

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MECANISMOS DE CONTROL BIOLÓGICO
DE LA DIVISION CELULAR EN MICROALGAS**

**SONSOLES GONZALEZ GIL
MADRID, Octubre 1994**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

"MECANISMOS DE CONTROL BIOLÓGICO
DE LA DIVISIÓN CELULAR EN MICROALGAS"

que presenta la Licenciada en
Biología Sonsoles González Gil
para optar al grado de Doctor

Madrid, Octubre 1994

Victoria López Rodas, Dra en Veterinaria y Eduardo Costas Costas, Dr en Biología, ambos Profesores Titulares de Universidad y adscritos al Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

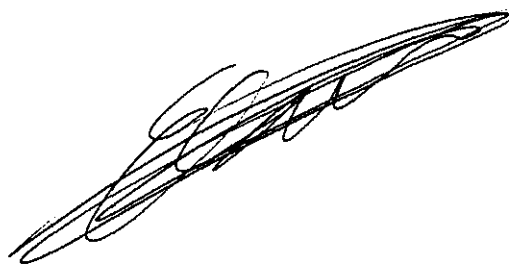
Que la Licenciada en Biología D^a Sonsoles González Gil ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Mecanismos de control biológico de la división celular en microalgas", y que el referido trabajo reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Madrid, a 25 de Octubre de mil novecientos noventa y cuatro

Los codirectores de la Tesis



Dra. Victoria López Rodas



Dr. Eduardo Costas Costas

ILMO SR. DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INDICE

1.- INTRODUCCION.....	1
1.1.- Proliferaciones masivas de organismos fitoplanctónicos	1
1.2.- Factores ecológicos.....	2
1.3.- Universalidad de los mecanismos biológicos que controlan el ciclo de división celular	3
1.4.- Ciclo celular. Factor Promotor de la Mitosis y p34 ^{cdc2} ...	5
1.5.- Ciclinas.....	10
1.6.- Regulación de la fase G2: activación del MPF y entrada en mitosis.....	11
1.7.- Desactivación del MPF: salida de la mitosis.....	14
1.8.- Regulación de la fase G1.....	17
1.9.- Regulación en organismos pluricelulares. Factores de crecimiento.....	19
1.10.- Protooncogenes.....	24
1.11.- Inhibición por contacto.....	28
1.12.- Formas de resistencia.....	29
1.13.- Justificación.....	34
1.14.- Objetivos.....	37
2.- MATERIAL Y METODOS	39
2.1.- Condiciones generales de los cultivos.....	40
2.1.1.- Aislamiento y fundación de clones.....	40
2.1.2.- Mantenimiento de los cultivos.....	41
2.1.3.- Tasas de reproducción.....	42
2.2.- Estimación del efecto de los Factores de Crecimiento sobre el Ciclo Celular de los diversos organismos.....	44
2.3.- Estimación del efecto de los Factores de Crecimiento sobre la germinación de los quistes de dinoflagelados.....	46
2.4.- Estimación del efecto de la inhibición por contacto sobre los diversos organismos.....	48
2.5.- Análisis estadístico	52
3.- RESULTADOS	53
3.1.- Resultados correspondientes al efecto de los Factores de crecimiento sobre el ciclo celular de los organismos	54
3.2.- Resultados del efecto de los Factores de Crecimiento sobre la germinación de los quistes de dinoflagelados	65

3.3.- Resultados correspondientes al efecto de la inhibición por contacto sobre los diversos organismos.....	70
4.- DISCUSION	76
5.- CONCLUSIONES	92
6.- RESUMEN	95
7.- SUMMARY	97
8.- BIBLIOGRAFIA.....	100
9.- APENDICE.....	114

INTRODUCCION

1.1- Proliferaciones masivas de organismos fitoplanctónicos

Desde hace tiempo, las proliferaciones masivas o blooms de determinados organismos fitoplanctónicos han llamado la atención por su apariencia espectacular. En general, son producidas por poblaciones muy concentradas de determinados organismos, en las que predominan una o pocas especies.

De entre las proliferaciones más conocidas, quizá las mareas rojas sean unas de las más estudiadas, no sólo por su importancia económica si no también por el problema sanitario que representan. Las mareas rojas son producidas por poblaciones de determinadas especies de dinoflagelados marinos que suelen dar lugar a que el agua cambie a un color rojizo o pardo. Normalmente estas manchas de color se limitan a la capa superficial y desaparecen en pocos días.

Aunque las mareas rojas no suelen tener otro efecto que el cambio de coloración del agua, en algunas ocasiones resultan tóxicas para ciertos organismos marinos, y a través de ellos para el hombre. Los dinoflagelados pueden llegar a alcanzar tales concentraciones en el mar (por ejemplo Prorocentrum minimum llegó a alcanzar concentraciones de $1,7 \cdot 10^9$ células l^{-1} en el fiordo de Oslo en 1979 en el transcurso de una marea roja (Tangen, 1980)) que las consecuencias ecológicas de las mareas rojas pueden llegar a ser catastróficas. Entre ellas, cabe destacar el descenso brutal en la concentración de oxígeno que se produce cuando existen semejantes concentraciones de organismos, lo que da lugar indirectamente a mortandades de peces y de otras especies marinas. Del mismo modo, a veces se producen obturaciones de las agallas de los peces debido a la acumulación de los dinoflagelados, lo que también produce la muerte del animal por asfixia (Taylor, 1987).

Sin embargo, quizá el principal problema que causan los dinoflagelados sea su capacidad de producir toxinas, no solamente cuando se encuentran en grandes concentraciones sino incluso en concentraciones aparentemente normales. Estas toxinas afectan principalmente a moluscos filtradores, aunque, en algunos países, también

afectan a peces, e indirectamente llegan a afectar al hombre cuando consume dichos moluscos. El coste económico que esto produce, tanto en la acuicultura, la pesca o incluso en el turismo, es tal que en numerosos países, incluido España, existen grandes programas de monitoring cuyo fin es el de poder predecir cuando se va producir una marea roja o cuando van a producirse episodios de toxicidad (Andersen et al., 1993; Fyllingen & Martinussen, 1993; Mariño & Maneiro, 1993; Reguera et al., 1993).

Sin embargo, no sólo los dinoflagelados sufren estos incrementos masivos en su proliferación celular, sino que otros grupos de organismos unicelulares también las sufren. Así, cabe destacar el caso de las cianofíceas entre aquellos organismos de aguas continentales que producen proliferaciones espectaculares. El grado de paralelismo con el caso de los dinoflagelados y las mareas rojas es evidente, ya que las cianofíceas, además de colorear el agua en tonos verde-azulados, también provocan episodios de toxicidad entre los animales y el hombre. Además, incrementan la cantidad de materia orgánica en las aguas profundas, acabando con el oxígeno disuelto y produciendo una considerable reducción de la biodiversidad con mortandades masivas de peces. Muchas especies de cianofíceas comunican al agua un sabor y olor desagradables impidiendo su consumo, mientras que otras especies producen potentísimas ficotoxinas (del grupo de la saxitoxina al igual que alcaloides neurotóxicos) con efectos paralizantes capaces de matar al ganado y aves acuáticas (o incluso seres humanos) que beben dichas aguas (Charmichael et al., 1990; NRA, 1991).

Tradicionalmente, todos estos procesos en los que intervienen casos anómalos (pero no por ello infrecuentes) de grandes incrementos en las tasas de división de determinados organismos, se han interpretado desde un punto de vista ecológico como fruto de complejas interacciones entre múltiples factores.

1.2- Factores ecológicos

Entre los factores ecológicos que pueden afectar a los blooms de fitoplancton destacan los factores físicos como la estratificación de la

columna de agua, las mareas, los vientos, la luz o la temperatura. Así por ejemplo, una marea roja solamente se producirá si los dinoflagelados encuentran un turbulencia relativamente baja de la masa de agua con gran estabilidad del medio (Figueiras, 1989) y temperaturas altas (Perez-Camacho, 1989).

Además, los factores nutricionales son de gran importancia ya que solamente en el caso de que existan nutrientes suficientes en el medio, podrán proliferar los organismos. Actualmente, dado el alto grado de contaminación que existe en el mundo, factores como la acuicultura, aguas residuales urbanas e industriales, la deforestación, la agricultura y la ganadería contribuyen significativamente a la eutrofización de las aguas (tanto marinas como continentales) incrementando, entre otros contaminantes, el nivel de fosfato de océanos (Hallegraeff, 1993), acequias, ríos, lagos y embalses (Alvarez et al., 1991). Es tan difícil este problema, que incluso especies que normalmente no son tóxicas (Chrysochromulina, Nitzschia pungens cf. multiseries o Prymnesium parvum) pueden llegar a producir toxicidad bajo regímenes anómalos de nutrientes como por ejemplo un deficiencia de fosfatos (Hallegraeff, 1993).

1.3- Universalidad de los mecanismos biológicos que controlan el ciclo celular

En la actualidad se piensa que los factores biológicos, propios del organismo tienen un papel determinante en el control de su propia proliferación.

En los últimos 4 años se han empezado a elaborar una serie de hipótesis sobre el modo en que todos los organismos, de cualquier nivel evolutivo, controlan su ciclo celular. Esta regulación está basada en la existencia de determinados genes, denominados genes cdc (de ciclo de división celular), que hasta el momento se han encontrado en todos los organismos eucariotas analizados (Nurse, 1990; Cantley et al., 1991; North, 1991; Moreno, 1992; Norbury & Nurse, 1992; Murray, 1993), y que responden a la acción de factores de crecimiento (Goustin et al., 1986). Por este motivo, la hipótesis que se ha desarrollado es que existe

un mecanismo de control de la división celular en todos los organismos de todos los niveles evolutivos, y que este mecanismo es un mecanismo universal (Nurse, 1990).

Cuando se empezaron a realizar este tipo de estudios ya se conocía con bastante detalle los controles que regulan la división celular de las células de mamífero. Un enfoque multidisciplinar muestra que este tipo de células, aparentemente las más evolucionadas del reino animal, controlan su crecimiento mediante 4 leyes generales (Lewin, 1987):

- 1- Dependencia de anclaje: las células necesitan una superficie sólida o firme a la cual sujetarse.
- 2- Dependencia de suero: el suero es necesario porque suministra los factores de crecimiento esenciales para el crecimiento de la célula.
- 3- Densidad de saturación o inhibición por contacto: las células crecen únicamente hasta una densidad determinada porque el crecimiento se inhibe, quizá por procesos en los que median contacto célula-célula.
- 4- Envejecimiento celular: aparentemente las células están programadas para morir después de un determinado número de divisiones, que varía de un tipo celular a otro.

Mientras, un enfoque molecular aplicado a cada uno de estos procesos ha revelado la existencia de genes de ciclo celular cuyos productos son capaces de hacer progresar éste a lo largo del tiempo dependiendo tanto de los nutrientes como de las interacciones que se producen entre las células.

El registro fósil demuestra que hace unos 3500 a 4000 millones de años existieron seres procariotas, que habitaron la Tierra durante unos 2000 millones de años, y que, evolucionando y diversificándose dieron lugar a una enorme variedad de tipos diferentes. Se puede afirmar que estos procariotas "inventaron" todas las formas posibles de aprovechamiento de los recursos para su alimentación, o lo que es lo mismo, que todas las rutas bioquímicas fundamentales fueron establecidas en ese período. Los eucariotas más primitivos aparecieron

hace unos 1000 millones de años derivados, en opinión de la mayoría de los investigadores, de estos procariotas preexistentes mediante endosimbiosis (Shopf, 1978; Margulis, 1981; Margulis & Sagan, 1985; Knoll, 1992).

El hecho de que se hayan aislado genes del ciclo de división celular en todo el reino eucariota, desde las levaduras hasta el hombre, y el que haya tal grado de homología entre todos estos genes (Nurse, 1990), no hace más que apoyar estas hipótesis.

Si todos estos organismos eucariotas tienen mecanismos de control de la división celular semejantes, ¿sería posible que, efectivamente, el control fuese universal y abarcase por tanto a microalgas que tuvieron importancia en el proceso evolutivo que dió lugar a la aparición de las primeras células eucariotas? Si esto es así, algas tan primitivas como los dinoflagelados, las clorofíceas o las diatomeas se dividirían según los mismos principios por los que se divide una célula de mamífero.

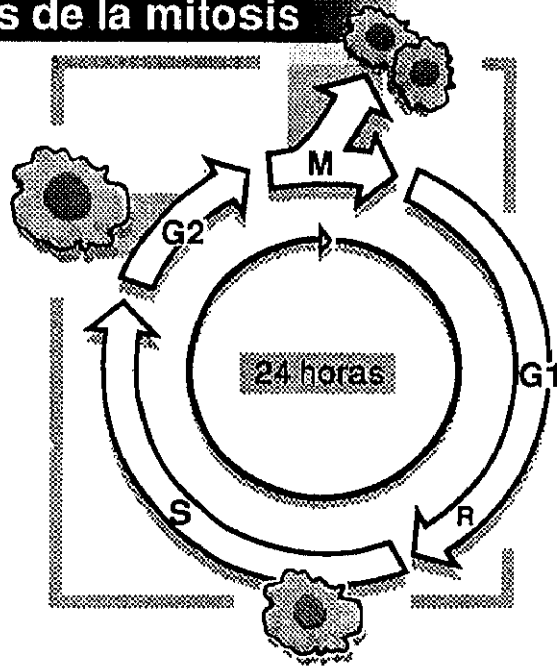
¿Cuales son estos principios que regulan el ciclo de división celular?

1.4- Ciclo celular. Factor Promotor de la Mitosis y p34^{cdc2}

El ciclo celular es el conjunto de reacciones que se desarrollan en ese proceso y consta de 2 fases bien diferenciadas: la fase S de síntesis de DNA, en la que los cromosomas se duplican; la fase M, de mitosis, en la que los cromosomas duplicados se segregan en los polos opuestos de la célula, y las fases G1 y G2 en las que las células preparan la maquinaria bioquímica necesaria para el inicio de la fase de síntesis de DNA (S) o de mitosis (M). Al final de la fase M la célula se divide en dos mediante el proceso de citocinesis. Así, un ciclo celular completo se representaría esquemáticamente de la siguiente forma: G1 S G2 M (Figura 1).

A pesar de la innumerable diversidad de organismos vivos existentes en el planeta, y de la cantidad de investigadores que centran sus

Fases de la mitosis



estudios en la regulación del ciclo celular, no ha sido hasta principios de 1990 cuando se ha puesto de manifiesto que los mecanismos básicos de control del ciclo celular son prácticamente comunes a todas las células, ya sean de organismos procariotas o de eucariotas, y que por tanto, se puede hablar de un control universal del ciclo celular (Nurse, 1990).

Tres de los organismos que más han contribuido al estudio del control de la división celular de organismos eucariotas, han sido la rana Xenopus laevis, la levadura de fisión Schizosaccharomyces pombe y la levadura de gemación Saccharomyces cerevisiae.

A principios de los años 70, Masui y Markert (1971), manipulando oocitos de Xenopus, descubrieron que cuando el citoplasma de una célula en mitosis se microinyectaba en otra célula en cualquier momento de la interfase (G1, S o G2), ésta última entraba en la fase M. Aparentemente, el citoplasma de la célula en Mitosis contenía una sustancia capaz de inducir el proceso divisor en ovocitos inmaduros. A esta sustancia se le denominó "Factor Promotor de la Mitosis" o MPF del inglés "M-phase-promoting Factor". Este factor, que no se logró aislar hasta el año 1988 (Lohka et al., 1988), es de importancia universal para las células eucariotas y ha sido altamente conservado durante la evolución, encontrándose en organismos tan distintos como mamíferos, erizos de mar, pollos, almejas, levaduras, etc. Durante cada ciclo celular, la actividad del MPF fluctua, ya que siempre es detectada en Mitosis pero nunca en Interfase.

Cuando se logró aislar y purificar este factor MPF, se vió que constaba principalmente de dos subunidades proteicas de 34 y 45 kilodaltons, y que su oscilación en cuanto a actividad dependía fundamentalmente de la síntesis de otras proteínas citoplasmáticas conocidas como ciclinas.

Paralelamente a estas investigaciones de Biología Celular, los genetistas seguían por su cuenta el estudio del ciclo celular. La base de sus trabajos eran las levaduras, hongos unicelulares que se reproducen casi tan rápidamente como las bacterias y cuyo genoma puede ser

menor del 1/100 del de un mamífero, por lo que son muy útiles a la hora de proceder a la identificación, clonaje y caracterización de los genes involucrados en el control del ciclo celular (Alberts et al., 1992).

Las dos especies utilizadas más frecuentemente son la levadura de gemación Saccharomyces cerevisiae y la levadura de fisión Schizosaccharomyces pombe. Mientras que la primera se divide asimétricamente produciendo una pequeña yema que va creciendo a lo largo del ciclo celular, la segunda se divide simétricamente por escisión en dos células hijas bastante similares. Los linajes evolutivos que condujeron a las levaduras de fisión por un lado y a las de gemación por otro, divergieron hace muchos millones de años (Pringle & Hartwell, 1981; Nurse, 1985), y a pesar de que existen diferencias evidentes respecto a su ciclo (S. pombe tiene fases G1, S, G2 y M bien definidas mientras que S. cerevisiae tiene fases G1, S y M pero no una fase G2 normal), ambas poseen ciclos similares al de las células eucariotas superiores, con fases S y M perfectamente caracterizadas (Moreno, 1992).

Gracias a estos dos organismos se empezaron a aislar lo que actualmente se conoce como genes del ciclo celular o genes cdc, genes que participan directamente en el control de la división celular, codificando productos (receptores membranales, proteínas, etc) que son indispensables en dicho control. Para la identificación de dichos genes, fué necesario el estudio de mutantes del ciclo de división celular, cuyas mutaciones afectaban específicamente a los componentes que controlan el ciclo celular, y en función de una temperatura determinada, se bloquean en una parte específica del mismo. Así, la célula no puede proceder a los pasos siguientes del ciclo.

De entre todos los mutantes analizados, la cepa cdc 2 de S. pombe destacaba porque se bloqueaba en dos puntos del ciclo celular, primero en G1, antes del inicio de la fase S y luego en G2 antes del inicio de la fase M. Por tanto, la proteína codificada por el gen cdc 2 era necesaria para que los dos procesos tuvieran lugar. Además, esta proteína tenía un peso molecular de 34 Kd. Tiempo después, se la identificó como uno de

los componentes del MPF (Hartwell et al., 1974; Nurse & Bisset, 1981; Reed et al., 1985; Doreé, 1990; Lewin, 1990), siendo llamada p34^{cdc2}.

De la misma manera se han encontrado muchos genes *cdc*, que son homólogos al *cdc2* encontrado en *S. pombe*. Así, en la levadura *S. cerevisiae* se ha encontrado el gen CDC 28 con un 63% de homología respecto al *cdc 2* (Beach et al., 1982), mientras que en humanos se ha encontrado el gen CDC 2 Hs que es capaz de llevar a cabo todas las funciones de *cdc 2* o CDC 28 en los respectivos organismos en ausencia de sus propios genes (Draetta et al., 1987; Lee & Nurse, 1987). Así mismo, se han encontrado genes homólogos a *cdc 2* funcionales en *Drosophila melanogaster* (Moreno, 1992), en plantas superiores (Hirayama et al., 1991), en algas rojas y pardas (John et al., 1989), en *Xenopus laevis* (Dunphy et al., 1988) y en estrellas de mar (Labbe et al., 1989). Hasta ahora, en todos los organismos eucariotas analizados, ya sean animales o plantas, se ha encontrado una proteína equivalente a *cdc 2*, lo que parece indicar claramente la presencia universal de esta proteína en todos los organismos eucariotas.

1.5- Ciclinas

En 1989, trabajando con embriones de almejas se descubrieron unas proteínas que, a diferencia del resto, se iban acumulando a lo largo de la interfase del ciclo celular para destruirse totalmente al final de cada mitosis (Hunt, 1989) y que por esta razón se denominaron ciclinas. Estas proteínas, de un peso molecular de 45 kd formaban parte del MPF junto con la p34^{cdc2}. Actualmente, los genes de las ciclinas ya han sido clonados en gran cantidad de organismos tan dispares como ranos, moscas, humanos y levaduras (gen *cdc 13*), por lo que su distribución también parece ser universal (Nurse, 1990; Pines & Hunter, 1990).

Hasta el momento se han identificado dos clases de ciclinas, A y B, y, aunque sus funciones no han sido todavía claramente definidas, ambas se asocian con la p34 (Hunt, 1991). Sin embargo, al parecer la ciclina B es la verdaderamente responsable de interaccionar con la p34^{cdc2} en la Mitosis, al menos en levaduras. La función de la ciclina A no está totalmente clara, pero se ha sugerido que también forma complejos con

la p34^{cdc2} (Norbury & Nurse, 1991). Otro tipo de clasificación permitiría agrupar a las ciclinas en dos grupos, ciclinas G1 y ciclinas G2, en función de si son efectores positivos de la transición G1/S o de la transición G2/M del ciclo celular respectivamente (Surana et al., 1991). Por el momento, las ciclinas G1 sólo se han descrito en la levadura S. cerevisiae, asociadas con la p34^{CDC28}, mientras que las ciclinas G2 se han encontrado prácticamente en todos los organismos estudiados. Al parecer, S. cerevisiae es el único organismo en el que las dos principales transiciones del ciclo celular (G1/S y G2/M) están reguladas por dos clases distintas de ciclinas (G1 y G2 respectivamente) en asociación con la misma subunidad catalítica (Surana et al., 1991).

Sin embargo, la asociación de las ciclinas G1 con la proteína p34 y la consiguiente activación de la actividad kinasa, es en muchos aspectos paralela a la activación de la p34 por ciclinas mitóticas (G2) (Ghiara et al., 1991), y ocurre de la misma forma en todos los organismos eucariotas estudiados (Nurse, 1990).

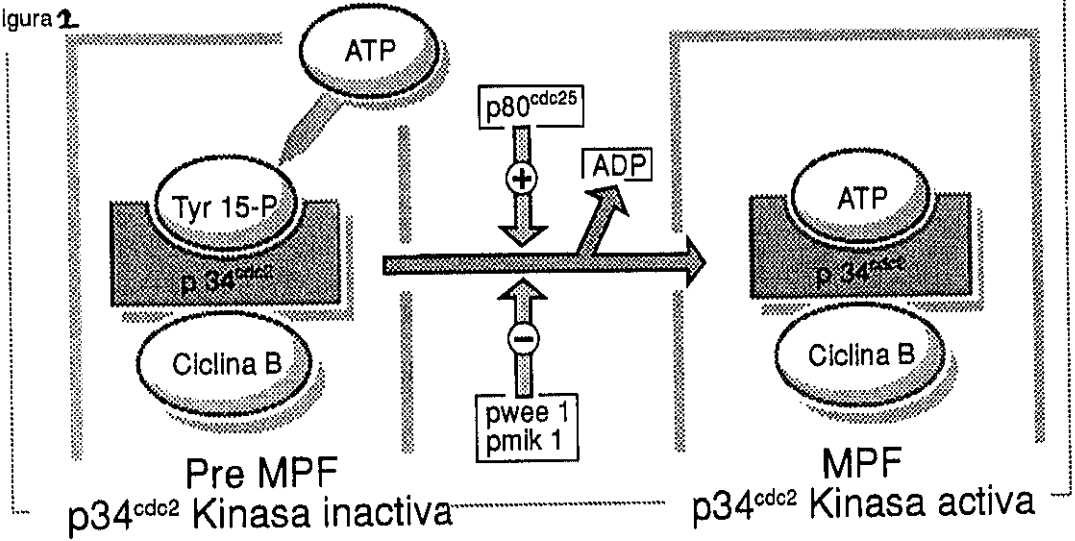
1.6- Regulación de la fase G2: Activación del MPF y entrada en la Mitosis

Así, una molécula de ciclina se asocia a otra molécula de proteína p34^{cdc2} para formar un dímero. La p34 (o su homóloga en su caso) es una proteína kinasa (pk) cuya actividad enzimática está regulada por la fosforilación del aminoácido tirosina 15: si la pk está fosforilada en dicho aminoácido, este fosfato impide la unión del ATP a ese sitio por lo que la proteína es inactiva. Consecuentemente, la desfosforilación de la p34 hace que ésta se active, mediante la estimulación de su actividad kinasa, permitiéndole entonces fosforilar a distintos efectores (Figura 2).

Hasta el momento, los organismos mejor estudiados han sido las levaduras, en especial la de fisión S. pombe. En ella, la fosforilación/desfosforilación del complejo formado por p34^{cdc2}/ciclina viene regulada por los productos de tres genes: el gen cdc 25 y los genes wee 1 y mik 1 como activador e inhibidores respectivamente de

Activación del complejo p34^{cdc2} / ciclina B

Figura 2.



la actividad kinasa (Nurse, 1990; North, 1991; Labib & Nurse, 1993; Murray, 1993).

La proteína cdc 25 es una proteína que se va acumulando a lo largo del ciclo celular hasta alcanzar una concentración tal que permite a la célula pasar del punto de inicio o start de la mitosis, punto en el que la célula entra irremediamente en la fase M, independientemente de las condiciones externas; de esta forma la proteína cdc 25 le comunica al complejo cdc 2/ciclina que la duplicación de los cromosomas (del DNA) ha terminado, es decir que la fase S ha finalizado (Kumagai & Dunphy, 1991). Recientes trabajos demuestran que la proteína cdc 25 es una fosfatasa, que al aumentar su concentración, promueve la desfosforilación de la proteína cdc 2 en la fase G2 del ciclo celular., lo que activa la actividad kinasa de esta proteína y promueve a la célula a entrar en la fase M (Moreno et al., 1990; Krek & Nigg, 1991; Labib & Nurse, 1993; Murray, 1993). El hecho de haberse encontrado genes homólogos al cdc25 de S. pombe en S. cerevisiae, Drosophila y Homo sapiens (Russell et al., 1989; Edgar & O'Farrell, 1989; Sadhu et al., 1990 respectivamente) parece confirmar todavía más la universalidad de un control de la entrada en Mitosis para todos los organismos eucariotas.

Por otro lado, los productos de los genes *wee1* y *mik1* inhiben la entrada en mitosis de la célula al impedir la desfosforilación de la p34^{cdc2}. El más estudiado de los dos es el gen *wee1*, cuya proteína es una proteína kinasa que fosforila (es decir inactiva) a la p34 in vitro (Parker et al., 1992).

Con la activación del complejo cdc2/ciclina se suceden una serie de cambios característicos de la Mitosis como resultado de la fosforilación de algunos de los sustratos de dicho complejo: así, la cdc2 fosforila a las láminas A, B y C de la membrana nuclear y a la vimentina, cuyos estados fosforilados permiten que se produzca la rotura de la membrana nuclear durante la Mitosis (Norbury & Nurse, 1992). Otro de los sustratos fosforilados es la Histona H1, que tiene gran importancia en el proceso de condensación de los cromosomas (Nurse, 1990). La fosforilación de otros sustratos como la p60^{src}, la nucleolina, el antígeno

T SV40, la RNA polimerasa II y el factor de elongación Ef-1 γ son los responsables respectivamente de la reorganización del citoesqueleto, la reorganización del nucleolo, la replicación del DNA y la inhibición de la transcripción, todos ellos procesos que se producen al inicio de la mitosis (Morgan et al., 1989; Moreno, 1992; Norbury & Nurse, 1992).

1.7- Desactivación del MPF: salida de la Mitosis

Al final de la Mitosis, en la anafase, el complejo cdc2/ciclina se inactiva por lo que los sustratos de este complejo tienen que ser desfosforilados. Hasta hace relativamente poco tiempo no se sabía exactamente cual era el proceso por el cual el complejo p34^{cdc2}/cyclina era destruido, pero una de las condiciones necesarias para ello parece ser la degradación de las ciclinas, con la consiguiente destrucción del complejo y la inactivación de la p34^{cdc2}, que entrará degradada en la siguiente interfase del próximo ciclo celular (Draetta et al., 1989; Murray & Kirschner, 1989).

