



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias

**“ULTRAESTRUCTURA DEL NUCLEO CELULAR
INTERFASICO DE ALGUNOS TAXA
DEL REINO PROTISTA.
ASPECTOS EVOLUTIVOS”**

T E S I S
Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
Presenta
JOSE MANUEL ELIZUNDIA ALVAREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., durante los años de 1984 a 1985 y bajo la asesoría de los Doctores Olga Margarita Echeverría Martínez y Gerardo Vázquez Nin.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Al Biol. Luis Felipe Jiménez García
A la Biol. Guadalupe Zavala Padilla.

Por el apoyo a la realización de este trabajo
y al impulso formativo brindado.

A mis padres.

A Artemisa Torreblanca Navarro.

A toda la familia.

INDICE

- I.-INTRODUCCION.
 - I.1.-ORIGEN EVOLUTIVO DEL NUCLEO.
 - I.2.-ANTECEDENTES HISTORICOS DEL ESTUDIO MORFOLOGICO DEL NUCLEO.
 - I.3.-COMPONENTES ESTRUCTURALES DEL NUCLEO.
 - I.3a).-Cromatina
 - I.3b).-Partículas ribonucleoproteicas y procesamiento postranscripcional de los ácidos ribonucleicos no solubles.
 - I.4.-PROTISTAS.
 - I.4a).-Importancia del estudio de los protistas.
 - I.4b).-Relaciones filogenéticas de los protistas con los Reinos más complejos.
 - I.4c).-Relaciones filogenéticas entre los grupos de protistas estudiados.
- II.-OBJETIVOS.
- III.-MATERIAL Y METODO.
- IV.-RESULTADOS.
- V.-DISCUSION.
- VI.-CONCLUSIONES.
- VII.-REFERENCIAS.

ACLARACIONES.

Se utiliza el término Protista para designar a organismos eucariontes unicelulares o multicelulares (pero sin diferenciación celular, ver diagnóstico de Corliss, 1984, en la sección 1.4a de la introducción). Algunos autores prefieren utilizar el término Protoctista (Margulis, 1981; Margulis y Schwartz, 1982) porque argumentan que el término Protista tiene una connotación de organismo unicelular. Sin embargo, hay que recordar que etimológicamente ninguno de los términos significa organismo unicelular o pluricelular. Además, Haeckel en 1866 y en 1878 incluía dentro del Reino Protista a organismos multicelulares como las esponjas y los hongos. Hogg, en 1860, acuña el término de Protoctista al reconocer la intergradación de las plantas y los animales en los organismos menos complejos, pero no le dio la categoría taxonómica de Reino, y a esta agrupación la llamó *Regnum Primigenum* (Whittaker, 1969).

Los autores que se encuentran entre paréntesis son los consultados directamente y por lo tanto son los únicos que aparecen enumerados en las referencias.

I. - INTRODUCCION.

I.1. - ORIGEN EVOLUTIVO DEL NUCLEO.

Un episodio importante en la evolución de los seres vivos lo constituyó el surgimiento de un nuevo tipo de organización celular, en el cual el material genético se encuentra reunido en el interior de un núcleo definido y rodeado por una membrana. Estos organismos, los eucariontes, presentan un nivel de complejidad estructural mayor que sus ancestros los procariontes. Aún más importante que la compartimentalización en sí, aunque evidentemente se derivó de ella, fue la adquisición de la reproducción sexual, en donde las variaciones genéticas pasan a la descendencia en forma de nuevas combinaciones. Con esto, la reproducción sexual permitiría que las adaptaciones benéficas se extiendan más rápidamente hacia toda la población, acelerando así, el proceso evolutivo, y permitiendo de esta forma la aparición de numerosos patrones estructurales bien adaptados a sus particulares medios ambientes (Schopf, 1978).

Otra ventaja importante de la organización celular eucarionte sería la de la centralización de la información genética para el control del metabolismo en el genoma nuclear. Esta interpretación es apoyada por la hipótesis del origen simbiótico de algunos organelos de los eucariontes, la cual postula que ciertos organelos como los *undulipodia* (flagelo de los eucariontes), mitocondrias y cloroplastos se originaron como resultado de la endocitosis de organismos procariontes por el organismo portador del citoplasma y del genoma nuclear eucarionte y del posterior establecimiento de relaciones endosimbióticas de los primeros con éste último (Margulis, 1981). Sin embargo, en los eucariontes actuales esta centralización o transferencia de los genomas de los organelos al genoma nuclear aún no es completa, ya que las genomas de las mitocondrias y de los cloroplastos todavía presentan funcionalidad, no para llevar una vida libre, pero sí para efectuar la duplicación de su ADN (ácido desoxirribonucleico) y la síntesis de unos cuantos polipéptidos. Con esta transferencia del genoma de los organismos endosimbiontes protorganelares hacia el genoma del organismo huésped, éste último aseguraba la estabilidad y durabilidad de la relación benéfica de ambos simbioses. Existen varios organismos actuales que pueden apoyar esta historia evolutiva. Por ejemplo, los organismos fotosintéticos poseen la enzima fijadora del CO₂, la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa. En las cianobacterias, tanto las subunidades catalíticas mayores como las subunidades reguladoras pequeñas son codificadas por un sólo genoma. En los cloroplastos de los eucariontes fotosintéticos, las dos subunidades son codificadas por diferentes genomas. La subunidad mayor por el genoma del cloroplasto, mientras que la menor por el genoma nuclear. En cambio, el protista *Cyanophora paradoxa* representa un caso intermedio, ya que la subunidad pequeña no es codificada por el genoma nuclear sino por el genoma de los organelos fotosintéticos (cianelos), al igual que la subunidad mayor. Estos cianelos están rodeados por una mem

brana vacuolar, contienen tilacoides no apilados y pigmentos fotosintéticos típicos de las cianobacterias de vida libre. Este organismo por lo tanto representa un caso en que aún no está tan avanzada la transferencia de genes desde los cianobacterios hacia el genoma nuclear como en el caso de los demás eucariontes fotosintéticos (Ellis, 1983; Heinhorst y Shively, 1983).

Los registros fósiles más antiguos para los eucariontes datan entre los 1,400 millones de años y parecen corresponder a microorganismos fotosintéticos planctónicos sin diferenciación tisular (protistas o protoctistas) y con pared celular (Vidal, 1984). Estimaciones basadas en el tamaño del segmento poliadenilado del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de las mitocondrias y de los cloroplastos sugieren que el origen de estos organelos se sitúa aproximadamente entre los 2,100 millones de años (Carlin, 1980). Esta antigüedad calculada para las mitocondrias y los cloroplastos concuerda con la estimada para la divergencia entre los procariontes y los eucariontes con base en la secuenciación del ARNr 5S (ácido ribonucleico ribosomal de coeficiente de sedimentación 5S) y del citocromo c para varias especies y que es aproximadamente de 1,800 millones de años (Kimura y Ohta, 1973). La biología comparada de los protistas sugiere que éstos sufrieron una diversificación muy temprana, a pesar de que el registro fósil no apoya esta afirmación. Independientemente de la magnitud de la radiación evolutiva inicial de los protistas, nuevos tipos estructurales continuaron apareciendo y diversificándose (y algunos otros extinguiéndose) a través de la historia evolutiva subsecuente del grupo. Después de la aparición de los microfósiles eucariontes fotosintéticos en el registro fósil, éstos presentaron una tendencia lenta (pero en aumento) hacia la diversificación a través de la Era tardía del Proterozoico. Al final del Precámbrico, esta diversificación se ve alterada por extinciones masivas para posteriormente en el Período Cámbrico sufrir una nueva radiación evolutiva (Knoll, 1985). Los fósiles de los protistas heterótrofos aparecen hasta los 800 millones de años. Sin embargo, el registro fósil de los protistas es poco adecuado para establecer relaciones filogenéticas, ya que los diferentes taxa de microorganismos y partes de ellos son atacados diferencialmente por la descomposición bacteriana, y por lo tanto numerosos taxa actuales no tienen representantes en este registro fósil (Knoll, 1985). De los eucariontes metazoarios se han encontrado trazas de ellos de entre los 1,000 y los 900 millones de años, y resultan relativamente abundantes en el Ediacara (680-580 m.a.) (Glaessner, 1985).

Con respecto al origen de un nuevo tipo de organización celular, la de los eucariontes, y de los diferentes tipos de genomas organelares que contienen se han propuesto dos hipótesis que intentan explicar estos hechos: la hipótesis de la endosimbiosis o xenógena y la hipótesis de la filiación directa. La hipótesis de la endosimbiosis

ya fue explicada en los párrafos anteriores, y en cuanto a la hipótesis de la filia_ ción directa, ésta sugiere que los genomas nucleares y organelares surgieron a par_ tir de una compartimentalización del genoma y la posterior especialización; pero todo ello dentro de una sóla célula (Raff y Mahler, 1972; Bogorad, 1975).

