de heterocromatina y son incapaces de transcribir (Finnegan et al., 1993). Igualmente, en hongos, como el basidiomiceto *Schizophillum commune*, el ADN_r experimenta metilación que esta regulada durante el desarrollo del hongo (Buckner et al., 1988).

En ciliados, es en *Tetrahymena thermophila* (Blackburn et al., 1983) en donde se ha detectado metilación de genes ribosomales en el macronúcleo. El ADN_r de este ciliado son moléculas palindrómicas de 21 Kb, llevando cada molécula dos copias de los genes ribosomales. La base metilada es la N-6-metiladenina, que comprende aproximadamente un 0,4% de los residuos de adenina del palíndromo. Sin embargo, no se han observado diferencias en los patrones de metilación de estos genes a partir de células presentes en diferentes estados fisiológicos. Los autores (Blackburn et al., 1983) piensan que una posible función de los residuos de N-6-metiladenina es diferenciar formas moleculares de ADN que se han mantenido en el macronúcleo maduro de aquellas que han de ser reorganizadas o degradadas.

Es en el enquistamiento de *Colpoda inflata*, en donde se ha detectado, por primera vez, metilación de genes ribosomales macronucleares, y esta metilación podría tener distintos significados. En primer lugar, esta metilación sobre el gen ribosómico 17/18 S de *C. inflata*, podría igualmente estar presente en el resto de los genes ribosomales no detectados por la sonda utilizada, y representar el mecanismo por el cual se bloquea o silencia las transcripciones de estos genes, no utilizables en las fases tardias del enquistamiento. En segundo lugar, podría suponer un cambio en la conformación del ADN_r, inducido por metilación, ya que como se ha comprobado en diversos sistemas vivos la metilación del ADN estabiliza la inactividad génica alterando la estructura de la cromatina y las interacciones ADN-proteínas (Hergersberg, 1991; Keshet et al., 1986).

En las últimas etapas del enquistamiento existe una drástica condensación cromatínica macronuclear, y el quiste maduro presenta un estado cromatínico muy diferente al vegetativo, como podremos comprobar en el análisis ultraestructural que se discutirá en el próximo apartado. Así mismo, el comportamiento de los genes ribosomales en electroforesis de campo pulsado (comentado en el apartado 1.) en las muestras derivadas de quistes maduros, induce a pensar, como una de las interpretaciones posibles, en una reorganización de la estructura secundaria de dichas moléculas acomplejándolas en formas más difíciles de resolver en una electroforesis. Se conoce que metilaciones específicas en determinadas secuencias puede inducir la formación de estructuras heterodoxas en el ADN, como regiones curvadas,

cruciformes, segmentos con triple hélice o la forma Z de ADN (Zacharias, 1993). De momento, no tenemos evidencias de que esto pueda ser así en *C. inflata*, pero es una posibilidad a ser considerada.

Probablemente, al igual que en otros organismos eucariotas (microorganismos o no) incluyendo los ciliados, los genes ribosomales de *C. inflata* se encuentran amplificados diferencialmente respecto del resto de los genes macronucleares. Como no conocemos la distribución de los distintos genes ribosomales y el tamaño de los mismos, excluyendo al 17/18 S, no podemos saber el nivel de amplificación de ellos en el macronúcleo. Solo conocemos, de momento, que la sonda ribosómica 17/18 S reconoce un fragmento subcromosómico de aproximadamente 200 kb, en el cual podría estar sobradamente el resto de los tipos ribosómicos de la subunidad mayor. Si suponemos que en dicho elemento subcromosomal sólo se encuentran los genes ribosómicos y que éstos (subunidad pequeña + subunidad grande) se encuentran organizados en un transcrito precursor común como en otros muchos seres vivos, y este puede tener un tamaño similar al presentado en *Tetrahymena thermophila* (mitad del palindromo ≈ 10 Kb), se podría pensar que al menos 20 copias de dicho transcrito precursor podrían estar en dicho fragmento subcromosómico macronuclear. Evidentemente, esto es una especulación a la espera de tener datos propios de *C. inflata*.

3. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DEL SISTEMA NUCLEAR Y DE LA CROMATINA MACRONUCLEAR DURANTE EL ENQUISTAMIENTO

3.1. Microscopía electrónica de transmisión del sistema nuclear durante el enquistamiento de *Colpoda inflata*

Por microscopía electrónica de transmisión estandar se aprecia que el macronúcleo vegetativo de *Colpoda inflata*, esta constituido por una cromatina organizada en numerosos granos discretos de cromatina condensada conocidos, entre los ciliados (Raikov, 1982), como "pequeños cuerpos". Estos pequeños cuerpos cromatínicos, presentes en la mayoría de los ciliados (Raikov, 1982; 1995), son de forma irregular, entre 0,1 y 0,2 μm de tamaño y presentan una elevada electrodensidad. Consisten, en fibras de cromatina empaquetadas, estos paquetes de cromatina están interconectados entre si por fibras de cromatina, estas interconexiones

son más apreciables cuando se estudia la cromatina aislada (Vengerov et al., 1983).

Por consiguiente, podemos decir que la cromatina presentada por el macronúcleo de células vegetativas de *C. inflata* es la común a otros muchos ciliados, tales como numerosos ciliados de la clase Kinetofragminophorea (*Didinium*, *Coleps*, *Lacrymaria*, *Tillina*, *Colpoda*, *Bursaria* y *Balantidium*) o la clase Oligohimenophorea (*Tetrahymena*, *Paramecium*) y también de la clase Polyhymenophorea (*Spirostomum*, *Stentor* y *Euplotes*) (Raikov, 1982; 1995).

El macronúcleo de *C. inflata* en estado vegetativo contiene un nucleolo compuesto, formado por numerosas masas nucleolares, que ocupa gran parte del volumen macronuclear. Estas masas nucleolares no se encuentran fusionadas como en *C. steinii* (Frenkel, 1980; Raikov, 1982), sino más bien distribuidas en grupos aparentemente desconectados unos de otros y rodeados de los "pequeños cuerpos" cromatínicos. Desde un punto de vista estructural los cuerpos nucleolares de *C. inflata* en estado vegetativo se asemejan mucho a los que presenta *Tetrahymena* (Raikov, 1982): una zona fibrilar interna electrodensa de forma, a veces, arriñonada, compuesta de fibras empaquetadas que son ARN preribosomal unido a proteínas y una pequeña zona granular que la rodea superficialmente, constituida de gránulos de ribonucleoproteína (RNP), que son los precursores de las subunidades ribosómicas. También, al igual que en *Tetrahymena* y otros colpódidos (*C. maupasi*, *C. steinii* y *C. simulans*) (Raikov, 1982), presenta cuerpos cromatínicos, a veces localizados en la hendidura de la zona fibrilar, que forman el organizador nucleolar (ADNr). Igualmente, lo mismo que en *Tetrahymena* (Raikov, 1982), algunos de los cuerpos nucleolares están localizados muy cerca de la membrana macronuclear, a diferencia de lo que ocurre en algunos colpódidos que están localizados en el centro del macronúcleo.

El micronúcleo de la célula vegetativa de *C. inflata*, es igualmente, un micronúcleo típico de colpodido, elipsoidal o lenticular con cromatina condensada y de estructura continua. Se localiza, generalmente, en una hendidura o entrante del macronúcleo al igual que en otros muchos ciliados (Raikov, 1982).

En células prequísticas tempranas (20 h desde la inducción de enquistamiento), el micronúcleo se separa del macronúcleo no existiendo ninguna otra alteración a nivel macronuclear. Por el contrario, comienzan a apreciarse cambios significativos a nivel macronuclear; los "pequeños cuerpos" cromatínicos incrementan su tamaño respecto de los observados en células vegetativas, esto probablemente indica un comienzo de la condensación cromatínica macronuclear por fusión de los "pequeños cuerpos" cromatínicos. Las masas nucleolares del nucleolo compuesto comienzan a

fusionarse originando otras mayores y de forma muy irregular. En estadios prequísticos más avanzados (30 h) esta fusión de masas nucleolares se hace más dramática, alcanzándose la formación de tres o dos grandes y únicas masas nucleolares fruto de la fusión de las numerosas masas nucleolares del estado vegetativo. Esta fusión hace que la zona más visible y casi exclusiva de estas grandes masas nucleolares sea la región fibrilar electrodensa, mientras que la región granular se hace indistinguible o se reduce a una región interior envuelta por la zona fibrilar. Igualmente no se observan organizadores nucleolares.

Estos cambios estructurales de las masas nucleolares son indicadores de profundos cambios fisiológicos o biosintéticos respecto a elementos ribosomales, que se traducen en un bloqueo paulatino de la producción de ribosomas durante el proceso de enquistamiento.

Se conoce que la morfología de los nucleolos puede cambiar drásticamente, dependiendo del estado fisiológico de la célula eucariota (Mélèse and Xue, 1995). En protozoos ciliados, se ha descrito un fenómeno similar, en procesos diferentes a la criptobiosis, pero que presenta puntos en común con la misma, así por ejemplo; en *Paramecium* los múltiples nucleolos se fusionan cuando el ciliado está en inanición (Raikov, 1982), y en *Tetrahymena*, los pequeños nucleolos se fusionan en grandes agregados en la fase estacionaria de crecimiento (Raikov, 1982; 1995). Algo similar ocurre cuando el ciliado sufre una inhibición reversible de la síntesis de ARN, como en el caso de *Tetrahymena* bajo la acción de la Actinomicina D (Raikov, 1982; 1995). ¿Están estos procesos conectados de alguna forma con el enquistamiento?. Creemos que sí, ya que la inanición es el principal inductor exógeno de enquistamiento en ciliados y la fase estacionaria de cualquier curva de crecimiento se origina por escasez nutricional. Durante las etapas de hambre, las reacciones biosintéticas decrecen, y entre ellas la biosíntesis de ARN. Encontramos así paralelismos entre estos fenómenos (hambre, bloqueo biosintético) y el proceso de enquistamiento en el que ambos fenómenos están, igualmente, implicados (Gutiérrez et al., 1990).