En eucariotas, y particularmente en la rana Xenopus laevis, la degradación de las ciclinas se lleva a cabo mediante una "vía dependiente de ubiquitina", de una manera análoga a cómo se degradan muchas de las proteínas celulares (Luca, 1993). En este proceso, muchas copias de una molécula conocida como ubiquitina se unen covalentemente a restos de lisina de la proteína diana que va a ser destruida, de manera que sólo aquellas proteínas que estén multiubiquitinizadas serán posteriormente degradadas por una proteasa. Durante el ciclo de degradación de las ciclinas de Xenopus se han observado complejos multiubiquitinados de ciclinas, que siguen una cinética muy parecida a la de las ciclinas, acumulándose a lo largo del ciclo celular para desaparecer al final de la Mitosis.

Pero quizá lo más llamativo no sea este hecho, sino el que ciclinas procedentes de muy diversos organismos muestren una degradación dependiente de ciclo celular en extractos de Xenopus (Glotzer et al., 1991), lo que sugiere que debe existir una "estructura mínima esencial" que confiera a las ciclinas de todos los organismos la propiedad de ser degradadas vía ubiquitina.

Cuando se compararon los últimos 90 aminoácidos del extremo N-terminal de 13 ciclinas procedentes de 8 especies diferentes se observó que existía solamente un 10-20% de conservación de la secuencia. Sin embargo, en todas las ciclinas analizadas se encontró una región de 9 aminoácidos conocida como "destruction box" que era reconocida como señal por el sistema conjugador de la ubiquitina, y que contenía 4 aminoácidos altamente conservados. Además, existía otra región, nada conservada entre las ciclinas, que contenía una alta proporción de Lisinas ($\approx 17\%$) que sirve de sitio de unión a la ubiquitina.

En resumen, el control ejercido sobre el ciclo celular garantiza que todos los procesos que se dan en él ocurran de una manera correcta y puntual. Por ejemplo, la Mitosis no puede comenzar hasta que la célula ha crecido lo suficiente y la replicación de su genoma haya tenido lugar. Además, la división celular no puede ocurrir hasta que el huso mitótico haya distribuido los cromosomas entre las células hijas. La ordenación correcta de todos estos procesos se produce a través del MPF que es el complejo formado por la $p34^{cdc2}$ y las ciclinas.

La activación del MPF al inicio de la Mitosis aparece como resultado de una extensa interacción entre moléculas estimuladoras (como la $p80^{cdc25}$) e inhibitoras (como $pwee1$ y $pmik1$), que además se debe conjugar con los sistemas celulares que verifican que procesos bioquímicos como el crecimiento celular, la duplicación del centriolo y la replicación del DNA han tenido lugar correcta y previamente a la entrada en Mitosis (Hartwell & Weinert, 1989). Una vez que el MPF (o lo que es lo mismo, la $p34^{cdc2}$) es activado, la célula entra en Mitosis, lo que conlleva a una serie de procesos como la condensación de cromosomas, la reorganización del citoesqueleto, la rotura de la membrana nuclear y cambios en la morfología celular, que no necesariamente se dan en todos los eucariotas (Nurse, 1990). Finalmente, el MPF activado hace que se activen determinados enzimas que provocan la unión de la ubiquitina a las moléculas de ciclina del MPF, lo que activa la degradación de las ciclinas y la consiguiente

inactivación del MPF, induciendo a que el ciclo celular entre en la siguiente interfase, es decir que salga de la Mitosis (Figura 3).

Al mismo tiempo, todos estos hechos promueven que tenga lugar la segregación de los cromosomas, su descondensación, la formación de la membrana nuclear y por último, la citocinesis, aunque, al igual que en la Mitosis, no todos ellos tienen lugar en todos los eucariotas.

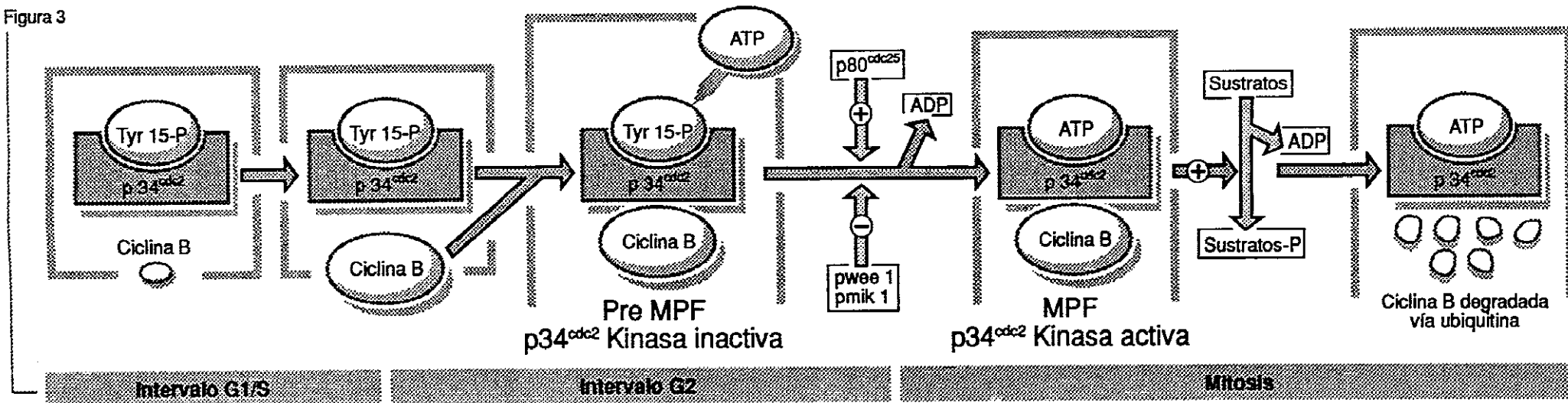
1.8- Regulación de la fase G1

Los ritmos de crecimiento de organismos sencillos de vida libre como las levaduras, dependen principalmente del aporte de nutrientes. Bajo condiciones de privación nutricional, las células hijas producidas en ciclos rápidos de división celular serían tremendamente pequeñas, debido a lo cual las células necesitan un mecanismo que les permita controlar el ritmo del progreso del ciclo de división (especialmente el cromosómico) de acuerdo con el ritmo de crecimiento celular. En las levaduras, así como en la mayor parte de los organismos eucariotas, las duraciones de las fases S (síntesis de DNA) y M (mitosis) permanecen relativamente constantes, independientemente de que las condiciones externas sean favorables o no. En cambio, la fase G1 suele ser la que se prolonga cuando las células sufren condiciones adversas, por lo que debe existir un punto crítico en la fase G1 en el que la célula pueda detenerse si el ambiente no es favorable al crecimiento (Norbury & Nurse, 1992).

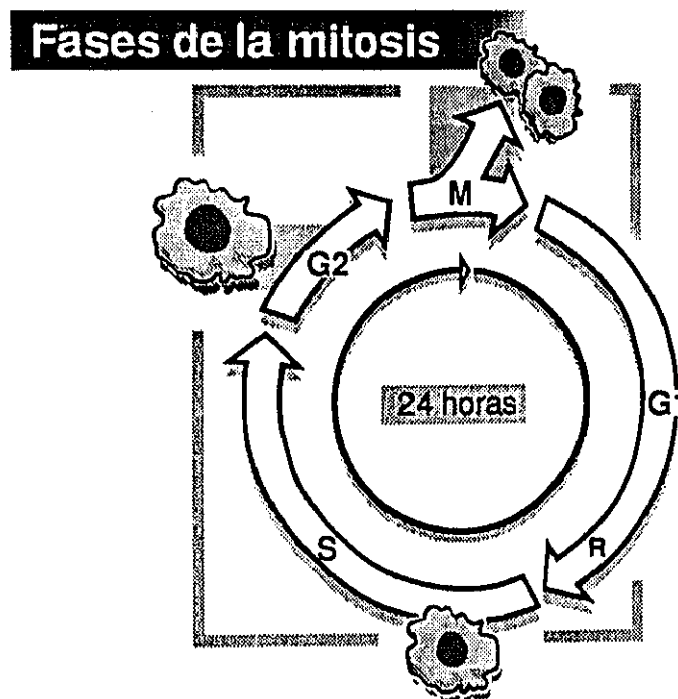
Este punto se conoce normalmente como punto de restricción R si nos referimos a células de mamífero, o punto de Inicio o Start si nos referimos al resto de las células eucariotas. Se ha postulado, y prácticamente, aceptado la existencia de un factor promotor de la fase de síntesis, que actuaría en el intervalo G1/S, concretamente en el punto de restricción (Norbury & Nurse, 1992). Tanto en levaduras como en fibroblastos de mamífero, para que se pueda pasar del punto de restricción es necesaria la presencia de la p34^{cdc2} (o su homóloga), pero cual es su función exacta permanece todavía sin describir.

Esquema general del ciclo celular

Figura 3



Una vez superado este punto de restricción, la célula continúa el resto de las fases de su ciclo celular independientemente del ambiente externo. Sin embargo, si la célula no ha podido pasar del punto R permanece en "estado quiescente" o en fase Go, como así se ha denominado al estado de la fase G1 en el que las células permanecen a la espera de que su ambiente mejore. El tiempo que las células permanecen en el estado Go depende del tipo celular de que se trate, pudiendo variar desde minutos hasta incluso años. En el hombre, por ejemplo, las neuronas o eritrocitos no se dividen nunca después de haber alcanzado la madurez. Sin embargo, las células epiteliales se dividen de forma continua y rápida a lo largo de toda la vida del organismo, completando su ciclo celular en 8 horas.



Sin embargo, las condiciones que se han de cumplir antes de que una célula crezca y se divida son considerablemente más complejas para una célula animal que para una levadura. En organismos unicelulares como las levaduras, protozoos y bacterias, existe una fuerte presión selectiva sobre cada célula individual para que crezca y se divida tan rápidamente como sea posible. De ello depende la supervivencia de la

especie o de la cepa. Por esta razón, el ritmo de división celular de este tipo de organismos sólo está limitado por el ritmo con que la célula puede tomar los nutrientes del medio y transformarlos en material celular.

Por el contrario, las células de un organismo pluricelular forman parte de un complicado conjunto celular, donde lo importante no es la supervivencia de unas pocas células sino la de todo el organismo. Por lo tanto existen complejos controles de la división celular considerablemente más complejos que los que actúan en un organismo simple como la levadura, aunque sus principios básicos sean los mismos.

1.9- Regulación en organismos pluricelulares: factores de crecimiento

El cultivo de células en el laboratorio nos ha permitido conocer cómo se produce la división celular dentro de un organismo pluricelular. Así, si a unas células de vertebrado mantenidas en un cultivo artificial se les elimina completamente el suero del medio, no pasarán del punto de restricción R y permanecerán en el estado Go, aunque tengan en el medio todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y división. Los componentes esenciales del suero son pequeños péptidos llamados factores de crecimiento, que estimulan la división celular mediante la activación de la transcripción de determinados genes. Así, cuando a células en cultivo que permanecen en un estado quiescente Go se les añade en el medio suero o algún factor de crecimiento específico, la estimulación de la división celular hace que estas células salgan de la fase Go y terminen el resto de su ciclo celular (Cross & Dexter, 1991).

Los factores de crecimiento conocidos hasta el momento tienen tres modos distintos de actuación:

- Pueden actuar de forma autocrina, mecanismo en el que los factores de crecimiento sintetizados por una célula actúan sobre la misma célula. Un ejemplo es el factor de crecimiento transformante (TGF).

- Pueden actuar de forma paracrina, en la que los factores de crecimiento secretados por una célula actúan sobre células vecinas. Como ejemplo tenemos a los factores peptídicos, como el epidérmico (EGF), y derivado de plaquetas (PDGF).
- Pueden ser endocrinos, actuando sobre células lejanas y viajando hacia ellas mediante la corriente circulante. El ejemplo más característico son las hormonas.

Las células que responden a la acción de factores de crecimiento tienen en su membrana receptores específicos para dichos factores; la gran variedad de estos factores y de sus receptores, junto con sus interacciones con células y tejidos, proporcionan un equilibrio para que se verifique de forma coordinada la proliferación celular durante el desarrollo. A menudo, la mayoría de los tipos celulares necesitan varios factores de crecimiento para conseguir una respuesta proliferativa máxima, y no sólo uno en particular, debido sobre todo a que los estímulos mitogénicos actúan en diferentes estadios del ciclo celular (James, 1984). Sin embargo, un número bastante pequeño de factores de crecimiento (aproximadamente 30), en sus distintas combinaciones, es el que regula selectivamente la proliferación de cada uno de los muchos tipos celulares de un organismo superior (Alberts et al., 1992).

El componente mayoritario del suero es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), llamado así por ser liberado por las plaquetas en un proceso de cicatrización, estimulando a las células conjuntivas a dividirse y paliando así el daño producido. La unión del PDGF y en general de cualquier factor de crecimiento a su receptor específico en la célula diana, desencadena una cascada de señales a través del citoplasma, que puede alcanzar el núcleo y alterar la expresión génica.

En particular, la unión del PDGF, el EGF, la insulina y algunas linfoquinas a sus receptores da lugar a la activación del dominio tirosin-kinasa presente en la porción citoplasmática de sus receptores respectivos (Hunter & Cooper, 1985). En el caso del receptor del PDGF, uno de los sustratos que es fosforilado (y en consecuencia activado) por la actividad kinasa es otra proteína kinasa que fosforila a un fosfolípido

presente en la membrana de la célula diana: el fosfatidil inositol (PI). Los fosfolípidos de inositol más importantes de la membrana son dos derivados (por fosforilaciones sucesivas) del PI: el PI-fosfato (PIP) y el PI-bifosfato (PIP₂), localizados ambos en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, parece que es la hidrólisis del PIP₂ la que es realmente importante en el proceso de señalización (Alberts et al., 1992) (Figura 4).

La hidrólisis del PIP₂ se produce mediante la acción enzimática de una fosfodiesterasa, la Fosfolipasa C. Los detalles del proceso de activación no son bien conocidos pero existen evidencias de que un receptor de membrana activado activa a una proteína G (denominada G_p), la cual a su vez activa a la fosfolipasa C (Cascales, 1989; Alberts et al., 1992). De esta manera, el PIP₂ es escindido en dos compuestos, el 1,4,5 trifosfato inositol (IP₃) y el diacilglicerol (DAG), que actúan como segundos mensajeros responsables de la transducción de señales que tendrá lugar a continuación desde la superficie celular hasta el núcleo.

El IP₃ es una molécula hidrosoluble que se difunde en el citoplasma y que moviliza los reservorios intracelulares de calcio (como el retículo endoplasmático), haciendo que se eleve la concentración de calcio citoplasmática. El calcio no sólo es un elemento imprescindible para la viabilidad celular, si no que la progresión a través del ciclo de división celular (G1 y Mitosis) es muy sensible a las concentraciones intracelulares de calcio. La calmodulina, el principal receptor del calcio en células eucariotas (excepto en las musculares), hace que se produzca una aceleración del ciclo celular (por acortamiento de la fase G1) con una simple elevación de su concentración intracelular. Además, en células de ratón, se ha comprobado que la concentración de calmodulina se duplica abruptamente en el límite G1/S, lo que coincide con la iniciación de la síntesis del DNA (Rasmussen & Means, 1989). Sin embargo, este aumento de calcio es transitorio, ya que el calcio es rápidamente bombeado hacia el exterior de la célula y porque el IP₃ se desfosforila (se inactiva) rápidamente.

Por su parte, el DAG es una molécula hidrofóbica que permanece por tanto cerca de la membrana plasmática. Su función principal es la

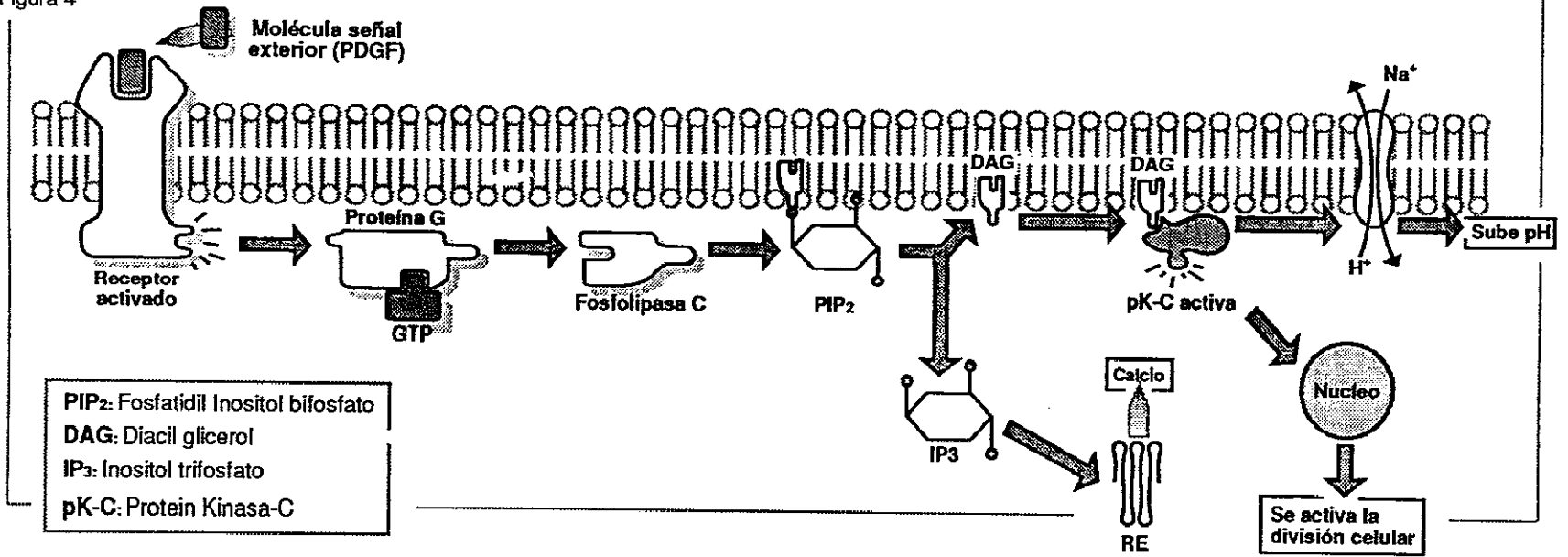
de activar a la protein kinasa C (pk C), que es dependiente de calcio y que a la vez provocará importantes cambios en el citoplasma celular: en primer lugar, es la responsable de la modificación de la actividad de varias proteínas diana, mediante la fosforilación de residuos de serina o treonina específicos. En segundo lugar, la pk C activa por fosforilación al intercambiador membranal de protones Na^+/H^+ , que hará que suba el pH intracelular, lo que en muchas células ya es una señal por sí sola inductora de proliferación (Pouyssegur et al., 1986). Las pruebas más convincentes sobre el efecto del incremento del pH intracelular en la división celular, son las producidas en fibroblastos mutantes de ratón, donde solamente un incremento de 0,2 unidades de pH sobre el pH normal de la célula, lleva a una activación de la síntesis proteica (Bravo & Mc Donald-Bravo, 1986). En otros eucariotas como protozoos y levaduras también se han observado cambios de pH intracelular durante el ciclo celular: durante el ciclo de Dictyostelium el pH oscila de acuerdo con el ciclo de replicación del DNA, en un rango de 0,1-0,3 unidades de pH debido a la salida de H^+ a través del intercambiador Na^+/H^+ (Cascales, 1989). Y en tercer y último lugar, la protein kinasa C incrementa la transcripción de determinados genes conocidos como genes tardíos, entre los que se encuentran algunos protooncogenes como c-fos, que codifica para un factor de transcripción (Curran & Franza, 1988), c-myc, cuyo producto se requiere en la replicación del DNA (Heikkilä et al., 1987) y c-jun, cuyo producto es otro factor de transcripción (Disa et al., 1989).

A partir de aquí se inicia una secuencia de acontecimientos que culminará en la síntesis de DNA y en la división celular.

Cuando las células crecen en un medio ambiente controlado, la división celular puede acelerarse, retardarse o detenerse. Existen muchos sistemas para acelerar la división celular e incluso para "mimetizar" alguno de los procesos moleculares que ocurren en un ciclo celular. A este respecto, cada una de las dos ramas del proceso de señalización mediante fosfolípidos de membrana puede ser provocado por agentes artificiales. Así, los efectos del IP_3 pueden ser mimetizados

Mecanismo de acción inducido por el PDGF y otros factores de crecimiento

Figura 4



utilizando un ionóforo de calcio o la ionomicina, los cuales permiten que el calcio entre en el citoplasma celular desde el exterior de las células. Por su parte, los efectos del DAG se mimetizan bien por derivados monoacilados del DAG o bien por ésteres de forbol, productos vegetales que entran en la célula por difusión y se unen a la proteína quinasa C activándola directamente. Curiosamente, estos ésteres de forbol son utilizados muy frecuentemente en estudios "in vitro" relacionados con la Biología del Cáncer, al ser sustancias conocidas como promotores tumorales que causan cáncer con una frecuencia bastante alta si se aplican después de un tratamiento con carcinógenos (Lamph et al., 1988).

Sin embargo, y aunque nos hemos centrado en un solo tipo de mecanismo transductor de señales que comparten muchos factores de crecimiento, existen muchas vías de señalización a través de la membrana. Una de ellas es el sistema β -adrenérgico; en el que la ocupación del receptor por el agonista produce la activación del enzima de membrana Adenilato Ciclasa, lo que produce a su vez un incremento intracelular de AMPc.

El hecho de que los distintos factores de crecimiento no actúen por el mismo mecanismo sugiere que deben existir diferentes vías de transducción de señales a través de la membrana, aunque no todas ellas han sido por el momento clarificadas (Alberts et al., 1992). La importancia de estas vías y sus mecanismos está reforzada por los recientes hallazgos que hacen suponer que ciertos protooncogenes codifican proteínas que participan en la transducción de señales (Berridge, 1987).

1.10- Protooncogenes

En los procesos fisiológicos normales proliferativos como la embriogénesis, la cicatrización, la regeneración tisular o la respuesta inmune, la división celular está regulada por factores de crecimiento y por genes y productos génicos que responden a dichos factores de crecimiento (Baserga et al., 1986; Goustin et al., 1986; Cantley et al., 1991; North, 1991). Así, toda alteración de la estructura de estas

moléculas o de su concentración originará diferentes patologías. Por ejemplo el enanismo y la diabetes son debidas respectivamente a una falta de hormona de crecimiento o de insulina. Lo mismo ocurre con cualquier modificación del número, de la función o de la afinidad de los receptores membranales: el pseudoparatiroidismo, enfermedad que se caracteriza por una caída del calcio plasmático que origina convulsiones y tetanias es debida a un fallo de las proteínas G de acoplamiento. Lo mismo ocurre en enfermedades autoinmunes como la myasthenia gravis, parálisis muscular que se produce por la fabricación por parte del enfermo de anticuerpos antireceptores de la acetil colina, por lo que la contracción muscular estará inhibida.

Una característica principal de todos los eucariotas superiores es la duración definida de la vida de cada organismo, una propiedad que se extiende a las células somáticas individuales, cuyo crecimiento y división está altamente regulado. Una excepción la constituyen las células cancerosas que se originan como variantes que han perdido su control de división normal. Existen numerosos agentes que convierten las células normales en células transformadas y se usan como sistemas modelo para el estudio de los procesos implicados en el cáncer. Numerosos descubrimientos realizados en estos últimos años proporcionan una visión inesperada sobre la naturaleza del cáncer, y permiten un mejor conocimiento del proceso. Durante años los investigadores se han preguntado qué es lo que hace que las células cancerosas se diferencien de las normales: la respuesta a este enigma a nivel molecular se ha podido obtener recientemente a partir de resultados procedentes de campos biológicos muy diversos. Los progresos realizados en todos los campos de la biología, desde las manipulaciones genéticas hasta los anticuerpos monoclonales, permiten abordar la exploración de como funcionan los genes en una célula de un organismo superior.

En general, se puede decir que la producción anormal de los factores de crecimiento, de sus receptores celulares o de sus mediadores intracelulares puede conducir a estados patológicos entre los que se incluye el cancer, en los cuales los mecanismos que gobiernan la proliferación celular están alterados. De esta forma,

cualquier gen que codifique para un factor de crecimiento, para un receptor de membrana o para una proteína reguladora de la transcripción puede ser considerado un protooncogen (Egan & Weinberg, 1993).

Así, las células transformadas carecen de las restricciones y los controles que rigen el crecimiento de las "células normales". En este sentido, estas células crecen más rápidamente que las normales al no depender de suero ni de factores de crecimiento para crecer, han perdido su capacidad de crecer en monocapa sin necesidad de una superficie sólida a la cual adherirse, e incluso no tienen fenómenos de inhibición por contacto célula-célula. Además, las células transformadas son inmortales y no alcanzan la senescencia cuando están en cultivo (Alberts et al., 1992).

Hasta ahora se han identificado más de 50 protooncogenes y todos los estudios apuntan a que la mayoría de ellos son genes que participan en el control de la división celular de cualquier célula normal. Así, la independencia de factores de crecimiento por parte de las células cancerosas o su capacidad de crecimiento ilimitado obedecería a alteraciones en cualquiera de los componentes del sistema de internalización de las señales transmitidas por factores de crecimiento: el propio factor de crecimiento, su receptor específico o su sistema de transmisión intracelular hasta el lugar de acción, entre los que se incluyen proteínas G, protein kinasas o proteínas reguladoras de la actividad génica localizadas en el núcleo.

Una característica sorprendente de este grupo de genes es que han conservado su secuencia de nucleótidos prácticamente invariable durante millones de años, y así por ejemplo el oncogen c-myc presenta una homología de más del 95% en varias de sus regiones entre la estrella de mar Asteria vulgaris y el hombre (Walker et al., 1992), a la vez que se han detectado proteínas análogas a las del oncogen c-myc en eucariotas primitivos y en praxinophyceas (Costas et al., in press a).

Lo mismo ocurre con la proteína codificada por el oncogen c-src, p60^{src}, que durante muchos años se consideró característica de células

de vertebrado, pero que recientemente se ha encontrado en Drosophila (Hunter, 1984). La proteína p60^{src} es una proteína kinasa de la membrana plasmática que fosforila residuos de tirosina en gran cantidad de proteínas diana, entre las que se incluye el receptor de la fibronectina, que cuando se encuentra fosforilado pierde la afinidad por dicha proteína dando lugar a un debilitamiento general de las adhesiones celulares y haciendo que, en último término, la célula se redondee (Hirst et al., 1986). Este hecho es una de las características que adquiere una célula cuando es transformada: no necesita una superficie a la que adherirse, su forma es redondeada y ha perdido su dependencia de anclaje.

Otro ejemplo significativo de protooncogenes conservados a lo largo de la evolución es el de la familia de los genes ras. Estos protooncogenes están relacionados con protooncogenes que codifican receptores membranales produciendo proteínas que se unen e hidrolizan GTP, indicando una estrecha relación con las proteínas G que participan en muchos de los procesos transductores de señales (Cascales, 1989). Así, los genes ras mutantes están asociados con grandes incrementos de IP₃ y DAG, de manera que hacen a la célula hipersensible a diversos factores de crecimiento como el PDGF. En un principio estos genes se identificaron en mamíferos como parte de una gran familia de genes (N-K- y H-ras) que codificaban proteínas de 21 Kd localizadas en la cara citoplasmática de la membrana celular, pero recientemente se ha caracterizado en Xenopus un c-DNA de K-ras cuya secuencia es prácticamente homóloga a su correspondiente de mamífero (Andeol et al., 1992), mientras que en la levadura de gemación S. cerevisiae se han encontrado genes homólogos a ras que participan en el control del ciclo de división celular de acuerdo con el aporte de nutrientes en el medio (Barbacid, 1987). Así mismo, en la levadura de fisión S. pombe existen genes homólogos a ras cuyos productos controlan la meiosis, la esporulación y el tamaño celular (Egan & Weinberg, 1993), mientras que en D. melanogaster los genes ras controlan el desarrollo del ojo compuesto (Perrimon, 1993).

En el DNA de levaduras, anfibios, gallinas, insectos y mamíferos se han encontrado secuencias similares a los protooncogenes que se

encuentran en humanos. Esto quiere decir que los antecesores de los protooncogenes humanos debían haber evolucionado ya hace unos 800 millones de años, cuando vivía el antecesor común de seres humanos y levaduras, ya que si los protooncogenes no desempeñasen un papel tan vital en la supervivencia celular normal, no se habrían conservado en el genoma (Knoll, 1992).