Para explicar el origen de la estructura nuclear se han propuesto una serie de eventos que se llevaron a cabo dentro de un organismo carente de pared celular y que desarrolló como tipo de nutrición la fagocitosis. Posteriormente este organis_ mo adquiere un sistema de microtúbulos para movilizar a los cromosomas circulares. Estos cromosomas circulares en un inicio se encontraban insertos en la membrana celular; pero al ser endocitados quedaron envueltos en una estructura protonuclear. Finalmente, la envoltura protonuclear circuncibiría al nucleoplasma, formando así a la membrana nuclear (Cavalier-Smith, 1975). Otros autores piensan que el núcleo pudo haberse originado a partir del establecimiento de una relación simbiótica (al igual que con el origen de las mitocondrias y los cloroplastos), en el que el organismo inicialmente ingerido perdió la mayor parte de su citoplasma. Como ejem_ plo, existen algunos dinoflagelados que tienen dos núcleos, uno muy característico de este grupo y otro muy parecido al de los demás eucariontes (Pickett-Heaps, 1974). Se ha propuesto un mecanismo algo diferente para explicar el origen evolutivo de la estructura nuclear. Debido a que el metabolismo citoplasmático está completamen_ te bajo el control del genoma nuclear, el núcleo y el citoplasma de la célula euca_ rionte son parte de un sólo sistema que realiza la síntesis de biomoléculas y regu_ la el metabolismo celular, y por lo tanto ambos tienen un ancestro común. Ejemplos que apoyan esta interpretación la proporciona Whatley en 1977, al encontrar en *Pro_ chloron* membranas que separan al genóforo y parte del citoplasma de otras áreas citoplasmáticas ricas en ribosomas. Cantino y Myers, en 1977, encontraron que en *Bla_ stocladia*, el casquete nuclear contiene a los ribosomas. En *Pelomyxa*, los túbulos membranosos, que parecen tener continuidad con el retículo endoplasmático, se extien_ den desde las membranas de las bacterias endosimbiontes perinucleares hasta los poros nucleares del organismo huésped. Entonces, el núcleo y el citoplasma evolucionaron juntos como parte de una unidad reticulada integrada. La membrana nuclear apa_ reció, junto con el resto de membranas internas, después de la adquisición de las mitocondrias y por lo tanto de la síntesis de esteroides (Margulis, 1981).

Las hipótesis que explican la aparición de los eucariontes tienen en común como punto de partida a los procariontes. Sin embargo, debido a que en los últimos años se han acu_ mulado evidencias bioquímicas, fisiológicas, genéticas y de biología molecular que ponen en duda la unicidad filética de los procariontes, se ha sugerido la partición de estos en dos grupos taxonómicos y filogenéticos. Por un lado se encuentran las arqueobacterias y por el otro a las eubacterias. Con respecto a esto, se ha sugerido que las arqueobacte-

rias, las eubacterias y los urcariontes (célula eucarionte primitiva), partieron de un ancestro común, el progenote, mucho más simple que los más sencillos procariontes. Un argumento presentado para sustentar este punto de vista es el hecho de que el núcleo eucarionte parece contener al menos tres tipos de genomas: uno de origen eubacteriano; otro al parecer de origen arqueobacteriano y finalmente uno de origen desconocido e hipotético. Los eucariontes evolucionarían después de que el ancestro urcarionte se convirtiera en huésped de endosimbiontes bacterianos, los cuales darían lugar a las mitocondrias y a los cloroplastos (Woese y Fox, 1977; Woese, 1981). Un ejemplo de la multiplicidad de las líneas filéticas de los procariontes lo proporciona Fox y col. en 1980 al proponer un árbol filogenético con base en la secuenciación del ARNr 16S (ácido ribonucleico ribosomal de coeficiente de sedimentación 16S) de 170 especies de procariontes. En este árbol filogenético se encuentran representadas cinco líneas filéticas importantes de las eubacterias. Sin embargo, Woese en 1983 considera que el número de subgrupos con profundas diferencias filogenéticas deben ser once (Knoll, 1985).

El genoma nuclear eucarionte, además de las diferencias estructurales, presenta varias características en cuanto a su organización, expresión y regulación que lo distinguen del genoma de los procariontes; sin embargo, estas características no son lo suficientemente exclusivas para que con base en éstas se pueda definir la condición eucarionte. Estas son:

- a).-La presencia de cromosomas lineales múltiples con numerosos puntos de partida para su duplicación.
- b).-Condensación del ADN por histonas en la cromatina. En algunos procariontes existen proteínas asociadas al ADN parecidas a las histonas de los eucariontes; pero cuya función aún no se ha determinado si consiste en la condensación del ADN como en los eucariontes. La arqueobacteria *Thermoplasma* presenta una proteína (HTa), que tiene un alto grado de homología con las histonas H2A y H3 de los eucariontes; además de que al reasociarse con el ADN forma estructuras con gran similitud morfológica a los nucleosomas, pero de menor tamaño. Asimismo, *Escherichia coli*, una eubacteria, tiene una proteína (H) que se une al ADN, la cual inhibe la transcripción, tiene una composición de aminoácidos similar a la de la histona H2 de los eucariontes y es neutralizada por anticuerpos específicos para esta histona.
- c).-La carencia de operones, que son unidades de transcripción en los cuales se encuentran genes de funciones relacionadas y están agrupados por un sólo promotor y un terminador. Son transcritos en un sólo ARNm (ácido ribonucleico mensajero) policistrónico.
- d).-Contiene tres tipos de ARN polimerasas específicas: la I que transcribe los genes ribosomales; la II que transcribe los genes que codifican proteínas; y por último la III que transcribe los genes del ARNr 5S, ARNt (ácido ribonucleico de transferencia) y de los ácidos ribonucleicos pequeños solubles. No obstante, técnicas inmunológicas han

revelado que existe homología entre las ARN polimerasas de los eucariontes, de las arqueobacterias y de las eubacterias. Aunque existe una mayor homología entre las ARN polimerasas de los eucariontes y de las arqueobacterias que entre las de los eucariontes y de las eubacterias. Asimismo, la droga silibina estimula al doble la transcripción de las ARN polimerasas de las arqueobacterias y de la ARN polimerasa I de los eucariontes (Zillig y col., 1985).

e).-La ARN polimerasa II actúa sobre sitios de reconocimiento no homólogos en posición a los reconocidos por las ARN polimerasas eubacterianas y el funcionamiento de la ARN polimerasa III por medio de sitios de reconocimiento internos.

f).-La presencia en la mayoría de los genes nucleares de los eucariontes de secuencias de ADN, los intrones, que son transcritas pero no aparecen en el ARNm maduro o citoplasmático. Sin embargo, Kaine y col. en 1983 encontraron que el genoma arqueobacteriano también contiene intrones (Knoll, 1985).

g).-La organización característica de los genes del ARNr en unidades de transcripción cuya secuencia es promotor-18S-5.8S-28S-terminador, mientras que los genes del ARNr5S se encuentran físicamente separados y son transcritos independientemente con un promotor diferente. En los procariontes los genes de los ácidos ribonucleicos ribosomales son parte de una unidad transcripcional, promotor-16S-23S-5S-terminador, la cual frecuentemente incluye a los genes de los ácidos ribonucleicos de transferencia.

h).-La adición en los transcritos primarios de los genes nucleares de una terminal 5' modificada, proceso llamado de encapuchamiento, y de una cola poliadenilada en el extremo 3'.

i).-La existencia en el genoma nuclear de secuencias de ADN mediana y altamente repetitivas. Sin embargo, algunas arqueobacterias como *Methanobacterium* parecen contener algo de ADN repetitivo (Van Valen y Maiorana, 1980).

j).-Los ribosomas 80S de los eucariontes difieren en su estructura y funcionamiento de los ribosomas 70S de los procariontes.

Con respecto a lo anterior se han propuesto dos hipótesis para tratar de explicar la gran brecha existente en cuanto a la estructura y funcionamiento entre los genomas de los procariontes y los eucariontes. La primera de ellas afirma que el genoma nuclear de los eucariontes se derivó recientemente a partir de un genoma eubacteriano ancestral y posteriormente sufrió una reorganización rápida y fundamental. Por lo que las diferencias básicas entre sus biología molecular se derivaron después del surgimiento de la membrana nuclear y como consecuencia del establecimiento de endosimbiontes protoorganelares. En este sentido debe verse a las caracte-

rísticas del genoma nuclear como ventajas selectivas y es precisamente aquí de donde emanan las principales objeciones a este punto de vista. Se debe principalmente a que sólo algunas de las características del genoma nuclear, anteriormente mencionadas, pueden representar alguna ventaja adaptativa como las de los incisos "a" y "b" para células de genomas fragmentados y grandes que deben duplicarse y separarse rápidamente, o la característica del inciso "h" como protección para el ARNm en su viaje hacia el citoplasma.