Con respecto a observaciones, en torno a los nucleolos, durante el enquistamiento de ciliados, debemos apuntar que; en *Colpoda cucullus* (Kawakami and Yagiu, 1963), durante las fases tempranas del enquistamiento, los cuerpos esféricos electrodensos de los cuales se compone el nucleolo se fusionan unos con otros. También en este mismo ciliado, *C. cucullus* (Chessa et al., 1983), tanto en células en fase estacionaria como en prequísticos y en quistes de resistencia, el nucleolo compuesto aparece fragmentado en varios agregados.

En *Tillina magna* (Frenkel, 1992), una hora después de comenzado el

enquistamiento, el material fibrilar nucleolar incrementa su tamaño, interpretándose esto como debido a la fusión de los mismos. El material granular es visiblemente menor en células prequísticas de tres horas, pero el número de estos gránulos nucleolares incrementa en lo que la autora considera "quistes tempranos". Igualmente, la interpretación de esta observación consiste en suponer que existe una disminución temporal de los requerimientos de ARNr en células prequísticas, que posteriormente se vería restaurada por una nueva necesidad de síntesis de ARNr para la formación del quiste de resistencia (Frenkel, 1992). Aunque estas interpretaciones (en base a los escasísimos datos experimentales que se aportan en este trabajo, sobre la cinética de enquistamiento, cómo diferenciar células prequísticas, quistes tempranos y quistes maduros, etc.), nos parecen demasiado arriesgadas, damos aquí testimonio de las mismas.

Entre las 25 y 36 horas, la célula prequística de *Colpoda inflata* presenta una pared quística aún incompleta, los cilios somáticos son reabsorvidos (Martín-González et al., 1991) y se correspondería con el estado de "célula esférica roja con un halo naranja" según el estudio de la cinética de enquistamiento realizado sobre este ciliado usando un anticuerpo policlonal contra elementos de pared quística (Benítez et al., 1994). Durante este periodo de tiempo tiene lugar una extrusión macronuclear (cuerpo de extrusión), lo que significa una pérdida de material macronuclear de aproximadamente 1/3 del volumen del macronúcleo. El contenido de este cuerpo de extrusión es inespecífico, observándose en él tanto material cromatínico como nucleolar.

Al contrario de lo que expresa Frenkel (1980) a propósito de la descripción del cuerpo de extrusión en *Colpoda steinii*, el proceso de extrusión no elimina exclusivamente y selectivamente un exceso de ADNr, sino más bien es un proceso inespecífico que elimina cualquier contenido del macronúcleo; ya sea cromatina exclusivamente o cromatina más elementos nucleolares. Datos bioquímicos y autoradiográficos indican que el ADN del cuerpo de extrusión no difiere del resto del ADN-macronuclear (Raikov, 1982) y consecuentemente no puede ser un ADN específico, como el ADNr.

La formación de cuerpos de extrusión o el fenómeno de extrusión cromatínica es un hecho bastante común entre los ciliados. Normalmente ocurre durante la división macronuclear, pero también se puede dar durante el envejecimiento clonal (hemixis) en el género *Paramecium* (Raikov, 1982), y también durante el enquistamiento de algunos ciliados, entre ellos muchos colpódidos. Se ha descrito extrusión macronuclear tanto durante la división como el enquistamiento en los

siguientes colpódidos: *Colpoda maupasi*, *C. inflata* (Martín-González et al., 1991), *C. cucullus* (Kidder and Claff, 1938; Morat et al., 1981), *C. steinii* (Frenkel, 1980), *Tillina magna* (Beers, 1946; Frenkel, 1992), *T. canalifera*, *Bresslava sicaria*, *B. vorax* y *B. insidiatrix* (Burt et al., 1941). Sin embargo, en otros colpódidos no existe este fenómeno, como por ejemplo; *Colpoda aspera* (Burt et al., 1941) y *Cyrtolophosis elongata* (Díaz et al., 1995).

Existen diversas teorías sobre el significado fisiológico de esta pérdida de ADN-macronuclear durante, tanto la división como el enquistamiento. Ya en 1930, Calkins (Burt et al., 1941) lo interpretó como un proceso de "purificación", y Kidder (1933) (recogido en Burt et al., 1941) lo denominó "limpieza" del macronúcleo. Kidder and Claff (1938), consideran, a propósito de la división de *C. cucullus*, que la reorganización que implica el cuerpo de extrusión viene a sustituir la ausencia de conjugación en esta especie y otras relacionadas. Fauré-Fremiet (1953) (Raikov, 1982) supone que este proceso regula el grado de poliploidia macronuclear, por eliminación de genomas completos sobrantes, o el equilibrio cromosómico del macronúcleo, por extrusión de cromosomas extra. En *Tetrahymena thermophila* (Raikov, 1982) se ha medido el contenido de ADN del cuerpo de extrusión, y refiriéndose al contenido del micronúcleo se observa que no es un múltiplo del contenido de ADN-micronuclear, por lo que no se puede considerar, como la eliminación de genomas completos contenidos en el macronúcleo.

No vamos a discutir aquí el contenido de cada una de estas hipótesis, primero porque pensamos que no hay datos suficientes aún, y segundo porque no es el lugar para ello. Sin embargo, consideramos otra posible interpretación, que para nosotros puede ser más plausible, como es considerarlo como un mecanismo que regula la razón nucleocitoplasmática. Durante, tanto la división como el enquistamiento, existe una considerable reducción de volumen y por lo tanto la razón nucleocitoplasmática debe corregirse, reduciéndose el volumen ocupado, en el nuevo volumen citoplasmático, por el sistema nuclear (macronúcleo). Este equilibrado del nuevo volumen nuclear/volumen citoplasmático se alcanza eliminando inespecíficamente el exceso de ADN en forma de cuerpo de extrusión, junto con la reducción de volumen macronuclear por condensación cromatínica (ayudada por la deshidratación celular en el caso del enquistamiento). En general la reducción de volumen citoplasmático ligada al enquistamiento en ciliados se acompaña de condensación macronuclear (cuando hay varias masas macronucleares) o de extrusión macronuclear con o sin condensación cromatínica (cuando hay una única masa macronuclear), pues bien, se suele dar una fuerte correlación entre el volumen citoplasmático reducido y el

volumen nuclear reducido, o en otras palabras; las pérdidas de volumen citoplasmático y nuclear suelen ser equivalentes (Gutiérrez, 1985).

En células prequísticas de *C. inflata* de 36 horas y posteriores, el micronúcleo presenta la típica forma lenticular, ya descrita previamente a nivel óptico (Martín-González, et al., 1991), aunque y a pesar de este cambio morfológico no se detectan cambios importantes en su cromatina, al igual que se ha indicado en otros colpódidos (Beers, 1946; Burt et al., 1941; Chessa, 1994; Morat et al., 1981) y no colpódidos, como en hipotricos (Matsusaka and Kimura, 1981). En esta fase de enquistamiento las masas nucleolares se encuentran todas fusionadas en un único cuerpo nucleolar constituido fundamentalmente por componente fibrilar condensado, y que ocupa una gran parte del macronúcleo. La región de precursores ribosomales (región granular) se ve prácticamente anulada frente a la fibrilar que contiene los elementos preribosomales unidos a proteínas. Todo ello nos indica la ausencia de biosíntesis proteica en esta fase, y posteriores, y por lo tanto la no formación de nuevos ribosomas.

Esta fuerte condensación de la maquinaria biosintética ribosomal, junto con la alteración estructural que conlleva esta fusión nucleolar, quizá tenga su interpretación molecular en los resultados obtenidos en la electroforesis de campo pulsado (ADN nativo) de quistes de resistencia maduros. El ADN_r pudiera verse acomplejado por la parte fibrilar condensada de los cuerpos nucleolares durante la fusión, y por lo tanto verse impedido por una movilidad electroforética normal o equivalente a la de los vegetativos.

Por último, la cromatina macronuclear de un quiste maduro es similar a la presentada por el micronúcleo, indicando así su inactividad génica al igual que el micronúcleo, que es intrínseca en el mismo.

3.2. Microscopía electrónica de transmisión de cromatina aislada de vegetativos, prequísticos y quistes maduros

La aplicación de la técnica de dispersión cromatínica y su visualización por microscopía electrónica tanto a los macronúcleos aislados como células vegetativas completas de *Colpoda inflata*, reveló que la cromatina macronuclear vegetativa de este ciliado está constituida fundamentalmente por haces de fibras o cordones fibrilares. Estos cordones de fibras son de naturaleza supranucleosomal y probablemente representen regiones amplificadas del genoma macronuclear. De los cordones o haces más gruesos parten o emergen otras fibras más finas que divergen en diferentes puntos, siendo las fibras más finas, o últimas unidades fibrilares, de naturaleza

nucleosomal.

La cromatina de *Colpoda inflata* completamente dispersa es de naturaleza nucleosomal, al igual que la mayoría de la cromatina eucariota.

La distribución en haces de fibras de las hileras nucleosomales probablemente representa un fenómeno de oligotenia, quizá solo localizada en algunas regiones del genoma macronuclear del ciliado, o tal vez en todo él. Estructuras semejantes a las descritas en *C. inflata* se han encontrado, hasta este momento, sólo en otro colpodido como lo es *Bursaria ovata* (Sergejeva and Bobyleva, 1995) y también ha sido supuesta en otra especie del mismo género *B. truncatella* (Sergejeva, 1977). En el trabajo de Sergejeva and Bobyleva (1995) sobre *B. ovata* se considera que los haces de fibras, forman estructuras polinémicas locales a lo largo de la cromatina macronuclear y se estima que puede ser un caso particular del fenómeno general de politenia. No es una politenia clásica, como la presentada en los cromosomas del esbozo macronuclear en ciliados hipotricos (Prescott, 1994; Raikov, 1995) o la de los cromosomas politénicos de muchos dípteros, e igualmente, las regiones politénicas mostradas en estos colpódidos tampoco son similares a la oligotenia (politenia no clásica) presente en los cromosomas de algunas plantas (Sergejeva and Bobyleva, 1995). Por ello, se podría sugerir que esta politenia es diferente a cualquiera de las descritas en otros sistemas vivos eucariotas y tal vez sea una característica común a los macronúcleos poliploides de ciliados, pero este punto ha de ser aún suficientemente dilucidado, estudiando la cromatina de otros ciliados colpódidos y no colpódidos que presenten un genoma complejo constituido por moléculas de tamaño subcromosómico. Politenia y poliploidia podrían ser fenómenos conectados, ya que tienen funciones similares; el incrementar el material genético (Sergejeva and Bobyleva, 1995).