Quizá, la conclusión más general que podemos extraer sea que la transformación de células normales en cancerosas se efectúa bajo la dirección de genes cuya función normal es contribuir al crecimiento y división de las células. En realidad cualquier gen implicado directa o indirectamente en el control del crecimiento y división celular puede ser considerado un protooncogen.

El esclarecimiento de todos los mecanismos que controlan la proliferación celular normal junto con la regulación de dichos mecanismos durante procesos de diferenciación y desarrollo de organismos superiores es uno de los mayores desafíos de la investigación básica sobre el cáncer. Sin embargo no es fácil afrontar el problema en dichos organismos, por lo que se hace necesario el empleo de sistemas modelo que tengan las propiedades de las células superiores pero cuyo manejo sea más sencillo. Así, la detección, aislamiento y caracterización de los productos de los propios protooncogenes o de los genes del ciclo de división celular en dichos sistemas modelo sea un objetivo prioritario. En este sentido es de suponer que cuanto más esencial sea la función de estos componentes celulares mejor se habrán conservado durante la evolución. Por todos estos motivos, organismos como S. cerevisiae, Neurospora crassa, Dictyostellium discoideum o D. melanogaster están contribuyendo ya enormemente al entendimiento de los secretos del cáncer y de los mecanismos reguladores de la división celular en los organismos superiores.

1.11- Inhibición por contacto

La inhibición por contacto es un fenómeno tradicionalmente asociado a células animales como un mecanismo que utilizarían para

controlar su división celular. Este mecanismo se observa fácilmente en células que están mantenidas con suero en placas de cultivo de laboratorio. Estas células, normalmente fibroblastos o células epiteliales, empiezan a crecer hasta que entran en contacto unas con otras, momento en el que han formado una monocapa en toda la placa. En este instante, las células paran su crecimiento, pero si se abre una "herida" en la monocapa, es decir se crea una zona libre de células, las células que están situadas en los bordes de la herida empiezan a crecer nuevamente hasta que las células vecinas se toquen de nuevo unas con otras. Este tipo de fenómeno se conoce normalmente con el nombre de inhibición por contacto o inhibición de la división celular dependiente de densidad, y está afectado por muchos factores biológicos entre los que se incluyen la competencia por factores de crecimiento o cambios en la forma relacionados con los contactos intercelulares (Figura 5) (Alberts et al., 1992).

El crecimiento de algunos eucariotas unicelulares como las microalgas sugiere un fenómeno parecido y así, si se deposita un inóculo de una microalga en un medio de cultivo apropiado bajo condiciones ambientales idóneas, el inóculo crece de forma exponencial durante varios días hasta que alcanza la saturación (Brand et al., 1981). Tradicionalmente, se interpreta esta saturación como consecuencia del agotamiento de los nutrientes del cultivo o del acúmulo de metabolitos de deshecho.

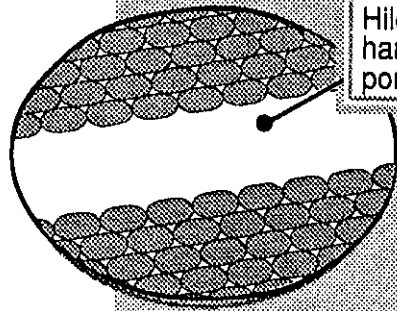
Sin embargo, es probable que dicho proceso de saturación sea un proceso más complejo de lo que aparentemente representa a simple vista, en el que además de estos factores densodependientes influyan otros mecanismos de control biológico como la inhibición por contacto o la competencia por factores de crecimiento.

1.12- Formas de resistencia

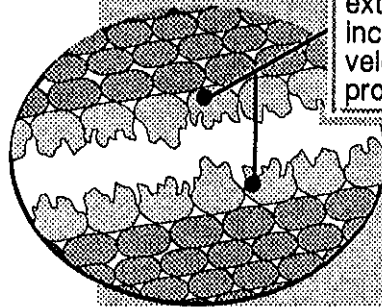
Gran cantidad de microalgas producen formas de resistencia o quistes como un mecanismo de defensa frente a determinadas condiciones adversas. De esta manera pueden aguantar grandes períodos

Inhibición por contacto

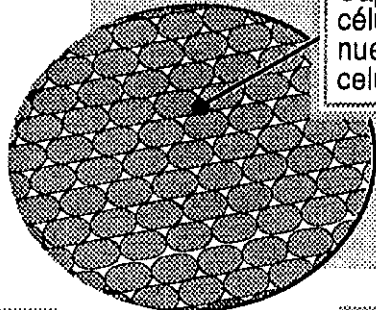
Figura 5



Hilera de células que han sido eliminadas por rascado.



Las células de los márgenes se extienden y aplanan, incrementando la velocidad de síntesis proteica.



Capa confluyente de células formada de nuevo por división celular

de tiempo en condiciones en las que la célula vegetativa no podría sobrevivir. Cuando estas condiciones ambientales mejoran y son favorables, los quistes de resistencia germinan dando de nuevo lugar a células vegetativas.

En el caso de los dinoflagelados los quistes de resistencia pueden permanecer en el sedimento marino por períodos superiores a 15 años (Blanco, 1989) y conservarse en estado perfectamente viable.

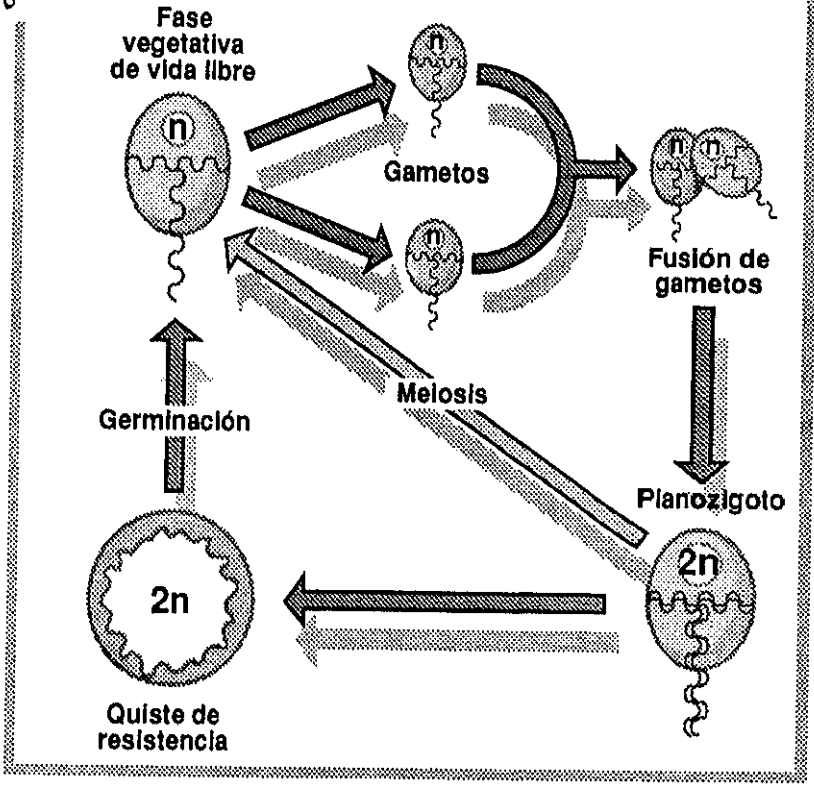
El ciclo de vida de los dinoflagelados es un ciclo característico en el que las fases diploides alternan con las haploides (Figura 6). En el caso particular de los dinoflagelados planctónicos, la fase vegetativa, de vida libre, es haploide y se reproduce asexualmente por una simple división. Solamente en determinadas condiciones ambientales la fase vegetativa se reproduce sexualmente dando lugar a un cigoto diploide o planozigoto. Estos cigotos pueden continuar su vida en el plancton hasta que sufren una meiosis para volver a dar células haploides vegetativas y planctónicas (Dale, 1983).

En algunas ocasiones, especialmente cuando las condiciones ambientales no son favorables, los cigotos pueden formar una cubierta de resistencia dando lugar a lo que se conoce como quiste de resistencia o hipnozigoto. Este quiste es extraordinariamente resistente a condiciones adversas como la desecación, condiciones reductoras en el sedimento o tratamiento con algunos ácidos, y puede permanecer viable aunque sin germinar durante períodos superiores a 15 años (Blanco, 1989). La posterior germinación de estos quistes daría de nuevo lugar a la fase de vida libre.

Gran número de autores han postulado sobre el posible papel de los quistes de resistencia en la vida de los dinoflagelados. En general y fundamentalmente, son un mecanismo de supervivencia de las especies que los producen frente a épocas claramente desfavorables. De esta forma, los quistes que pasan al sedimento pueden servir de inóculo a poblaciones que se desarrollen en años posteriores en la misma zona. Además, en el caso de que la población de células vegetativas de vida

Ciclo de vida de los dinoflagelados

Figura 6



libre desaparezca, sería una "reserva de células" que evitaría el problema de la desaparición de dicha especie (Blanco, 1989).

En segundo lugar, los quistes permiten ampliar el área de distribución de la especie por medio de su dispersión. El hecho de que sean tan resistentes permite que puedan ser transportados de una forma viable de una zona a otra en la que se pueda desarrollar la fase móvil. De hecho, esta hipótesis ha sido sugerida recientemente como una de las posibles explicaciones a la aparición de especies productoras de mareas rojas en zonas donde no habían aparecido nunca (Anderson et al., 1982; Ellegaard et al., 1993; Gosselin et al., 1993; Anderson, 1994). La resistencia de estos quistes es tan grande, que incluso se ha llegado a sugerir que el transporte de grandes masas de agua por el lastre de los barcos mercantes, conteniendo quistes de dinoflagelados tóxicos (hasta más de 300 millones de quistes en un sólo tanque), haría de inóculo inicial de una población en lugares extraordinariamente alejados de la zona original de dicha población (Anderson, 1994).

En tercer lugar, los quistes pueden ser un mecanismo de defensa contra la predación (Dale, 1983) dada la resistencia que tienen sus paredes y la tendencia de los quistes a depositarse en el sedimento.

Y en cuarto y último lugar, aunque no por ello menos importante, los quistes de resistencia y su posibilidad de actuar bajo condiciones favorables como un inóculo inicial de la columna de agua, son una de las hipótesis sobre la formación y el origen de las mareas rojas (Steidinger, 1975; Anderson & Wall, 1978; Blanco, 1989; Estrada, 1989; Rigby et al., 1993).

Una vez que las condiciones ambientales mejoran, estos quistes de resistencia pueden germinar para dar de nuevo lugar a la fase vegetativa haploide. La germinación de los quistes de dinoflagelados es un fenómeno que ha sido ampliamente estudiado, y que, tradicionalmente se acepta como el resultado de una compleja interacción entre diversos factores ambientales como la duración del día, la intensidad de la luz, la temperatura y la cantidad de nutrientes y oxígeno (Anderson, 1980). Pero la regulación de la germinación todavía es un problema que no se

ha llegado a resolver, ya que después de su formación los quistes entran en un periodo de "quiescencia" en el cual, aunque las condiciones ambientales sean idóneas, no se produce la germinación (Pfiester & Anderson, 1988). Se ha propuesto que, en una alternativa a los mecanismos ambientales, existen mecanismos biológicos que regularían esta germinación y así se han sugerido diversos mecanismos basados en la existencia de relojes endógenos (Anderson & Keafer, 1987; Costas & Varela, 1989).

1.13- Justificación

Tradicionalmente se asume que todos estos mecanismos son característicos de los organismos pluricelulares. Sin embargo, trabajos recientes hacen suponer que los mecanismos de control de la división celular y los fenómenos de inhibición por contacto y de envejecimiento pueden ser universales, quizá como consecuencia de su origen evolutivo en una fecha muy temprana, y que afectarían por tanto a todo tipo de células eucariotas (Nurse, 1990; North, 1991).

La comprensión de los procesos implicados en el control de la división celular en los organismos pluricelulares resulta más difícil debido a la complejidad que en ellos alcanzaron dichas vías. Sin embargo, esta universalidad de los mecanismos de control del ciclo de división celular puede abordarse utilizando determinados phyla de organismos unicelulares, que, aparentemente, jugaron un papel destacado en la aparición y diversificación de las células eucariotas. Estudiar dichos procesos en eucariotas más sencillos debido a su mayor simplicidad, puede permitir una visión global e integradora del fenómeno de la división celular y de los controles ejercidos sobre ella, así como una mejor comprensión de los procesos individuales que toman parte en ella. Además, si se enfocan con una perspectiva evolutiva, podrían proporcionar una valiosa información para comprender cómo se originaron estos mecanismos, y cómo se diversificaron hasta alcanzar la complejidad que tienen en los eucariotas superiores de hoy en día.

A pesar de que los estudios relativos a la regulación del ciclo celular se han realizado en una gran variedad de organismos, que abarcan desde eucariotas muy primitivos como levaduras hasta los más evolucionados como el hombre, este tipo de estudios no se ha realizado en microalgas, que sin embargo tuvieron gran importancia en el proceso evolutivo que dió lugar a la aparición de las primeras células eucariotas.

Así, intentaremos estudiar todos estos controles de la división celular, aparentemente característicos de células "evolucionadas", en organismos primitivos que tuvieron cierta importancia en la aparición y diversificación de las células eucariotas.

En primer lugar dedicaremos un especial interés a los dinoflagelados por sus peculiares características. Los dinoflagelados han sido considerados como los organismos de transición entre procariotas y eucariotas, acuñándose para ellos el término de mesocariotas (Dodge, 1965). También han sido considerados como los eucariotas más primitivos (Bujak & Williams, 1981). Más recientemente han sido considerados como una línea hermana de los actuales eucariotas, filogenéticamente paralelos a ellos, pero no sus antecesores evolutivos (Loeblich, 1976; Bujak & Williams, 1981; Herzog et al., 1984). Los dinoflagelados surgieron hace unos 800 millones de años. En este trabajo utilizaremos dinoflagelados primitivos como los prorocentrales Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge y Prorocentrum triestinum Schiller, así como dinocontas más evolucionados como Alexandrium tamarense (Halim) y Alexandrium excavata Balech.

Estudiaremos además representantes de dos grupos de verdaderos eucariotas, supuestamente primitivos: el gamofito Spirogyra insignis (Hasall) Kutz y la praxinoficea Tetraselmis suecica Stein. Además, trabajaremos con uno de los grupos eucariotas de reciente aparición: la bacillaroficea Phaeodactylum tricornutum (Bohlin).

Los gamofitos son algas verdes, de células simétricas y con cloroplastos alineados normalmente a lo largo del eje longitudinal de la célula. Todos ellos son de agua dulce, encontrándose habitualmente en aguas de estanques, lagos y ríos. Tradicionalmente, los gamofitos se clasificaban dentro del grupo de los clorófitos, siendo considerados uno de los antecesores evolutivos de las plantas superiores, pero en la actualidad se les agrupa aparte (Margulis & Schwartz, 1985). Aparecieron hace 300 millones de años.

Por su parte, las praxinofíceas se consideran parte de los clorófitos, que constituyen uno de los principales componentes del fitoplancton, estimándose que fijan más de 1000 millones de toneladas de carbono al año en los océanos y mares de agua continental. Aparecieron hace aproximadamente 1000 millones de años, siendo consideradas las algas verdes más primitivas (Margulis & Schwartz, 1985).

En tercer lugar, las diatomeas se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas iluminadas de los ecosistemas acuáticos de todo el mundo, constituyendo uno de los grupos base de las cadenas tróficas de los océanos y de las aguas continentales. Actualmente se piensa que existen unas 10 000 especies vivas, pero estos organismos aparecieron en el Cretácico (desde hace 138 a 66 millones de años) de forma que existen cientos de especies fósiles (Margulis & Schwartz, 1985).

1.14- Objetivos

En este trabajo nos planteamos que estos mecanismos de control de la proliferación celular podrían haber aparecido en una época temprana de la evolución, asociados a la aparición de las células eucariotas. Por ello nos proponemos los siguientes objetivos:

1) Estudiar desde un punto evolutivo, si microalgas representantes de grupos filogenéticos que tuvieron relativa importancia en el proceso que dió lugar a organismos pluricelulares, responden a determinados mitógenos como lo haría cualquier célula de mamífero u otro organismo eucariota más evolucionado. Durante los últimos cuatro años estos controles han sido estudiados en algunos de los organismos eucariotas más primitivos (las levaduras) y en muchos organismos de una gran variedad de phyla llegando hasta el hombre, y siendo considerados universales a todos ellos. Sin embargo, las microalgas han sido escasamente estudiadas a pesar de tener gran importancia en la escala evolutiva, especialmente en la aparición y diversificación de los primeros organismos pluricelulares.

2) Estudiaremos el crecimiento de los organismos en medios suplementados con diversos factores de crecimiento, analizando el posible papel ecológico que podrían tener dichos mitógenos en medios naturales. Tradicionalmente, la proliferación de las microalgas es un fenómeno que en el laboratorio ha sido achacado a la presencia o ausencia de determinados factores nutricionales en el medio de cultivo, mientras que en los estudios ecológicos de campo, el cese del crecimiento o los blooms proliferativos de microalgas se achacan principalmente a factores ecológicos como la ausencia o presencia de nutrientes específicos, determinadas condiciones luminosas o incluso condiciones de estabilidad en la columna de agua. Sin embargo, las últimas hipótesis al respecto apuntan hacia un control de la proliferación celular, que no sólo se basa en factores ecológicos sino también en factores biológicos, como pueden ser la presencia en el medio de factores de crecimiento o el envejecimiento celular.

3) Analizaremos si los factores de crecimiento pueden ser un mecanismo biológico de control de la germinación de determinados quistes de dinoflagelados. Si la regulación del ciclo de división celular es un mecanismo universal, y los factores de crecimiento son capaces de inducir la división celular en cigotos o en células quiescentes de mamífero quizá sean también capaces de regular la germinación de los quistes de dinoflagelados.

4) Por último analizaremos si la inhibición por contacto es otro mecanismo de regulación de la división celular presente en organismos primitivos. Hasta ahora este tipo de fenómeno había sido descrito solamente en organismos pluricelulares, y más concretamente en células evolucionadas de mamífero. Pero si el mecanismo de regulación de la división celular es universal a todas las células eucariotas, y la inhibición por contacto forma parte de este control, las algas unicelulares también podrían tenerlo.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

2.1- Condiciones generales de los cultivos

2.1.1- Aislamiento y fundación de clones

Para la realización de los experimentos se trabajó con organismos pertenecientes a niveles evolutivos muy distintos entre sí: mesocariotas (dinoflagelados) y verdaderos eucariotas (protistas como gamophyceae, praxinophyceae y bacillariophyceae).

Los dinoflagelados tuvieron una procedencia diversa: los tres clones de Prorocentrum triestinum Schiller (Pt-a, Pt-b, Pt*) fueron aislados a partir de la marea roja que tuvo lugar en Septiembre de 1983 en las costas gallegas (Costas & Varela, 1987). Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge y Alexandrium excavata Balech procedían de la colección de dinoflagelados del Instituto Español de Oceanografía de Vigo y fueron aislados en la Ría de Vigo en 1989. Por último se trabajó con dos tipos celulares distintos de Alexandrium tamarense (Halim) Balech: quistes recogidos en un sedimento arenoso de la Bahía de La Coruña en Marzo de 1991, y células vegetativas procedentes de dos clones (At-a, At-b) aisladas en la Bahía de La Coruña en Mayo de 1985.

Los protistas eucariotas Tetraselmis suecica Stein (praxinophyceae), Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) (bacillariophyceae) y Spirogyra insignis (Hasall) Kutz (gamophyceae). Las dos primeras especies se aislaron en la Ría de Vigo en 1989 y procedían de la colección del Instituto Español de Oceanografía de Vigo, mientras que S. insignis se obtuvo en 1989 a partir de una muestra de agua del Pantano de Arganda del Rey.

Todos los clones de cada especie se obtuvieron a partir de una única célula vegetativa haploide de la muestra inicial mediante una micropipeta. Dicha célula fue depositada en una placa de Petri. De esta forma es posible obtener cultivos clónicos a partir de esa única célula que, dividiéndose asexualmente, daría lugar a una población en la que todos los individuos serían genéticamente idénticos.

En el caso de la gamophyceae S. insignis el procedimiento seguido fué distinto por ser un alga filamentosa: se aisló un solo filamento de la muestra inicial mediante pinzas y se depositó en una placa de Petri. Todas las células del filamento serán genéticamente idénticas ya que proceden de una única célula inicial; en el caso de producirse reproducción sexual (conjugación) el cigoto diploide resultante daría lugar mediante meiosis a dos células idénticas a sus antecesores.

2.1.2- Mantenimiento de los cultivos

Todas las especies marinas (P. lima, P. triestinum, A. tamarense, A. excavata, T. suecica, P. tricornutum) se cultivaron en placas de Petri con 20 ml de agua de mar natural procedente de la Bahía de La Coruña enriquecida con medio f/2 de Guillard sin silicatos (Sigma).

La especie de agua dulce, Spirogyra insignis, creció en placas de Petri con 20 ml de agua dulce procedente del Pantano de Arganda, enriquecida también con medio f/2.

El medio f/2 es un medio de enriquecimiento ideal para muchas especies de microalgas, ya que les proporciona los nutrientes y vitaminas necesarias para su crecimiento (Guillard, 1975; Navarro, 1990). Su composición queda reflejada en la Tabla 1 del Apéndice.

Todos los cultivos se conservaron en cámaras de cultivo con iluminación continua de $50 \mu\text{Ein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y a una temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para mantener los cultivos en el tiempo se realizaron transferencias seriadas cada 15 días o cada mes dependiendo del organismo, de un inóculo a medio fresco, siempre en condiciones rigurosamente axénicas.

Además, y para evitar posibles contaminaciones, siempre se trabajó en cámara de flujo con medios filtrados ($0,22 \mu$ millipore) y esterilizados previamente. Como medida de seguridad, se trataron todos

los cultivos con 150 mg l⁻¹ de Penicilina y 100 mg l⁻¹ de Estreptomicina en un pulso de dos horas.

Previamente a la realización de los distintos experimentos se comprobó la inexistencia de bacterias en el cultivo mediante el uso de técnicas de epifluorescencia. Para ello se tiñe la muestra de agua con una solución de 0,1 mg ml⁻¹ de Naranja de Acridina, para posteriormente pasar la muestra por un filtro negro de 0,22μ (Millipore). Si a continuación se coloca el filtro sobre un porta y se observa al microscopio de fluorescencia, es posible comprobar si existen o no bacterias en la muestra.

2.1.3- Tasas de reproducción

Para cuantificar el crecimiento de los cultivos, se utilizó el procedimiento habitual de medir las tasas de reproducción máximas aclimatadas en divisiones día⁻¹ según la fórmula de Crow y Kimura (1970):

$$\text{div día}^{-1} = 1/\text{Ln}2 \text{ Ln}(N_t/N_0)/t$$

siendo: N_t= número de células en el tiempo t
 N₀= número de células en el tiempo 0
 t= tiempo

Además, en el caso del experimento con factores de crecimiento, se midió el crecimiento celular en densidades celulares, contando el número de células ml⁻¹ durante los días en que se efectuó la experiencia.

Tanto los dinoflagelados, como la gamophyta S. insignis y la praxinophyta T. suecica, se contaron directamente en un microscopio invertido Zeiss Axiovert.

Cuando se realiza una transferencia de algas a medio nuevo, éstas crecen de una forma exponencial, hasta un momento en el que la falta

de nutrientes o fenómenos densodependientes limitan su crecimiento (Alberts et al., 1992; Costas et al., 1993). Entonces, las algas se empiezan a dividir sexualmente formando cigotos o quistes diploides y disminuyendo de esta manera la población, pudiendo incluso llegar a desaparecer. Es por ello por lo que el conteo de células se realizó siempre durante los 10 primeros días después de la transferencia, tiempo estimado en el que el cultivo crece exponencialmente (Brand et al., 1981).

El número de conteos a realizar en cada caso se estimó mediante la Técnica de las Medias Progresivas de Williams (1977), obteniéndose un error inferior al 5% en todos los casos.

2.2- Estimación del efecto de los factores de crecimiento sobre el ciclo celular de los distintos organismos.

Para cuantificar el efecto que producían distintos factores de crecimiento así como un mitógeno artificial (éster de forbol), sobre el crecimiento de diversas microalgas unicelulares pertenecientes cada una de ellas a un nivel evolutivo diferente. Así, se analizaron las siguientes especies: P. lima, S. insignis, T. suecica y P. tricornutum.

Tres replicados de cada especie crecieron en placas de Petri con 20 ml de medio artificial ASPM en el caso de ser organismos marinos o en agua destilada en el caso de ser dulceacuícolas. Ambos medios se suplementaron con un enriquecimiento f/2 (Sigma) sin silicatos. El ASPM es un medio artificial empleado habitualmente como sustituto del agua de mar. Dado que se conocen todos sus componentes, es un medio ideal para poder discernir de una manera precisa el efecto de cualquier compuesto que se añada al medio sobre los organismos presentes en él. Esto no sería posible si se emplease agua de mar natural, ya que podría poseer sustancias (factores de crecimiento, metabolitos de excreción de otros organismos, sustancias tóxicas, etc) que interferirían en el crecimiento de las microalgas. La composición del ASPM queda reflejada en la Tabla 2 del Apéndice.

De la misma manera, el agua destilada es un medio frecuentemente utilizado con organismos de agua dulce como sustituta del agua dulce de procedencia natural.

Para estimar el efecto producido por los factores de crecimiento, el medio de cultivo fué suplementado con diversos factores de crecimiento y mitógenos artificiales en las concentraciones que se indican a continuación:

- 1- Un control en ASPM f/2 o en agua destilada f/2 para organismos marinos y dulceacuícolas respectivamente (A).
- 2- A + 10 ng/ml de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas PDGF (SIGMA).

3- A + 10 ng/ml del ester de forbol Monoacetato 12 de Forbol (PMA) (SIGMA).

4- A + 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) (FLUKA).

Los organismos así cultivados se mantuvieron en cámaras de cultivo con una temperatura constante de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, un régimen de iluminación de 12:12 hr Luz-Oscuridad y una intensidad luminosa de $50 \mu\text{Ein m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Finalmente, se hallaron las tasas de reproducción máximas aclimatadas en divisiones día^{-1} mediante la fórmula de Crow y Kimura anteriormente mencionada.

En una segunda prueba, se trataron varios dinoflagelados con los mismos factores de crecimiento. El grupo de los dinoflagelados es uno de los grupos filogenéticos más controvertido, siendo considerados organismos intermediarios entre procariotas y eucariotas (Dodge, 1965) o antecesores evolutivos de los eucariotas actuales (Bujak & Williams, 1981). Por ello, un mayor estudio de su ciclo de vida así como de las rutas que controlan su ciclo de división celular podría aportar interesantes avances en su posición filogenética.

De este modo, trabajamos con dos especies de dinoflagelados: el prorocentral *P. triestinum* y el dinoconta *A. tamarense*. Tres replicados de cada clon (Pt-a, Pt-b, Pt-*, At-a, At-b) crecieron en las mismas condiciones experimentales que se mencionaron anteriormente y con los mismos factores de crecimiento, así como en agua de mar natural procedente de la Bahía de La Coruña, y enriquecida con f/2.

En este caso, el crecimiento de los organismos fué estimado mediante el método habitual de medir las tasas de reproducción en divisiones día^{-1} , así como midiendo las densidades celulares en células ml^{-1} , como un método más eficaz para evaluar correctamente el proceso seguido por el cultivo día a día durante todo el experimento.

2.3- Estimación del efecto de los factores de crecimiento sobre la germinación de los quistes de dinoflagelados.

Para estimar el efecto de los factores de crecimiento sobre la germinación de los quistes del dinoflagelado Alexandrium tamarense, se empleó un sedimento de arena superficial recogido a 1 metro de profundidad en la Bahía de La Coruña en Marzo de 1991, con el agua a una temperatura de 13,5 °C.

Dado que las bacterias son capaces de sintetizar y excretar factores de crecimiento al medio (Morotomi et al., 1990), su presencia en el sedimento arenoso podría suponer una alteración de los resultados. Por esta razón, los sedimentos que se iban a utilizar en el experimento se trataron previamente con antibióticos para eliminar las bacterias que pudieran estar presentes en el medio. Así, varias alícuotas de 1 ml de sedimento se lavaron tres veces con medio artificial ASPM mediante centrifugación, y se trataron posteriormente con 150 mg l⁻¹ de penicilina y 100 mg l⁻¹ de estreptomina durante un periodo de 2 horas. A continuación, las muestras se volvieron a lavar para eliminar la presencia de los antibióticos.