La segunda hipótesis sostiene que las peculiaridades de los eucariontes deben ser vistas como caracteres primitivos, es decir anteriores al surgimiento de las primeras células eucariontes y no como adaptaciones a la organización celular eucarionte. Esto es, las líneas filéticas de los eucariontes y de las eubacterias divergieron en una fase temprana de la evolución celular a partir de un ancestro común, en el cual los problemas de la organización, expresión y regulación del genoma aún no estaban completamente solucionados. Por lo tanto cada estirpe resolvió separadamente estos problemas. La principal objeción formulada contra esta hipótesis es que no existen organismos actuales con una organización procarionte pero que sean eucariontes en su biología molecular. Con respecto a esta objeción parecen ser reveladoras determinadas características de algunos miembros de los procariontes: las arqueobacterias. Es decir son procariontes en cuanto a su organización celular, pero algunas características de su biología molecular presentan gran similitud con la de los eucariontes. Por ejemplo, *Thermoplasma* posee: un tipo de ruta metabólica respiratoria que, de acuerdo con los postulados de la teoría de la endosimbiosis correspondería al tipo de células que tuvieran el genoma nuclear ancestral; una proteína parecida a las histonas, la HTa, cuya secuenciación ha demostrado que presenta un alto grado de homología con las histonas H2A y H3 de los eucariontes, además las nucleoproteínas aisladas de las células o reconstruidas por la adición al ADN desnudo de la proteína HTa al ser observadas con el microscopio electrónico presentan gran similitud estructural con los nucleosomas de la cromatina; un sistema de proteínas como los citocromos c, b, d, la citocromo oxidasa y las menaquinonas que sugieren un sistema de transporte de electrones terminal oxidativo; una proteína parecida a la actina. Otra arqueobacteria, *Halobacteria* comparte con los eucariontes: un glicopéptido de 200,000 daltones que ha sido considerado como estructuralmente similar a las glicoproteínas de la membrana celular de los eucarion

tes; rutas metabólicas para la biosíntesis del β -caroteno similares a las de las plantas; mecanismos de transporte de aminoácidos muy similares a los de los eucariontes; el uso del metionil-ARNt inalterado para la iniciación de la síntesis de proteínas; la aminoacilación del ARNt es efectuada más rápidamente por la aminoacil-ARNt sintetasa de levaduras que por la de las eubacterias; una proteína ribosomal A más parecida a la proteína ribosomal A de los eucariontes que a la de las eubacterias. Sin embargo aún se carece de la cantidad y calidad suficiente de evidencias como para determinar sin ambigüedad el origen del genoma nuclear eucarionte (Gray y Doolittle, 1982). No obstante, algunos autores consideran, por las características de las arqueobacterias anteriormente mencionadas, que tanto éstas como los organismos protoeucariontes proveedores del citoplasma y del genoma nuclear eucarionte tienen un ancestro común (Van Valen y Maiorana, 1980).

II.2.-ANTECEDENTES HISTORICOS DEL ESTUDIO MORFOLOGICO DEL NUCLEO.

Al parecer fue Leeuwenhoeck el primero en observar el núcleo celular en los elementos sanguíneos del salmón, su descripción apareció en la Royal Society en 1700. Poco después, Trembley en 1774 y Müller en 1786 lo observaron en protozoarios. Asimismo, Hewson en 1777 lo estudió en eritrocitos de vertebrados y tortugas.

Aparte del descubrimiento del núcleo en los eritrocitos hacia finales del siglo XVIII, Fontana lo encontró en diversos tejidos, especialmente en la piel de las anguilas, denominándolo *petite corps*. Ya en el siglo XIX, Purkinje descubrió la vesícula germinal en el huevo, pero sin llegar a establecer nexos con los hallazgos anteriores en los hematíes y en las células epidérmicas. La facilidad de observación en este material permitió la proliferación de reportes científicos de trabajos hechos en huevos de diversos organismos. Así lo hicieron Coste en 1833, quien trabajó con huevos de coneja, y Bernhardt en 1834 con huevos de diferentes animales.

Los botánicos no se rezagaron, y fueron Bauer y Meyen los primeros en publicar sus observaciones hechas en vegetales. Habría, sin embargo, que esperar a Brown en 1833 quien proclamaría la universalidad del núcleo en las células vegetales, acuñando el término con que todavía se le conoce.

Posteriormente, a mediados del tercer decenio del siglo XIX, varios investigadores en el campo de la citología animal confirmaron la presencia del núcleo en otros tejidos. Purkinje en 1836 menciona que las células, *Körnchen*, que recubren el plexo coroideo se encuentran provistas de corpúsculos, *Körperchen*. También en 1836, Valentin introdujo el término de núcleo, *Kern*, en la citología animal, el cual había sido acuñado tres años antes para los vegetales por Brown. En 1837, Henle describe células nucleadas en diversos tejidos humanos. Fueron precisamente Valentin y Henle los que iniciaron una nueva era para la citología animal: la de la célula nucleada. Sin embargo aún no se había llegado a una concepción general que permitiera establecer una teoría universal. Fue en las tres décadas siguientes, con los trabajos de Schleiden y Schwann quienes llegaron a conformar la teoría celular. Es evidente que estos avances, tanto en la observación como en la conceptualización, no hubieran sido posibles sin los avances técnicos en el área de la microscopía fotónica como en el procesamiento y tinción del material (Albarracín-Teulón, 1983).

I.3.-COMPONENTES ESTRUCTURALES DEL NUCLEO.

Hasta el momento se han reconocido varios elementos estructurales que conforman el núcleo celular en interfase. Estos son:

- a).-Membrana nuclear. De naturaleza lipoproteica circunscribe y separa a la zona nuclear de la citoplasmática; sin embargo, ambas zonas quedan interconectadas por la presencia de poros en la membrana y por la existencia de una continuidad entre la membrana nuclear y la membrana celular.
- b).-El nucleoplasma o jugo nuclear. Representa la mayor parte del volumen nuclear. Abarca las áreas entre la cromatina condensada o heterocromatina, por lo tanto contiene tanto a la eucromatina o cromatina laxa como a algunos componentes ribonucleoproteicos.
- c).-Cromatina condensada o heterocromatina. Este componente se dispone, generalmente, en su mayoría en la zona adyacente a la membrana nuclear y en la periferia del nucleolo.
- d).-Nucleolo. Es la estructura ribonucleoproteica más compleja; puede ser único o múltiple.
- e).-Partículas ribonucleoproteicas. Comprenden a las fibras y gránulos pericromatinianos, a los gránulos intercromatinianos y a los cuerpos espiralados (De Robertis y col., 1977).

De los componentes estructurales del núcleo celular interfásico que se estudiaron en este trabajo se hará una revisión más amplia en las secciones siguientes de las investigaciones que en las últimas décadas que han contribuido a proporcionar mayores conocimientos acerca de su ultraestructura y funcionamiento.

I.3a).-CROMATINA

Las primeras observaciones que probablemente describían a la cromatina fueron hechas por Nägeli entre 1842 a 1847 en polen de *Tradescantia* y Reichert en 1847 al estudiar la espermatogénesis de *Strongylus auricularis*. Pero fue Kowalevski en 1871 quien realizó las primeras descripciones precisas de los cromosomas, los cuales, sin embargo, fueron interpretados como productos de la división de los nucleolos. Russow en 1872 trabajando en polen de criptógamas vasculares, Schneider trabajando con huevo de *Merostomum ehrenbergii* y Tschistiakoff en 1875 realizaron las primeras reproducciones gráficas de una etapa de la mitosis: la metafase. Ewetsky en 1875 describe gráficamente a la profase. Bütschli entre 1873 y 1876 realiza dibujos de la metafase y de la anafase. Sin embargo, hubo que esperar hasta que Flemming en 1880 sistematizara las fases de la mitosis y asociara a los cromosomas con la cromatina del núcleo celular interfásico (Albarracín-Teulón, 1983).

Kornberg en 1974 fue el primero en proponer la estructura básica de la cromatina (Finch y Klug, 1976). Esta se encuentra compuesta por subunidades proteicas: los nucleosomas. El nucleosoma consiste de una cantidad de ADN de entre 140 a 240 pares de bases asociada a un octámero de histonas. El ADN forma una superhélice uniformemente enrollada alrededor del cilindro proteico; el diámetro de esta hélice es de 90 Å y cada 75 a 82 pares de bases da una vuelta completa. El octámero de histonas contiene dos unidades de histonas ricas en lisina (H2A y H2B) e histonas ricas en arginina (H3 y H4); la histona H1 no es parte del nucleosoma pero se encuentra asociada a él. Los trabajos de Richards y col. en 1977 y Pardon en 1977, utilizando las técnicas de difracción de rayos X y de neutrones, sugieren que el nucleosoma no es esférico sino que se trata de una estructura cilíndrica de aproximadamente 100 Å de diámetro y 50 Å de altura (Felsenfeld, 1978). Todas las evidencias que sugieren que la cromatina se encuentra organizada por medio de subunidades repetitivas, así como el conocimiento de su estructura han provenido de trabajos realizados *in vitro*; pero recientemente también han sido observados los nucleosomas *in situ* en hepatocitos de rata (Derenzini y col., 1983).

Horgan y Silver en 1978 han demostrado que la cromatina de muchos eucariontes unicelulares se encuentra organizada de la misma manera que la cromatina de los eucariontes pluricelulares, presentando tanto las mismas histonas como la organización nucleosomal. En cuanto a la histona H1, presenta un gran polimorfismo así como una variación evolutiva considerable; sin embargo, Lipps y Morris en 1976 detectaron en varios eucariontes uni-

celulares proteínas histónicas parecidas a la H1 (Morris, 1980). En *Trypanosoma cruzi* se ha comprobado que la cromatina presenta la organización nucleosomal; pero las histonas en este organismo difieren bastante de las de los eucariontes más complejos (Castañeda, 1984). Los dinoflagelados carecen de las histonas que se encuentran en los demás eucariontes y por lo tanto no presentan la organización nucleosomal en la cromatina (Rizzo y col., 1982; Galleron, 1984), aunque poseen proteínas básicas asociadas a la cromatina parecidas a las histonas de los demás eucariontes (Rizzo, 1981).