Tanto en *C. inflata* como en *B. ovata* se observan, en algunas micrografías, lo que podría interpretarse como horquillas y burbujas de replicación, aunque la confirmación de ello debería de pasar por algún experimento de marcaje. En *B. ovata* (Sergejeva and Bobyleva, 1995) se comparan las fibras cromatínicas de células hambrientas con las de células alimentadas, en estas últimas las regiones politénicas están formadas por fibras nucleosomales con numerosas horquillas a diferencia de lo encontrado en las primeras, las fibras son de mayor espesor y se supone que tienen histona H1 y son inactivas transcripcionalmente. Por lo tanto, existiría una correspondencia entre mayor actividad metabólica celular y una más intensa actividad replicativa.

Como se apreció por microscopía electrónica de transmisión sobre secciones ultrafinas, la cromatina de *C. inflata*, al igual que la mayoría de los ciliados, se

compone de los llamados "pequeños cuerpos" cromatínicos entrelazados por fibras de cromatina. En *B. truncatella* (Sergejeva et al., 1987; Tikhonenko et al., 1984) y *Didinium nasutum* (Karajan et al., 1995), usando la técnica de dispersión cromatínica, se ha identificado "pequeños cuerpos" como grumos o agrupaciones de fibras de 100- 200 nm de diámetro (en *B. truncatella*) y que representa cromatina transcripcionalmente inactiva. Estos grumos de cromatina pueden disgregarse o descondensarse tras incubación con tampón borato (0,1 mM) y el grado de descondensación es proporcional al tiempo de incubación. En *Didinium nasutum* (Karajan et al., 1995) se distingue un patrón de transición entre los grumos densos de cromatina y las cadenas nucleosomales (cromatina activa), siendo el estado intermedio unos gránulos de cromatina inactiva de 19-25 nm de diámetro. Cuando se incubaba con el tampón borato, de estos cuerpos densos de cromatina emergen bucles y fibras cromatínicas alrededor de los mismos, indicando que estos grumos no son más que las fibras altamente condensadas o empaquetadas.

En *Colpoda inflata* no hemos observado estos grumos, probablemente porque fueron completamente descondensados durante la incubación con el tampón borato.

En algunas de las imágenes de las fibras polinémicas obtenidas en *C. inflata* se observó que en algunos haces de fibras, estas no se dispersan linealmente sino de forma festoneada. Esta imagen nos recuerda a las obtenidas de moléculas macronucleares de tamaño génico de hipotricos como *Stylonychia mytilus* (Lipps, 1980) y *Oxytricha nova* (Lipps et al., 1982), en las que algunas moléculas se unen o acomplejan unas con otras o entre regiones de una sola originando estructuras festoneadas. Estos agregados se pueden originar *in vitro* incrementando la fuerza iónica (Lipps, 1980) o *in vivo* en la cromatina macronuclear por la interacción de regiones teloméricas de unas moléculas con otras, formando complejos multiméricos estabilizados por una proteína (Lipps et al., 1982). Ciertamente el genoma de un hipotrico es muy diferente del de un colpódido, pero se podría especular sobre la posibilidad de que las regiones unidas entre si que forman el festón podrían ser autoapareantes.

Entre las fibras polinémicas de la célula vegetativa de *C. inflata* aparecen en un número bajo, unas estructuras poligonales, generalmente de seis caras (hexagonales), que están formadas por fibras nucleosomales compactadas. Como se discutirá a continuación, esta será la principal forma en que se presenta la cromatina de los quistes de resistencia maduros en este ciliado. Estas formas de cromatina condensada podrían localizarse en los "pequeños cuerpos" cromatínicos típicos del macronúcleo vegetativo de *C. inflata*, y representaría cromatina transcripcionalmente inactiva.

En los quistes de resistencia de *C. inflata*, la cromatina macronuclear fundamentalmente se presenta, después de la aplicación de la técnica de dispersión cromatínica, en forma de cuerpos poligonales, semejantes a los observados en la cromatina de células vegetativas pero en mucha mayor cantidad. Al igual que los cuerpos poligonales vegetativos, éstos están formados por fibras nucleosomales, cuya compactación o agregación origina estas estructuras supranucleosomales.

Un intento de disgregar estas estructuras poligonales incubándolas con tampón borato (0,1 mM) durante dos horas, no alteró básicamente la configuración, obteniéndose lo mismo que con la incubación estandar (20 minutos). Una disgregación parcial se consiguió tras incubación durante la noche, y de la aplicación de este tratamiento se produjo la liberación de algunas fibras nucleosomales, lo que confirma que estas estructuras están integradas de fibras cromatínicas de naturaleza nucleosomal.

El estudio realizado sobre células prequísticas, reveló lo que se pueden considerar como formas intermedias de agregación de las fibras, antes de llegar a la forma poligonal definitiva de los quistes maduros. En prequísticos de 84 horas de *C. inflata*, que corresponderían al tercer y último estado prequístico establecido en la cinética de enquistamiento de este ciliado (Benítez et al., 1994), la cromatina macronuclear se presenta en pequeños grumos o agrupaciones irregulares que podrían constituir los centros iniciales de agregación de fibras cromatínicas, y que a partir de ellos se originarían los cuerpos poligonales.

En *Bursaria truncatella* (Sergejeva et al., 1987), durante el enquistamiento, la cromatina se compacta en lo que los autores han denominado cromonemas y distinguen dos tipos básicos dependiendo de los elementos unitarios que surgen cuando se disgregan en tampón de baja fuerza iónica. Independientemente de los elementos intermedios que surgen, todos los cromonemas se componen en último término de fibras nucleosómicas.

Los cuerpos poligonales (hexagonales) se han observado, por primera vez entre los ciliados, en dos especies del género *Bursaria* (*B. truncatella* y *B. ovata*) (Sergejeva and Bobyleva, 1988). Los autores diferencian dos tipos de lamelas hexagonales en la cromatina macronuclear prequística y quística de ambas especies; las lamelas hexagonales de tipo-I constituidas por hebras que se disponen helicoidalmente o en espiral a partir del centro del hexágono, y las lamelas de tipo-II compuestas por fragmentos cortos de fibras, junto con minicírculos y minirosetas.

El descubrimiento de estructuras similares en la cromatina quística de *C. inflata*, por una parte, confirma los resultados, publicados hace ocho años, obtenidos en las

dos especies del género *Bursaria* (Sergejeva and Bobyleva, 1988) y por otra parte, constituye la segunda vez que se describen estructuras de este tipo en un ciliado colpódido, y es la primera vez que se describen en el género *Colpoda*. De momento, solo se han descubierto en estos dos géneros de colpódidos, tanto en formas vegetativas (en pequeña cantidad) como en prequísticos y quistes de resistencia maduros (casi toda la cromatina macronuclear se encuentra en esta forma), por lo que para confirmar la posible existencia de estas estructuras entre los colpódidos y otros grupos de ciliados, o si es un proceso de organización cromatínica específico de enquistamiento, es absolutamente necesario ampliar la aplicación de la técnica de dispersión cromatínica a otros colpódidos y en general, a otros ciliados.

Sobre la posibilidad de que se tratase de artefactos originados por la técnica, debemos de decir que ello es bastante improbable por las siguientes razones; esta misma técnica ha sido utilizada anteriormente en otros ciliados, no describiéndose tales estructuras, y si fuera un artefacto, sería probable o habitual encontrarlas en muestras de cromatina. La disgregación de estos polígonos de cromatina en fibras nucleosomales demuestra su naturaleza y composición claramente.

¿Cómo se llegan a formar estos cuerpos cromatínicos hexagonales?. A continuación presentamos una posible explicación y un modelo de formación de los mismos, en base a la biofísica del ADN en soluciones concentradas y a la similaridad del proceso con otros de elevada condensación cromatínica que aparecen en otros sistemas vivos.

Un factor realmente importante en nuestro modelo es la existencia, durante el proceso de enquistamiento (Gutiérrez et al., 1990), de una considerable deshidratación celular que conlleva una apreciable pérdida de volumen citoplasmático y macronuclear, un incremento de la densidad citoplasmática, empaquetamiento de organelas y condensación cromatínica macronuclear. Esta pérdida de agua intracelular es paulatina a lo largo del proceso de enquistamiento y se hace más evidente en las últimas fases del proceso, hasta la formación del estado quiescente (quiste de resistencia) en donde la actividad metabólica es, consecuentemente, nula o muy escasa.

En la condensación cromatínica o empaquetamiento del ADN no sólo tiene una función importante la presencia de proteínas especializadas, sino también la concentración de dichas macromoléculas por unidad de volumen, ya que el valor de este parámetro, cuando es elevado, puede acarrear el ordenamiento espontáneo del ADN en fases cristalinas líquidas (Leforestier and Livolant, 1993; 1994). Se ha estimado que tanto el nucleóide bacteriano como el núcleo eucariota es un medio

denso, fluido de macromoléculas, donde la concentración de ADN puede estar dentro del rango de 50-500 mg/ml (Leforestier and Livolant, 1994), llegando hasta 800 mg/ml en las cápsidas virales maduras (Krawiec and Riley, 1990). Dentro de este rango de posibles concentraciones, el ADN forma *in vitro* tres posibles y diferentes fases cristalinas líquidas dependiendo de la concentración del polímero; la fase isotrópica, en donde las moléculas se orientan al azar. A medida que la concentración aumenta, las moléculas de ADN se ordenan en un cristal líquido de tipo colestérico y por último, cuando se alcanza una elevada concentración se obtiene la fase columnar hexagonal (Livolant, 1984; 1991; Livolant et al., 1989). Estas dos últimas fases, no solamente se obtienen *in vitro* con ADN aislado, sino también las podemos encontrar en sistemas vivos. Una organización colestérica se ha encontrado en ciertos nucleoides bacterianos, en los cromosomas de dinoflagelados, en espermatozoides de mamíferos y ciertas mitocondrias (Livolant, 1984), mientras que una organización columnar hexagonal presenta similitudes con el empaquetamiento del ADN en cápsidas virales y en la cromatina de espermatozoides (Livolant et al., 1989). Esta formación de cristales líquidos entre los seres vivos es debida básicamente a la suma del efecto de condensación (mayor concentración de ADN por unidad de volumen) y a un efecto de cristalización por deshidratación macronuclear. En el proceso de enquistamiento existen ambas; condensación cromatínica y deshidratación, que puede provocar cristalización macronuclear.