Sin embargo, al desconocer el efecto que pudieran tener los antibióticos sobre la germinación de los quistes, se realizó una prueba previa que consistió en que 4 alícuotas de 1 ml de sedimento cada una se dejaron crecer simplemente en 3 ml de medio ASPM f/2, mientras que otras 4 se trataron previamente con 150 mg l⁻¹ de penicilina y 100 mg l⁻¹ de estreptomina durante un periodo de 2 horas. Posteriormente, se contó el número de células vegetativas en cada caso y se comprobó la inexistencia de diferencias significativas entre la germinación de unos quistes y otros.

A continuación, 4 alícuotas ya axénicas de 1 ml cada una se depositaron en placas multiensayo con 3 ml de los siguientes medios:

- 1- Un control en agua artificial ASPM con enriquecimiento f/2.
- 2- Un control en ASPM f/2 suplementado con un 10% de medio RPMI (DIFCO).

- 3- ASPM f/2 suplementado con 10 ng ml^{-1} de PDGF (SIGMA).
- 4- ASPM f/2 suplementado con un 10% de FBS (FLUKA).

El RPMI es un medio standard utilizado habitualmente en los cultivos de células de mamífero que proporciona nutrientes pero ningún factor de crecimiento.

Todos los cultivos se mantuvieron en cámaras de cultivo con una iluminación de $50 \mu\text{Ein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un periodo de 12:12 horas de luz-oscuridad a 20°C . Para evitar diferencias en el grado de iluminación recibida, todas las placas multiensayo se cambiaban aleatoriamente de sitio una vez al día.

Para realizar el conteo de las células germinadas, todos los días se retiraba el medio líquido de cada pocillo con una jeringuilla estéril, evitando hacer turbulencias en el sedimento arenoso. A continuación, se fijaba la muestra líquida con formaldehído al 4% y se contaban en un microscopio invertido las células vegetativas de A. tamarense que habían germinado. Una vez efectuado el conteo de las células, se procedía al llenado de los pocillos con otros 3 ml de cada medio respectivo.

Este procedimiento se realizó todos los días, a la misma hora y durante un periodo de 7 días, que fué el tiempo en el que se observaron células vegetativas.

Al mismo tiempo, se fijaron muestras del sedimento original para contar el número de quistes ml^{-1} de sedimento en cada pocillo al principio del experimento. Así se pudo estimar posteriormente el porcentaje de germinación para cada tratamiento como el número total de células germinadas/número total de quistes en el sedimento al principio del experimento.

2.4- Estimación del efecto de la inhibición por contacto en distintos organismos

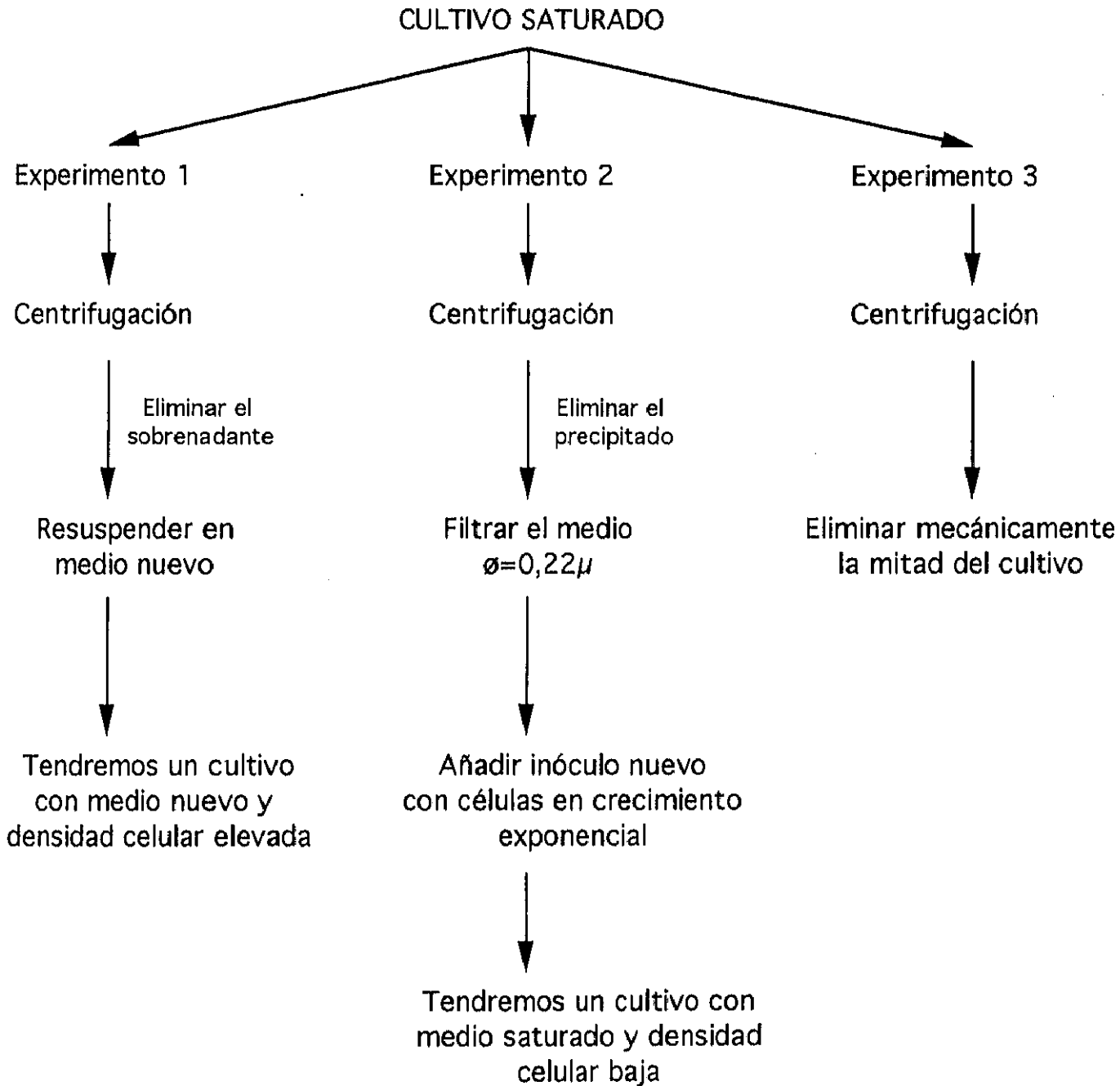
En un intento de comprobar si la inhibición por contacto es un mecanismo de control de la proliferación celular que fué desarrollado antes de la aparición de los organismos pluricelulares, sometimos a los dinoflagelados Alexandrium excavata, Prorocentrum lima y Prorocentrum triestinum, a la gamophyceae Spirogyra insignis, a la praxinophyceae Tetraselmis sp. y a la bacillariophyceae Phaeodactylum tricornutum a 3 tipos de experimentos.

Los cultivos de las distintas especies se cultivaron tal y como se describe en los puntos 2.1.1 y 2.1.2, mediante transferencias seriadas de inóculos de 500 ± 30 células a medio nuevo una vez cada día. De esta forma, los cultivos crecieron exponencialmente durante unos 20-30 días y después empezaron a mostrar evidencias de una clara inhibición del crecimiento debido, aparentemente, a una alta densidad celular o a una falta de nutrientes. El método usado para detectar cuando un cultivo alcanzaba la saturación, fué el de medir diariamente las tasas de reproducción y la densidad celular (en células ml^{-1}); así, cuando la tasa se aproximaba a cero (es decir, no existía prácticamente crecimiento) y la densidad celular alcanzaba su máximo valor, el cultivo se consideraba saturado.

Tres días más tarde de considerarse el cultivo saturado, se procedió a realizar los 3 experimentos siguientes, que quedan esquematizados en la Figura 7.

Experimento 1- Cinco replicados de cada especie se centrifugaron durante 20 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron en la misma cantidad de medio nuevo. Es decir, obtendremos un cultivo con medio nuevo pero con una densidad celular a saturación. Se midieron entonces, durante 5 días las tasas de reproducción y las densidades celulares.

Figura 7- Esquema de los procedimientos a los que fueron sometidos los diferentes cultivos celulares.



Experimento 2- Cinco replicados de cada especie se centrifugaron durante 20 minutos a 1000 rpm. A diferencia del caso anterior, después de la centrifugación el medio saturado se filtró a través de un filtro de 0,22 μ , obteniéndose así un medio saturado libre de células y axénico. A continuación un inóculo de cada especie con las células en crecimiento exponencial se dejó crecer en este medio. Es decir, obtendremos un cultivo con un medio saturado pero con una densidad celular baja.

Con estos dos experimentos es posible discernir si las células ven inhibido su crecimiento por un proceso de inhibición por contacto (elevada densidad celular) o bien por fenómenos tales como la falta de nutrientes o la acumulación de metabolitos de deshecho, de una manera mutuamente excluyente. Así, si las células presentan fenómenos de inhibición por contacto, serán capaces de crecer en el experimento 2 (densidad celular baja) pero no en el experimento 1 (densidad celular a saturación). Por el contrario, si la proliferación celular se ve inhibida por falta de nutrientes o acúmulo de catabolitos, las células no serán capaces de crecer en un medio saturado pero sí en un medio nuevo con aporte de nutrientes: es decir, no crecerán en el experimento 2 pero sí en el 1.

Experimento 3- Asimismo, se realizó otro tipo de experimento en aquellas especies capaces de crecer en monocapa: S. insignis y P. lima. Cinco replicados de cada especie crecieron en placas de Petri hasta alcanzar la saturación. Una vez que los cultivos alcanzaron la saturación, se procedió a la eliminación mecánica de las células de una de las mitades de la placa de Petri, tal y como se hace habitualmente en los estudios con fibroblastos de mamífero. En este caso, si las células de la mitad de la placa que no han sido eliminadas continúan creciendo, significaría que su crecimiento se vio inhibido por un fenómeno de inhibición por contacto (al disminuir la densidad celular pueden seguir creciendo).

Para valorar los 3 experimentos, se midieron las tasas de reproducción y las densidades celulares durante los 5 días siguientes al inicio de los mismos, en cada uno de los cinco replicados de cada

especie. Las densidades celulares se estimaron como el número de células ml^{-1} (o por cm^2 en el caso del experimento 3 en el cual se midieron las células por unidad de área). Las tasas de reproducción se midieron en divisiones día^{-1} (Crow & Kimura, 1970). Así mismo, se calculó el porcentaje de incremento de densidad celular ($\% \Delta$) en las 24 horas siguientes de realizado el experimento.

2.5- Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron, en todos los casos, mediante las pruebas no paramétricas de la U de Mann Whitney para la comparación de dos medias, y la H de Kruskal Wallis para la comparación de tres o más muestras (Siegel, 1956). Elegimos la estadística no paramétrica debido a que no se puede asumir la normalidad en la distribución de todos los resultados obtenidos.

El test de U de Mann Whitney es la alternativa no paramétrica más eficaz a la prueba paramétrica t de Student para la comparación de las medias de dos grupos independientes. Su relación potencia-eficiencia es de un 95,5%.

Por su parte, el test H de Kruskal Wallis tiene también una relación potencia- eficacia del 95,5% frente a la prueba paramétrica F, siendo por tanto la alternativa no paramétrica más eficaz para la comparación de tres o más muestras.

RESULTADOS

RESULTADOS

3.1- Resultados correspondientes al efecto de los factores de crecimiento sobre el ciclo celular de los organismos

En la Tabla 1 se representan en divisiones día⁻¹ las tasas de reproducción máximas aclimatadas de todos los organismos en los 5 medios ensayados: control en ASPM o en agua destilada enriquecido con f/2 y sin ningún aporte de factores de crecimiento, medio "control" suplementado con Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), medio "control" suplementado con Monoacetato 12 de Forbol (PMA), medio "control" suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) y medio natural (agua de mar o dulce) enriquecido con f/2. Del mismo modo, las Figuras 1-5 del Apéndice representan el crecimiento de cada organismo en dichos medios.

Aunque se trata de organismos filogenéticamente muy diferentes entre sí, todos ellos muestran un aumento de su tasa de reproducción con la adición de factores de crecimiento. Así, todos los organismos tienen una tasa de reproducción mínima en el control sin factores de crecimiento, y tanto el PDGF, el FBS o el PMA producen grandes diferencias ($p < 0,01$) en su proliferación.

En todos los casos, excepto en el dinoflagelado Prorocentrum lima, el valor máximo de proliferación es alcanzado en presencia de FBS, que produce incrementos de hasta 8.71 y 9.66 veces el valor alcanzado en el experimento control en los casos de los eucariotas Tetraselmis suecica y Spirogyra insignis respectivamente.

Por otro lado, tanto el PDGF como el PMA, provocan unas tasas de reproducción muy similares en todos los organismos, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores alcanzados.

Entre todos los organismos ensayados, los que sufren una proliferación mayor en presencia de factores de crecimiento y del PMA son las eucariotas, particularmente la gamophyta S. insignis, cuya tasa de reproducción "control" se incrementa un promedio de 9.33 veces en

Tabla 1- Tasas de reproducción en divisiones/día de los distintos organismos en los medios ensayados. Con una * se indica la inexistencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las tasas de reproducción del medio control y las tasas en medios suplementados con factores de crecimiento, y con ** se indica la existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$).

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de forbol

FBS= Suero bovino fetal

Agua natural= Agua de mar o dulce, según los organismos

Medios	<i>P. lima</i>	<i>T. suecica</i>	<i>S. insignis</i>	<i>P. tricornutum</i>
ASPM f/2 (A)	0,13±0,04	0,14±0,02	0,12±0,07	0,12±0,02
A+PDGF	0,61±0,03**	1,02±0,02**	1,11±0,02**	0,73±0,02**
A+PMA	0,58±0,08**	0,94±0,04**	1,09±0,04**	0,62±0,02**
A+FBS	0,53±0,02**	1,22±0,04**	1,16±0,04**	0,83±0,03**
Agua natural	0,31±0,08**	0,74±0,01**	0,36±0,02**	0,51±0,04**

presencia de factores de crecimiento, mientras que el dinoflagelado P. lima se encuentra en una posición intermedia al ver incrementada su tasa de reproducción una media de 3.90 veces respecto al control.

Un hecho a destacar es el crecimiento que se produce en los organismos cuando son cultivados en un medio natural (agua de mar o dulce, en cada caso). Todos los organismos alcanzan unas tasas de división, que si bien son superiores estadísticamente ($p < 0,01$) a las obtenidas en un medio artificial, son menores ($p < 0,01$) a los valores que se alcanzan en un medio suplementado con factores de crecimiento. Así por ejemplo, T. suecica multiplica una media de 7,5 veces su tasa de división control con factores de crecimiento, mientras que solo lo hace 5,28 veces en agua natural; lo mismo les ocurre al resto de los organismos: tanto P. lima, como S. insignis o P. tricornutum ven incrementadas su tasa de división en presencia de factores de crecimiento un promedio de 4.40, 9.33 y 6.05 veces respectivamente, mientras que en un medio natural solo lo hacen 2.38, 3.00 y 4.25 veces.

En cuanto a la respuesta particular de los dinoflagelados, queda reflejada en la Tabla 2. Todos ellos (excepto el clon Pt* de P. triestinum) responden de una manera semejante: en presencia de factores de crecimiento y mitógenos artificiales incrementan significativamente su crecimiento ($p < 0,001$) respecto a los controles carentes de factores de crecimiento. Además, tanto el PDGF como el PMA provocan incrementos similares de proliferación en cada organismo no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Así, los dos clones de Alexandrium tamarense, At-a y At-b, incrementan su tasa de reproducción una media de 398,33% y 318,18% en presencia de factores de crecimiento, mientras que los dos clones de Prorocentrum triestinum, Pt-a y Pt-b, lo hacen en un 423,33% y un 287,33% respectivamente. Las Figuras 6-10 del Apéndice representan el crecimiento de cada organismo en los distintos medios.

Tabla 2- Tasas de reproducción en divisiones/día de los distintos dinoflagelados en los medios ensayados. Con una * se indica la inexistencia de diferencias significativas ($p>0,05$) entre las tasas de reproducción del medio control y las de los medios suplementados con factores de crecimiento, mientras que con ** se indica la existencia de diferencias significativas ($p<0,001$).

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMA= Monoacetato 12 de forbol
FBS= Suero bovino fetal

Medios	<i>A. tamarense-a</i>	<i>A. tamarense-b</i>	<i>P. triestinum-a</i>	<i>P. triestinum-b</i>	<i>P. triestinum*</i>
ASPM f/2	0,20±0,02	0,11±0,03	0,10±0,04	0,21±0,03	0,89±0,02
A+PDGF	0,97±0,06**	0,48±0,06**	0,54±0,09**	0,79±0,06**	0,92±0,03*
A+PMA	0,99±0,03**	0,45±0,04**	0,53±0,06**	0,81±0,03**	0,89±0,01*
A+FBS	1,03±0,07**	0,45±0,03**	0,50±0,02**	0,84±0,04**	1,02±0,03*
Agua de mar	0,81±0,04**	0,33±0,05**	0,33±0,03**	0,63±0,05**	0,90±0,03*

De todos los dinoflagelados ensayados, el clon Pt* de P. triestinum es el que muestra una respuesta más anómala: su crecimiento es prácticamente el mismo en todos los casos, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) en las tasas de reproducción alcanzadas en medios carentes de factores de crecimiento y en medios suplementados con ellos, incrementando su tasa de división apenas en un 5,99% sobre la tasa obtenida en el medio control carente de factores de crecimiento.

Por último, comentar que cuando los dinoflagelados son cultivados en un medio marino natural, sus tasas de reproducción, aunque superan las obtenidas en un medio control, no llegan a alcanzar los valores que se obtienen en medios suplementados con factores de crecimiento. Esta generalización no se hace extensiva al clon Pt* de P. triestinum, donde no existen diferencias significativas entre el crecimiento en un medio natural ($0,90 \pm 0,01$ divisiones día⁻¹), el crecimiento en un medio control ($0,89 \pm 0,02$ div día⁻¹) e incluso el crecimiento en un medio suplementado con FBS ($1,02 \pm 0,03$ div día⁻¹) ($p > 0,05$).

El hecho de que Pt* creciera igualmente en todos los medios ensayados, hizo que se planteara un experimento adicional, en un intento de comprobar si este clon podía excretar algo al medio que pudiera después volver a reutilizarlo, haciendo así que no fuera capaz de crecer más en medios a los que se les había añadido factores de crecimiento. Así, se tomó un cultivo de Pt* en crecimiento exponencial y se filtró todo el medio, deshechando a continuación las células. Teóricamente, en ese medio, condicionado por Pt*, existen todos los nutrientes característicos del medio (ASPM f/2) más todo lo que haya podido excretar Pt*. Sobre ese medio condicionado cultivamos otro clon de Prorocentrum, Pt-v, cuyas características nucleares y citoplasmáticas eran "normales" (Costas & Goyanes, 1989).

La Tabla 3 indica las tasas de reproducción obtenidas en los distintos medios ensayados para Pt-v y Pt*. El medio condicionado por Pt* incrementa significativamente ($p < 0,01$) la tasa de reproducción del clon Pt-v, alcanzándose un incremento mayor al 100% con respecto al control en ASPM f/2. Por el contrario, si se realiza el experimento inverso, es decir se cultivaba Pt* sobre el medio condicionado por Pt-v,

Tabla 3- Tasas de reproducción en divisiones/día de los dos clones de *Prorocentrum triestinum*, Pt-v y Pt* en los medios ensayados. Con * se indica la no existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) y con ** la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$).

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de forbol

FBS= Suero bovino fetal

c-Pt*= Medio condicionado por Pt*

c-Pt-v= Medio condicionado por Pt-v

	ASPM f/2	A+PDGF	A+PMA	A+FBS	c-Pt*	c-Pt-v
Pt*	0,89±0,02	0,92±0,03*	0,89±0,01*	1,02±0,02*	-	0,86±0,03*
Pt-v	0,20±0,02	0,78±0,02**	0,51±0,03**	0,82±0,01**	0,48±0,03**	-

no se producía ninguna variación en la tasa de reproducción de Pt* ($p > 0.05$). La Figura 11 del apéndice representa gráficamente esta diferencia en el crecimiento de los dos clones.

Además, en el caso de los dinoflagelados, se midió el crecimiento de los cultivos en función de la densidad celular, es decir contando el número de células/ml día a día durante todo el tiempo que duró el experimento. Al tratarse de contajes realizados día a día se representó el crecimiento en rectas ajustadas a una ecuación exponencial. Como es de esperar, los resultados, que quedan reflejados en las Figuras 8-11 se corresponden con los obtenidos midiendo las tasas de reproducción en divisiones día⁻¹. Todos los clones ensayados (At-a, At-b, Pt-a, Pt-b) crecen espectacularmente en presencia de factores de crecimiento ya desde los primeros días, mientras que en un medio carente de ellos (como el ASPM) el crecimiento es mucho menor y mucho más lento. Así por ejemplo, el caso más evidente es el del clon At-a de A. tamarense donde la tasa de reproducción se ve incrementada un promedio de 36,22 veces en un medio suplementado con factores de crecimiento, mientras que en el medio control ASPM sólo se incrementa 2,68 veces, todo ello al final de los 7 días que dura el experimento. En la Tabla 3 del Apéndice se observan los datos relativos a la densidad celular de estos clones.

El agua de mar natural produce un crecimiento mayor que un medio control, aunque nunca se llegan a alcanzar los valores de un medio suplementado con factores de crecimiento; en el caso anteriormente mencionado, el clon At-a incrementa su tasa de reproducción unas 16,5 veces aproximadamente.

Figura 8- Densidad celular en células/ml del clon At-a de Alexandrium tamarense en los distintos medios ensayados.

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

FBS= Suero bovino fetal

PMA= Monoactato 12 de Forbol

Agua natural= Agua de mar

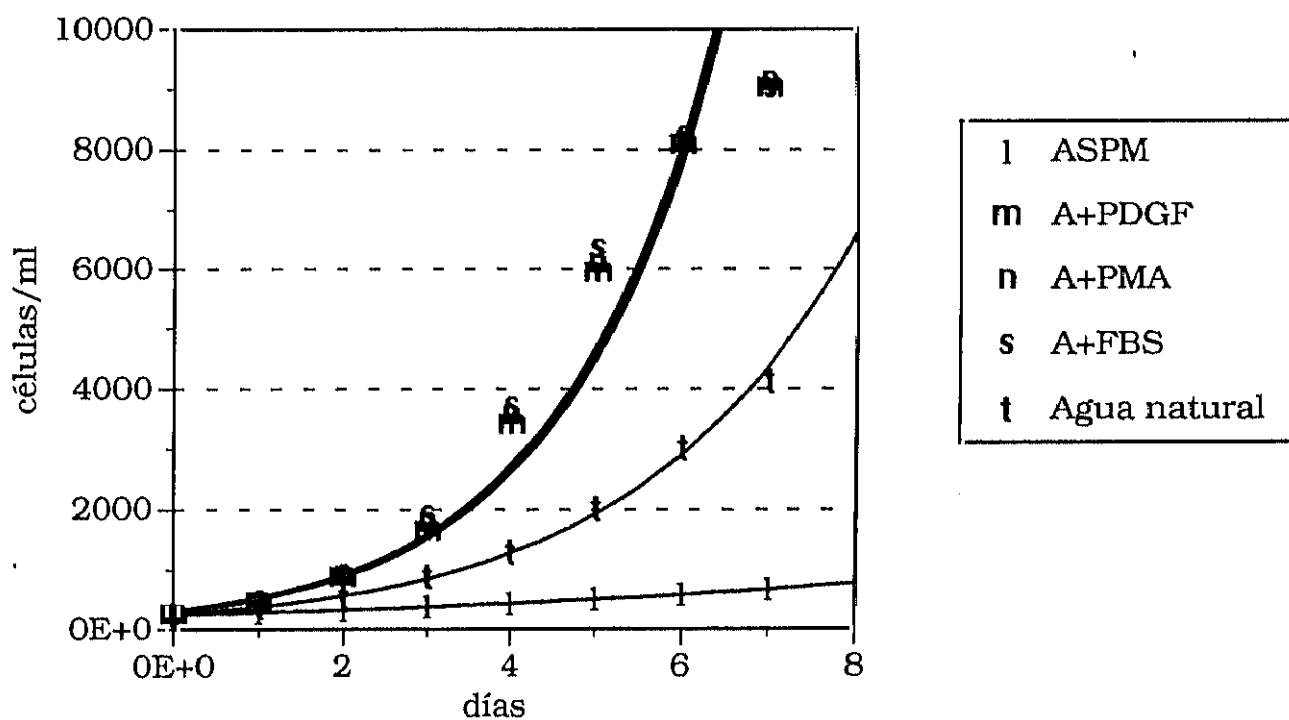


Figura 9- Densidad celular en células/ml del clon At-b de Alexandrium tamarense en los distintos medios ensayados.

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

FBS= Suero bovino fetal

PMA= Monoacetato 12 de forbol

Agua natural= Agua de mar

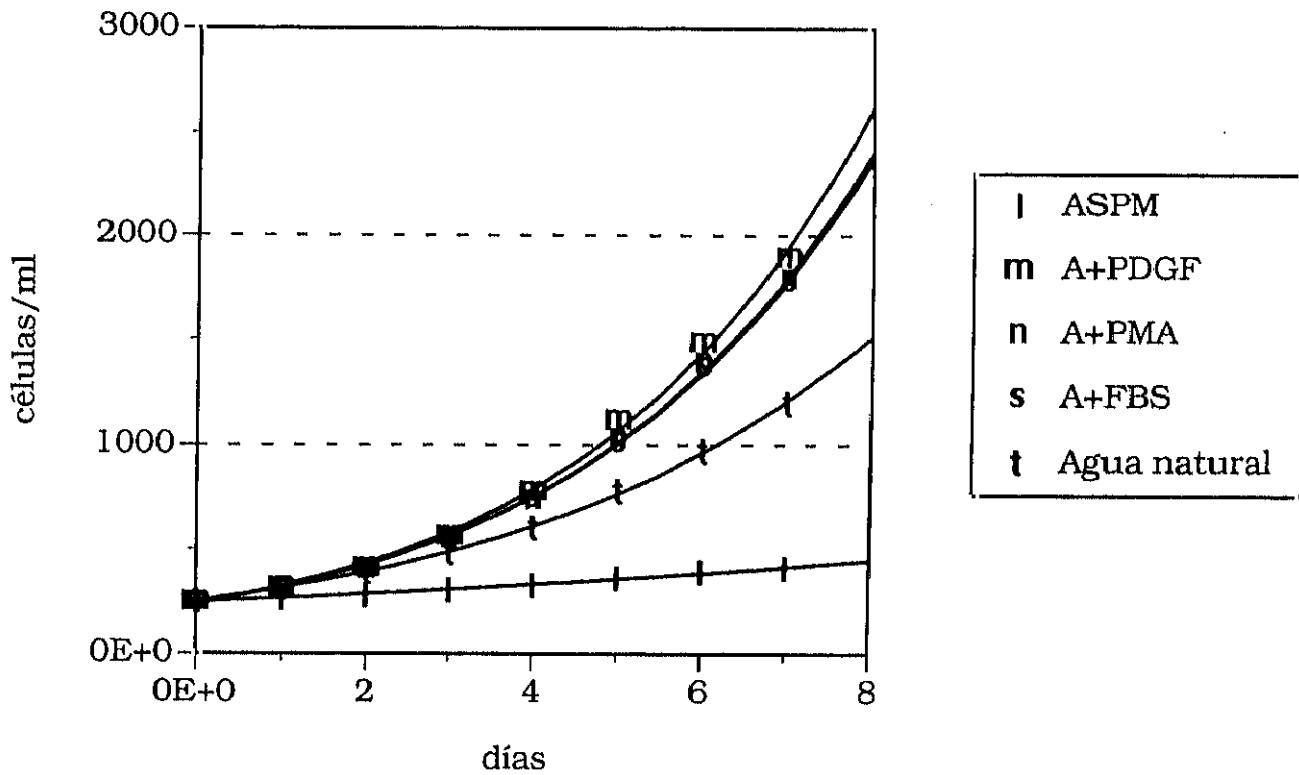


Figura 10- Densidad celular en células/ml del clon Pt-a de Prorocentrum triestinum en los distintos medios ensayados.