Woodcock en 1973 y Olins y Olins en 1974 reportaron arreglos lineales de los nucleosomas sobre el ADN; pero es probable que esta disposición sea debida a las técnicas de extracción. Se cree que normalmente la cromatina tiene otro nivel de compactación como el propuesto por el modelo solenoide, en donde los nucleosomas se disponen en el espacio para formar una estructura helicoidal con un diámetro externo de 300Å, con una inclinación de 110Å por vuelta y un diámetro interno de 100Å, conteniendo de 4 a 10 nucleosomas por vuelta. La máxima compactación de los nucleosomas permitiría que solamente hubiera 2.7 nucleosomas por vuelta, por lo que se ha propuesto que la parte central podría contener a la histona H1, a proteínas no histónicas, a otros elementos de control o bien ADN desnudo (Finch y Klug, 1976). Existe otro grado aún mayor de compactación representado por los nucleoides, los cuales son estructuras carentes de histonas y de la mayoría de las proteínas que caracterizan a la cromatina; en estos nucleoides la cromatina presenta un alto grado de superenrollamiento (Cook y Brazell, 1976). En los dinoflagelados se ha determinado que existen por lo menos seis niveles de compactación helicoidal del ADN: 1) molécula de ADN; 2) hélice de 10nm de diámetro; 3) enrollamiento helicoidal, 18nm de diámetro; 4) estructura helicoidal doble, 25 a 31nm (2 filamentos de 18nm); 5) superenrollamiento en una sola hélice levógira, 43 a 56nm y 6) estas últimas fibras se unen para formar un doble haz helicoidal del cromosoma, con un diámetro de 1250nm (Galleron, 1984).

En ciertas condiciones los nucleosomas, o la mitad de ellos, se separan; esto sugiere que la cromatina no es una estructura estática sino dinámica (Oudet y col., 1978). Heitz en 1928 describió a la heterocromatina como el estado condensado de la cromatina y a la eucromatina como el estado laxo (Frenster, 1981). Por otro lado, se ha sugerido que los factores involucrados en la condensación de la cromatina son similares en todos los ani

males(Sunkara y col.,1979).Sin embargo existen diferencias en cuanto a las condiciones en que intervienen los mecanismos de condensación entre las plantas y los animales;en las primeras la condensación es dependiente de la especie,independiente de su función,probablemente determinada por la cantidad de ADN y la organización del genoma;en los segundos la compactación depende de los tejidos,de su función y controlada por el metabolismo de las histonas(Nagl,1979).

En 1965,Frenster al realizar el análisis bioquímico de ambas formas de la cromatina,la condensada y la laxa,encontró un contenido igual de proteínas histónicas,pero encontró en la cromatina descondensada un exceso de ARN,proteínas no histónicas y fosfoproteínas(Frenster,1981).Sin embargo,la carencia de histonas en estructuras que presentan un superenrollamiento del ADN sugiere que las histonas desempeñan un papel importante en la descondensación(Cook y Brazell,1976;Galleron,1984).Asimismo,la extracción de la histona H1 de la cromatina provoca la descompactación de la heterocromatina(Tanaka y Oda,1976).En este sentido se ha propuesto que la histona H1 puede servir como neutralizador de las cargas eléctricas negativas del ADN internucleosomal(Gaubatz y col.,1978).Otros autores ,como Matsumoto y col.en 1980 apoyan la hipótesis de que la compactación de la cromatina es debida a la fosforilación,acetilación,metilación y poli(ADP-ribosil)ación de las proteínas histónicas,en especial de la histona H1(Jiménez-García,1983).La carencia de histonas en los dinoflagelados presenta implicaciones en cuanto a la estabilización estructural de la cromatina,por lo que se ha propuesto que estos organismos han desarrollado un sistema de estabilización distinto al de los demás eucariontes,sobretudo en su carácter de irreversible(Sigee,1984).El hecho de que Keller y col.en 1975 hayan encontrado gran cantidad de proteínas no histónicas fosforiladas en la heterocromatina,ha llevado a sugerir que estas proteínas regulan en determinada manera la estructura de la cromatina(Kleinsmith,1981).Se ha propuesto también que la compactación sea debida a la neutralización de las cargas eléctricas negativas de los radicales fosfato del ADN mediante interacciones de este ácido nucleico con cationes libres(Derenzini y col.,1978).Por otra parte se ha sugerido que los grados de compactación son debidos a la cantidad de productos transcripcionales unidos a la cromatina,encontrándose esta más dispersa cuanto mayor sea la cantidad de partículas ribonucleoproteicas que contienen ácido ribonucleico premensajero de síntesis reciente que se encuentren adheridas todavía a la cromatina(Derenzini y col.,1981).Asimismo se ha observado una correlación inversa entre la

cantidad de cromatina condensada y la densidad de gránulos pericromatinianos (partículas que se cree se encuentran involucradas en el procesamiento, almacenamiento y/o transporte del ARN premensajero), durante la diferenciación y maduración neuronal (Jiménez-García, 1983), o durante los diversos estados metabólicos de los linfocitos (Valkov y col., 1974), sugiriendo esto que ocurre una descondensación de la heterocromatina cuando existe una mayor actividad transcripcional.

Se ha encontrado que el estado de condensación varía según la fase del ciclo celular, condensándose la cromatina en cromosomas durante la división celular. Excepciones a lo anterior se encuentran solamente entre los protistas; por ejemplo, en *Trypanosoma cruzi* no se desarrolla tal condensación, e incluso, la cromatina se encuentra más descondensada en la división celular que durante el período de interfase (Castañeda, 1984). Los dinoflagelados y los euglenidos constituyen otras excepciones al presentar cromosomas durante la interfase (Taylor, 1980). En *Euglena* los cromosomas se encuentran aún más laxos en la división celular que durante la interfase (Magnaval y col., 1979). La cromatina en el núcleo interfásico de *Amoeba proteus* se encuentra en forma totalmente descondensada y ocupa un volumen nuclear de los más bajos encontrados entre los eucariontes (Wise y Goldstein, 1972). Lo anterior probablemente se relacione con otra peculiaridad de los amebidos: la carencia de la fase G1 en su ciclo celular (Makhlin y col., 1979). La cromatina en el macronúcleo de los ciliados, el núcleo transcripcionalmente activo, no presenta condensación previa a la división celular (Raikov, 1976).

Las peculiares características de la cromatina que tienen numerosos protistas durante la división nuclear son interpretadas, según la teoría de la endosimbiosis, como ejemplos que ayudan a reconstruir la evolución de la mitosis en los eucariontes. Debido a la alta homología que existe entre el sistema de microtúbulos de los undulipodia y del aparato mitótico, es posible que haya ocurrido una diferenciación gradual de los simbiontes superficiales (protoundulipodia) en el aparato mitótico. Existen organismos como *Pelomyxa palustris*, que poseen estrategias no mitóticas para la distribución de las copias múltiples de su genoma a sus descendientes. Sin embargo, se ha comprobado que este mecanismo de segregación azarosa es bastante ineficaz. Se han propuesto una serie de pasos evolutivos que sufrieron los simbiontes superficiales durante su diferenciación en aparato mitótico:

Paso I. En un inicio, los centros microtubulares fueron usados como cinetosomas por los undulipodia. El ácido nucleico de estos simbiontes móviles fue usado para su propia reproducción. Ejemplo de este paso lo constituye el dinoflagelado *Prorocentrum*.

Paso II. Los centros microtubulares son incorporados al núcleo para la segregación de la cromatina del huésped, produciendo esto la pérdida permanente de los undulipodia. Ejemplos para este paso los encontramos entre los amebidos.

Paso III. Los centros microtubulares fueron usados tanto para la división nuclear como para cinetosomas de los undulipodia, pero en diferentes estadios del ciclo de vida del organismo. Ejemplos de esto lo encontramos entre los ameboflagelados.

Paso IV. Algunos centros microtubulares son usados para formar cinetosomas de los undulipodia, mientras que otros se diferenciaron permanentemente como centros independiente de división nuclear. Ejemplos de esto lo encontramos en la mayoría de los protistas. Con esto se lograba evitar el cese de la actividad locomotriz del organismo durante la división nuclear. Esta tendencia evolutiva hacia la menor dependencia de las funciones somáticas con respecto a la división nuclear, pudo haber originado en los ciliados la aparición de dos núcleos con funciones diferentes; el macronúcleo encargado de la síntesis de proteínas y el micronúcleo que actúa como banco genético (Margulis, 1981).

En cuanto a las funciones de los diferentes estados estructurales de la cromatina, Littau y col. en 1964, utilizando autorradiografía, observaron que la mayoría del ARN recién sintetizado se encontraba en las proximidades de la eucromatina; Hay y Revel en 1963, también con autorradiografía, encontraron que en la eucromatina existe una mayor síntesis de ADN (Frenster, 1981). Tokuyasu y col., en 1968, y Jiménez-García, en 1983, determinaron que existe una correlación entre la actividad genética y el incremento del volumen nuclear ocupado por la eucromatina, así como un decremento en la cantidad de heterocromatina (Jiménez-García, 1983). En los dinoflagelados existe una mayor incorporación de timidina tritiada cuando los cromosomas interfásicos sufren una desespiralización ligera (Spector y Triemer, 1981). Asimismo, utilizando autorradiografía de alta resolución, se encontró que en los dinoflagelados la transcripción ocurre en filamentos de ADN extracromosómico, siendo el ADN cromosómico transcripcionalmente inactivo, presentando una función meramente estructural (Sigeo, 1984). La síntesis de ARN en los euglénidos es mayor en la cromatina extendida que en los cromosomas interfásicos (Magnaval y col., 1979). Por otro lado, Fakan y Bernhard, en 1971, con autorradiografía de pulsos breves de uridina tritiada determinaron que el sitio de mayor síntesis de ARN en el núcleo de los mamíferos se encuentra situado en la periferia de la cromatina condensada (Nash y col., 1975).