El modelo que proponemos aquí para explicar la formación de los cuerpos hexagonales se puede dividir en varias fases según el esquema que se adjunta (Fig.32). Este modelo originado de las observaciones de *C. inflata*, podría igualmente ser aplicado al género *Bursaria* o a cualquier otro ciliado con dichas estructuras cromatínicas.

En el estado vegetativo, la cromatina de *C. inflata* esta distribuida en los clásicos pequeños grumos denominados "pequeños cuerpos", éstos se encuentran interconectados entre si por fibras (polinémicas o no) de cromatina descondensada, los grumos representan estados condensados de estas mismas fibras. Cuando se induce el enquistamiento, comienza la célula a perder volumen y adopta la forma esférica, la cromatina macronuclear, en una primera fase de este modelo, comienza a experimentar el fenómeno de condensación que se traduce en un incremento de los grumos cromatínicos por fusión de grumos más pequeños y un acortamiento de las fibras intergranulares. A esta condensación de la cromatina acompaña una condensación de los componentes nucleolares, hasta que se condensan en una única masa nucleolar inactiva.

En una segunda fase del modelo, estos granos o agrupaciones de cromatina fibrilar condensada y mayores que la de los "pequeños cuerpos" de los vegetativos, comienzan, en prequísticos tardíos, a experimentar más intensamente la deshidratación. De tal manera, que los grumos esféricos o irregulares semiesféricos, al incrementar la concentración de ADN por unidad de volumen en los mismos, podrían cristalizar en formas poligonales con múltiples pequeñas caras, que al ir cristalizando por la deshidratación, se fusionan originando caras mayores hasta obtener el hexágono, que sería la última fase de este modelo y que estarían presentes en gran número en el macronúcleo del quiste maduro.

Por lo tanto, en nuestro modelo (Fig.32), podríamos distinguir al menos cuatro tipos de compactosomas (entendemos por "compactosoma" a cualquier tipo de compactación de ADN), independientemente de los nucleosomas en que se organizan las fibras cromatínicas, que también son compactosomas. Estos tipos de compactosomas serían: los "pequeños cuerpos" de las células vegetativas, los grumos o agrupaciones surgidas de la unión de dos o tres "pequeños cuerpos" cromatínicos, las agrupaciones de grumos que originan la base o el núcleo iniciador de los cuerpos poligonales y finalmente los cuerpos o lamelas hexagonales.

Para la formación de estos compactosomas no es absolutamente necesario acudir a la aparición de proteínas específicas que ayuden a la compactación, sólo la reducción de volumen y por lo tanto, incremento de la concentración junto con una cristalización inducida por la deshidratación, serían suficientes para su formación.

¿Son estos cuerpos hexagonales similares a la organización columnar hexagonal descrita para elevadas concentraciones de ADN?. Aunque existe una analogía estructural entre la organización cromatínica en la cabeza de un espermatozoide y la organización cromatínica del interior de los cuerpos hexagonales de *C. inflata*, creemos que no tienen que ser iguales ya que, la organización columnar hexagonal se origina *in vitro* sin intervención de proteína alguna, y en los ejemplos biológicos antes citados, en donde se puede dar esta organización, la cromatina esta desprovista de las histonas típicas y no presenta una estructura nucleosómica. En los cuerpos hexagonales, por el contrario, se mantiene la estructura nucleosomal.

Por todo ello, pensamos que estas formas de cristalización de cromatina, encontradas en dos ciliados colpódidos, pueden ser únicas y específicas del proceso de enquistamiento y de la cromatina macronuclear de estos ciliados.

Por último, también debemos recordar que el encontrar, tanto en el citoplasma como en el interior del macronúcleo de protozoos ciliados enquistándose, formas cristalinas o paracristalinas, es bastante común (Dallai et al., 1985; Gutiérrez and

Perez-Silva, 1983). Muy probablemente, estas estructuras se originen, igualmente por la deshidratación que sufre la célula durante la formación del quiste de resistencia.

MODELO DE FORMACIÓN DE LOS CUERPOS HEXAGONALES

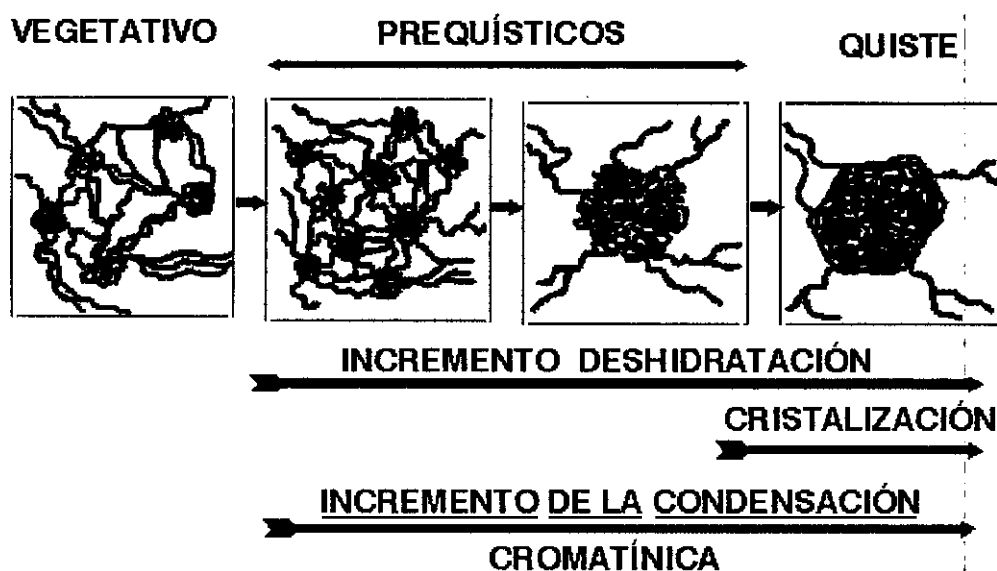


Fig.32

4. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL Y CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS ESTADOS VEGETATIVO Y QUISTICO DE *Colpoda inflata*

Del análisis de las micrografías de microscopía confocal sobre vegetativos de *C. inflata*, se confirma lo observado por microscopía electrónica de transmisión; la cromatina macronuclear vegetativa se compone de regiones más condensadas incluidas en un carioplasma de cromatina difusa. Estas imágenes se corresponden o equivalen a las obtenidas tras tinción con Feulgen (Martín-González et al., 1991) o con el fluorocromo DAPI en *C. inflata*. A su vez, las regiones más condensadas se componen de otras, de intensidad fluorescente variable, que podrían corresponder a los denominados "pequeños cuerpos", perfectamente observados por microscopía electrónica.

Por el contrario, la cromatina macronuclear de quistes maduros presenta una fluorescencia (con el YP) homogénea en toda la masa macronuclear y no se detectan

zonas "claras" o "vacías" de fluorescencia que corresponderían a regiones de cromatina fibrilar difusa no compactada. Igualmente, estas observaciones encajan con las obtenidas, tanto por microscopía electrónica de transmisión estandar como las de dispersión de cromatina, en donde se muestra la fusión de agrupaciones cromatínicas durante el enquistamiento.

A partir de estas micrografías se realizó una estimación de los volúmenes ocupados por la masa macronuclear quística y la vegetativa, y se cuantificó la pérdida de volumen experimentada durante el enquistamiento. La diferencia obtenida entre dichos volúmenes se estimó en, aproximadamente, un 65%. Este es el volumen ($322,8 \mu\text{m}^3$) que se pierde entre el estado vegetativo y quístico. Esta reducción de volumen macronuclear se corresponde, o es proporcional, a la pérdida de volumen citoplasmático o celular, que igualmente es de un 65% (Martín-González et al., 1992).

Una correspondencia igualmente estrecha entre la pérdida de volumen celular y la macronuclear, también se ha encontrado en el hipotrico *Gastrostyla steinii* (Gutiérrez, 1985). En este ciliado, la pérdida de volumen celular desde la forma vegetativa al quiste de resistencia es del orden de un 87%, mientras que la reducción de volumen macronuclear (cuatro masas macronucleares en estado vegetativo, que se fusionan originando una única masa macronuclear quística) es de un 80%, un valor equivalente al volumen celular.

En cuanto a la reducción de volumen, *C. inflata* esta en general, dentro de los márgenes establecidos para los ciliados (60-80%) (Gutiérrez et al., 1990). Si en el resto de los ciliados enquistables se establece, igualmente, una correlación entre pérdida de volumen celular y macronuclear, tan estrecha como en los dos casos mencionados, se podría establecer, por extrapolación, una regla general aplicable al enquistamiento de ciliados, en la que se podría decir que; durante el enquistamiento la reducción de volumen nuclear es proporcional a la reducción de volumen de la célula, manteniéndose así constante la razón núcleo-citoplasmática.

En la reducción del volumen nuclear podría influir, no sólo la condensación cromatínica, sino la pérdida de ADN macronuclear, en lo que se denomina el cuerpo de extrusión. No en todos los ciliados se origina, durante el enquistamiento, una pérdida visible de ADN en forma de cuerpo de extrusión, por lo que no es generalizable a todos los ciliados.

Por primera vez, en el estudio del enquistamiento de ciliados, se ha aplicado la citometría de flujo para la estimación de la cantidad de ADN total (fundamentalmente macronuclear), usando el fluorocromo DAPI, de vegetativos y quistes de resistencia maduros de *C. inflata*.

El análisis de los histogramas obtenidos nos mostró que aunque los valores de ADN total eran amplios para ambas poblaciones (vegetativos y quistes), indicando la amplitud de la heterogeneidad en los valores de ploidía macronuclear, en la población de quistes los valores son menores, lo cual se puede deber a que en la población de vegetativos encontramos células en todas las fases del ciclo crecimiento-división, por lo que la amplitud de la distribución es mayor que en una población diferenciada (quiste de resistencia).