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas
 FBS= Suero bovino fetal
 PMA= Monoacetato 12 de Forbol
 Agua natural= Agua de mar

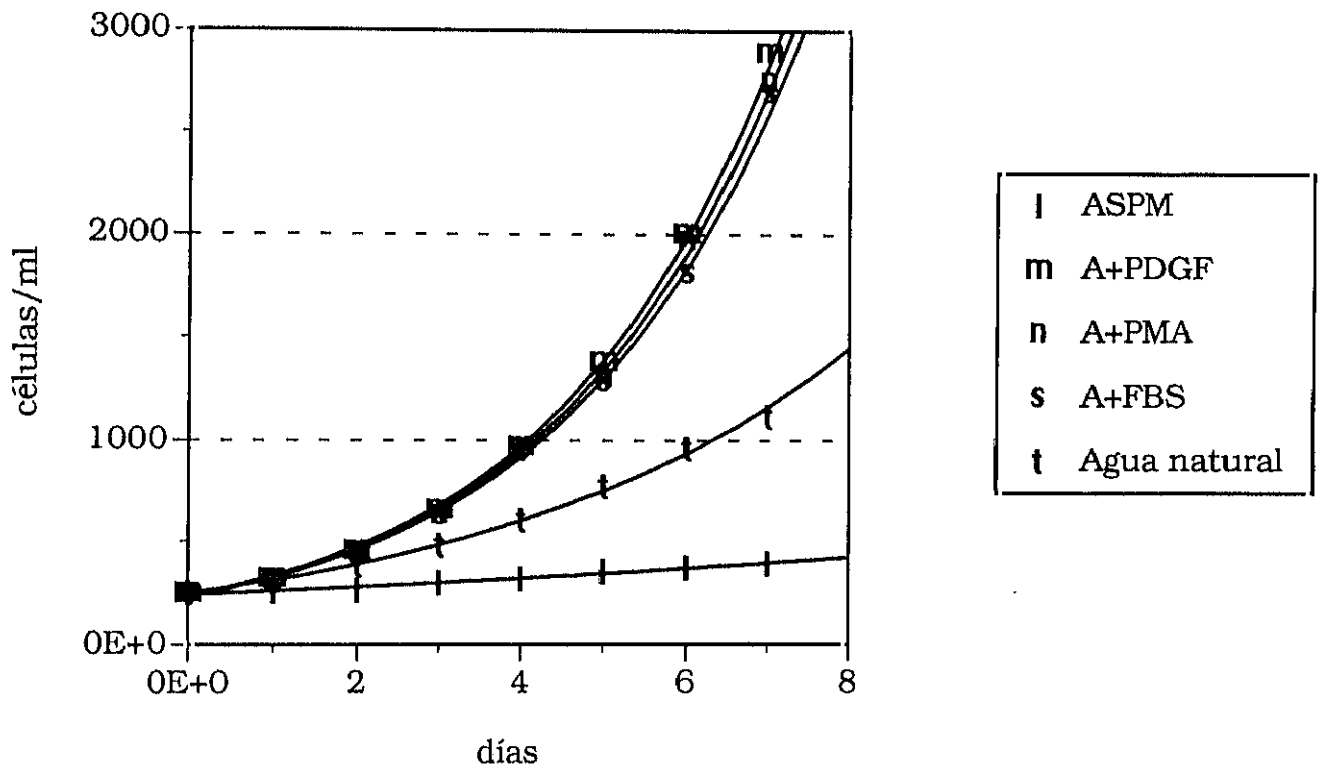
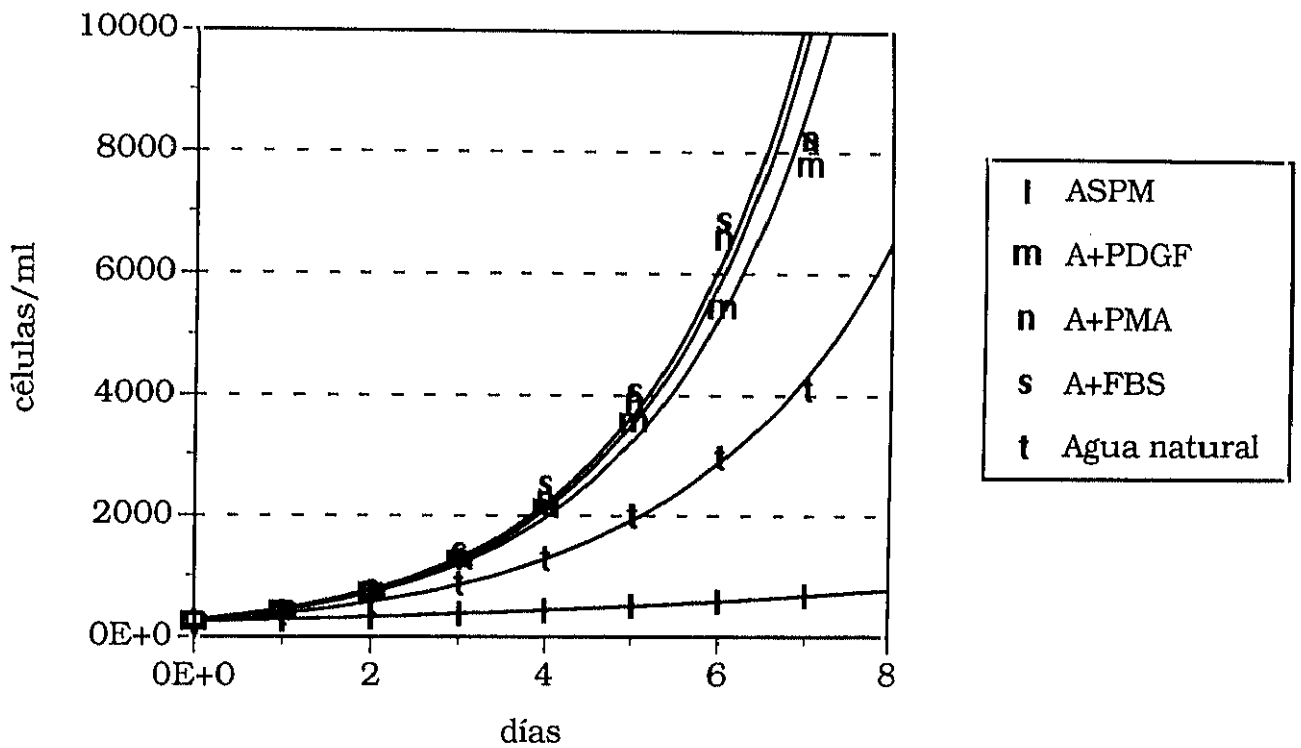


Figura 11- Densidad celular en células/ml del clon Pt-b de Prorocentrum triestinum en los distintos medios ensayados.

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas
 FBS= Suero bovino fetal
 PMA= Monoacetato 12 de Forbol
 Agua natural= Agua de mar



3.2- Resultados del efecto de los factores de crecimiento sobre la germinación de los quistes de dinoflagelados

Los datos que reflejan el efecto que tienen los antibióticos sobre la germinación de los quistes de Alexandrium tamarense se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la germinación que se produce en un medio tratado previamente con antibióticos y en otro que no ha sido tratado con ellos, tanto si se compara día a día la germinación como si se considera el período total de 7 días. Así, es posible la realización del tratamiento con factores de crecimiento sin que interfiera en él la presencia de bacterias o el efecto de antibióticos.

En la Tabla 5 y la Figura 12 del Apéndice quedan reflejadas el número de células germinadas (media \pm desviación típica) a lo largo de los 7 días que duró el experimento y en los distintos medios suplementados con factores de crecimiento y en los medios control.

El hecho más importante a destacar es la casi total dependencia por parte de los quistes de factores de crecimiento para germinar. Así, en los medios carentes de factores de crecimiento (ASPM f/2 y ASPM f/2 + RPMI) no se produjo prácticamente germinación, alcanzándose una media aproximada de 0,70 células germinadas en ambos casos a lo largo de todo el experimento. Por el contrario, la adición al medio de factores de crecimiento específicos (PDGF) o inespecíficos (FBS), incrementaba significativamente ($p < 0,01$) la germinación, alcanzándose valores de 3,16 veces el valor alcanzado en el medio control ASPM f/2 en el caso de FBS y de 3,01 el control en el caso del PDGF.

Tanto el ASPM f/2 como el RPMI son medios nutritivos utilizados habitualmente en el cultivo de líneas celulares de algas y mamíferos respectivamente; los dos aportan gran cantidad de nutrientes pero carecen de factores de crecimiento, produciendo además una germinación media similar entre los quistes de A. tamarense ($0,71 \pm 0,52$ en ASPM f/2 y $0,68 \pm 0,48$ en ASPM \pm RPMI), no existiendo diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Tabla 4- Efecto del tratamiento con antibióticos sobre la germinación de los quistes de *Alexandrium tamarense*. Se representa el número de células germinadas por día y por ml de sedimento ($m \pm sd$ de los cuatro replicados). La germinación no se produjo después del día 7°. Con una * se indica la no existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$).

Días	Control	Antibiótico
1	1,0 \pm 0,7	1,8 \pm 0,7
2	0,5 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0
3	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,7
4	0,5 \pm 0,5	0,8 \pm 0,5
5	0,8 \pm 0,8	0,3 \pm 0,4
6	1,0 \pm 0,7	1,0 \pm 0,0
7	0,3 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0
Total células germinadas por ml durante 7 días	5,1*	4,9*

Tabla 5- Número de células germinadas de *Alexandrium tamarense* (m±sd) a lo largo de los 7 días que duró el experimento, en los distintos medios ensayados.

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

FBS= Suero bovino fetal

RPMI= Medio standard de mamífero

Días	ASPM f/2 (A)	A+RPMI	A+FBS	A+PDGF
1	1,00±0,70	1,25±1,03	3,75±0,83	4,25±1,22
2	0,50±0,50	1,00±0,70	4,75±1,09	4,50±1,09
3	1,00±0,00	0,50±0,05	5,00±1,22	4,25±0,50
4	0,50±0,50	0,75±0,43	1,75±1,09	2,00±0,50
5	0,75±0,83	1,00±0,70	0,50±0,50	0,00±0,00
6	1,00±0,70	0,25±0,43	0,00±0,00	0,00±0,00
7	0,25±0,43	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Por otro lado, tampoco existieron diferencias entre los efectos producidos por el PDGF y el FBS ($p > 0,05$), que producían, como media, respectivamente $2,14 \pm 0,47$ y $2,25 \pm 0,53$ células germinadas a lo largo de toda la experiencia.

Un hecho a destacar es que la germinación se produjo principalmente durante los cuatro primeros días del experimento en el caso de estar el medio suplementado con factores de crecimiento; sin embargo, en ambos controles (ASPM f/2 y ASPM \pm RPMI) la germinación ocurrió de forma relativamente uniforme a lo largo de los 7 días en que se observó germinación.

Finalmente, en la Tabla 6 quedan reflejados los datos correspondientes a los porcentajes de germinación para cada tratamiento. En los medios no suplementados con factores de crecimiento (ASPM f/2 y ASPM+RPMI) el porcentaje de quistes germinados es alrededor del 27%, mientras que en los medios suplementados con factores de crecimiento este porcentaje llega a alcanzar un 90%. Es decir, la adición al medio de factores de crecimiento incrementa de manera espectacular la germinación de los quistes.

Tabla 6- Porcentajes de germinación de los quistes de *Alexandrium tamarense* para cada tratamiento.

% germinación= $\frac{\text{N}^\circ \text{ total de células germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ quistes al principio del experimento}}$

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

FBS= Suero bovino fetal

RPMI= Medio standard de mamífero

Medios	Nº total de células germinadas por ml de sedimento	Nº total de quistes/ml de sedimento al principio del experimento	%germinación
ASPM f/2	15	52	29
ASPM+RPMI	13	52	25
ASPM+FBS	47	52	92
ASPM+PDGF	45	52	88

3.3- Resultados correspondientes al efecto de la inhibición por contacto en los distintos organismos

En las Tablas 7 y 8 se reflejan las características de cada organismo ensayado así como las tasas de reproducción y el porcentaje (en %) de incremento de densidad celular (% Δ) en los dos experimentos realizados: en un medio nuevo con densidad celular alta (experimento 1) y en un medio saturado con baja densidad celular (experimento 2); así mismo, se indican las tasas de reproducción de los cultivos en fase exponencial y de los cultivos saturados.

Quizá el resultado más evidente sea el del dinoflagelado Prorocentrum lima, cuyo crecimiento parece ser inhibido claramente por fenómenos dependientes de densidad celular, alcanzando incrementos de un 47% en medios saturados con baja densidad celular (experimento 2) y creciendo solamente un 2% en aquellos medios, que, aunque nuevos, presentan una alta densidad celular (experimento 1). Tanto las tasas de crecimiento y la densidad celular son significativamente diferentes ($p < 0,01$) en ambos experimentos.

Cuando P. lima se cultiva en placas de Petri y una vez alcanzada la saturación celular se quitan mecánicamente las células de una de las mitades de la placa (Tabla 9), solamente vuelven a crecer las células que están en contacto con la zona libre (Figura 12), lo que indica que inicialmente su crecimiento fué inhibido por un fenómeno denso-dependiente. Esta inhibición se produjo, además, cuando el $69 \pm 2\%$ de la superficie de la placa estuvo llena de células. Todo ello parece indicar que P. lima es un organismo que claramente ve inhibido su crecimiento cuando el cultivo alcanza altas densidades celulares.

Por el contrario, hay dos organismos cuyo crecimiento no se ve afectado por una inhibición por contacto: tanto la praxinophyceae Tetraselmis sp. como la bacillariophyceae Phaeodactylum tricornutum, no son capaces de crecer prácticamente (% de incremento celular de 1% y 3% respectivamente) en un medio cuya densidad celular es baja (experimento 2) y sin embargo crecen perfectamente en medios que

Tabla 7- Características de las especies utilizadas

Especie	Grupo	Característica
<u>Prorocentrum lima</u>	Dinophyceae	Béntico, unicelular
<u>Prorocentrum triestinum</u>	Dinophyceae	Nadador, unicelular
<u>Alexandrium tamarense</u>	Dinophyceae	Nadador, unicelular
<u>Tetraselmis</u> sp.	Praxinophyceae	Nadador, unicelular
<u>Phaeodactylum</u> <u>tricornutum</u>	Bacilliarophyceae	Béntico, unicelular
<u>Spirogyra insignis</u>	Conjugatophyceae	Béntico, Filamentoso cenobial

Tabla 8- Tasas de reproducción y porcentaje de incremento de la densidad celular. Experimento 1: medios nuevos con densidad celular alta. Experimento 2: medios saturados con densidad celular baja. Se indican con ** las diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los dos experimentos y con * las diferencias no significativas ($p > 0.05$).

r exp= tasas de reproducción de los cultivos exponenciales

r satur= tasas de reproducción de los cultivos saturados

r= tasas de reproducción

%Δ= porcentaje de incremento de la densidad celular

Especie	r exp.	r satur.	Experimento 1		Experimento 2	
			r	%Δ	r	%Δ
<u>Prorocentrum</u> <u>lima</u>	0,38±0,03	0,01±0,01	0,03±0,02**	2±1	0,39±0,07**	47±2
<u>Prorocentrum</u> <u>triestinum</u>	0,91±0,05	0,01±0,01	0,29±0,02**	33±1	0,07±0,02**	7±2
<u>Alexandrium</u> <u>tamarense</u>	0,43±0,03	-0,03±0,02	0,12±0,05*	12±5	0,07±0,02*	7±1
<u>Tetraselmis</u> sp.	0,96±0,05	-0,04±0,01	0,87±0,07**	138±6	0,01±0,01**	1±1
<u>Phaeodactylum</u> <u>tricornutum</u>	0,88±0,04	0,02±0,01	0,52±0,01**	68±2	-0,03±0,02**	-2±3
<u>Spirogyra</u> <u>insignis</u>	0,94±0,05	0,03±0,02	0,18±0,05**	19±4	0,68±0,05**	97±6

Tabla 9- Tasas de reproducción de Prorocentrum lima y Spirogyra insignis en las placas de Petri cuya mitad había sido mecánicamente eliminada.

"Borde" en donde se han Zona cuyas células no
 eliminado las células han sido eliminadas

<u>Prorocentrum lima</u>	0,31±0,07	0,01±0,01
<u>Spirogyra insignis</u>	0,47±0,03	0,03±0,02

tienen una alta densidad celular y un medio nuevo (experimento 1), alcanzando en este caso unos porcentajes de crecimiento estadísticamente diferentes ($p < 0,01$) a los alcanzados en el experimento 2 (138% y 68% respectivamente). Por ello, no parece que estos organismos dejen de crecer por una inhibición por contacto.

Por último, hay tres organismos, S. insignis, P. triestinum y A. tamarense, que crecen en ambos experimentos (1 y 2), por lo que tienen una respuesta compleja en cuanto a la interpretación de los resultados.

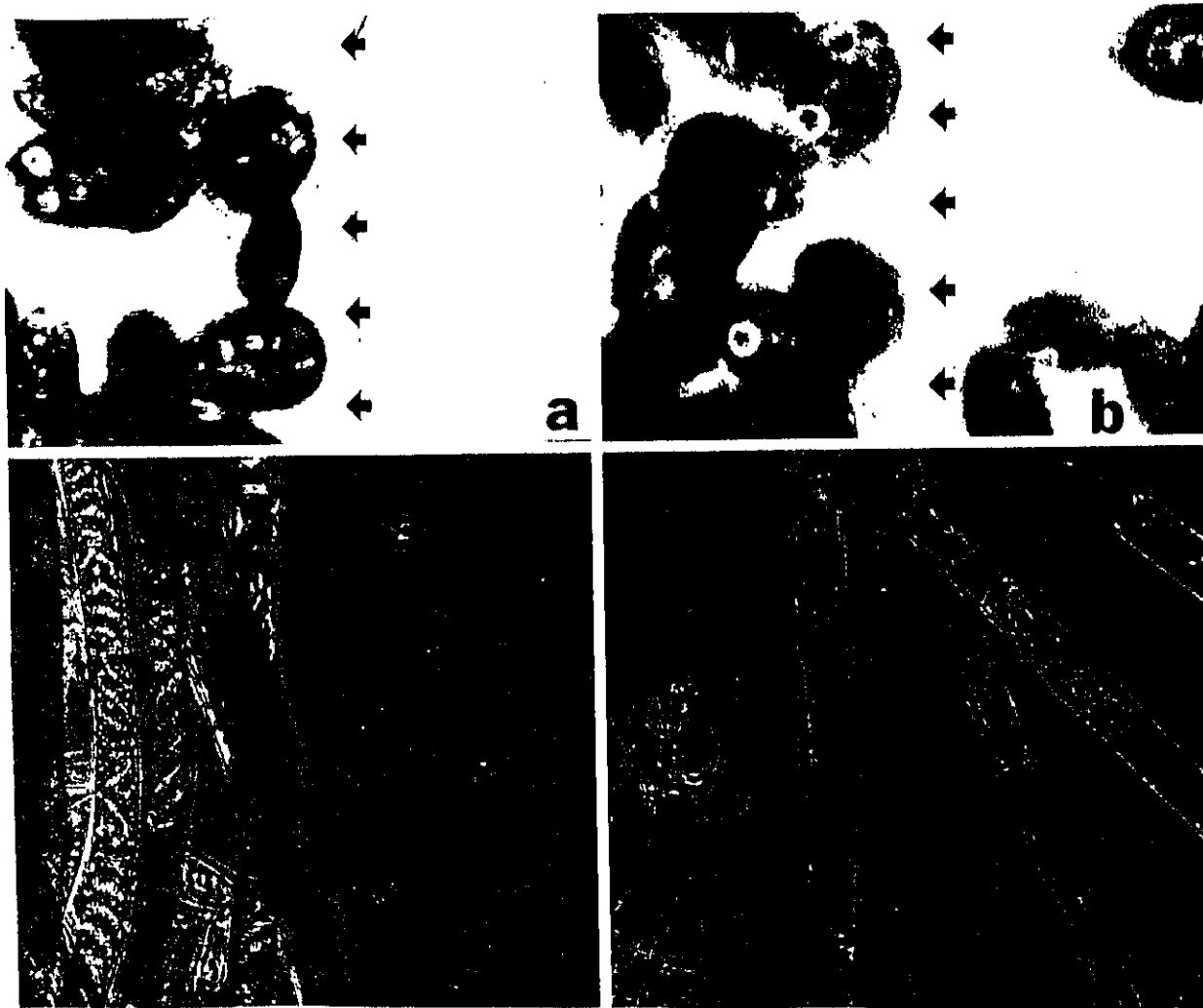
Quizá el más complicado de todos ellos sea el dinoflagelado A. tamarense, ya que estadísticamente no existen diferencias ($p > 0,05$) en los crecimientos alcanzados en ambos experimentos, y prácticamente no es capaz de crecer en ninguno de los dos (12% de Δ en el experimento 1 y 7% en el experimento 2).

Por su parte, S. insignis, que crece un 97% en medios saturados y con densidad baja y solamente un 19% en aquellos medios nuevos con alta densidad celular, el fenómeno que predomina es el de la inhibición del crecimiento por fenómenos dependientes de densidad, es decir por inhibición por contacto. Cuando además, S. insignis se cultiva en placa de Petri (Figura 12), los filamentos de células vuelven a crecer una vez que se han eliminado los de una mitad de la placa, lo que indica que, efectivamente, la inhibición por contacto, al menos, es importante en el cese de crecimiento de S. insignis.

Sin embargo, en el dinoflagelado P. triestinum predomina una inhibición del crecimiento debida, no a una alta densidad celular, sino a otro tipo de fenómenos, ya que este organismo crece significativamente más ($p > 0,01$) en medios en los que la densidad celular es alta, mientras que prácticamente no sufre incremento alguno en su crecimiento en aquellos medios cuya densidad celular es baja.

Figura 12- Crecimiento de Prorocentrum lima y Spirogyra insignis cuando las células fueron eliminadas mecánicamente de una de las mitades de una plac de Petri. Las flechas representan la línea a partir de la cual se produjo de nuevo el crecimiento.

- a) Cultivo saturado de Prorocentrum lima en el momento en que se eliminaron las células.
- b) Cultivo de Prorocentrum lima 72 horas después, cuando ya empiezan a proliferar de nuevo las células en la parte libre de la placa.
- c) Cultivo saturado de Spirogyra insignis en el momento en que eliminaron las células.
- d) Cultivo de Spirogyra insignis 72 horas después, cuando ya empiezan a proliferar de nuevo las células en la parte libre de la placa.



DISCUSSION

DISCUSION

Todos los organismos analizados muestran una clara dependencia por los factores de crecimiento, al igual que ocurre con las células de mamífero. En todos los casos el suplementar el medio con factores de crecimiento produce un fuerte incremento en la proliferación de todos los organismos: así, las tasas de reproducción son mínimas en el control sin factores de crecimiento, pero tanto el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el suero bovino fetal o el ester de forbol, incrementan significativamente las tasas de reproducción de los distintos organismos.

Este aumento del crecimiento se debe, aparentemente, al efecto mitógeno específico del factor de crecimiento derivado de plaquetas, monoacetato 12 de forbol o suero bovino fetal y no a una deficiencia de nutrientes del medio de cultivo corregida con la adición de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento son péptidos pequeños que se unen a receptores específicos de membrana desencadenando una cascada de segundos mensajeros que provocan la división celular.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas es un mitógeno específico, codificado por el oncogen c-sis y que actúa por la vía de los fosfatidil-inositoles induciendo síntesis de DNA y división celular (Goustin et al., 1986; Cantley et al., 1991). En este sentido, el efecto del monoacetato 12 de forbol sobre la tasa de reproducción corrobora la existencia de la vía del fosfatidil inositol en estos organismos. Este ester de forbol es un análogo de síntesis artificial del diacilglicerol, que penetra por difusión en la célula y, que actuando directamente sobre la proteína kinasa C, induce la división celular de la misma forma que lo hace el factor de crecimiento derivado de plaquetas de una manera natural. Esto explicaría el por qué mediante la suplementación del medio con monoacetato 12 de forbol se obtienen tasas de reproducción en todos los organismos muy similares a las que se obtienen con factor de crecimiento derivado de plaquetas.

En presencia de suero bovino fetal, los organismos también crecen significativamente más que en los controles, y en algunos casos es

cuando se produce una mayor proliferación; esto es lógico si se considera que el suero bovino fetal es una fuente inespecífica de factores de crecimiento, en donde el factor de crecimiento derivado de plaquetas es el factor de crecimiento predominante.

Sin embargo, el posible papel corrector que se puede achacar a los factores de crecimiento de alguna hipotética deficiencia de nutrientes del preparado con agua artificial ASPM f/2 es aparentemente despreciable: el factor de crecimiento derivado de plaquetas es tan solo un pequeño péptido del que se añade al medio una cantidad ínfima (10 ng ml^{-1}) y el monoacetato 12 de forbol es molecularmente un ester de fabricación sintética, del que se añaden también apenas trazas y que no se descompone metabólicamente por la célula para utilizarlo como fuente de carbono o energética, sino que solo participa específicamente en la activación de la protein kinasa C (Kraft & Wayne, 1983).

Todo esto parece confirmar que los organismos ensayados necesitan factores de crecimiento específicos para proliferar, tal y como ocurre con otras líneas celulares eucariotas. Su única diferencia con las células de mamífero es que son capaces de proliferar con un solo factor de crecimiento, mientras que la mayoría de las líneas celulares de mamífero precisan varios factores de crecimiento a la vez (James, 1984). Esta es una de las razones de haber utilizado el suero bovino fetal, que contiene diferentes factores de crecimiento.

Todo ello sugiere que la principal ruta metabólica mediante la cual todos los organismos analizados regulan su ciclo de división celular, es la ruta de los fosfatidil inosítoles.

Al ser organismos pertenecientes a grupos filogenéticamente alejados, cabe pensar que la regulación del ciclo de división celular mediante factores de crecimiento puede ser un mecanismo universal, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de Nurse (1990) que el mecanismo de disparo de la mitosis es un mecanismo común a todos los seres vivos, altamente conservado durante la evolución y ya desarrollado por el antecesor común de los primeros eucariotas.

De la misma manera, es probable que los primeros receptores de factores de crecimiento en los eucariotas primitivos fuesen relativamente inespecíficos respondiendo a conjuntos de factores de crecimiento de estructura semejante, y quizá siga siendo así en muchos de ellos. El que ya estos eucariotas hubiesen desarrollado receptores de factores de crecimiento diferentes pudo ser un hecho de la máxima relevancia evolutiva, al permitir que los primeros eucariotas ya tuvieran diferentes tipos de factores de crecimiento, estando así preadaptados a los mecanismos de control de la división celular que se dan en los organismos pluricelulares, donde cada tipo celular responde a un factor de crecimiento determinado. Este hecho sugiere que a lo largo de la evolución los mecanismos de control del ciclo de división celular dependientes de factores de crecimiento alcanzaron una mayor diversidad en los organismos pluricelulares para así poder controlar el crecimiento de sus distintos tejidos diferenciados. Y quizá esto explique el poco tiempo transcurrido entre la aparición de células eucariotas y la radiación adaptativa de los organismos pluricelulares. Según esta hipótesis, el control de la división celular en base a factores de crecimiento probablemente fue alcanzado ya por los procariotas mucho antes del origen de los primeros eucariotas y se trataría de una verdadera homología evolutiva.

Evolutivamente, la transición de procariotas a eucariotas, que tuvo lugar hace aproximadamente 1500 millones de años, fué quizá la más importante. Se ha sugerido, y es una hipótesis bastante aceptada, que tanto las mitocondrias como los cloroplastos de las células eucariotas tendrían que ser "derivados evolucionados" de microorganismos que en una época muy temprana de la evolución fueron organismos de vida libre. Por ejemplo, los cloroplastos aparentemente fueron antiguas cianofíceas que fueron englobadas por otra célula y que más tarde establecieron una relación simbiótica con ella.

En apoyo de esta teoría endosimbiótica (Margulis, 1981), algunos estudios proponen que tanto las mitocondrias como los cloroplastos contienen pequeños fragmentos de DNA cuya organización es similar a la del DNA que contienen los procariotas (Loeblich, 1976; Bujak & Williams, 1981), mientras que otros más recientes han encontrado

bacterias endosimbióticas dentro del mismo núcleo de algunos dinoflagelados (Costas & López-Rodas, 1990).