En cambio, la función primordial de la heterocromatina parece ser meramente estructural (Sigeo, 1984). Algunos autores suponen que la heterocromatina participa en la separación del genoma en diferentes partes funcionales, por ejemplo, la heterocromatina centromérica en la división nuclear (De Robertis y col., 1977). Una pequeña fracción de los genes repetitivos que se encuentran en las regiones heterocromáticas codifican para proteínas, pero la mayoría no tiene esta función (Long y Dawid, 1980). Se ha propuesto, para los transcritos de los genes repetitivos que no codifican para proteínas, una función en la regulación genética (Davidson y Britten, 1979). Recientemente se ha suge-

rido que las secuencias redundantes tienen una gran influencia en la variabilidad genética mediante el mecanismo de la conversión genética, el cual se ha demostrado que existe mediante el empleo de técnicas genéticas por Rosignol y col. en 1979, y molecularmente por Petes y col. en 1982; así, la conversión genética permite una mayor variación en los genes de las inmunoglobulinas, Peerler y col. 1980, y en los antígenos de histocompatibilidad, Estratiadis y col. 1980 (Kourilsky y Gachelin, 1985). Se cree también que la heterocromatina es fundamental en la distribución equitativa del genoma a los descendientes durante la división nuclear (Castañeda, 1984).

Con lo que respecta a la regulación de la actividad genética, Kleinsmith y col. en 1966, sugirieron que esta se encontraba ligada a la compactación y descompactación de la cromatina (Derenzini y col. 1978). Existen evidencias de que en la cromatina transcripcionalmente activa se encuentran estructuras parecidas a los nucleosomas (McGhee y Felsenfeld, 1980). Sin embargo, es muy probable que el nucleosoma deba sufrir cambios estructurales para que no provoque un impedimento estérico durante la transcripción del ADN que se encuentra a su alrededor (Paul y col., 1978). Bellard y Chambon en 1976, encontraron que la frecuencia de repetición nucleosomal en eucariontes complejos varía de acuerdo a las células y tejidos revisados, mientras que Ermini y Kuenzle en 1980, encontraron que esta frecuencia varía incluso en los diferentes núcleos de las células del mismo tejido, sugiriendo esto que los nucleosomas regulan la transcripción de alguna manera (Morris, 1980). Más evidencias con respecto a esta postura de pensamiento, provienen del hecho de que Lipps y Morris en 1976 encontraron que la longitud de repetitividad nucleosomal en el micronúcleo de los ciliados, el núcleo transcripcionalmente inactivo, es menor que la encontrada para el macronúcleo, el núcleo transcripcionalmente activo. Además, Prince y Colen 1977, encontraron que la frecuencia de repetitividad nucleosomal del macronúcleo de los ciliados *Tetrahymena pyriformis* y *Paramecium aurelia* varía en correlación con su tasa de crecimiento (Morris, 1980). Wasylk y col. en 1979, apoyan la hipótesis de que la simple presencia o ausencia de las histonas no es el factor determinante en la regulación de la transcripción, por lo que piensan que la cromatina sufre modificaciones que afectan tanto a la conformación y movilidad de los nucleosomas individuales, así como a su habilidad para interactuar en la formación de estructuras de compactación mayores (McGhee y Felsenfeld, 1980).

En cambio, Stein y col., en 1982, piensan que la metilación del ADN tiene un papel preponderante en determinados casos; esta función puede deberse a interacciones ADN-proteínas, o a cambios estructurales del ADN (Doerfler, 1983). El hecho de que Comings y col. en 1977 hayan encontrado mayor cantidad de proteínas no histónicas y fosfoproteínas en la eucromatina, así como el que la naturaleza de estas moléculas sea de gran complejidad y heterogeneidad, y que su modificación se correlacione con la actividad

transcripcional, ha llevado a Paul, en 1972, y a Jeter y Cameron en 1974, a proponer que estas moléculas se encuentran involucradas en la regulación de la expresión genética (Derenzini y col., 1981).

Los ciliados presentan varias características nucleares únicas que los diferencian de los demás eucariontes. Son de los pocos eucariontes, junto con algunos dinoflagelados, que presentan un dualismo nuclear. Este dualismo consiste en que cada organismo posee uno o más micronúcleos diploides y uno o más macronúcleos somáticos con miles de veces el contenido de ADN del micronúcleo (Raikov, 1976). El macronúcleo presenta varias peculiaridades, como el hecho de que el contenido del ADN no es fijo, variando considerablemente según las condiciones medioambientales o bien de acuerdo a la edad de los clones. Este macronúcleo se divide amitóticamente sin la condensación previa de la cromatina en cromosomas y sin la formación de un huso mitótico simple (Berger, 1979), además, la distribución del material genético del macronúcleo a los descendientes es desigual (Doerder, 1979). Se cree que las características nucleares, sobre todo las del macronúcleo, son el producto de presiones selectivas para proveer al gran volumen celular (este volumen en algunos ciliados es bastante mayor al promedio encontrado entre los eucariontes) de la mayor tasa transcripcional posible, combinándolo asimismo con un tiempo generacional corto (Berger, 1979). Además de las diferencias morfológicas entre los núcleos, existe división en cuanto a sus funciones. En el macronúcleo es donde se lleva a cabo la mayor síntesis del ADN y del ARN (Prescott y col., 1973; Raikov y Morat, 1977; Nanney y Preparata, 1979; Berger, 1979; Doerder, 1979; Nanney, 1980) y al parecer el micronúcleo funciona como una especie de banco genético, que en algunos casos es la base para la regeneración del macronúcleo, durante la cual existe una amplificación y eliminación preferencial del genoma (Raikov, 1976). Como la distribución del ADN a las células hijas no es equitativa, existen mecanismos postdivisionales para la regulación de la cantidad del ADN. En *Paramecium tetraurelia* el genoma se encuentra dispuesto como un mosaico de subunidades que sufren una síntesis de ADN diferencial e independiente hasta llegar a las proporciones adecuadas (Berger, 1979). Existe otro mecanismo diferente en *Tetrahymena pyriformis*, en donde la célula hija que recibió poco ADN sufre ciclos sucesivos de síntesis de ADN sin que exista división nuclear o celular; si, por el contrario, la célula hija recibe demasiado ADN, esta lo expulsa hacia el citoplasma en forma de "cuerpos de expulsión" durante la división celular o bien presenta una fase S del ciclo celular más corta (Doerder, 1979).

I.3b).-PARTICULAS RIBONUCLEOPROTEICAS Y PROCESAMIENTO POSTRANSCRIPCIONAL DE LOS ACIDOS RIBONUCLEICOS NO SOLUBLES.

Existen numerosas evidencias de que el procesamiento postranscripcional de los diferentes ácidos ribonucleicos no solubles se efectúa no sobre la molécula desnuda de ARN sino en complejos ribonucleoproteicos (Flint, 1984). El estudio sistemático de estos complejos ribonucleoproteicos se inició en 1969 al ser implementada por Bernhard una técnica de contraste regresivo preferencial para las partículas ribonucleoproteicas (Bernhard, 1969). Con esta técnica se empezó a caracterizar morfológicamente a las partículas ribonucleoproteicas y posteriormente sería de gran utilidad en el estudio de sus funciones. Así, en 1969, Monneron y Bernhard caracterizan a las principales partículas ribonucleoproteicas encontradas en el núcleo celular interfásico de los mamíferos. Las fibras pericromatinianas (FPC), son fibras de aproximadamente 30 a 50Å de diámetro, que se encuentran en la periferia de la cromatina condensada y sufren un enrollamiento para formar a los gránulos pericromatinianos (GPC). Los GPC se encuentran generalmente en la periferia de la heterocromatina, presentan un diámetro de 400 a 450Å y tienen un halo claro alrededor de ellos de 200 a 250Å; se ha observado que en la cercanía de los poros nucleares sufren cambios estructurales al deshilacharse y formar conjuntos de fibras. Los gránulos intercromatinianos (GIC), son cúmulos de partículas con un diámetro de 200 a 250Å; no presentan relación topográfica con la heterocromatina, nucleolo o con los poros nucleares. Por último, se encuentran los cuerpos espiralados (CE), constituidos por fibras en espiral con un grosor de 400 a 600Å (Monneron y Bernhard, 1969).

Fakan y Bernhard en 1971, al utilizar pulsos breves de uridina tritiada, demostraron que la mayor parte de la actividad transcripcional se encuentra localizada en la periferia de la cromatina condensada (Moyné y Puvion, 1976). Las primeras evidencias de que las FPC se encontraban relacionadas con la actividad transcripcional provienen de condiciones experimentales que reducen la tasa transcripcional, como el ayuno, durante el cual se observa un decremento en la cantidad de FPC y un incremento al restablecerse las condiciones de normalidad (Petrov y Bernhard, 1971). Asimismo, se determinó esta correlación al someter a las células a tratamientos con drogas que inhiben la síntesis de ARN extranucleolar, como la bleomicina (Vázquez-Nin y col., 1979), la α -amanitina (Petrov y Sekeris, 1971), y la cordicepina (Puvion y col., 1976). Se ha sugerido que las fibras pericromatinianas representan el substrato estructural para el ARN extranucleolar de marcaje rápido, lo cual es apoyado por los resultados obtenidos en condiciones experimentales en las que las células son tratadas con cortisol, hormona que aumenta la actividad transcripcional, y marcadas con precursores radiactivos para el ARN (Nash y col., 1975). Finalmente, el análisis bioquímico de las fibras pericromatinianas realizado por Bachelier y col. en 1975, indicó que presentan las mismas características que el ARNpre-m (ácido ribonucleico premensajero) (Moyné y Puvion, 1976).