Otra característica diferenciativa importante, es la que nos indican los valores medios del contenido de ADN de ambas poblaciones. La diferencia encontrada es de aproximadamente un 47%. Este valor diferencial probablemente representa la pérdida de ADN macronuclear causada por el cuerpo de extrusión, por lo que, si es así, el ADN extruido es el 47% del ADN total macronuclear. Este porcentaje de ADN no equivale exactamente con el volumen estimado del cuerpo de extrusión ($1/3 \approx 164 \mu\text{m}^3$) respecto del volumen del macronúcleo, pero, de hecho, no son parámetros que deben necesariamente corresponder o estar relacionados. Curiosamente, el volumen estimado para el cuerpo de extrusión es prácticamente similar al del macronúcleo del quiste maduro cuando ya se encuentra completamente condensada la cromatina.

Si no fuera por la evidencia de la aparición del cuerpo de extrusión durante el enquistamiento, la reducción en la cantidad de fluorescencia en quistes maduros se podría también interpretar como la interacción no estequiométrica "colorante-ADN", que se puede deber a una disminución en la permeabilidad celular al colorante o a un cambio conformacional del ADN que implicara una disminución de la capacidad de unión del colorante a dicha macromolécula. Ambas consideraciones son factibles en el proceso de enquistamiento, ya que la pared quística podría retener o disminuir el acceso del colorante al interior celular y además, como conocemos, el ADN macronuclear quístico se encuentra altamente condensado, por lo que podría igualmente dificultar la interacción del fluorocromo con el ADN.

Estos dos factores, y sobre todo el segundo, no deben excluirse completamente al considerar las medidas de fluorescencia de quistes maduros. Sin embargo, pensamos, que una gran parte de la disminución de fluorescencia se debe a la sustancial pérdida de ADN macronuclear que tiene lugar durante el enquistamiento de este ciliado.

El dato obtenido (un 47%) representa la pérdida de fluorescencia promedio de una población heterogénea de quistes de resistencia maduros de *C. inflata*, lo cual nos lleva a considerar que muy probablemente no todas las células pierden la misma cantidad y que ello dependerá de la cantidad de ADN macronuclear vegetativo del

que parta al enquistarse. Esto estaría de acuerdo con la consideración, aplicada a *Cucullus* (Morat et al., 1981), de que la cantidad de ADN del cuerpo de extrusión está relacionada con la de la célula prequística. Lo que, igualmente, podría estar de acuerdo con la idea de que el cuerpo de extrusión tiene la finalidad de mantener la constancia de la razón núcleo-citoplasmática celular.

Una posible y futura forma de cuantificar la pérdida génica involucrada en la formación del cuerpo del cuerpo de extrusión durante el enquistamiento, podría ser evaluando la disminución de dosis génica de un gen o genes específicos (como el ADNr) usando la técnica de PCR-cuantitativo, partiendo del mismo número de células vegetativas y quísticas, siempre y cuando supongamos que la pérdida de ADN macronuclear no sea selectiva.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Sobre la naturaleza del ADN macronuclear vegetativo y quístico de *Colpoda inflata*.

a)- El ADN macronuclear de *C. inflata*, es básicamente similar al mostrado por himenostómidos, como *Tetrahymena*, y está organizado por moléculas de tamaño subcromosómico sólo visualizables en electroforesis de campo pulsado.

b)- El tamaño promedio de las moléculas macronucleares de *C. inflata* se asemeja más al que presenta *Tetrahymena thermophila*, y se aleja del que presentan el resto de los ciliados con ADN de elevado tamaño molecular.

c)- El patrón electroforético de *C. inflata*, obtenido por electroforesis de campo pulsado es similar al mostrado por diferentes especies del género *Paramecium*; una población heterogénea y continua de moléculas de un amplio rango de tamaños. Por el contrario se diferencia sustancialmente del mostrado por diferentes especies del género *Tetrahymena*.

d)- Los genes ribosómicos de *C. inflata* se localizan en una banda discreta dentro del patrón electroforético de campo pulsado. Esta localización parece presentar cierto grado de polimorfismo, dentro del género *Colpoda*, por lo que sería una herramienta útil para la identificación de algunas especies, adicional al análisis del corticotipo.

2. Sobre los cambios en el patrón de metilación macronuclear durante el enquistamiento de *Colpoda inflata*.

a)- El genoma macronuclear de *C. inflata* parece presentar como única base metilada la 5-metilcitosina, al igual que *Blepharisma japonicum* y al contrario de lo que sucede en el resto de los ciliados, hasta ahora estudiados, no presenta 6-metiladenina.

b)- Tanto el análisis con endonucleasas de restricción como los experimentos con el agente desmetilante 5-azacitidina muestran la existencia de posibles

desmetilaciones en el ADN macronuclear, como un posible mecanismo de apertura de genes involucrados en el enquistamiento de *C. inflata*. Igualmente, la desmetilación del ADN macronuclear se realizaría por un mecanismo activo, sin la intervención de replicación del ADN.

c)- Además, durante el enquistamiento de este ciliado, existiría una metilación selectiva de genes ribosomales macronucleares.

3. Sobre el análisis estructural del macronúcleo y cromatina macronuclear durante el enquistamiento de *C. inflata*.

a)- Al igual que en la mayoría de los ciliados, la cromatina macronuclear vegetativa de *C. inflata* está constituida por numerosos cuerpos discretos de cromatina condensada, los cuales presentan una organización típica nucleosomal.

b)- El macronúcleo de *C. inflata* contiene un nucleolo compuesto, formado por numerosas masas nucleolares. Durante el proceso de enquistamiento, estas masas nucleolares se fusionan originando una única masa nucleolar sin organizadores nucleolares. De manera similar a lo que ocurre en otros procesos, en donde la inanición está presente, la fusión de nucleolos lleva consigo un cese en la biosíntesis de ARN ribosómico y, por extrapolación, un bloqueo o disminución biosintética generalizada.

c)- Durante el enquistamiento de *C. inflata*, al igual que en otros colpódidos, existe la formación de un cuerpo de extrusión de cromatina macronuclear. Esta pérdida de ADN macronuclear (estimada en un 47%) se interpreta como un mecanismo que mantiene constante la razón núcleo-citoplasmática de la célula.

d)- Por segunda vez, se ha detectado la presencia de un fenómeno de oligotenia en la cromatina macronuclear de un ciliado colpódido.

e)- La cromatina macronuclear de quistes de resistencia maduros de *C. inflata* está constituida fundamentalmente por cuerpos de estructura poligonal

(hexagonal), que, a su vez, se componen de fibras nucleosomales compactadas. El descubrimiento de estas estructuras en la cromatina quística de *C. inflata*, por una parte, confirma los resultados obtenidos en las especies del género *Bursaria*, y por otra parte, constituye la segunda vez que se describen en un ciliado colpódido, siendo la primera vez que se observan en el género *Colpoda*.

f)- Tanto los datos moleculares como los estructurales nos confirman la idea de que la cromatina macronuclear quística es transcripcionalmente inerte, y que el quiste de resistencia o estado criptobiótico es una forma genéticamente inactiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Afon'kin, S.Y. and Skovorodkin, I.N. (1987). The mating type of *Dileptus anser* clones remain unchanged after encystment- excystment. *Tsitologiya*, 29: 372-375 (En ruso, con resumen en inglés).
- Altschuler, M.I. and Yao, M.-C. (1985). Macronuclear DNA of *Tetrahymena thermophila* exists as defined subchromosomal-sized molecules. *Nucleic Acids Res.*, 13: 5817-5831
- Allito, B.A. and Karrer, K.M. (1983) A DNA rearrangement in the development of the macronúcleus of *Tetrahymena*. *J. Cell Biol.*, 97: 130A.
- Amils, R. y Abad, J.P. (1990). Genética de extremófilos mediante electroforesis de campo pulsado. En: *Microbiología 1990*. J. Casadesus y F. Ruiz-Berraquero eds. pp: 148-157
- Ammermann, D.M. (1970). The micronúcleus of the ciliate *Stylonychia mytilus*: its nucleic acid synthesis and its function. *Exp. Cell Res.*, 61: 6-12.
- Ammermann, D.M., Schlegel, M. and Hellmer, K.-H. (1989). North American and Eurasian strains of *Stylonychia lemnae* (Ciliophora, hypotrichida) have a high genetic identity, but differ in the nuclear apparatus and in their mating behavior. *Europ. J. Protistol.*, 25: 67-74.
- Ammermann, D., Steinbrück, G., Baur, R. and Wohlert, H. (1981). Methylated bases in the DNA of the ciliate *Stylonychia mytilus*. *Eur. J. Cell. Biol.*, 24: 154-156.
- Baird, S.E. and Klobutcher, L.A. (1988). Genetic characterization and use of a restriction fragment length variant in the hypotrichous ciliate *Euplotes crassus*. *J. Protozool.*, 35: 459-464.
- Ballarini, P., La Terza, A., Salvini, M., Nobili, R. and Miceli, C. (1992). Analysis of *Blepharisma japonicum* macronuclear DNA using pulse field gel electrophoresis. Italian Section Society of Protozoologists. 12 Annual meeting.
- Beers, C.D. (1946). History of the nuclei of *Tillina magna* during division and encystment. *J. Morphol.*, 78: 181-200.
- Benítez, L. (1990). Analisis del proceso criptobiótico en *Colpoda inflata*: estudio de la cinética, cambios morfogénéticos y algunos aspectos metabólicos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología (UCM).
- Benítez, L. (1995). Estrategias para el estudio de transcritos y genes específicos de enquistamiento en *Colpoda inflata*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología (UCM).
- Benítez, L., Martín-González, A. and Gutiérrez, J.C. (1991). Protein glycosylation has an important role in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. *Cell Biol. Intern. Reports*, 15: 221-228.
- Benítez, L., Martín-González, A. and Gutiérrez, J.C. (1994). Identification of precystic stages and encystment kinetics analysis of *Colpoda inflata* by using an immunofluorescent method. *J. Euk. Microbiol.*, 41: 387-391.
- Bird, A.P. (1984). DNA methylation versus gene expression. *J. Embryol. exp. Morph.* 83: 31-40.
- Bird, A.P. (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70: 5-8.
- Blackburn, E.H., Pan, W.-C. and Johnson, C.C. (1983). Methylation of ribosomal RNA genes in the macronucleus of *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.*, 11: 5131-5145.
- Bruns, P. (1986). Genetic organization of *Tetrahymena*. En: *The molecular biology of ciliated protozoa*. J.G. Gall ed., pp. 27-44. Academic Press, Orlando, Florida.
- Buckner, B., Novotny, C.P. and Ullrich, R.C. (1988). Developmental regulation of the methylation of the ribosomal DNA in the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.*, 14: 105-111.
- Burt, R.L., Kidder, G.W. and Claff, C.L. (1941). Nuclear reorganization in the family Colpodidae. *J. Morphol.*, 69: 537-561.