Hoy en día conocemos con bastante detalle alguno de los mecanismos generales que produjeron esta asociación endosimbiótica (Margulis, 1981; Margulis & Sagan, 1985), si bien nos falta elucidar algunos de sus procesos funcionales. Entre ellos, la regulación del ciclo de división celular debió ser uno de los principales problemas a los que se enfrentaron los primeros eucariotas, que además tuvieron que conseguir una cierta armonía en la división de sus organelas. El mecanismo mediante el cual resolvieron este problema, así como su origen evolutivo, plantean uno de los principales problemas a la biología actual. Pero si todos los procariotas que participaron en la asociación endosimbiótica que dió origen a las células eucariotas tenían el mismo mecanismo de control de la división celular en base a factores de crecimiento, entonces resulta más fácil comprender cómo pudo conseguirse una división coordinada de todo el conjunto y cómo el procariota englobante pudo llegar a hacerse con el control de la división celular de sus endosimbiontes.

Un hecho a destacar en el experimento realizado con factores de crecimiento, es el diferente crecimiento que se produce cuando los organismos crecen en un medio completamente artificial como es el ASPM f/2 o cuando crecen en agua de procedencia natural (ya sea marina o dulce) enriquecida así mismo con f/2. Las tasas de crecimiento así obtenidas son en todos los casos, excepto en el clon Pt* de Prorocentrum triestinum, significativamente mayores en aquellos medios que fueron preparados a partir de agua de procedencia natural.

Estas diferencias puede que se deban a la carencia de factores de crecimiento de los medios artificiales, sugiriendo entonces que en los medios naturales existen factores de crecimiento de forma libre que pueden ser utilizados por las microalgas. El origen de estos factores de crecimiento es desconocido en la actualidad, pero basándose en el carácter paracrino de los factores de crecimiento (Cascales, 1989), se

han postulado varias teorías indicando que estos factores de crecimiento son liberados al medio por otros organismos. Así por ejemplo, el alga Chlorella es capaz de excretar factores de crecimiento al medio sintetizados previamente por ella (Soong, 1980), mientras que más recientemente se ha comprobado que ciertas bacterias fecales son capaces de producir y excretar al medio diacilglicerol (Morotomi et al., 1990). Así mismo, la presencia masiva de bacterias y de materia orgánica parecen ser factores determinantes para la producción masiva de microalgas en el mar (Arzul & Gentien, 1990), de la misma manera que los ácidos húmicos provocan incremento del crecimiento de cultivos de dinoflagelados (Gedziorowska & Plinski, 1990) y que el número de bacterias simblontes afecta a las tasas de crecimiento (Silva & Franca, 1985; Costas & Lopez-Rodas, 1990).

Los factores de crecimiento que se han añadido en los experimentos realizados no pueden presentar un efecto nutricional (Costas & Lopez-Rodas, 1991a); el hecho de que una pequeña molécula orgánica como el PMA, que no puede ser utilizada como fuente de nitratos, induzca un incremento tan elevado en la tasa de reproducción (incrementos de hasta 9,08 veces el control en el caso de S. insignis), confirma el efecto mitogénico de los factores de crecimiento, al menos en P. lima, dos clones de P. triestinum (Pt-a y Pt-b), A. tamarense, T. suecica, S. insignis y P. tricornutum.

Así, todos estos organismos podrían producir de forma endógena sus propios factores de crecimiento, al igual que lo hacen otras líneas celulares eucariotas. Esta producción autocrina de factores de crecimiento explicaría el por qué algunos de ellos son capaces de crecer en medios artificiales en total ausencia de factores de crecimiento.

Un caso completamente diferente es el que presenta el clon Pt* de P. triestinum, que es capaz de crecer exactamente igual en un medio constituido con agua natural que en otro con agua destilada (como es el caso del ASPM) ajustando la osmolaridad. Tampoco influyen sobre su proliferación los factores de crecimiento con que se suplementa el medio. Así, tanto con el PMA, el PDGF, el FBS, el control en ASPM o en

agua natural, se obtienen tasas de crecimiento que no difieren significativamente entre sí, no incrementándose en ningún caso la proliferación de este dinoflagelado.

Además, un hecho relevante son los resultados que se obtienen en los medios condicionados. Estos resultados sugieren que el clon Pt* es capaz de producir sus propios factores de crecimiento, autoestimulando su división y que también es capaz de excretarlos al medio, como lo demuestra que el clon Pt-v incrementa su proliferación en un 100% en un medio condicionado por Pt*. Aparentemente Pt-v utiliza los factores de crecimiento existentes en el medio y que fueron previamente excretados por Pt*.

Curiosamente, estudios anteriores sobre este clon demostraron que Pt* presentaba una serie de anomalías respecto a otros clones de la misma especie. Entre ellos destacaba el que tenía un mayor número de cromosomas y bastante más cantidad de DNA que otros clones y que además tenía un número anormalmente elevado de mitocondrias, así como un ciclo celular anómalo (Costas & Goyanes, 1988, 1989; Costas et al., 1988).

La independencia de factores de crecimiento es una de las características de las células que han sufrido una transformación (Lewin, 1987). De alguna manera, estas células transformadas pueden producir factores de crecimiento de forma autocrina (Kaplan et al., 1982; Ishikawa et al., 1990). De hecho, tanto los receptores de membrana como los factores de crecimiento están codificados por protooncogenes (Cantley et al., 1991). Así mismo, se ha descrito la existencia de líneas celulares tumorales que son capaces de producir factores de crecimiento de forma autocrina (Kaplan et al., 1982; Ishikawa et al., 1990). Así proponemos que al igual que algunas células de mamífero sufren transformaciones oncógenas que las vuelven independientes de estos factores, análogamente algunos de estos protistas podrían sufrir el equivalente a una transformación oncógena, perdiendo la dependencia por factores de crecimiento.

Así, este fenómeno podría tener una antigüedad mucho mayor de la que se ha supuesto, y en su origen ser consecuencia del mecanismo de control de la división celular fijado ya en una época muy temprana de la historia de la vida.

En principio, la idea de una producción autocrina de factores de crecimiento y su excreción al medio por parte de los dinoflagelados puede resultar extraña, y el que ya organismos tan "primitivos" como los dinoflagelados puedan sufrir transformaciones oncógenas, puede resultarlo todavía más. Pero si, como se ha visto anteriormente, organismos como bacterias fecales o clorofíceas como Chlorella pueden hacerlo ¿por qué no los dinoflagelados? Además, si asumimos que estos organismos son capaces de liberar ectocrinamente inhibidores del crecimiento de otras algas, especialmente de diatomeas, que compiten con ellos (Gentien & Arzul, 1990), la liberación autocrina de factores de crecimiento podría seguir una dinámica parecida.

Así mismo, la universalidad de los mecanismos de control propuesta en 1990 por Nurse y corroborada y aceptada ya por numerosos autores, implica que los mecanismos reguladores de la división celular son básicamente los mismos en todos los organismos eucariotas. La base genética de estos mecanismos de control son los protooncogenes y los genes cdc del ciclo de división celular (Cantley et al., 1991), habiéndose encontrado genes homólogos a los protooncogenes de vertebrados en una gran variedad de organismos que van desde protistas hasta células de mamífero (Walker et al., 1992; Costas et al., en prensa a). Además, algunos dinoflagelados del género Prorocentrum producen un polieter derivado de un ácido graso de 38 carbonos : el ácido okadaico. Este ácido okadaico se revela como un poderoso mitógeno que actúa, como si de un factor de crecimiento se tratase, sobre los propios Prorocentrum (Costas et al., en prensa b). Pero también actúa como un potente mitógeno en células de mamífero, resultando un promotor de tumores, con múltiples efectos sobre las proteínofosfatasas, e induciendo una activación de la Mitosis (Murray, 1993).

En este sentido se podría interpretar que algunas mareas rojas, que básicamente son espectaculares incrementos demográficos de ciertas

especies (principalmente de dinoflagelados), pudieran ser en realidad el resultado de una alteración de los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular de estas especies, que pudieron haber sufrido el análogo a una transformación.

Aparentemente, los factores de crecimiento son capaces de inducir la división celular en células quiescentes de mamífero (Cantley et al., 1991), de la misma forma a como lo hacen en los quistes del dinoflagelado Alexandrium tamarense que se ha utilizado en este trabajo. En nuestro caso, los quistes germinan perfectamente en aquellos medios que fueron suplementados con factores de crecimiento (PDGF y FBS) mientras que en los medios control (ASPM f/2 y ASPM f/2+RPMI) apenas son capaces de germinar. Así, en los medios sin suplementar con factores de crecimiento solamente el 30% de los quistes son capaces de germinar, pero la adición de factores de crecimiento hace que este porcentaje se incremente hasta alcanzar un 90% de germinación.

Este incremento en la germinación de los quistes se debe aparentemente al efecto mitogénico de los factores de crecimiento añadidos al medio y no a una deficiencia de nutrientes. La importancia del PDGF como nutriente es mínima y además solamente se añade un ínfima cantidad (10 ng ml^{-1}). Por su parte el RPMI es un medio de cultivo que se utiliza frecuentemente en cultivos de células de mamífero y que principalmente contiene una gran variedad de nutrientes, incluyendo pequeños péptidos, pero no contiene factores de crecimiento. En dicho medio se produce aproximadamente el mismo crecimiento que en el medio artificial ASPM f/2 tradicionalmente usado como control para microalgas (aproximadamente un 14% de germinación en ambos casos), lo que indica que no es la falta de nutrientes lo que produce tan poca germinación.

Probablemente en la superficie de los quistes existan receptores de membrana, que al unirse con los factores de crecimiento, estimulen la división celular mediante la activación de los genes implicados en el proceso de germinación, de una manera análoga a como ocurre en los

zigotos (Hartwell & Weinert, 1989) y en las células vegetativas de muchos otros organismos (Cantley et al., 1991), apoyando la teoría de un mecanismo universal de control de la división celular (Nurse, 1990).

Podemos considerar que los quistes de los dinoflagelados son análogos a las células de mamífero que permanecen en estado quiescente a la espera de que las condiciones ambientales sean favorables. Si el control de la división celular es universal, ambos tipos celulares se encontrarían en el estado G_0 de la fase G_1 del ciclo celular. El tiempo que las células permanecen en este estado es muy variable, y puede durar incluso años, como ocurre en algunos quistes de dinoflagelados donde han llegado a encontrarse quistes fósiles, perfectamente viables, que datan del Eoceno, es decir de hace unos 50 millones de años (Hallegraeff & Maclean, 1989). Solamente cuando en el medio encuentran condiciones favorables al crecimiento, que no son sólo nutrientes sino factores de crecimiento (Cross & Dexter, 1991), las células que permanecen en G_0 salen de este estado y completan el resto de su ciclo celular.

Además, si los factores de crecimiento inducen tanto la germinación de los quistes como la de las células vegetativas de los dinoflagelados, entonces los factores de crecimiento tienen que jugar un papel muy importante en el origen de los blooms de los dinoflagelados. A este respecto, es importante la posible presencia de factores de crecimiento en el medio natural, como ya indicábamos anteriormente.

Dado el carácter paracrino de los factores de crecimiento, la densidad de los quistes en el sedimento marino puede afectar directamente a su germinación, y a lo mejor es necesaria una mínima densidad celular para incrementar esta germinación. Estos factores de crecimiento pueden ser producidos por bacterias libres en el medio (Morotomi et al., 1990) o incluso por las numerosas bacterias que tienen muchos organismos epífitos en su superficie (Silva & Franca, 1985). Recientemente se ha comprobado que muchas especies de macroalgas y de organismos marinos son capaces de sintetizar y excretar al medio determinadas glicoproteínas llamadas lectinas que

tienen capacidad mitógena sobre muchas especies de microalgas. Así, por ejemplo, moluscos como Aplysia depilens o Tridacnea crocea, esponjas como Aaptos papillata, algas verdes como Ulva lactuca o Codium fragile, algas rojas como Ptilota plumosa, corales como Erythrina cristagalli e incluso el lubricante Homarus americanus, son capaces de producir lectinas, que influyen directamente sobre la proliferación celular de muchas microalgas (Slifkin & Doyle, 1990), aparentemente mediante la activación de vías de segundos mensajeros similares a las activadas por factores de crecimiento (Aguilera et al., 1993).

En la actualidad quedan todavía muchas cuestiones por resolver respecto al papel que desempeñan los mecanismos de control biológico en general y los factores de crecimiento en particular sobre el origen y desarrollo de las floraciones de dinoflagelados. Pero no cabe duda que los factores biológicos juegan un papel al menos tan importante como el de los factores físicos en las proliferaciones de fitoplancton.

Hasta el momento se han descrito fenómenos que se consideraban exclusivos de organismos pluricelulares eucariotas, como la germinación de células quiescentes (o quistes en su caso), la dependencia de factores de crecimiento y la presencia de posibles transformaciones oncógenas en organismos unicelulares, apoyando la teoría de un mecanismo universal de control de la división celular basada en factores de crecimiento, en genes y en productos génicos que responden a dichos factores de crecimiento (Goustin et al., 1986; Cantley et al., 1991).

Entre los mecanismos biológicos que controlan la división celular en células de mamífero, aparte de los anteriormente citados, se encuentran el envejecimiento celular y la inhibición por contacto (Alberts et al., 1992). Respecto al primero, la mayor parte de las células están programadas genéticamente para degenerar y morir después de un determinado número de divisiones celulares (Hartman, 1985).

Las células sufren cambios morfológicos, se paran de dividir y mueren. Aunque el mecanismo de envejecimiento celular no es del todo conocido, parecen existir ciertos genes que controlarían el envejecimiento de las células de mamífero (Hartman, 1985). Aparentemente, el mecanismo regulador de estos genes es capaz de contar generaciones o de medir tiempo. Este mecanismo de envejecimiento también se encuentra presente en algunas algas unicelulares como S. insignis (Costas & Lopez-Rodas, 1991b).

Respecto a la inhibición por contacto, los resultados obtenidos parecen prometedores. La inhibición del crecimiento de los cultivos saturados de algas unicelulares es un proceso complejo en el que están implicados fenómenos tales como la falta de nutrientes, el acúmulo de metabolitos de deshecho, efectos de sombra de unas células sobre otras y, probablemente la inhibición por contacto. Dado que todos estos factores no actúan independientemente, el diseñar un experimento que pueda discernir, por independiente, la importancia de cada uno de estos factores puede ser importante. En este sentido, el diseño experimental que presentamos aquí solamente nos permite discernir si la inhibición por contacto toma o no parte en la inhibición del crecimiento.

De todos los organismos ensayados, es P. lima el que presenta una respuesta más evidente, al estar su crecimiento directamente influido por fenómenos del tipo de la inhibición por contacto. Así, tanto las tasas de reproducción como las densidades celulares que se obtienen en el experimento 1 y en el 2 son claramente diferentes: P. lima no es capaz de crecer en medios nuevos que se encuentran con alta densidad celular pero sí lo hace en medios saturados que tienen una baja densidad celular. Lo mismo ocurrió cuando P. lima se cultivó en placas de Petri hasta que alcanzó la saturación y posteriormente se eliminaron mecánicamente las células de una de las mitades de la placa: a pesar de haber parado de crecer, las células empezaron a hacerlo de nuevo a partir de la línea divisoria y hacia la zona libre de células de la placa, lo que indica que el crecimiento de P. lima se habría visto inhibido claramente por un fenómeno denso dependiente.

Por el contrario, ni P. tricornutum ni Tetraselmis sp. presentan inhibición por contacto al no poder crecer en medios saturados pero que tienen una densidad celular baja. Sin embargo, dichos organismos sí crecen en aquellos medios que presentan una densidad celular alta pero cuyo medio de cultivo ha sido reemplazado por uno nuevo (es decir medio "fresco"), lo que indica que, en este caso, el crecimiento se ha visto afectado por otro tipo de fenómenos como el acúmulo de metabolitos de deshecho o la falta de nutrientes en el medio.

Por último, tres de los organismos, S. insignis, P. triestinum y A. tamarense, crecen en ambos experimentos aunque no de la misma forma. Así, A. tamarense crece prácticamente en la misma proporción en medios de cultivo que están saturados y con densidad celular baja y en aquellos medios nuevos con densidad celular alta. Al parecer la inhibición por contacto toma parte en la inhibición del crecimiento de A. tamarense, pero otros mecanismos (acúmulo de desechos o falta de nutrientes) son, al menos, tan importantes.

Los otros dos organismos, P. triestinum y S. insignis también crecen en los dos experimentos pero de una forma diferente. Mientras que en P. triestinum predominan los fenómenos tales como la falta de nutrientes o el acúmulo de metabolitos de deshecho, en S. insignis ocurre lo contrario y su crecimiento se inhibe por fenómenos densodependientes. Al cultivarse en placas de Petri, S. insignis tiene el mismo patrón de crecimiento descrito para P. lima: una vez eliminados los filamentos de una de las mitades de la placa, el resto de los filamentos empieza a crecer de nuevo, colonizando la parte vacía de la placa. En el caso de S. insignis parece que la inhibición por contacto juega algún papel importante en el control de ciclo celular.

A la vista de los resultados obtenidos, dos de las tres especies bénticas que se analizaron aquí (P. lima y S. insignis) muestran inhibición por contacto, lo que sugiere que dicho fenómeno podría ser un mecanismo adaptativo en las especies de algas bénticas.

La inhibición por contacto ha sido tradicionalmente un mecanismo considerado exclusivamente de las células animales, cuya función sería limitar su proliferación celular cuando las células alcanzan una

determinada densidad en el medio. Los resultados obtenidos aquí sugieren una visión alternativa, al trabajar con organismos filogenéticamente más primitivos que las actuales células de mamífero. En este sentido, los dinoflagelados son el grupo más interesante de estos cinco organismos ensayados, ya que han sido considerados como uno de los grupos más controvertidos en cuanto a su posición filogenética. Al haber desarrollado mecanismos tales como la inhibición por contacto, se puede sugerir que este mecanismo fué desarrollado ya por los organismos unicelulares primitivos en una época muy temprana de la evolución, probablemente como un mecanismo para autocontrolar sus poblaciones naturales. Sin embargo, este tipo de mecanismos también fueron desarrollados por otras algas (por ejemplo las Conjugatophyceae) alejadas filogenéticamente de los dinoflagelados, lo que sugiere además que dicho mecanismo fué desarrollado independientemente en diferentes grupos de organismos unicelulares.

En definitiva, se han descrito fenómenos que hasta ahora se consideraban exclusivos de organismos pluricelulares eucariotas, como la inhibición por contacto, la salida de la fase G1 de las células quiescentes de mamífero o la actividad protein kinasa en diversos organismos unicelulares y eucariotas primitivos, que parecen haber sido muy bien conservados en el curso de la evolución.

Una de las características más sorprendentes del proceso evolutivo, es que todos los phyla de organismos pluricelulares aparecieron muy rápidamente sobre la Tierra tras un largo periodo en el que las células eucariotas solo alcanzaron un nivel de organización protista (unicelular). Asumiendo los principios de simplicidad y economía tan característicos de los procesos biológicos, cabe pensar que probablemente, las primeras células eucariotas, hace unos 1500 millones de años desarrollaron casi todos los mecanismos necesarios para producir organismos pluricelulares durante ese aparente periodo de estasis de

casi 1000 millones de años que precedió a la aparición brusca de todos los tipos de animales y plantas conocidas en un periodo menor, quizá de 20 millones de años.

Y entre esos mecanismos destacan muy especialmente los mecanismos de control de la proliferación celular.

En esta tesis se recoge como las células eucariotas más primitivas que existen en la actualidad, las microalgas de diversos phyla implicados en el origen y diversificación del resto de todos los organismos, ya controlaban su ciclo de división celular por mecanismos dependientes de factores de crecimiento, analogamente a como lo hacemos nosotros hoy en día, hasta el punto de responder al factor de crecimiento derivado de plaquetas.

También descubrieron los mecanismos de inhibición por contacto, tan importantes para la organización en tejidos y órganos de los animales y plantas.

En base a estos hechos nos atrevemos a sugerir que estos mecanismos de control de la proliferación celular pudieron desarrollarse como mecanismos netamente ecológicos de autocontrol de la densidad de las poblaciones naturales, mientras que el envejecimiento celular les permitía predecir la variación estacional.

Estos organismos descubrieron además los factores de crecimiento como telemediadores para comunicarse con sus vecinos. También descubrieron la inhibición por contacto como un mecanismo para regular su densidad celular. E incluso descubrieron el envejecimiento celular como un mecanismo para adaptarse a las periodicidades de un ambiente fluctuante alrededor de las variaciones circanuales.

Creemos que la evolución ha sido siempre conservadora y que pudo utilizar estos mecanismos primitivos de control de la proliferación para la formación de los organismos pluricelulares. Aunque esto no ha sido probado, nos parece una atractiva hipótesis de trabajo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) Todas las microalgas estudiadas responden de forma positiva a los factores de crecimiento, que provocan un aumento significativo tanto de su tasa de reproducción como, consecuentemente de su densidad celular. Esto se debe, aparentemente, a que el control de la división celular en estos organismos se realiza a través de la vía de los fosfatidil inositoles.

2) El crecimiento de los organismos en medios naturales, es decir sin ningún aporte artificial de factores de crecimiento, es significativamente mayor que en los controles, pero es a su vez significativamente menor que en los medios suplementados con factores de crecimiento. Este hecho sugiere que en el agua de procedencia natural existen determinados factores de crecimiento de forma libre, que actuarían sobre los organismos.

3) La germinación de los quistes del dinoflagelado Alexandrium tamarense se incrementa significativamente cuando en el medio existen factores de crecimiento. De algún modo, estos factores activarían vías de segundos mensajeros responsables de la división celular, lo que provocaría su germinación.

4) La inhibición por contacto es un mecanismo de control biológico que utilizan algunas especies de microalgas para controlar su proliferación. Este fenómeno tiene lugar principalmente en dos de las especies bentónicas, el dinoflagelado Prorocentrum lima y la conjugatophyceae Spirogyra insignis. Este mecanismo de control de la división celular al parecer fué desarrollado ya por organismos unicelulares primitivos, antes de que surgieran los primeros organismos pluricelulares.

5) Uno de los clones, el clon Pt* del dinoflagelado Prorocentrum triestinum, responde de forma anómala a la adición de factores de crecimiento al medio: ninguno de los factores de crecimiento añadidos incrementa de forma significativa su tasa de reproducción. Esto sugiere que este clon ha perdido los controles que regulan su división celular y

aparentemente, se comporta de manera semejante a una célula transformada.

6) El control de la división celular parece ser un mecanismo universal, existe en todos los organismos eucariotas incluyendo phyla de microalgas como los dinoflagelados.

RESUMEN

RESUMEN

Numerosos estudios sobre líneas de mamíferos y levaduras indican que las células eucariotas controlan su ciclo de división celular mediante una serie de genes y productos génicos específicos para la regulación de su ciclo celular. Tradicionalmente se asume que todos estos mecanismos son característicos de organismos pluricelulares, mientras que los organismos unicelulares de vida libre proliferan tan sólo limitados por las condiciones ambientales. Sin embargo, trabajos recientes hacen suponer que tanto los mecanismos de control de la división celular como los procesos de dependencia de factores de crecimiento y de envejecimiento celular podrían ser universales, afectando a todo tipo de células eucariotas y haciéndose extensivo incluso a organismos unicelulares.

Así, se analizaron los efectos de algunos factores de crecimiento (Suero Bovino Fetal, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas y Monoacetato 12 de Forbol) sobre la proliferación de diversos organismos unicelulares elegidos por su posible implicación en el origen y diversificación de las células eucariotas: los mesocariotas (Prorocentrum lima dinophyceae, Prorocentrum triestinum dinophyceae y Alexandrium tamarense dinophyceae), el eucariota primitivo Tetraselmis sp. praxinophyceae y los eucariotas más recientes Phaeodactylum tricorutum bacillariophyceae y Spirogyra insignis conjugatophyceae).

Del mismo modo se analizó el efecto de determinados factores de crecimiento sobre la germinación de quistes del dinoflagelado Alexandrium tamarense. Y por último se estudió si la inhibición por contacto pudiera ser un mecanismo de control de la división celular en este tipo de organismos de una manera análoga a cómo ocurre en las células de mamífero.

Todos los organismos ensayados responden a factores de crecimiento tal y como hacen las células de mamífero. Los factores de crecimiento, debido a su efecto mitogénico específico, incrementaron significativamente la densidad celular así como las tasas de

reproducción. Del mismo modo, son capaces de inducir la germinación de los quistes de dinoflagelados en fase de latencia. Finalmente, la inhibición por contacto forma parte de los mecanismos que controlan la proliferación celular, en algunos de los organismos ensayados.

Todo ello sugiere que el control de la división celular es un mecanismo altamente conservado durante la evolución, y que ya fué desarrollado por algunos de los primeros organismos unicelulares, antes de la aparición de los organismos pluricelulares, y que podría tener consecuencias sobre la cinética de la proliferación de microalgas en condiciones naturales.

SUMMARY

A lot of works related to cell lines of both mammals and yeasts suggest that their cell division cycle is controlled by a specific set of genes and gene products. It was traditionally assumed that these kind of controls belong to pluricellular organisms, while the control of the unicellular ones is only limited by the environmental conditions. However, recent works suggest that the control mechanisms as well as the dependence of growth factors and the ageing processes could be universal for all the eukaryotic cells, including unicellular organisms.

Thus, the effect of different growth factors and mitogenes (fetal bovine serum, platelet derived growth factor and phorbol 12 monoacetate) were analyzed on the proliferation of several unicellular organisms. These organisms were selected by its importance in the evolutive origin and diversification of the eukaryotic cells: The mesokayotes Prorocentrum lima dinophyceae, Prorocentrum triestinum dinophyceae and Alexandrium tamarense dinophyceae, the early eukaryote Tetraselmis sp. praxinophyceae and the more recent eukaryotes Phaeodactylum tricornutum bacillariophyceae and Spirogyra insignis conjugatophyceae.

In the same way, the effect of different growth factors on the excystment of the Alexandrium tamarense dinophyceae cysts were analyzed. Finally, it was studied whether the contact inhibition of growth takes place in the control of cell proliferation in these kind of organisms.

Cell yield and acclimated growth rates of all the clones tested increased significantly due to the specific mitogenic effect of growth factors. Furthermore, growth factors are able to induce the excystment in dinoflagellate cysts, and contact inhibition has its importance as a control mechanism in the cellular proliferation of some of these organisms.

Apparently, this is thought to be due to the existence of a universal mechanism controlling the cell division cycle in all eukaryotic cells, in a

similar way as mammalian and yeast cells do. This control mechanism were developped by some unicellular algae, some time before the pluricellular organisms appear.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

AGUILERA, A.; GONZALEZ-GIL, S.; GONZALEZ de CHAVARRI, E.; LOPEZ-RODAS, V. & COSTAS, E. 1993. Mecanismos de control biológico de la proliferación celular de los dinoflagelados marinos Prorocentrum lima y Prorocentrum triestinum: 2- Uso de lectinas in vitro. Revista de Biología Marina 28(1): 165-174.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; ROFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. 1992. Crecimiento y división celular. En: Biología Molecular de la Célula. Ed. Omega, Barcelona. pp. 775-842.

ALVAREZ, M. 1991. La eutrofización de las aguas continentales españolas. Ed. Henkel Ibérica. Barcelona.

ANDEOL, Y.; MECHALI, M. & HOURDRY, J. 1992. Localization of ras protooncogen expression during development in Xenopus laevis. Molecular Reproduction and Development 32: 187-195.

ANDERSEN, P.; EMSHOLM, H.; JOHANNESSEN, J. & HALD, B. 1993. Report on the Danish monitoring programme on toxic algae and algal toxins 1991-1992. Proceedings of the VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Nantes, Francia. pp 91.

ANDERSON, D. M. 1980. Effects of temperature conditioning on development and germination of Gonyaulax tamarensis hypnozygotes. J. Phycology 16: 166-172.

ANDERSON, D. M. 1994. Red tides. Scientific American. August 1994. pp. 52-58.