Los gránulos pericromatinianos fueron observados por primera vez por Watson en 1962 en hepatocitos de roedores (Swift, 1963). Se ha resaltado la similitud morfológica y citoquímica entre los gránulos pericromatinianos y los gránulos de Balbiani; estos últimos se encuentran en los núcleos de larvas de dípteros y representan el producto de la actividad transcripcional (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). En condiciones experimentales se ha encontrado que existen dos poblaciones de gránulos pericromatinianos, las cuales pueden ser distinguidas funcionalmente, pero no morfológicamente: los nucleolares y los extranucleolares (Moyné y col., 1977). La función de los gránulos pericromatinianos extranucleolares se ha esclarecido mediante la utilización de drogas que alteran la síntesis o el procesamiento del ARNpre-m, como la cordicepina (Puvion y col., 1976), la camptotecina (Gajkowska y col., 1977), la cicloheximida (Moyné y col., 1977), el 5,6-dicloro-1- β -ribofuranosilbenzimidazol (DRB), el bromuro de etidio y la adriamicina (Cervera y col., 1983). También utilizando otros factores que alteran igualmente la síntesis o el procesamiento del ARNpre-m, como el choque hipotérmico (Cervera y Montero, 1980), hormonas como el cortisol (Petrov y Bernhard, 1971; Moyné y Puvion, 1976), el estradiol (Vázquez-Nin y col., 1978; Echeverría y col., 1980). Asimismo, se ha estudiado cuantitativamente a los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación de los neuroblastos (Vázquez-Nin y col., 1980). Con la información obtenida de este conjunto de trabajos se ha propuesto que los gránulos pericromatinianos extranucleolares se encuentren involucrados en el procesamiento, almacenamiento y/o transporte del ARNpre-m (Vázquez-Nin y col., 1980); en tanto que los gránulos pericromatinianos nucleolares se encuentran relacionados con el procesamiento del ARNpre-r (ácido ribonucleico prerribosomal) (Puvion y col., 1981). Los polipéptidos que se han encontrado en estas partículas tienen pesos moleculares de 30,000; 31,000 y 34,000, encontrándose además un ARNsnU₆ (ácido ribonucleico pequeño nuclear, especie U₆) (Daskal y col., 1980; Daskal, 1981). Con respecto a estos ácidos ribonucleicos pequeños se han encontrado también las especies U₁ y U₂ en complejos ribonucleoproteicos que contienen ARNpre-m, además de varios polipéptidos de 25,000 hasta 130,000 daltones (Sekeris y Niessing, 1975). Otros autores como Lerner y Steitz en 1979 han encontrado a las especies U₄, U₅ y U₆ en complejos ribonucleoproteicos que contienen ARNpre-m y cuatro polipéptidos de 10,000 a 14,000 daltones por lo que estos autores sugieren que estos ácidos ribonucleicos intervienen de alguna forma en el proceso de edición o maduración del ARNpre-m (Brunel y col., 1981). En este sentido resulta revelador el que Oshima en 1981 haya encontrado apareamiento de bases entre el ARNpre-m y el ARNsnU₁ en la zona de transición exón-intrón (secuencia codificadora-secuencia no codificadora del ARNpre-m) y apareamiento de bases entre el ARNpre-m y el ARNsnU₂ en los extremos de los exones; este hallazgo llevó a proponer a Oshima que estas especies de ácidos ribonucleicos

pequeños confieren una mayor precisión a los eventos de edición (escisión-unión del ARNpre-m) (Flint, 1984). Sin embargo, utilizando la técnica de inmunofluorescencia y con el uso del microscopio electrónico para la localización de los complejos antígenos-anticuerpos, se encontró que la especie ARNsnU₁ se localiza en los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Spector y col., 1983); los cuales se cree que representan sitios de transferencia o de acumulación del ARN nucleolar (Puvion y col., 1984).

Al parecer dentro de los gránulos intercromatinianos se llevan a cabo reacciones enzimáticas, como lo demostraron Vorbrott y Bernhard en 1969, quienes encontraron que estas partículas presentaban actividad ATPasa y GTPasa (Puvion y Moyne, 1981). Además se ha determinado en estos gránulos la existencia de enzimas como la β -glicerofosfatasa y la NAD-pirofosfatasa (Buchwalow y Unger, 1977). Sin embargo, aún se desconoce completamente la interacción de este conjunto de enzimas con el complejo ribonucleoproteico en general o su función global. Las pruebas enzimáticas sugieren que los gránulos intercromatinianos contienen proteínas ácidas, las cuales protegen al ARN de la acción de la ribonucleasa; pero estas partículas son digeridas si previo al tratamiento con la ribonucleasa son sometidas a la acción de la pepsina (Smetana y col., 1971).

Análisis citoquímicos extensos han determinado que estas partículas contienen proteínas fosforiladas (Wassef, 1979). Sin embargo, ni las pruebas enzimáticas ni las citoquímicas han sido capaces de determinar inequívocamente la presencia de ARN en los gránulos intercromatinianos; en tanto que el alto contraste que adquieren con la técnica de contraste regresivo preferencial para las ribonucleoproteínas de Bernhard, no es una prueba concluyente debido a su carácter preferencial (por lo tanto no específico) (Puvion y Moyne, 1981). Las pruebas con autorradiografía han evidenciado que los gránulos intercromatinianos se marcan débilmente con precursores radiactivos para el ARN, por lo que pueden contener cantidades pequeñas de ácido ribonucleico de marcaje lento (Fakan y Bernhard, 1973). Siguiendo esta línea de pensamiento se cultivaron células en un medio con uridina tritiada y posteriormente fueron tratadas con ribósido de diclorobenzimidazol, droga que inhibe solamente la síntesis del ARN extranucleolar, y se encontró que los gránulos intercromatinianos presentaban un marcaje intenso, con lo que se demostró así la presencia de ARN en estas estructuras (Puvion, 1982).

Recher y col. en 1976, con base en las observaciones hechas al estudiar los diferentes componentes del nucleolo utilizando varias drogas, que además de interferir en la síntesis del ARN inducen cambios estructurales en el nucleolo, sugirieron que los gránulos intercromatinianos pueden derivar de una fracción del nucleolo, la P2, la cual se encuentra constituida por una matriz proteica, fibras resistentes a la acción de la pepsina y gránulos sensibles a la ribonucleasa (Recher y col., 1976). Por último, Puvion y col. en 1984 sometieron a un grupo de células a pulsos breves con uridina tritiada

y posteriormente fueron incubadas en presencia de DRB y observaron que los gránulos intercromatinianos presentaban un marcaje intenso; otro grupo de células, por el contrario, fueron pretratadas con pequeñas dosis de actinomicina D para inhibir la síntesis de ARNr, con lo que se inhibió completamente la incorporación de los precursores radiactivos para el ARN en los gránulos intercromatinianos. Con estos resultados se propuso que los gránulos intercromatinianos representan sitios de transferencia y/o acumulación del ARN nucleolar (Puvion y col., 1984).

Masurovsky y col. en 1967, sugirieron que los cuerpos espiralados son productos de la degeneración en las neuronas al recibir estas dosis excesivas de irradiación de rayos X. Por otro lado, Hardin y col. en 1969, con base en el parecido morfológico y a la relación topográfica entre los cuerpos espiralados y el nucleolo, proponen que los primeros se encuentran involucrados en el transporte del ARNr del nucleolo hacia el citoplasma; en tanto que Le Beux en 1971 propone que los cuerpos espiralados representan puffs provocados por la amplificación selectiva de los genes ribosomales (Hervás y col., 1980).

Existen en el núcleo interfásico de los mamíferos otras estructuras con un grado mayor de complejidad estructural que las partículas ribonucleoproteicas anteriormente descritas: los cuerpos nucleares. Estas estructuras fueron observadas por primera vez por Dethe y col. en 1960 en células en estado de degeneración oncogénica; sin embargo, Weber y col. en 1964 las encontraron en células normales, pero que presentaban una actividad transcripcional intensa. Han sido descritos cinco tipos principales de cuerpos nucleares con diámetros entre los 0.2 a los 0.9 μm (Chaly y col., 1983a). El contraste obtenido con la técnica de contrastación regresiva preferencial para las partículas ribonucleoproteicas, sugiere que los cuerpos nucleares simples se encuentran constituidos por material fibrilar no cromatínico, el cual parece ser principalmente proteico. Los componentes fibrilares y granulares de los cuerpos nucleares complejos parecen ser ribonucleoproteínas. Ninguno de los cuerpos nucleares se contrastan con nitrato de plata, el cual es específico para el nucleolo, y no presentan además incorporación ni de uridina ni de timidina tritiada, por lo que hasta el momento se desconoce completamente cuál pueda ser la función de estas estructuras. Por último, los gránulos interiores del cuerpo nuclear tipo III presentan una gran similitud morfológica con los gránulos intercromatinianos (Chaly y col., 1983b).