- Bussers, J.C. and Jeuniaux, Ch. (1974). Recherche de la chitine dans les productions metaplasmatiques de quelques ciliés. *Europ. J. Protistol.*, 10: 43-46.
- Butler, A.P., Laughlin, T.J., Codilla, C.L., Henry, J.M. and Olins, D.E. (1984). Physical structure of gene-sized chromatin from the protozoan *Oxytricha*. *Nucleic Acids Res.*, 12: 3201-3217.
- Calvo, P., Torres, A., Navas, P. and Pérez-Silva, (1983). Complex carbohydrates in the cyst wall of *Histiculus similis*. *J. General Microbiol.*, 129: 829-832.
- Calvo, P., Torres, A. and Pérez-Silva, J. (1986). Ultrastructural and cytochemical study of the encystment of hypotrichous ciliate *Histiculus similis*. *Arch. Protistenkd.*, 132: 201-211.
- Capowski, E.E., Wells, J.M., Harrison, G.S. and Karrer K.M. (1989). Molecular analysis of N⁶-methyladenine patterns in *Tetrahymena thermophila* nuclear DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2598-2605.
- Carle, G.F. and Olson, M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3756-3760.
- Caron, F. (1992). A high degree of macronuclear chromosome polymorphism is generated by variable DNA rearrangements in *Paramecium primaurelia* during macronuclear differentiation. *J. Mol. Biol.*, 225: 661-678.
- Caron, F. and Meyer, E. (1989). Molecular basis of surface antigen variation in *Paramecium*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 43: 23-42.
- Carter, N.G. (1990). Measurement of cellular subsets using antibodies. En: *Flow Citometry. A Practical Approach*. M.G. Ormerod ed. The Practical Approach Series. pp. 45-67. Oxford University Press.
- Cedar, H., (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53: 3-4.
- Conover, R.K. and Brunk, C.F. (1986). Macronuclear DNA molecules of *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.*, 6: 900-905.
- Corliss, J.O. and Esser, S.C. (1974). Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival on the free-living protozoa. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 93: 578-593.
- Counts, J.L. and Goodman J.I. (1995). Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, 83: 13-15.
- Cummings, D.J., Tait, A. and Goddard, J.M. (1974). Methylated bases in DNA from *Paramecium aurelia*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 374: 1-11.
- Chessa, M.G. (1994). The resting cysts of Colpodidae: structural aspects and functional significance. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Génova*, 58-59: 35-41.
- Chessa, M.G., Corrado, M.U.D. and Ramoino, P. (1983). Studio della fine struttura del macronucleo di *Colpoda cucullus*. Il variare del sistema nucleolare nel corso del ciclo di sviluppo. Estratto dagli Atti dell'Accademia Ligure di Scienze e Lettere, Vol. XXXX: 3-15.
- Chomet, P.S. (1991). Cytosine methylation in gene-silencing mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 31: 438-443.
- Chu, G. Vollrath, D. and Davis, R.W. (1986). Separation of charge DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234: 1582.
- Dallai, R., Luporini, P. and Miceli, C. (1985). Macronuclear inclusions in the ciliated protozoon *Euplotes*. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 104: 64-69.
- Delgado, P., Calvo, P. and Torres, A (1987). Encystment in the hipotrichous ciliate *Paraurostyla weissei*. Ultrastructure and citochemistry. *J. Protozool.*, 34: 104-110.

- Díaz, S., Martín-González, A. y Gutiérrez, J.C. (1995). Estudio morfogénico de la división y enquistamiento del ciliado colpódico *Cyrtolophosis elongata*. XV Congreso de la Sociedad Española de Microbiología (SEM).
- Doerfler, W. (1983). DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 93-124.
- Doerfler, W., Toth, M., Kochanek, S., Achten, S., Freisem-Rabien, U., Behn-Krappa, A. and Orend, G. (1990). Eucaryotic DNA methylation: facts and problems. *FEBS lett.*, 268: 329-333.
- Elliot, A.M. (1973). Life cycle and distribution of *Tetrahymena*. En: *Biology of Tetrahymena*. pp. 259-286. Dowden. Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Paris.
- Findly, R.C. and Gall, J.G. (1978). Free ribosomal RNA genes in *Paramecium* are tandemly repeated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3312-3316.
- Findly, R.C. and Gall, J.G. (1980). Organization of ribosomal genes in *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell Biol.*, 84: 547-549.
- Finnegan, E.J., Brettell, R.I.S. and Dennis, E.S. (1993). The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. En: *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. J.P. Jost and H.P. Saluz eds., pp. 218-261. Birkhäuser Verlag Basel/Suiza.
- Foissner, W. (1993). Colpodea (Ciliophora). Protozoenfauna. Dieter Matthes ed., Vol. 411. Gustav Fischer Verlag.
- Frenkel, M.A. (1980). Fine structure of the macronucleus of the active and encysted (dividing) forms of the ciliate *Colpoda steinii*. *Europ. J. Protistol.*, 16: 339-351.
- Frenkel, M.A. (1992). Fine structure of the macronucleus in the resting cysts of the ciliate *Tillina magna*. *Arch. Protistenkd.*, 141: 27-40.
- Fronk, J. and Magiera, R. (1994). DNA methylation during differentiation of a lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *Biochem. J.*, 304: 101-104.
- Giese, A. C. (1973). *Blepharisma*: the biology of a light-sensitive protozoan. Stanford Univ. Press.
- Giri, C.P., and Gorovsky, M.A. (1980). DNase I sensitivity of ribosomal genes in isolated nucleosome core particles. *Nucleic Acids Res.*, 8: 197-214.
- Gorovsky, M.A. and Keevert, J.B. (1975). The absence of histone H1 in a mitotically dividing, genetically inactive nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 2672-2676.
- Gorovsky, M.A. and Woodard, J. (1969). Studies on nuclear structure and function in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, 42: 673-682.
- Gorovsky, M. A., Hattman, S. and Pleger, G. L., (1973). (N⁶)methyl adenine in the nuclear DNA of a eukaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 56: 697-701.
- Graessmann, M. and Graessmann, A. (1993). DNA methylation, chromatin structure and the regulation of gene expression. En: *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. J.P. Jost and H.P. Saluz eds., pp. 404-424. Birkhäuser Verlag Basel /Suiza.
- Greenwood, S.J., Schlegel, M., Sogin, M.L. and Lynn, D.H. (1991). Phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum Ciliophora inferred for complete small subunit rRNA gene sequences. *J. Protozool.*, 38: 1-6.
- Grim, J.N. and Manganaro, C.A. (1985). Form of the extrusomes and secreted material of the ciliate protozoon *Pseudourostyla cristata*, with some phylogenetics interpretations: a light, scanning electron, and transmission electron microscopic study. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 104: 350-359.

- Grimes, G.W. (1973). Differentiation during encystment and excystment in *Oxytricha fallax*. J. Protozool., 20: 92-104.
- Gutiérrez, J.C. (1985). Quantitative cytochemical study of chromatin and histones on isolated macronuclear masses from the resting cyst of *Gastrostyla steinii*. Microbios, 43: 43-51
- Gutiérrez, J.C. and Martín-González, A. (1990). Evidence for protein degradation and synthesis during encystment of the ciliate *Colpoda inflata*. Microbios Letters, 43: 57-63.
- Gutiérrez, J.C. and Pérez-Silva, J. (1983). Ultrastructural aspects of the precystic and cystic cytoplasm of the hypotrichous ciliate, *Laurentiella acuminata*. Acta Protozool., 22: 203-210.
- Gutiérrez, J.C., Martín-González, A. and Matsusaka, T. (1990). Towards a generalized model of encystment (Criptobiosis) in ciliates: a review and a hypothesis. Biosystems, 24: 17-24.
- Gutiérrez, J.C., Torres, A. and Pérez-Silva, J. (1981). Excystment cortical morphogenesis and nuclear process during encystment and excystment in *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida, Oxytrichidae). Acta Protozool., 20: 145-152.
- Gutiérrez, J.C., Torres, A., and Pérez-Silva, J. (1983a). Fine structure of the cyst wall of *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida, Oxytrichidae). Trans. Am. Microsc. Soc., 102: 55-59.
- Gutiérrez, J.C., Torres, A., and Pérez-Silva, J. (1983b). Structure of the cyst wall precursors and kinetics of the appearance during the encystment of *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida, Oxytrichidae). J. Protozool., 30: 226-233.
- Gutiérrez, J.C., Torres, A. and Pérez-Silva, J. (1984). Composition of the cyst wall of the hypotrichous ciliate *Laurentiella acuminata* I. Cytochemical, Cytophotometrical, enzymatic analysis. Europ. J. Protistol., 20: 313-326.
- Harrison, G.S. and Karrer, K.M. (1985). DNA synthesis, methylation and degradation during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. Nucleic Acids Res., 13: 73-87.
- Hattman, S., Kenny, C., Berger, L. and Pratt, K. (1978). Comparative study of DNA methylation in three unicellular eucaryotes. J. Bacteriol., 135: 1156-1157.
- Hayat, M.A. (1986). Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy. Academic Press, Inc.
- Hergersberg, M. (1991). Biological aspects of cytosine methylation in eucaryote cells. Experientia, 47: 1171-1185.
- Hildebrandt, A. (1986). Methylation is an early and necessary step in the sporulation programme of the slime mold *Physarum polycephalum*. Exp. Cell. Res., 167: 271-275.
- Holt, P.A. and Chapman, G.B. (1971). The fine structure of the cyst wall of the ciliated protozoon *Didinium nasutum*. J. Protozool., 19: 604-614.
- Holliday, R. (1989). DNA methylation and epigenetic mechanisms. Cell Biophys., 15: 15-20.
- Howard, E.A. and Blackburn, E.H. (1985). Reproducible and variable genomic rearrangements occur in the developing somatic nucleus of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. Mol. Cell Biol., 5: 2039-2050.
- Isaacs, R.E., Santos, B.G. and Musils, G. (1973). Studies on nuclei of *Paramecium aurelia*. I. Isolation and purification by continuous or discontinuous sucrose gradient. Centrifugation and Biochemical Composition. J. Protozool., 20: 447-481.
- Iwamura, Y., Sakai, M., Mita, T. and Muramatsu, M. (1979). Unequal gene amplification and transcription in the macronucleus of *Tetrahymena pyriformis*. Biochemistry, 18: 5289-5294.