ANDERSON, D. M.; KULIS, D. M.; ORPHANOS, J. A. & CEURVELS, A. R. 1982. Distribution of the toxic dinoflagellate Gonyaulax tamarensis in the Southern New England region. Est. Coast. Mar. and Shelf. Sci. 14: 447-458.

ANDERSON, D.M. & KEAFER, B.A. 1987. An endogenous annual clock in toxic marine dinoflagellate Gonyaulax tamarensis. Nature 325: 616-617.

ARZUL, G. & GENTIEN, P. 1990. Chemical typology of coastal sediments in relation to red tides. En: Toxic Marine Phytoplankton. E. Graneli (eds). Elsevier Sci. Publ. Co, New York. pp. 93-97.

BARBACID, M. 1987. Ras genes. Ann. Rev. Biochem. 56: 779-827.

BASERGA, R.; KACZMAREK, L.; CALABRETTA, B.; BATTINI, R. & FERRARI, S. 1986. Cell cycle genes as potential oncogenes. En: Cell cycle and oncogenes. Tanner, W. & Gallwitz, D. (eds). Springer Verlag, New York. pp. 3-12.

BEACH, D.; DURKACZ, B. & NURSE, P. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in fission yeast and budding yeast. Nature 300: 706-709.

BERRIDGE, M. J. 1987. Inositol lipids and cell proliferation. En: Oncogenes and growth control. Kahn, P. & Graf, T. (eds). Springer Verlag, Berlin. pp. 147-153.

BLANCO, J. 1989. Quistes de dinoflagelados y mareas rojas. En: Las purgas de mar como fenómeno natural: las mareas rojas. Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas 4: 85-93. Fraga, F. & Figueiras, F. G. (eds). Edición do Castro, La Coruña.

BRAND, L. E.; GUILLARD, R. R. & MURPHY, L. S. 1981. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. J. of Plankton Research 3: 192-201.

BRAVO, R. & MacDONALD-BRAVO, H. 1986. The effect of pH on the induction of competence and progression to the S-phase in mouse fibroblast. FEBS Letters 195: 309-312.

BUJAK, J. P. & WILLIAMS, G. L. 1981. The evolution of dinoflagellates. *Can. J. Bot.* 59: 2077-2087.

CANTLEY, L. C.; AUGER, K.; CARPENTER, C.; DUCKWORTH, B.; GRAZIANI, A.; KAPPELLER, R. & SOLTOFF, S. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281-302.

CARMICHAEL, W. et al. 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). En: *Marine Toxins: Origin Structures and Molecular Pharmacology*. ACS-Symposium Series 418. Washington DC.

CASCALES, M. 1989. Mecanismos reguladores de la proliferación celular. Real Academia de Doctores. Madrid.

COSTAS, E. 1986. Ultraestructura cromosómica en dinoflagelados. Consideraciones evolutivas. Ph. D. Tesis. Universidad Santiago de Compostela. 138 pp.

COSTAS, E. & VARELA, M. 1987. Variabilidad genética en tasas de reproducción en una marea roja del dinoflagelado Prorocentrum triestinum Schiller. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 4(2): 29-36.

COSTAS, E. & GOYANES, V. J. 1988. Comparative analysis of dinoflagellate chromosomes and nuclei: a phylogenetic approach. *Genét. (Life Sci. Adv.)* 7: 15-18.

COSTAS, E.; FERNANDEZ, J.L.; NAVARRO, M. & VARELA, M. 1988. A comparative morphometrical study of the ultrastructural organization in six dinoflagellate species using stereology. *Botanica Marina* 31: 555-562.

COSTAS, E. & GOYANES, V. J. 1989. Ultrastructure and division behaviour of dinoflagellate chromosomes II. Quantitative three dimensional organization and karyotype of Prorocentrum triestinum. *Cytologia* 54: 539-546.

COSTAS, E. & VARELA, M. 1989. A circannual rhythm in cyst formation and growth rates in the dinoflagellate Scrippsiella trochoidea Stein. *Chronobiologia* 16:265-270.

COSTAS, E. & LOPEZ-RODAS, V. 1990. An endocytobiological origin of dinoflagellate chromosomes?. *Endocytobiosis and Cell Res.* 7: 105-107.

COSTAS, E. & LOPEZ RODAS, V. 1991a. Persistence of cell division synchrony in Spirogyra insignis. Membrans proteoglycans transmitting information throughout generations. *Chronobiology International* 8(2): 85-92.

COSTAS, E. & LOPEZ RODAS, V. 1991b. Evidence for an annual rhythm in cell ageing in Spirogyra insignis (Chlorophyceae). *Phycologia* 30: 597-599.

COSTAS, E.; AGUILERA, A.; GONZALEZ-GIL, S. & LOPEZ RODAS, V. 1993. Contact inhibition: Also a control for cell proliferation in unicellular algae?. *Biological Bulletin* 184: 1-5.

COSTAS, E.; AGUILERA, A.; GONZALEZ-GIL, S. & LOPEZ-RODAS, V. (en prensa a). C-myc protooncogen peptides in early and modern eukaryotes. *Biosystems*.

COSTAS, E.; AGUILERA, A.; GONZALEZ-GIL, S. & LOPEZ-RODAS, V. (en prensa b). Control mechanisms of cell proliferation in the marine dinoflagellate Prorocentrum lima. En: *Toxic Marine Phytoplankton*. P. Lassus (ed). Nantes, Francia.

CROSS, M. & DEXTER, T. M. 1991. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64: 271-280.

CROW, F. J. & KIMURA, M. 1970. En: *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row (eds). 591 pp.

CURRAN, T. & FRANZA, B. R. 1988. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55: 395-397.

DALE, D. 1983. Dinoflagellate resting cyst: benthic plankton. En: *Survival strategies of the algae*. Fryxell, G. A. (ed). Cambridge University Press. pp. 69-114.

DISA, S.; MANILLA, C. & SCHER, C. D. 1989. Purification and characterization of PDGF and Heavy-Metal-Modulated nuclear proteins. *The J. of Biol. Chemistry* 264(27): 15993-15999.

DODGE. 1965. Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesokaryotic cell. 2nd. Int. Conf. on Protozool. Exc. Med. Int. Congr. Serv. 91. p. 339.

DOREE, M. 1990. Control of M-phase by Maturation-Promoting Factor. *Current Opinions in Cell Biology* 2: 269-273.

DRAETTA, G.; BRIZUELA, L.; POTASHKIN, J. & BEACH, D. 1987. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2⁺* and *suc1⁺*. *Cell* 50: 319-325.

DRAETTA, G.; LUCA, F.; WESTENDORF, J.; BRIZUELA, L.; RUDERMAN, J. & BEACH, D. 1989. *cdc 2* protein kinase is complexed with cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56: 829-838.

DUNPHY, W. G.; BRIZUELA, L.; BEACH, D. & NEWPORT, J. 1988. The Xenopus *cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmatic regulator of mitosis. *Cell* 54: 4223-431.

EDGAR, B. A. & O'FARRELL, P. H. 1989. Genetic control of cell division patterns in Drosophila embryo. *Cell* 57: 177-187.

EGAN, S. E. & WEINBERG, R. A. 1993. The pathway to signal achievement. *Nature* 365: 781-782.

ELLEGAARD, M.; CHRISTENSEN, N. & MOESTRUP, Ø. 1993. Gymnodinium catenatum germinated from Danish marine sediments. Proceedings of the VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Nantes, Francia. pp. 67.

ESTRADA, M. 1989. Proliferaciones de dinoflagelados en microcosmos y en ecosistemas naturales. En: Las purgas de mar como fenómeno natural: las mareas rojas. Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas 4: 45-53. Fraga, F. & Figueiras, F. G. (eds). Ediciós do Castro. La Coruña.

FIGUEIRAS, F. G. 1989. Formación y mantenimiento de loas purgas de mar en las Rías Bajas. En: Las purgas de mar como fenómeno natural: las mareas rojas. Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas 4: 73-84. Fraga, F. & Figueiras, F. G. (eds). Ediciós do Castro. La Coruña.

FYLLINGEN, I. & MARTINUSSEN, I. 1993. Norwegian monitoring and forecasting of algal occurrence. Proceedings of the VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Nantes, Francia. pp. 94.

GEDZIOROWSKA, D. & PLINSKI, M. 1990. Humic compounds and growth response of phytoplankton dominated by dinoflagellates (Late spring bloom): observation in coastal waters of the Southern Baltic. En: Toxic Marine Phytoplankton. E. Graneli, Sundstron, B., Edler, L., Anderson, D.M. (eds) . Elsevier Sci. Publ. Co, New York. pp.155-160.

GENTIEN, P. & ARZUL, R. 1990. A theoretical case of competition based on the ectocrine production by Gyrodinium cf. aureolum. En: Toxic Marine Phytoplankton. E. Graneli, Sundstron, B., Edler, L., Anderson, D.M. (eds) . Elsevier Sci. Publ. Co, New York. pp.161-164 .

GLOTZER, M.; MURRAY, A. W. & KIRSCHNER, M. W. 1991. Cyclin is degraded by ubiquitin pathway. Nature 349: 132-138.

GOSSELIN, S.; LEVASSEUR, M. & GAUTHIER, D. 1993. Transport and introduction of toxic dinoflagellates via ballast water on the Eastern

Atlantic Coast of North America. Proceedings of the VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Nantes, Francia. pp. 90.

GOUSTIN, A.S.; LEOF, E.B.; SHIPLEY, G.D. & MOSES, H.L. 1986. Growth factors and cancer. *Cancer Research* 46: 1015-1029.

GHIARA, J. B.; RICHARDSON, H. E.; SUGIMOTO, K.; HENZE, M.; LEW, D. J.; WITTENBERG, C. & REED, S. I. 1991. A cyclin B homolog in Saccharomyces cerevisiae: chronic activation of the CDC28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell* 665: 163-174.

GUILLARD, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture Of Marine Invertebrate Animals*. W. Smith & M. Chanley (eds) Plenum. Publ. Co, New York. pp. 29-60.

HALLEGRAEFF, G. M. & McCLEAN, J. L. 1989. En: *Biology, epidemiology and management of Pyrodinium bahamense red tides*. Hallegraeff, G. M. & McClean, J. L. (eds). ICLARM Conference Proceedings 21: 286 pp.

HALLEGRAEFF, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2): 79-99.

HARTMAN, C. 1985. Les genes de la mort. *La Recherche* 167: 838-839.

HARTWELL, L. & WEINERT, T. 1989. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle. *Science* 246: 629-634.

HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; PRINGLE, J. R. & REID, B. J. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46-51.

HEIKKLE, R.; SCHWAB, G.; WICKSTROM, E.; LOBE, S. L.; PLUZNIK, D. H.; WATT, R. & NECKERS, L. M. 1987. Ac-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S-phase but no progress from G0 to G1. *Nature* 328: 445-449.

HERZOG, M.; BOLETZKY, S. & SOYER, M. O. 1984. Ultrastructure and biochemical nuclear aspects of eukaryotic classification: independent evolution of the dinoflagellates as a sister group of the actual eukaryotes. *Origins of Life* 13: 205-215.

HILLMAN, K.; LUKATELICH, R. J. & McCOMB, A. J. 1990. The impact of nutrient enrichment on nearshore and estuarine ecosystems in Western Australia. *Proceedings of the Ecological Society of Australia* 16: 39-53.

HIRAYAMA, T.; IMAJUKU, Y.; ANAI, T.; MATSUI, M. & OKA, A. 1991. Identification of two cell-cycle-controlling *cdc2* gen homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 105: 159-165.

HIRST, R.; HORWITZ, A.; BUCK, C. & ROHRSCHEIDT, L. 1986. Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6470-6474.

HUNT, T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Current Opinion in Cell Biology* 1: 274-286.

HUNT, T. 1991. Cyclins and their patterns: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* 4: 213-222.

HUNTER, M. B. & COOPER, J. A. 1985. Protein-tyrosine kinases. *Annual Review of Biochemistry* 54: 897-930.

HUNTER, T. 1984. The proteins of oncogenes. *Sci. Am.* 251(2): 70-79.

ISHIKAWA, J.; MAEDA, S.; UMEZU, K.; SIGIYAMA, T. & KAMIDONO, S. 1990. Amplification and overexpression of the epidermal growth factor gene in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 45: 1016-1021.

JAMES, 1984. Polypeptide growth factors. *Ann. rev. Biochem.* 53: 259-292.

JOHN, P. C. L.; SEK, F. J. & LEE, M. G. 1989. A homologue of the cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the cell division cycle of Chlamydomonas and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* 1: 1185-1193.

KAPLAN, P.; ANDERSON, M. & OZANE, B. 1982. Transforming growth factors production enables cells to growth in absence of serum: an autocrine system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 485-489.

KNOLL, A. H. 1992. The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* 256: 622-627.

KRAFT, A.S. & WAYNE, B.A. 1983. Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* 301: 621-623.

KREK, W. & NIGG, E. A. 1991. Mutations of p34^{cdc2} phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cell: evidence for a double block to p34^{cdc2} kinase activation in vertebrates. *The EMBO Journal* 10(11): 3331-3341.

KUMAGAI, A. & DUNPHY, W. G. 1991. The cdc 25 protein controls tyrosine dephosphorylation of cdc 2 protein in a cell free system. *Cell* 64: 903-914.

LABBE, J. C.; PICARD, A.; PEAUCELLIER, G.; CAVADORE, J. C.; NURSE, P. & DOREE, M. 1989. Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase p34^{cdc2} and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* 57: 253-263.

LABIB, K. & NURSE, P. 1993. Bring on phosphatases. *Current Biology* 3(3): 164-166.

LAMPH, W. W.; WAMSLEY, P.; SASSONE-CORSI, P. & VERMA, I. M. 1988. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 334: 629-631.

LEE, M. G. & NURSE, P. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327: 31-35.

LEWIN, B. 1987. *Genes III*. John Wiley & Sons (eds).

LEWIN, B. 1990. Driving the cell cycle: M-phase kinase, its partners and substrates. *Cell* 61: 743-752.

LOEBLICH III, A. R. 1976. Dinoflagellate genetics and DNA characterization. *Stadler Symp.* 8: 111-128.

LOHKA, M. J.; HAYES, M. K. & MALLER, J. L. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3009-3019.

LUCA, F. C. 1993. Does degradation lead to segregation? *Current Biology* 3(10): 716-718.

MARGALEF, R. 1974. *Ecología*. Editorial Omega. Muchas pp.

MARGULIS, L. 1981. Symbiosis in cell evolution, life and its environment on the early Earth. Freeman (ed).

MARGULIS, L. & SAGAN, D. 1985. Origen de las células eucariotas. *Mundo Científico* 46: 366-374.

MARGULIS, L. & SCHWARTZ, K. V. 1985. *Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra*. Editorial Labor, S. A. Barcelona.

MARIÑO, J. & MANEIRO, J. 1993. El nuevo sistema de monitoring en la costa gallega. III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y

Biotoxinas. Vilaxoan, Pontevedra. pp. 156-161. Mariño & Maneiro (eds). Xunta de Galicia.

MASUI, Y. & MARKET, C. 1971. Cytoplasmatic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129-146.

MORENO, S. 1992. Así empieza la mitosis. *Investigación y Ciencia*. Abril 1992. pp. 62-69.

MORENO, S.; NURSE, P. & RUSSELL, P. 1990. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80^{cdc25} mitotic inducer in fission yeast. *Nature* 344:549-552.

MORGAN, D. O.; KAPLAN, J. M.; BISHOP, J. M. & VARMUS, H. E. 1989. Mitosis-specific phosphorylation of p60^{c-src} by p34^{cdc2}-associated protein kinase. *Cell* 57: 775-786.

MOROTOMI, M.; GUILLEN, G.; LOGERFO, P.; WEINSTEIN, I. B. 1990. Production of diacylglycerol, an activator of protein kinase C, by human intestinal microflora. *Cancer Research* 50: 3595-3599.

MURRAY, A. W. 1993. Turning on mitosis. *Current Biology* 3: 291-293.

MURRAY, A. W. & KIRSCHNER, M. W. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339: 275-280.

NAVARRO, M. 1990. Características de los cultivos a pequeña escala de diinoflagelados marinos. Su evaluación para la producción primaria en acuicultura. Tesis. Universidad Complutense. Madrid. 197 pp.

NORBURY, C. & NURSE, P. 1991. *Current Biology* 1: 23-24.

NORBURY, C. & NURSE, P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441-470.

NATIONAL RIVERS AUTHORITY. 1991. Toxic blue-green algae. Water Quality Series nº 2. London.

NORTH, G. 1991. Starting and stopping. *Nature* 351: 604-605.

NURSE, P. & BISSET, Y. 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292: 558-560.

NURSE, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-507.

NURSE, P. 1985. Cell cycle control genes in yeast. *Trends Genet.* 1: 51-55.

PARKER, L. L.; ATHERTON-FESSLER, S. & PIWNICA-WORMS, H. 1992. p107^{wee1} is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34^{cdc2} on Tyr-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2917-2921.

PEREZ-CAMACHO, A. 1989. Las mareas rojas y la acuicultura en Galicia. En: *Las purgas de mar como fenómeno natural: las mareas rojas. Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas 4: 111-120.* Fraga, F. & Figueiras, F. G. (eds). Edición do Castro. La Coruña.

PERRIMON, N. 1993. The torso receptor protein tyrosine-kinase signalling pathway: an endless story. *Cell* 74: 219-222.

PFIESTER, L. A. & ANDERSON, D. M. 1988. Dinoflagellate reproduction. En: *Biology of dinoflagellates.* Taylor, F. J. R. (ed), Oxford. pp. 611-648.

PINES, J. & HUNTER, T. 1990. Human cyclin A is adenovirus EA1-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346: 760-763.

POUYSSÉGUR, J.; FRANCHI, A.; KOHNO, M.; L'ALLEMAIN, G. & PARIS, S. 1986. Na⁺/H⁺ exchange and growth control in fibroblasts: a genetic approach. *Curr. Top. Memb. Transp.* 26: 201-220.

PRINGLE, J. R. & HARTWELL, H. 1981. The Saccharomyces cerevisiae cell cycle. En: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Life Cycle and Inheritance. J. N. Stathern, Jones, E. N., Broach, J. R. (eds). Cold Spring Harbour, N. Y. pp. 97-142.

RASMUNSEN, C. D. & MEANS, A. R. 1989. Calmodulin is required for cell cycle progression during G1 and Mitosis. *EMBO Journal* 8: 73-82.

REED, S. J.; HADWIGER, J. A. & LORINCZ, A. T. 1985. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC 28. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4055-4059.

REGUERA, B.; CAMPOS, M. J.; FRAGA, S.; MARIÑO, J. & BRAVO, I. 1993. The monitoring of harmful algal blooms in Galicia. *Proceedings of the International Symposium on Marine Biotoxins*. C.N.E.V.A. (ed). París, 30-31 Enero 1991.

RIGBY, G. R.; TAYLOR, A. H.; HALLEGRAEFF, G. M. & MILLS, P. 1993. The behaviour of toxic dinoflagellates in ships' ballast water and progress in research and management to minimise international transfer. *Proceedings of the VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Nantes, Francia. pp. 168.

RUSSELL, P.; MORENO, S. & REED, S. I. 1989. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeast. *Cell* 57: 295-303.

SADHU, K.; REED, S. I.; RICHARDSON, H. & RUSSELL, P. 1990. Human homolog of fission yeast cdc 25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 5139-5143.

SHOPF, J. W. 1978. The evolution of the earliest cells. En: Life at the Edge. Reeding from Scientific American. pp. 7-23. Gould & Gould (eds).

SIEGEL, S. 1956. En: Estadística no paramétrica. Editorial Trillas, México. pp. 120-226.

SILVA, E.S. & FRANCA, S. 1985. The association dinoflagellate-bacteria: Their ultrastructural relationship in two species of dinoflagellates. Protistologia 21: 429-446.

SLIFKIN, M. & DOYLE, R.J. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. Clinical Microbiology Rev. 3(3): 197-218.

SOONG, P. 1980. Production and development of Chlorella and Spirulina in Taiwan. En: Algae Biomass. Shelef, G. & Soeder, J. (eds). pp. 97-103.

STEIDINGER, K. A. 1975. Basic factor influencing red tides. Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms. V. R. Lo Cicero, (ed). Massachussets Science and Technology Foundation. pp. 153-162.

SURANA, U.; RUBITSCH, H.; PRICE, C.; SCHUSTER, T.; FITCH, I.; FUTCHER, A. B. & NASAMYTH, K. 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast S. cerevisiae. Cell 65: 145-161.

TAYLOR, F.R.J. 1987. Ecology of dinoflagellates. En: The Biology of Dinoflagellates. Taylor (ed). Blackwell Sci. Publ. London. pp. 398-502

WALKER, C. H.; BOOM, J. D. G. & MARSH, A. G. 1992. First nonvertebrate member of the c-myc gene family is seasonally expressed in an invertebrate testis. Oncogene 7: 2007-2012.

WILLIAMS, M. 1977. Stereological techniques. En: Practical methods in electron microscopy. Glavert A. M. (ed). North Holland America Elsevier, Amsterdam. pp. 1-216.

APENDICE

TABLA 1- Composición del medio de enriquecimiento f/2.

1) NaNO ₃ mg	75
2) Na H ₂ PO ₄ H ₂ O	5 mg
3) Metales traza	
Na ₂ EDTA	4.360 mg
FeCl ₃ 6H ₂ O	3.150 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	3.150 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.022 mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.010 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.180 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.006 mg
4) Vitaminas	
Tiamina HCl	0.1 mg
Biotina	0.5 µg
B ₁₂	0.5 µg
5) Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	15-30 mg
6) H ₂ O (de mar o dulce)	1 litro

Datos de Guillard (1975)

TABLA 2- Composición del medio artificial ASPM.

Sustancia	Gramos*
NaCl	23,38
KCl	0,75
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,93
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,07
CaCl ₂	1,11
NaHCO ₃	0,17
H ₃ BO ₃	0,025

* Cantidad a añadir por litro de agua destilada.

Datos procedentes de Guillard (1975).

Figura 1 - Tasas de reproducción de los organismos en los distintos medios ensayados.

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero Bovino Fetal

Agua natural= Agua de mar o dulce, según los organismos

ASPM f/2= ASPM+f/2 en organismos marinos ó Agua destilada+f/2 en los de agua dulce