El conglomerado ribonucleoproteico intranuclear más complejo tanto estructural como bioquímicamente, es sin duda el nucleolo. El inicio de los estudios que empezaron a proporcionar información más precisa acerca de la naturaleza de esta estructura se sitúa en los años sesentas. Así, estudios hechos empleando técnicas como la citoquímica ultraestructural y la autoradiografía, permitieron a Granboulan y Granboulan en 1964 determinar la existencia de cromatina dentro del nucleolo, así como a Spiegelman y col.

en 1961 detectar actividad transcripcional nucleolar. Existen bastantes evidencias que permiten suponer que es en el nucleolo donde se lleva a cabo la síntesis del ARNr. Edstrom en 1960 encontró que la composición de bases es muy similar entre los ácidos ribonucleicos ribosomal y nucleolar. Perry en 1962 observó que al ser tratadas las células con actinomicina D, droga que inhibe la síntesis del ARNr, cesaba completamente la incorporación de uridina tritiada en el nucleolo, más no así en la cromatina extranuclear. Brown y Gurdon en 1964 determinaron que un mutante anucleolado de *Xenopus laevis* era incapaz de sintetizar ARNr (Granboulan y Granboulan, 1965).

En la estructura del nucleolo es posible reconocer diversos componentes como:

- a). -Centros o zonas fibrilares constituídos por fibras de 50Å de diámetro y de 300 a 400Å de longitud.
- b). -Centros o zonas granulares constituídos predominantemente por gránulos de 150Å de diámetro.
- c). -Los constituyentes fibrilares y granulares del nucleolo conforman una red fibrilar gruesa: el nucleolonema. Existen también zonas homogéneas llamadas partes amorfas o matriz amorfa, en las cuales los componentes fibrilares y granulares son escasos.
- d). -Por último se encuentra la cromatina perinucleolar (Ghosh, 1976).

Los elementos bioquímicos son numerosos:

- a). -ARN polimerasa I.
- b). -Proteínas prerribosomales de alto peso molecular que nunca abandonan el nucleolo.
- c). -Muchas de las proteínas ribosomales.
- d). -Enzimas procesadoras del ARNpre-r: enzimas modificadores; metilasas; fosfatasas; endonucleasas; proteínas modificadoras de las enzimas y kinasas.
- e). -ARNpre-r de alto peso molecular como el 45S, así como productos intermedios y productos finales como el 20S y el 18S.
- f). -ARNsnU3.
- g). -90% o más de ADNr (ácido desoxirribonucleico ribosomal) de la célula.
- h). -ADN que no contiene secuencias prerribosomales (Smetana y Busch, 1981).

Bernhard y Granboulan en 1963 realizando digestiones enzimáticas sobre el nucleolo demostraron que los constituyentes fibrilares y granulares son complejos ribonucleoproteicos (Granboulan y Granboulan, 1965). Se ha sugerido que la red fibrilar que queda en los cuerpos fibrilares y asociada al nucleolonema después del tratamiento enzimático con ribonucleasa y pepsina puede tratarse de cromatina (Recher y col., 1969). Knibiehler y col. en 1977, con base en los resultados obtenidos utilizando técnicas de hibridización *in situ*, y Hernandez-Verdun y col. en 1978 mediante la técnica de contrastación con plata, sugieren que la cromatina asociada a los cuerpos fibrilares contiene genes ribosomales. Mirre y Stahl en 1981, al estudiar la cromatina de los cuerpos fibrilares con uridina tritiada durante la nucleologénesis, observaron que este ADNr, que inicialmente se encuentra sólo

en los cuerpos fibrilares, se distribuye posteriormente a todas las regiones fibrilares del nucleolonema (Mirre y Stahl, 1981). Asimismo, los estudios autorradiográficos han permitido establecer el desplazamiento que efectúa el ARN recién sintetizado desde los cuerpos fibrilares hasta las zonas granulares y además de que las fibras son los elementos precursores de los gránulos (Granboulan y Granboulan, 1965). Además, estudios hechos empleando técnicas autorradiográficas y bioquímicas han permitido confirmar que la producción del ARNr 38S y sus primeras modificaciones de corte-unión ocurren en los cuerpos fibrilares y posteriormente sus productos, principalmente el ARNr 30S, son transportados y almacenados en la región granular (Das y col., 1970).

Otro tipo de partículas ribonucleoproteicas se han encontrado en algunos organismos unicelulares. Pappas en 1965, detectó la presencia en el núcleo interfásico de *Amoeba proteus* de estructuras helicoidales de 140Å de diámetro y de 7,000Å de longitud. Posteriormente, utilizando precursores radiactivos para el ARN, se demostró que se trataba de partículas ribonucleoproteicas (Wise y col., 1972). Se han encontrado estas estructuras helicoidales en otros amebidos, como en *A. discoides*, *A. amazonas* y en *A. dubia* (Flickinger, 1974). En otro taxón de los protistas, los euglénidos, se ha estudiado también la ultraestructura de su núcleo interfásico, empleando la técnica de contrastación regresiva preferencial para las partículas ribonucleoproteicas junto con digestiones enzimáticas. Además de que la ultraestructura general del núcleo de *Euglena gracilis* difiere bastante de la de los metazoarios, se ha encontrado un conjunto de partículas que anteriormente no habían sido descritas. Como elementos ribonucleoproteicos se encuentran una matriz fibrilar de 50Å de diámetro y fibras en forma de U de 200Å de diámetro, de 400 a 600Å de ancho y 900Å de longitud. También se encontraron unos gránulos de 900Å de diámetro cuya naturaleza se desconoce; por otra parte, no se observaron ni fibras ni gránulos pericromatinianos (Moyné y col., 1975).

El nucleoplasma o jugo nuclear, que se encuentra comprendido en la región extranucleolar interheterocromatiniana se concebía como un coloide, en el cual se encontraban en suspensión numerosas moléculas, principalmente proteínas y ácidos nucleicos, o fracciones de estas moléculas. Es en esta región en donde se creía que se llevaba a efecto varias reacciones enzimáticas, además de la síntesis y el transporte de las diversas moléculas de una manera más o menos azarosa. Otra perspectiva a esta aparente desorganización nuclear es proporcionada por los descubrimientos hechos en el núcleo celular interfásico, uno de los cuales es la existencia de una especie de andamiaje en el cual se encuentran anclados o insertados tanto la cromatina en todas sus formas como los complejos ribonucleoproteicos (Bouvier y col., 1982). Este andamiaje o matriz nuclear es puesto en evidencia después de tratar a los núcleos con diversas concentraciones

salinas y de detergentes, así como al ser sometidos a enzimas como la ADNasa y la ARNasa. Entre los constituyentes moleculares destacan los elementos proteicos y en menor cantidad el ADN, ARN, carbohidratos y fosfolípidos. Si se logra extraer en su totalidad al ADN y al ARN de la matriz nuclear, queda solamente un armazón proteico llamado matriz nuclear proteica, la cual se encuentra compuesta principalmente por tres polipéptidos de pesos moleculares de 62,000; 66,000 y 69,000 (Berezney y Coffey, 1977). Los elementos estructurales de la matriz nuclear son: el complejo lámina-poro nuclear; la matriz intranuclear y la matriz nucleolar (van Eekelen y van Venrooij, 1981). Cook y col. en 1976, aportaron evidencias de que la matriz nuclear es fundamental para el ordenamiento del genoma en el núcleo celular interfásico (Bouvier y col., 1982). Técnicas de autorradiografía han revelado que la mayor parte del ADN recién sintetizado se encuentra asociado a la matriz nuclear (Berezney y Coffey, 1975). Asimismo, debido a que el ADN uncatenario se une preferencialmente a las proteínas de la matriz nuclear se ha propuesto que esta estructura resulta fundamental no solamente para el ordenamiento del ADN, sino también para la duplicación (Comings y Wallack, 1978). Esta hipótesis es asimismo apoyada por el hecho de que la ADN α -polimerasa se encuentra asociada a la matriz nuclear en células que presentan una duplicación activa del ADN (Smith y Berezney, 1980). Para explicar la manera en que interviene la matriz nuclear en la duplicación del ADN se ha propuesto un modelo según el cual la duplicación del ADN ocurre en sitios fijos en la base de sus asas, las cuales son móviles con respecto a su sitio de adhesión a la matriz nuclear (Vogelstein y col., 1980). No solamente en la duplicación del ADN interviene la matriz nuclear, sino también modula la actividad transcripcional, al respecto las primeras evidencias provienen del descubrimiento de que existen partículas ribonucleoproteicas que contienen ARNhn (ácido ribonucleico heteronuclear o premensajero) asociadas a la matriz nuclear (van Eekelen y van Venrooij, 1981). Debido a esto, se ha propuesto que el ARN es sintetizado conforme el ADN pasa a través de un complejo molecular y el ARN recién sintetizado se adhiere a la matriz nuclear (Jackson y col., 1981). Otras especies de ARN que forman complejos con las proteínas de la matriz nuclear son las responsables de que esta estructura mantenga su configuración tridimensional (Bouvier y col., 1982). Por último, Berezney y Coffey en 1977 encontraron estructuras morfológicamente similares a los gránulos intercromatinianos asociadas a la matriz nuclear (Wassef, 1979).