- Janisch, R., (1980). A freeze-etch study of the ultrastructure of *Colpoda inflata* protective cyst. *Acta Protozool.*, 19: 604-614.
- Jones, P.A. and Taylor, S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20: 85-93.
- Kaney, A.R. and Speare, V.J. (1983). An amiconucleate mutant of *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Cell Res.*, 143: 461-467.
- Katzen, A.L., Cann, G.M. and Blackburn, E.H. (1981). Sequence specific fragmentation of macronuclear DNA in a Holotrichous ciliate. *Cell*, 24: 313-320.
- Karajan, B.P., Popenko, V.I. and Raikov, I.B. (1995). Organization of transcriptionally inactive chromatin of the interphase macronucleus of the ciliate *Didinium nasutum*. *Acta Protozool.*, 34: 135-141.
- Karrer, K.M. and Gall J.G. (1976). The macronuclear ribosomal DNA of *Tetrahymena pyriformis* is a palindrome. *J. Mol. Biol.*, 104: 421-453.
- Karrer, K.M. and Stein-Gavens, S. (1990). Constancy of adenine methylation in *Tetrahymena* macronuclear DNA. *J. Protozool.*, 37: 409-414.
- Karrer, K.M. and Yao, M.-C. (1988). Transformation of *Tetrahymena thermophila* with hypermethylated rRNA genes. *Mol. Cell Biol.*, 8: 1664-1669.
- Kawakami, H. and Yagiu, R. (1963). An electron microscopical study of the change of fine structures in the ciliate, *Colpoda cucullus*, during its life cycle. II. From the preencystment stage to the early stage of the formation of the first layer of resting cyst membrane. *Zool. Mag.*, 72: 146-151 (En japonés, con resumen en inglés).
- Keilin, F.R.S. (1959). The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. Soc. London*, 150: 149-191.
- Keshet, L., Lieman-Hurwitz, J. and Cedar, H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell*, 44: 535-543.
- Kidder, G.W. and Claff, C.L. (1938). Cytological investigations of *Colpoda cucullus*. *Biol. Bull.*, 74: 178-197.
- Krawiec, S. and Riley, M. (1990). Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, 54: 502-539.
- Kwok, F.W.K. and Ng, S.F. (1989). 5-azacytidine affects the programming of expresion of the somatic nucleus of *Paramecium*. *Development*, 105: 559-568.
- Lahlafi, T. and Mètènier, G. (1991). Low molecular weight DNA in the heteromeric macronuclei of two cyrtophorid ciliates. *Biol. Cell*, 73: 79-88.
- Lawn, R., Heumann, J.M., Herrick, G. and Prescott, D.M. (1978). The gene-sized DNA molecules of *Oxytrycha*. *Quant. Biol.*, 42: 483-492. Cold Spring Harbor Symp.
- Leforestier, A. and Livolant, F. (1993). Supramolecular ordering of DNA in the cholesteric liquid crystalline phase: An ultrastructural study. *Biophys. J.*, 65: 56-72
- Leforestier, A. and Livolant, F. (1994). DNA liquid crystalline blue phases. Electron microscopy evidence and biological implications. *Liquid crystals*, 17: 651-658.
- Lion, A. and Haas, O.A. (1990). Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 188: 335-337.
- Lipps, H.J. (1980). In vitro agregation of the gene-sized DNA molecules of the ciliate *Stylonychia mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4104-4107.

- Lipps, H.J., and Morris, N.R., (1977). Chromatin structure in the nuclei of the ciliate *Stylonichia mytilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 230-234.
- Lipps, H.J., Gruijsen, W. and Prescott, D.M. (1982). Higher order DNA structure in macronuclear chromatin of the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2495-2499.
- Livolant, F. (1984). Cholesteric organization of DNA *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.*, 33: 300-311
- Livolant, A. (1991). Supramolecular organization of double-stranded DNA molecules in the columnar hexagonal liquid crystalline phase. An electron microscopic analysis using freeze-fracture methods. *J. Mol. Biol.*, 218: 165-181.
- Livolant, F., Levelut, A.M., Doucet, J. and Benoit, J.P. (1989). The highly concentrated liquid-crystalline phase of DNA is columnar hexagonal. *Nature*, 339: 724-726.
- Magiera, R. and Fronk, J. (1994). Gene-specific changes of DNA methylation accompany differentiation of the slime mold *Physarum polycephalum*. *Cell Biol. International*, 18: 907-909.
- Martín-González, A., Benítez, L. and Gutiérrez, J.C. (1991). Cortical and nuclear events during cell division and resting cyst formation in *Colpoda inflata*. *J. Protozool.*, 38: 338-44.
- Martín-González, A., Benítez, L. and Gutiérrez, J.C. (1992). Ultrastructural analysis of resting cyst and encystment in *Colpoda inflata* 2 Encystment process and a review of ciliate resting cyst classification. *Cytobios*, 72: 93-106.
- Martín-González, A., Palacios, G. and Gutiérrez, J.C. (1994). Cyst wall precursors of *Colpoda inflata*: a comparative ultrastructural study and a review of ciliate cyst wall precursors. *Cytobios*, 77: 215-223.
- Martinkina, L., Vengerov, Y. Y., Bepalova, I.A. and Tikhnenko, A.S. (1983). The structure of inactive interphase macronuclear chromatin of the ciliate *Bursaria truncatella*. Radial loops in the structure of chromatin clumps. *Eur. J. Cell Biol.*, 30: 47-53.
- Matsusaka, T. (1976). An ultrastructural study of encystment in the hypotrichous ciliate *Pleurotricha* sp. *Kumamoto J. Sci. Biol.*, 13: 13-26.
- Matsusaka, T. (1979). Effects of cycloheximide on the encystment and ultrastructure of the ciliate *Histiculus*. *J. Protozool.*, 26: 619-625.
- Matsusaka, T. and Hongo, F. (1984). Cytochemical and electrophoretic studies on the cyst wall of a ciliate, *Histiculus muscorum* Kahl. *J. Protozool.*, 31: 471-475.
- Matsusaka, T. and Kimura, S. (1981). Changes in macronuclear ultrastructure during encystment in a ciliate, *Histiculus muscorum*. *Kumamoto J. Sci. Biol.*, 15: 49-58.
- Mèlèse, T. and Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 319-324.
- Mètenier, G. and Hufschmid, J.-D. (1988). Evidence of extensive fragmentation of macronuclear DNA in two non-hypotrichous ciliates. *J. Protozool.*, 35: 71-73.
- Miller, O.L., Jr. and Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science*, 164: 955-957.
- Morat, G., Chessa, G. and Crippa-Francheschi, T. (1981). Etude de la regulation des teneurs en ADN nucléaire au cours de la reproduction végétative et L'enkystement d'attente chez le cilié *Colpoda cucullus*. *Europ. J. Protistol.*, 17: 313-329.
- Murti, K.G. and Prescott, D.M. (1970). Micronuclear ribonucleic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, 47: 460-467.

- Ng, S.F. (1986). The somatic function of the micronucleus of ciliated protozoa. En: Progress in Protistology. Vol.1, pp. 215-286. Biopress Ltd.
- Ng, S.F. (1988). Cortical positioning and the gate of oral structures during the sexual process in amiconucleate homopolar tandems of *Paramecium*. Development, 102: 587-594.
- Ng, S.F. (1989). Cytidine analogues and stomatogenic recovery in amiconucleate *Paramecium tetraurelia* and *Paramecium jenningsi*. J. Protozool., 36: 74-81.
- Noyer-Weidner, M. and Trautner, T.A. (1993). Methylation of DNA in Prokaryotes. En: DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance. J.P. Jost and H.P. Saluz eds. pp. 39-108. Birkhäuser Verlag Basel/Suiza.
- Ormerod, M.G. (1990). Analysis of DNA. En: Flow Cytometry. A Practical Approach. The Practical Approach Series. pp. 69-112. Oxford University Press.
- Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. En: Methods in Cell Biology. Z. Darzynkiewicz and H.A. Crissman eds. Vol. 33. pp. 105-110. Academic Press, Inc.
- Palacios, G., Martín-González, A. and Gutiérrez, J.C. (1994). Macronuclear DNA demethylation is involved in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. Cell Biol. International, 18: 223-227.
- Palacios, G., Benítez, L., Olmo, A., Ruiz-Pérez, L. and Gutiérrez, J.C. (1992). "Electrophoretic Karyotypes" of macronuclear DNA using CHEF system. I. *Tetrahymena* species. Europ. J. Protistol., 28: 352.
- Pasternak, J. (1967). Differential genic activity in *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool., 165: 395-418.
- Pelvat, B. and de Haller G. (1976). Macronuclear DNA in *Stentor coeruleus*: a first approach to its characterization. Genet. Res., 27: 277-289.
- Phan, H.L., Forney, J. and Blackburn, E. H. (1989). Analysis of *Paramecium* macronuclear DNA using pulsed field gel electrophoresis. J. Protozool., 36: 402-408
- Pigon, A. and Edsteöm, J.E. (1961). Encystment ability respiratory metabolism, and ribonucleic acid content in two types of resting cysts of *Colpoda cucullus* O.F. Müller. J. Protozool., 8: 257-260.
- Piras, I., Salvini, M. and Nobili, R. (1989). Macronuclear chromatin DNA of *Blepharisma japonicum*. J. Protozool., 36: 27A.
- Pratt, K. and Hattman, S., (1981). Deoxyribonucleic acid methylation and chromatin organization in *Tetrahymena thermophila*. Mol. Cell Biol., 1: 600-608.
- Preer, J.R., Jr. (1986). Surface antigens of *Paramecium*. En: The Molecular Biology of Ciliated Protozoa. J.G. Gall ed. pp. 301-339. Academic Press, Inc.
- Preer, J.R., Jr. and Preer, L.B. (1979). The size macronuclear DNA and its relationship to models for maintaining genic balance. J. Protozool., 26: 14-18.
- Prescott, D.M. (1994). The DNA of ciliated protozoa. Microbiol. Rev., 58: 233-267.
- Prescott, D.M., Bostock, C.J., Murti, K.G., Laughth, M.R. and Gamow, E. (1971). DNA of ciliated protozoa. I. Electron microscopic and sedimentation analysis of macronuclear and micronuclear DNA of *Stylonychia mytilus*. Chromosoma, 34: 355-366.
- Rae, P.M.M. and Spear, B.B., (1978). Macronuclear DNA of the hypotrichous ciliate *Oxytricha fallax*. Proc. Natn. Acad. Sci. USA. 75: 4992-4996.