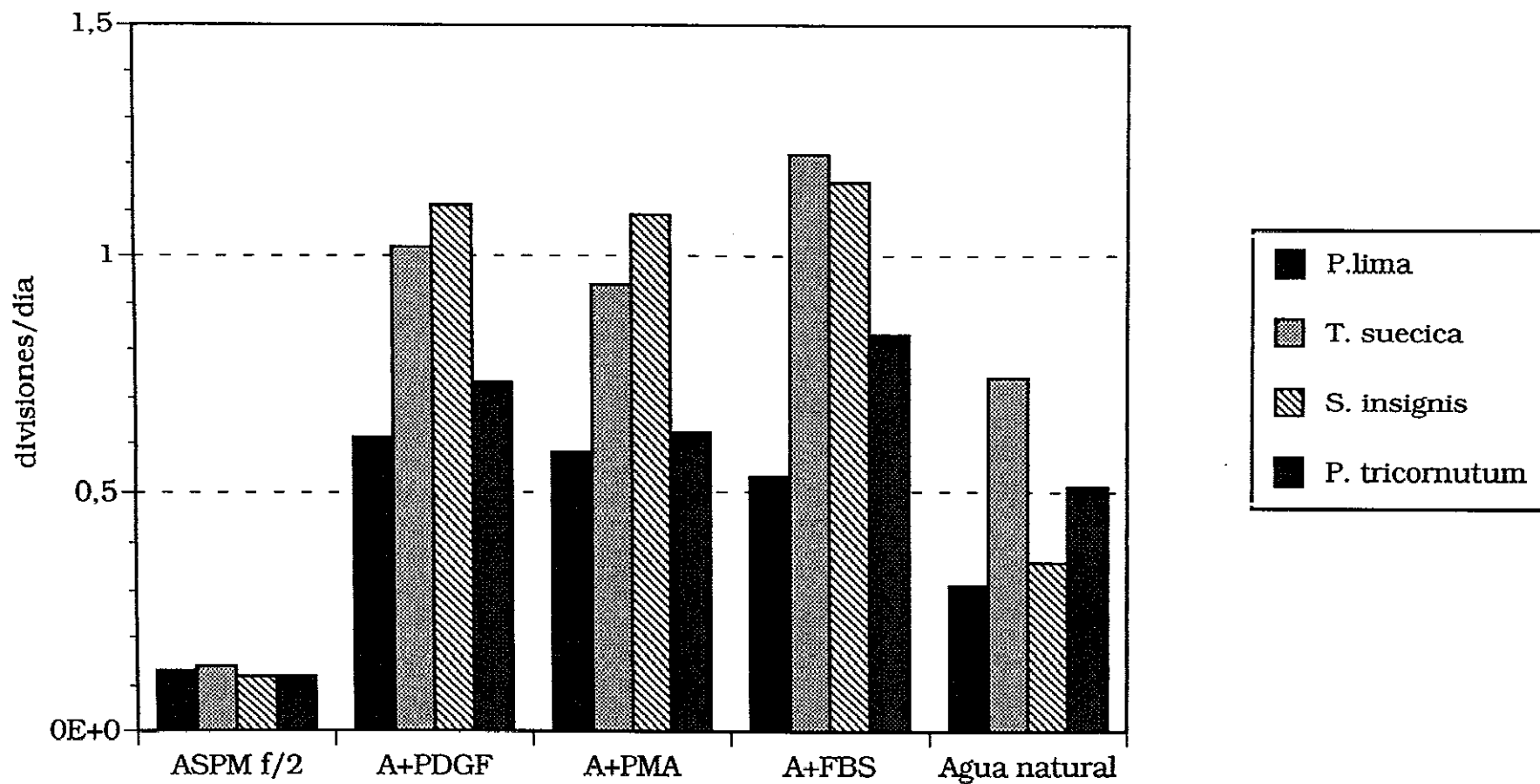


Figura 2- Tasas de reproducción de Prorocentrum lima

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monacetato 12 de Forbol

FBS= Suero bovino fetal

Agua natural= Agua de mar

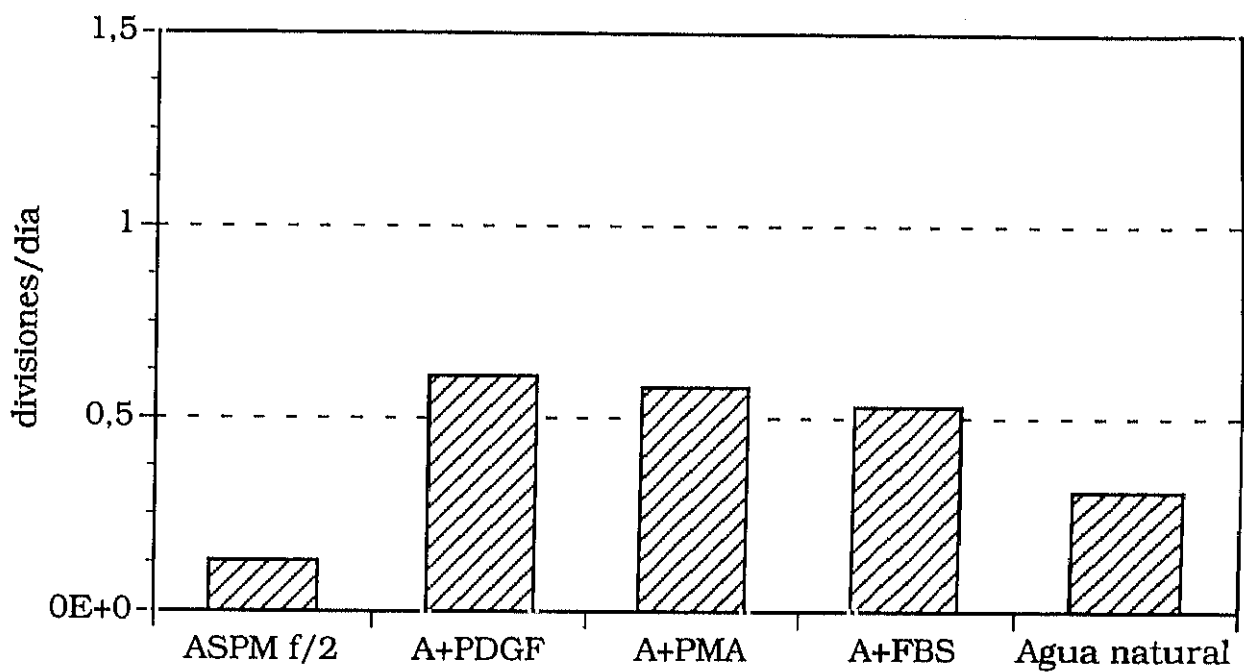


Figura 3- Tasas de reproducción de Tetraselmis suecica

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero Bovino Fetal

Agua natural= Agua de mar

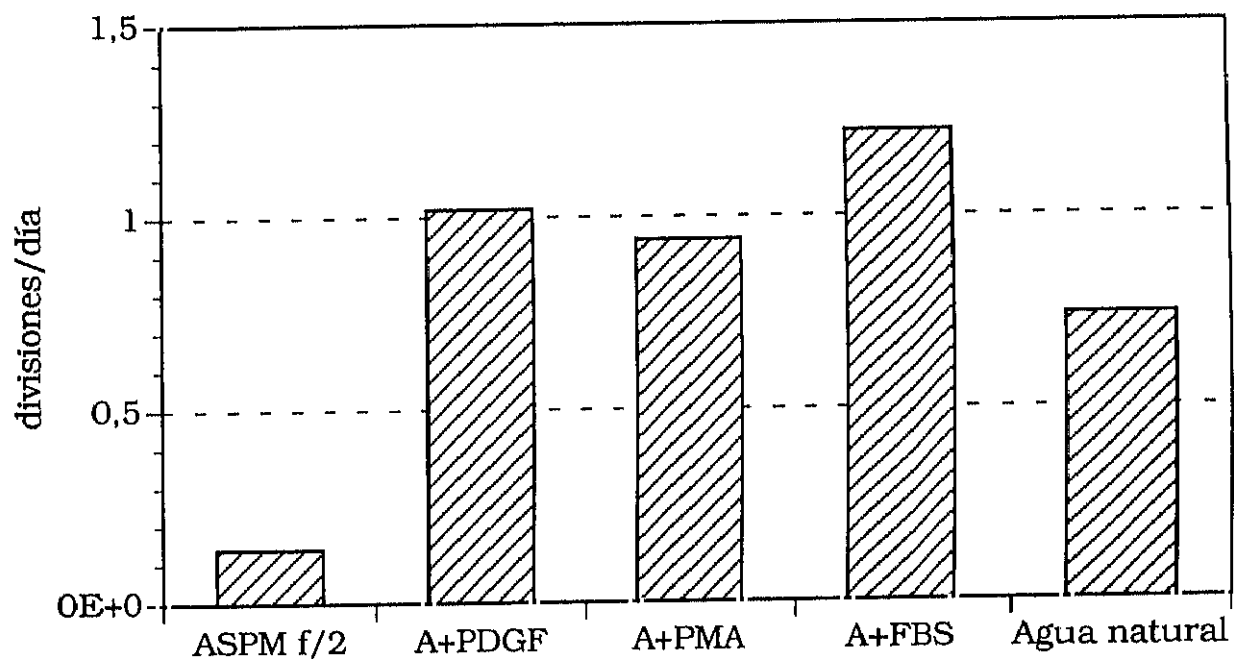


Figura 4- Tasas de reproducción de Spirogyra insignis

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero Bovino Fetal

Agua natural= Agua dulce

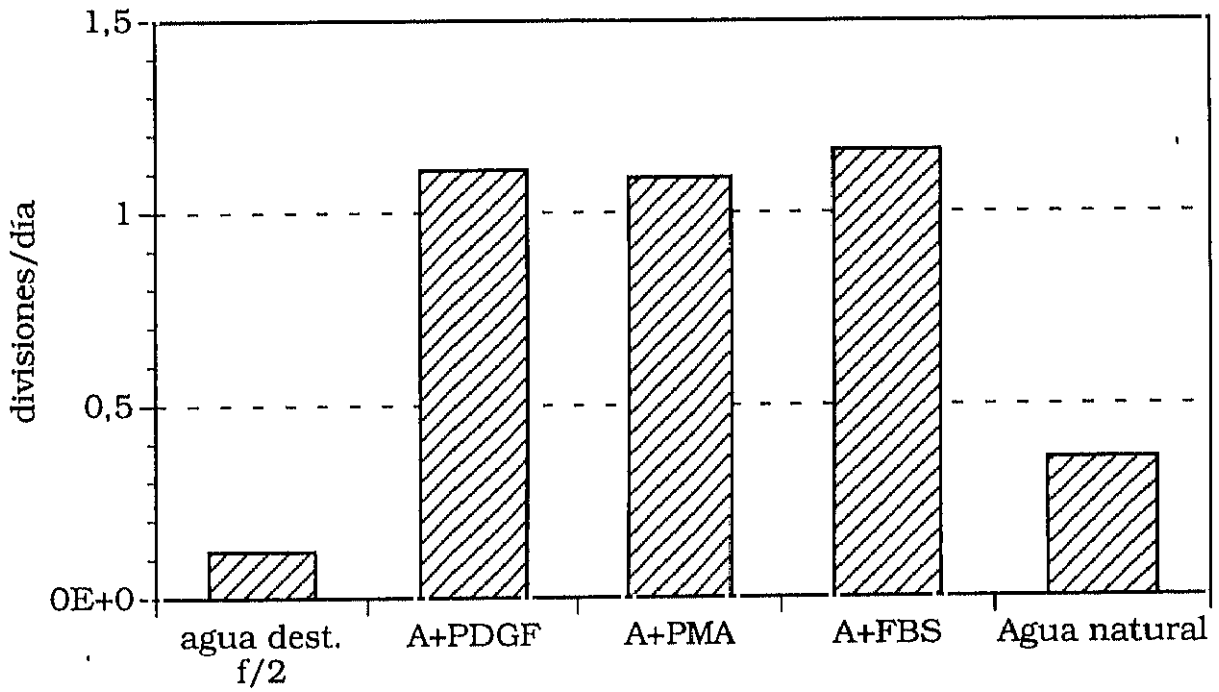


Figura 5- Tasas de reproducción de Phaeodactylum tricornutum

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero Bovino Fetal

Agua natural= Agua de mar

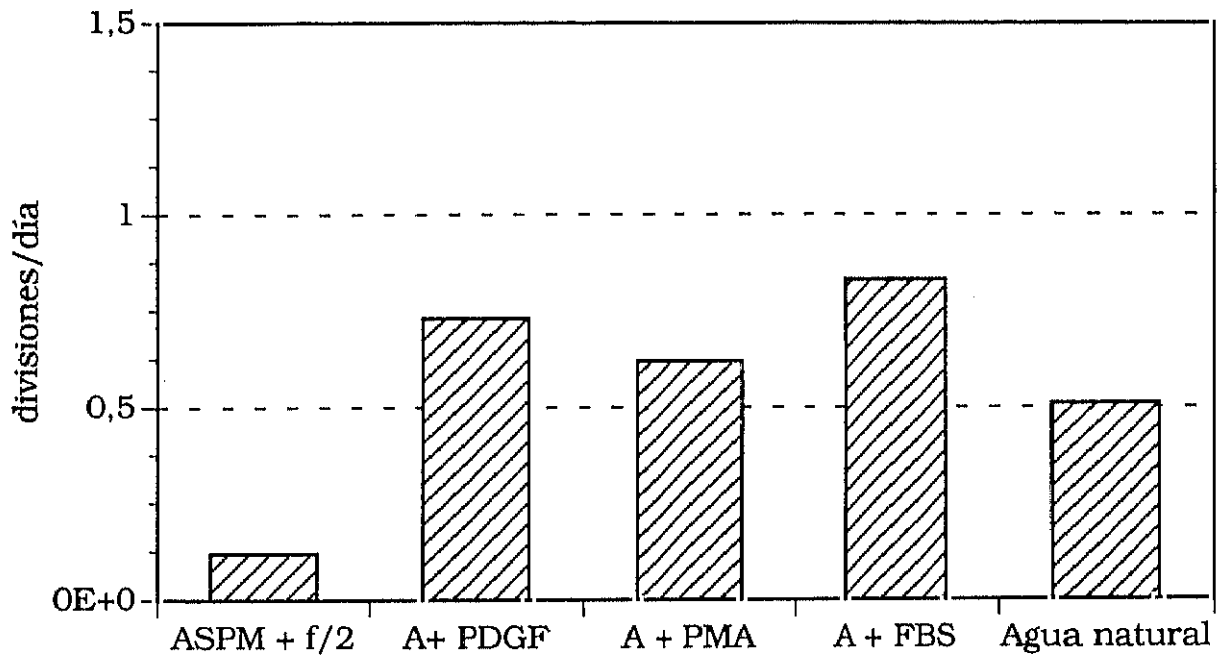


Figura 6- Tasas de reproducción del clon At-a de Alexandrium tamarense

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero bovino fetal

Agua natural= Agua de mar

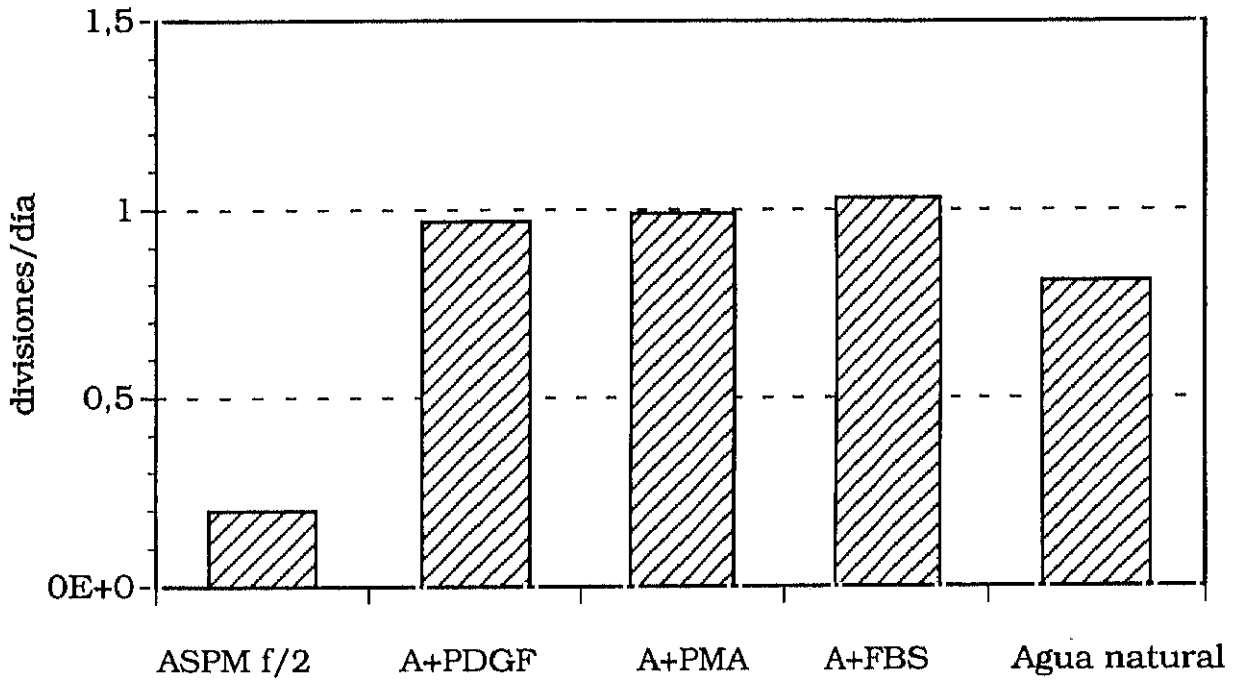


Figura 7- Tasas de reproducción del clon At-b de Alexandrium tamarense

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero bovino fetal

Agua natural= Agua de mar

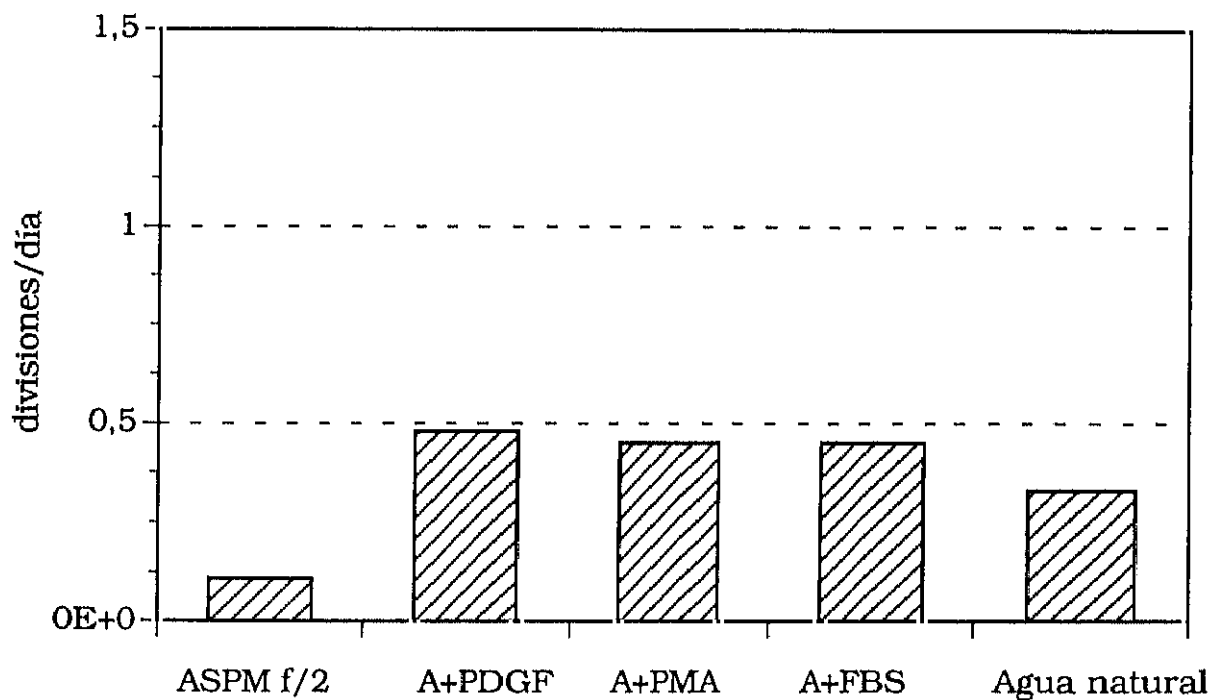


Figura 8- Tasas de reproducción del clon Pt-a de Prorocentrum triestinum

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero bovino fetal

Agua natural= Agua de mar

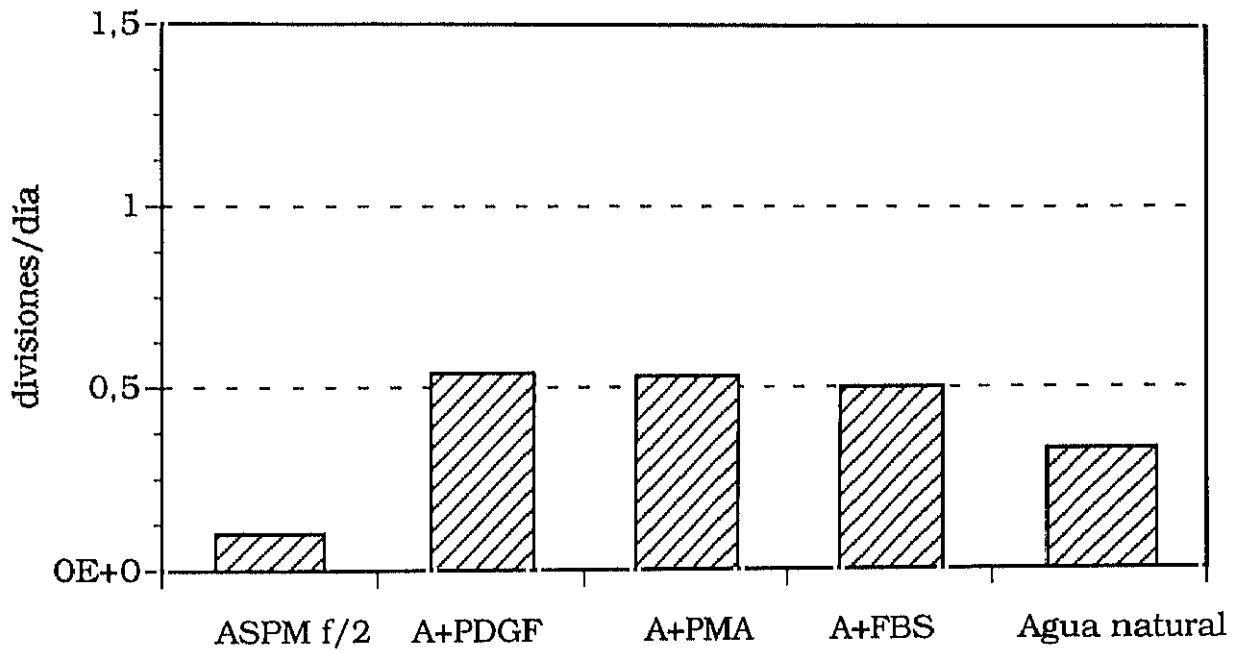


Figura 9- Tasas de reproducción del clon Pt-b de Prorocentrum triestinum

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA= Monoacetato 12 de Forbol

FBS= Suero bovino fetal

Agua natural= Agua de mar

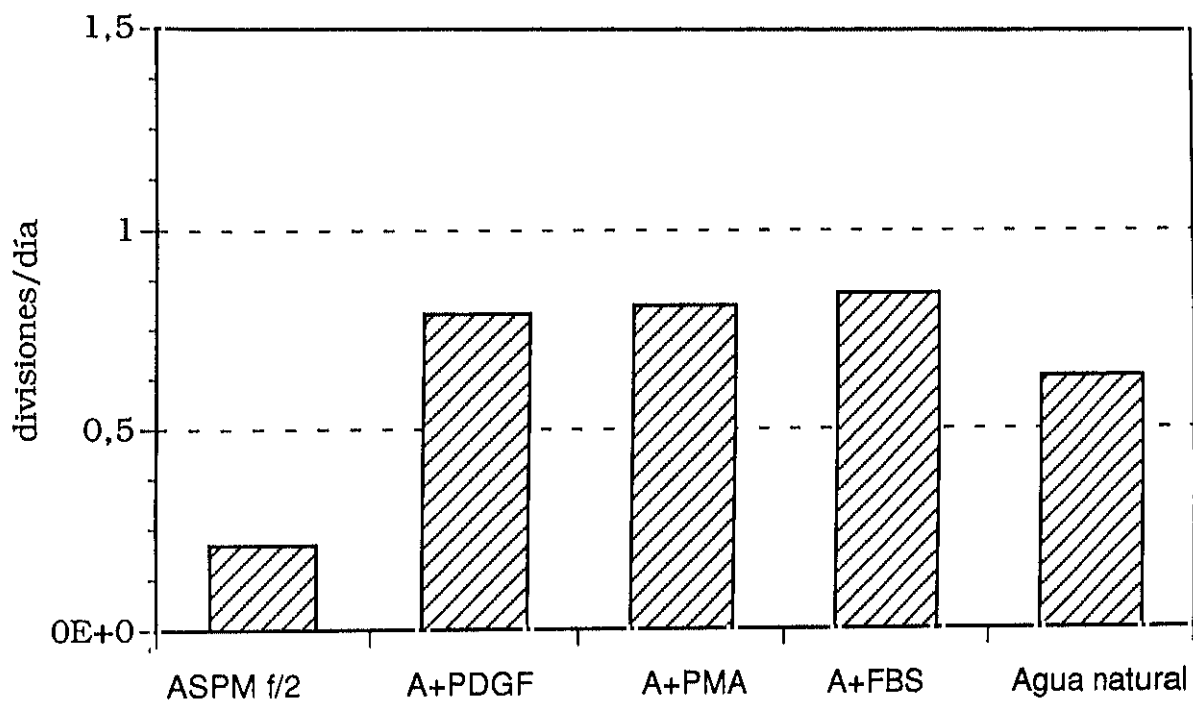


Figura 10- Tasas de reproducción del clon Pt* de Prorocentrum triestinum

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMA= Monoacetato 12 de Forbol
FBS= Suero bovino fetal
Agua natural= Agua de mar

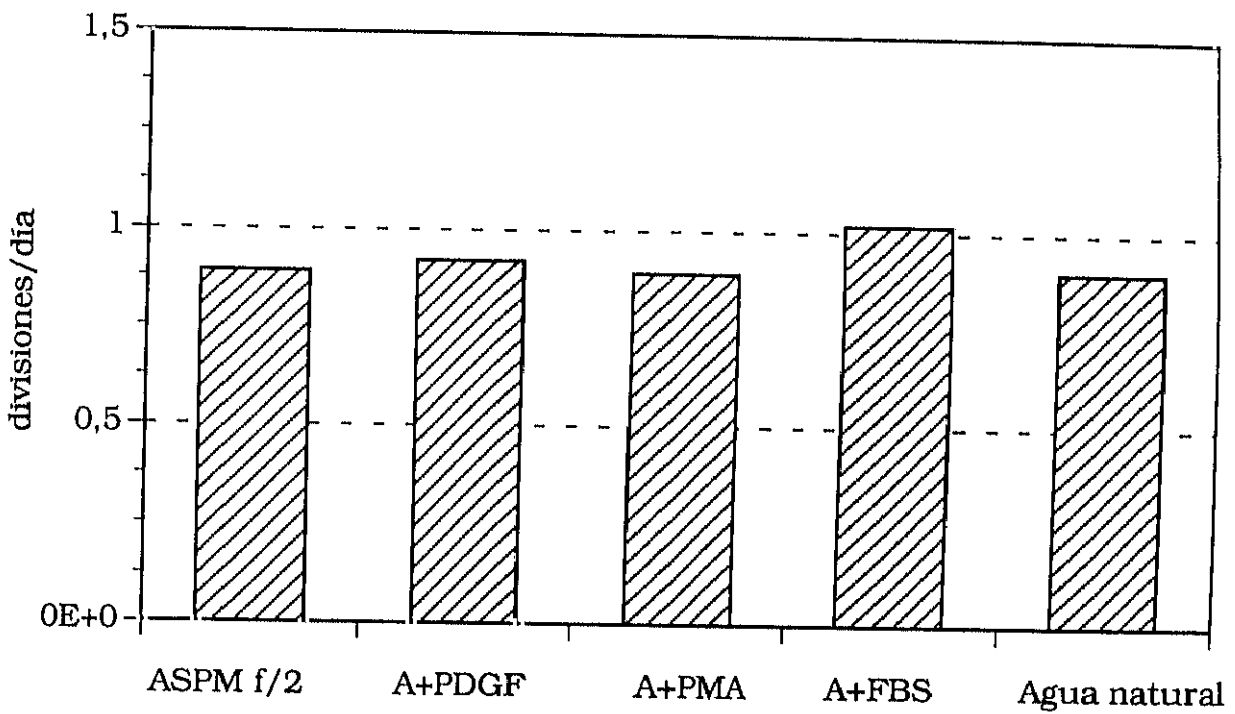


Figura 11- Tasas de reproducción de los clones Pt-v y Pt* de Prorocentrum triestinum

PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas
 PMA= Monoacetato 12 de Forbol
 FBS= Suero bovino fetal
 c-Pt-v= Medio condicionado por Pt-v
 c-Pt*= Medio condicionado por Pt*

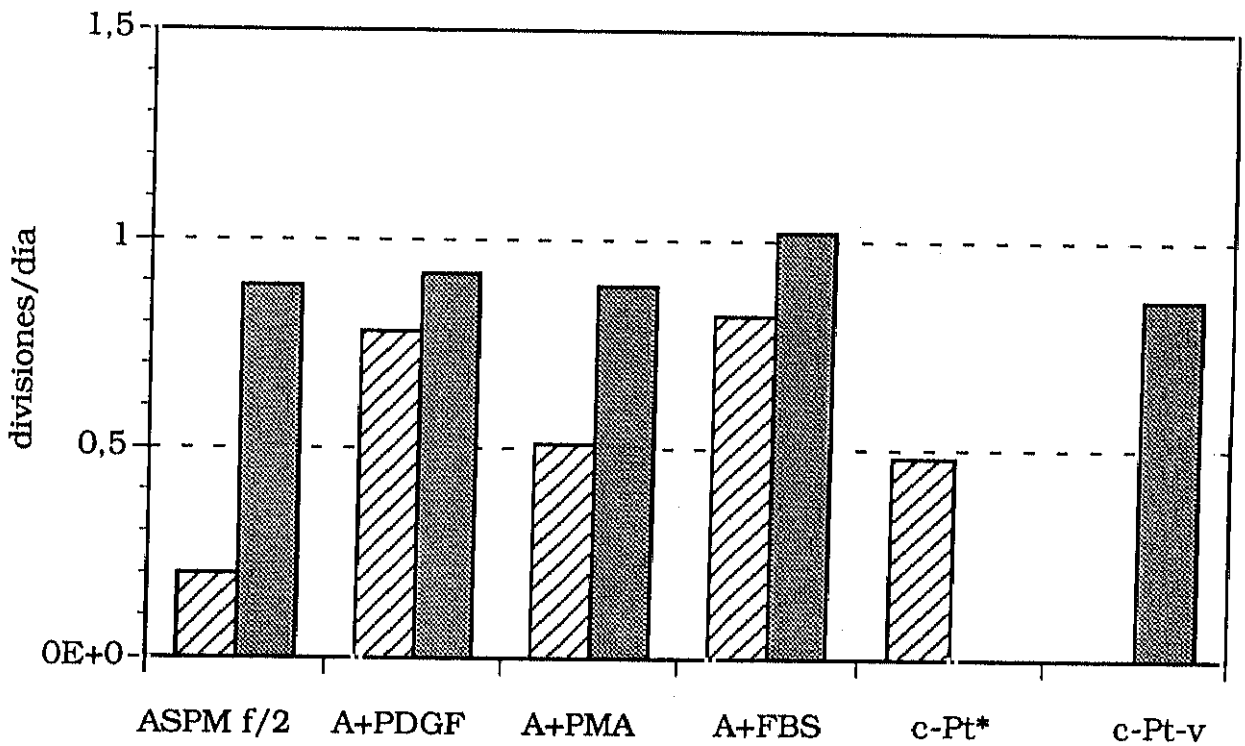
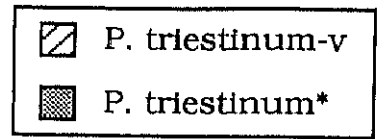


Tabla 3- Densidad celular en células/ml de los dos clones de *Alexandrium tamarense* (At-a y At-b) así como de los dos clones de *Prorocentrum triestinum* (Pt-a y Pt-b).

At-a					
Días	ASPM	PDGF	PMA	FBS	Mar
0	250	250	250	250	250
1	276	462	454	486	370
2	321	872	903	931	541
3	372	1641	1788	1891	882
4	433	3411	3572	3711	1290
5	504	5940	6096	6341	2012
6	582	8082	8114	8230	3007
7	670	9024	9132	9011	4132

At-b					
Días	ASPM	PDGF	PMA	FBS	Mar
0	250	250	250	250	250
1	261	319	316	318	310
2	278	414	404	411	392
3	301	570	556	551	483
4	327	781	742	751	607
5	359	1119	1030	1009	782
6	391	1487	1391	1370	968
7	411	1892	1792	1780	1194

Pt-a					
Días	ASPM	PDGF	PMA	FBS	Mar
0	250	250	250	250	250
1	258	323	318	311	370
2	262	458	446	432	541
3	297	656	632	628	882
4	316	970	961	941	1290
5	351	1380	1300	1282	2012
6	370	2006	1971	1808	3007
7	392	2894	2751	2694	4132

Pt-b					
Días	ASPM	PDGF	PMA	FBS	Mar
0	250	250	250	250	250
1	279	427	431	411	373
2	318	727	746	763	555
3	368	1249	1288	1379	871
4	426	2114	2236	2492	1284
5	497	3534	3872	4032	1992
6	576	5428	6550	6840	2950
7	668	7760	8181	8201	4106

Figura 12- Efecto de los distintos medios sobre la germinación de los quistes de Alexandrium tamarense. Se representa el número de células germinadas ($m \pm sd$) cada día.

FBS= Suero bovino fetal

PDGF=Factor de crecimiento derivado de plaquetas