- Raikov, I.B. (1982). *The Protozoan Nucleus, Morphology and Evolution*. Springer-Verlag, Viena, New York.
- Raikov, I.B. (1995). Structure and Genetic organization of the polyploid macronucleus of Ciliates: a comparative review. *Acta Protozool.*, 34: 151-171.
- Rao, M.V.N. and Prescott, D.M. (1967). Micronuclear RNA synthesis in *Paramecium caudatum*. *J. Cell Biol.*, 33: 281-285.
- Razin, A. and Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.*, 55: 451-458.
- Razin, A. and Riggs, A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science*, 210: 604.
- Ricci, N., Verni, F. and Rosati, G. (1985). The cyst of *Oxytricha bifaria* (Ciliata Hypotrichida) I. Morphology and significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 104: 70-78.
- Rios, R.M., Torres, A., Calvo, P. and Fedriani, D. (1985). The cyst of *Urostyla grandis* (Hypotrichida:Urostylidae): Ultrastructure and evolutionary implications. *Europ. J. Protistol.*, 21: 481-485.
- Ruthmann, A. and Kuck, A. (1985). Formation of the cyst wall of the ciliate *Colpoda steinii*. *J. Protozool.*, 32: 677-682.
- Salvini, M., Durante, M. and Nobili, R. (1983). Characterization of macronuclear DNA in *Blepharisma japonicum*. *Protoplasma*, 117: 82-88.
- Salvini, M., Durante, M., Citti, L. and Nobili, R. (1984). 5'Metyl-cytosine in the macronuclear DNA of *Blepharisma japonicum*. *Experientia*, 40: 1401-1403.
- Sambrook, J.C., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santi, D.V., Garret, C.E. and Barr, P.J. (1983). On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell*, 33: 9-10.
- Schütz, M. and Gafner, J. (1994). Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 253-257.
- Sendo, Y. and Matsusaka, T. (1982). Changes in two acid hydrolase levels during cyst differentiation of a ciliate, *Histiculus muscorum*. *J. Protozool.*, 29: 125-129.
- Sergejeva, G.I. (1977). On the structure of macronuclear chromatin of the ciliate *Bursaria truncatella*. *Tsitologiya*, 19: 1146-1154 (En ruso, con resumen en inglés).
- Sergejeva, G.I. and Bobyleva, N.M. (1988). The formation of cristal- like structures in somatic nucleus chromatin of *Bursaria* (Ciliophora,Protozoa) upon their preparation to a longterm resting state. *Tsitologiya*, 30: 1291-1299 (En ruso, con resumen en inglés).
- Sergejeva, G.I. and Bobyleva, N.M. (1995). Polynemic structures in the differentiated macronucleus of the ciliate *Bursaria ovata* Beers 1952. *Acta Protozool.*, 35: 115-124.
- Sergejeva, G.I., Bobyleva, N.M. and Ibrachinov, (1987). Electron microscopic study of somatic nucleus chromatin at different stages of encystment in the ciliate *Bursaria truncatella*. *Tsitologiya*, 29: 5-10. (En ruso, con resumen en inglés).
- Small, E.B. and Lynn, D.H. (1985). Phylum Ciliophora Doflein, 1901. En: *An Illustrated Guide to the Protozoa*. J.J. Lee Hutner and E.C. Boree eds. Society of Protozoologists. Allen Press, Laurence.
- Spurr, A.R. (1968). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31-43.

- Steinbrück, G., Haas, I., Kellmer, K.-H. and Ammermann, D. (1981). Characterization of macronuclear DNA in five species of ciliates. *Chromosoma*, 83: 199-208.
- Steinbrück, G., Radzikowski, S., Golembiewska-Skoczylas, M. and Sapetto-Rebow, B. (1995). Characterization of low and high molecular weight DNA in the macronucleus of the ciliate *Chilodonella steini*. *Acta Protozool.*, 34: 125-134.
- Swanton, M.T., Heumann, J.M. and Prescott, D.M. (1980). Gene-sized DNA molecules of the macronuclei in three species of hypotrichs: size distributions and absence of nicks. *Chromosoma*, 77: 217-227.
- Taylor, S.M., Constantinides, P.A. and Jones, P.A., (1984). 5-azacytidine, DNA methylation, and differentiation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 108: 115-127.
- Telle, W. and Hildebrandt, A. (1992). No evidence for DNA methylation in some differentiation specific genes of the slime mould *Physarum polycephalum* during development. *Cell Biol. International Reports*, 16: 1205-1210.
- Tibbs, J. (1966). The cyst wall of *Colpoda steinii* a substance rich in glutamic acid residues. *J. Biochem.*, 98:645-651.
- Tibbs, J. (1968). Fine structure of *Colpoda inflata* during encystment and excystment. *J. Protozool.*, 15: 725-732.
- Tibbs, J. and Marshall, B.J. (1970). Cyst wall protein synthesis and some enzyme changes on starvation and encystment in *Colpoda steinii*. *J. Protozool.*, 17: 125-128.
- Tikhonenko, A.D., Berpalova, I.A., Martinkina, L.P., Popenko, V.I. and Sergejeva, G.I. (1984). Structural organization of macronuclear chromatin of the ciliate *Bursaria truncatella* in resting cysts and excysting. *Eur. J. Cell Biol.*, 33: 37-42.
- Trendelenburg, M.F. and Puvion-Dutilleul, F. (1987). Visualizing active genes. En: *Electron microscopy in molecular biology*. J. Somerville and U. Scheer, eds., pp. 101-146. IRL Press. Oxford, U.K.
- Vengerov, Y.Y., Sergejeva, G.I., Martinkina, L.P., Bernalova, I.A., Popenko, V.I., Ryabova, R.V. and Tikhonenko, A.S., (1983). Electron microscopic and autoradiographic study of the macronuclear chromatin of *Bursaria truncatella* at different times after cell division. *Chromosoma*, 88. 328-332.
- Verni, F., Rosati, G. and Ricci, N. (1984). The cyst of *Oxytricha bifaria* (Ciliata Hypotrichida) II. The ultrastructure. *Europ. J. Protistol.*, 20: 87-95.
- Vollrath, D. and Davis, R.W. (1987). Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucleic Acids Res.*, 15: 7865.
- Wada, R.K., and Spear, B.B. (1980). Nucleosomal organization of macronuclear chromatin in *Oxytricha fallax*. *Cell Differ.*, 9: 261-268.
- Wagtendonk von W.J. (1955). Encystment and Excystment of Protozoa. En: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Vol. III. Academic Press, Inc.
- Walker, G.K. and Hoffman, J.T. (1985). An ultrastructural examination of cyst structure in the hypotrich ciliate *Gonostomun* sp. *Cytobios*, 44: 153-161.
- Walker, G.K. and Maugel, T.K. (1976). An ultrastructural investigation of encystment in hypotrich ciliates. *J. Protozool.*, 23: 21A.
- Walker, G.K. and Maugel, T.K. (1980). Encystment and excystment in hypotrich ciliates. II. *Diophrys scutum* and remarks on comparative features. *Europ. J. Protistol.*, 16: 525-531.

- Walker, G.K., Maugel, T. and Goode, D. (1975). Some ultrastructural observations on encystment in *Stylonychia mytilus* (Ciliophora: Hipotrichida). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **94**: 147-154
- Walker, G.K., Maugel, T. and Goode, D. (1980). Encystment and excystment in hipotrich ciliates. I. *Gastrostyla steinii*. *Europ. J. Protistol.*, **16**: 511-524.
- Weyer, G. (1930). Untersuchungen über die morphologie und physiologie der formwechsels der *Gastrostyla steinii*. Engelman. *Arch. Protistenkd.*, **71**: 139-228 (En alemán, con resumen en inglés).
- Wilson, T. (1990). *Confocal Microscopy*. Academic Press, London.
- Yao, M.C. and Gall, J.G. (1977). A single integrated gene for ribosomal RNA in a eukaryote *Tetrahymena pyriformis*. *Cell*, **12**: 121-132
- Yao, M.-C. and Gall, J.-G. (1979). Alteration of the *Tetrahymena* genome during nuclear differentiation. *J. Protozool.*, **26**: 10-13.
- Yao, M.-C. and Gorovsky, M.A. (1974). Comparison of the sequences of macronuclear and micronuclear DNA of *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma*, **48**: 1-18.
- Yao, M.-C., Zhu, S.-G. and Yao, C.-H. (1985). Gene amplification in *Tetrahymena*: formation of the extrachromosomal palindromic rDNA. *Mol. Cell Biol.*, **5**: 1260-1267.
- Yonezawa, F. (1985). Effects of Actinomycin-D, RNase and protein synthesis inhibitors on encystment in *Euplotes encysticus* (Ciliophora). *J. Sci. Hiroshima Univ.*, **32**: 73-82.
- Zacharias, W. (1993). Methylation of cytosine influences the DNA structure. En: *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. J.P. Jost and H.P. Saluz eds. pp. 27-38. Birkhäuser Verlag Basel/Suiza.
- Zentgraf, H., Bock, C.-T. and Schrenk, M. (1987). Chromatin spreading. En: *Electron Microscopy in Molecular Biology*. J. Sommerville and U. Scheer, eds., pp. 81-100. IRL Press. Oxford, U.K.
- Zhu, C. and Henney, H.R., (1990). DNA methylation pattern during the encystment of *Physarum flavicomum*. *Biochem. Cell Biol.*, **68**: 944-948.