En la actualidad son bien conocidas las transformaciones moleculares que sufren los primeros transcritos de los ácidos ribonucleicos no solubles; lo que contrasta con el panorama poco claro que se tiene de la correlación entre los cambios estructurales de estas moléculas y los substratos morfológicos en donde éstos se efectúan. El primer transcrito de los genes que codifican para proteínas, sintetizado por la enzima ARN polimerasa II, debe sufrir varias modificaciones antes de ser traducido por el ARNt (Alberts y col., 1983). Las modificaciones que se observan en el primer transcrito, o ARNpre-m, en los eucariontes son: la adición de un capuchón metilado en la terminal 5'; la adición de un segmento de poli(A) (poliadenilado) en la terminal 3'; reacciones de corte-unión y la metilación de residuos internos de adenosina (Kozak, 1983). En cuanto a la secuencia en la que se producen dichos eventos, se conoce gracias a la cinética de incorporación de marcadores radiactivos para el ARN, que el encapuchamiento es el primero de los procesos enzimáticos (Flint, 1984), y es seguido, en un lapso de tiempo breve, por la adición del segmento de poli(A) (Nevins, 1984).

Reddy y col. en 1974, pusieron en evidencia la existencia de un capuchón en la terminal 5' del ARNpre-m. Este capuchón consiste de un residuo de guanosina que bloquea la primera base del extremo 5', codificada en el ADN, mediante una unión 5'-5' que contiene tres grupos de fosfatos. El residuo bloqueador de guanosina presenta un radical metil en la posición N-7; además algunas veces la primera base y el residuo adyacente se encuentran metilados en el grupo ribosa. Cuando la primera base es adenosina, ésta se encuentra metilada en la posición N-6. Al parecer este capuchón resulta imprescindible en algunas ocasiones, para que se efectúe una traducción eficiente del ARNm; además se ha observado que las moléculas de ARNm que poseen esta estructura presentan una mayor estabilidad (Furui-chi y col., 1977). Este capuchón parece ser necesario también para que se efectúe con el mayor rendimiento la transformación del ARNpre-m a ARNm (Banerjee, 1980).

La presencia del segmento de poli(A) fue determinada por primera vez por Kates en 1970. Brawerman y Diez en 1975, utilizando la electroforesis en gel precisaron que la longitud de tal segmento era de 200 a 250 residuos adenilados. Sin embargo, además de que el fragmento poliadenilado varía entre las diferentes especies de organismos, existe una fuerte correlación entre la longitud de este fragmento y la antigüedad evolutiva del organismo o del taxón al que pertenece. Encontrándose los segmentos de poli(A) más cortos en las bacterias y los segmentos mayores en células de tejidos altamente diferenciados (Carlin, 1980). En cuanto

a su función, Penman y col. en 1970, al inhibir la adición de esta secuencia mediante el sometimiento de las células a dosis pequeñas de cordicepina, resaltaron la importancia que tiene esta estructura para que se lleve a cabo completamente la maduración del ARN pre-m. Por otra parte, Chen-Kiang y col. en 1970 al trabajar con ARNm tardío de adenovirus, Nevins y Wilson en 1977 con ARNm temprano de adenovirus y Harpold y col. en 1979 con el ARNm de la hormona del crecimiento, resaltaron que la mayor eficiencia en el transporte del ARNm desde el núcleo hacia el citoplasma se produce cuando estos ácidos ribonucleicos poseen la cola de poli(A). En este sentido Zeevi y col. en 1982, al tratar las células con cordicepina de tal manera que se evitase la adición del segmento poliadenilado, pero sin perturbar el transporte del ARNm hacia el citoplasma, comprobaron que los ARNm que carecían de tal segmento eran más susceptibles a la degradación enzimática durante el trayecto núcleo-citoplasma (Nevins, 1984). El ARNpre-m contiene secuencias codificadoras para proteínas (exones) y secuencias no codificadoras intercaladas entre los exones (intrones), que deben ser, estas últimas, eliminadas durante la maduración de dicho ácido ribonucleico (Crick, 1979). El primer transcrito puede ser de cinco a diez veces mayor que el ARNm maduro (Kolata, 1980). El reconocimiento de los intrones por las ribonucleasas no solamente es facilitado por la secuencia de nucleótidos en el ARNpre-m, sino que intervienen también estructuras secundarias e incluso terciarias y cuaternarias; es decir, ya en forma de complejos ribonucleoproteicos. La remoción de ciertos intrones puede conducir a cambios conformacionales de las partículas ribonucleoproteicas, de tal manera que se facilite la acción de las ribonucleasas sobre otros intrones (Lewin, 1983). En cuanto a la función de estas secuencias no codificadoras, Gruss y Khoury en 1980 al introducir intrones en sitios incorrectos (ocupados normalmente por exones) impidieron el transporte del ARNm hacia el citoplasma; en este sentido ya Boltz y Flint en 1979, expresaron que el proceso de edición o remoción de los intrones en el ARNpre-m podría representar un mecanismo de regulación de la actividad genética a nivel postranscripcional (Flint, 1984).

Perry y col. en 1975, descubrieron la existencia de residuos internos de adenosina metilados en el ARNpre-m. Wei y col. en 1976, sugieren que las metilasas tienen cierta especificidad para determinadas secuencias del ARNpre-m. Chen-Kiang en 1979, al estudiar la cinética de conservación de marcadores radiactivos (metionina tritiada) del ARNpre-m propone, al obser-

var una conservación preferencial de los residuos de adenosina metilados con respecto a las demás secuencias de bases, que estos residuos metilados actúan como señales que indican a las endonucleasas cuáles son las secuencias que deben conservarse (Flint, 1984).

El procesamiento postranscripcional del otro de los ácidos ribonucleicos no solubles, el ribosomal, es bastante más simple en cuanto al número de eventos que se tienen que llevar a cabo sobre el primer transcrito y sobre los productos intermediarios para llegar a los productos finales. El primer transcrito del ARNr es una molécula grande con un coeficiente de sedimentación de 45S, la cual es sintetizada en la región fibrilar del nucleolo, a partir de los organizadores nucleolares (de la cromatina que se encuentra en los centros fibrilares del nucleolo). Determinadas secuencias de esta molécula son metiladas en los grupos ribosa; estas regiones metiladas corresponden a los futuros ácidos ribonucleicos ribosomales 18S y 28S. Después de la metilación, la molécula de 45S es fragmentada y degradada, probablemente por medio de una endonucleasa, dando lugar a moléculas más pequeñas: 41S y 20S. Esta última es degradada en la porción no metilada, por una exonucleasa quedando como producto el ARNr 18S, el cual es transportado rápidamente hacia el citoplasma. Sobre la 41S actúa una exonucleasa produciendo como intermediarios a las moléculas 36S y 32S. La molécula 32S permanece durante algún tiempo (aproximadamente 40 min.) en la región granular del nucleolo y luego es degradada a 28S, que permanece en el nucleolo otros 30 min. antes de entrar en el citoplasma (De Robertis y col., 1977).

I.4.-PROTISTAS.

I.4a).-IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS PROTISTAS.

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por los organismos comprendidos en el Reino Protista. Esto se debe a que se relativa poca complejidad estructural, es decir no presentan diferenciación tisular, sugiere que su estudio sea vital para la comprensión de la eucariogénesis y el origen evolutivo de los Reinos más complejos.

El registro fósil, que ha sido de gran utilidad para los botánicos y zoólogos como fuente de evidencias para el establecimiento de relaciones evolutivas, ha sido para el caso de los protistólogos insuficiente, debido principalmente a la carencia en la mayoría de los Phyla de citoesqueleto interno o externo y por la poca o nula conservación de las estructuras internas, por lo que ha retrasado considerablemente con respecto a los Reinos más complejos el llegar a tener un panorama más claro de las relaciones filogenéticas. Para subsanar esta carencia de información se han realizado comparaciones entre los organismos actuales; esto sin embargo, presenta la desventaja de que estos organismos han divergido bastante de sus ancestros, lo que tiende a obscurecer las relaciones filogenéticas. Estas relaciones se han sugerido con base en, primero, a los datos obtenidos de la morfología comparada, y después, a la información proporcionada por disciplinas como la fisiología, la ultraestructura, la bioquímica, la genética y la biología molecular. A medida que se ha ido acumulando información el panorama filogenético se ha ido precisando, con lo que se han hecho numerosas reformas a las sistemáticas que comprenden a los Phyla de protistas, por ejemplo, se han desechado categorías taxonómicas como las "algas", los "protozoarios" por ser polifiléticas. Como se recordará, la evolución es la esencia de la sistemática, por tal motivo es deseable e indispensable que un Phylum, la categoría taxonómica mayor después del Reino, agrupe a varios organismos caracterizados por poseer un patrón de organización básico compartido, a pesar de que difieran en varios detalles generales de su estructura, por lo que se presupone que este grupo de organismos tienen un ancestro común (Whittaker y Margulis, 1978).

Por todo esto el número de Phyla del Reino Protista se ha ido modificando y creciendo, surgiendo gran cantidad de clasificaciones y de interpretaciones de las relaciones filogenéticas, muchas de ellas antagónicas. Por ejemplo, Whittaker en 1969 incluye de 10 a 11 Phyla; Margulis en 1974 incluía de 31 a 33 Phyla; Whittaker y Margulis en 1978 consideraban la existencia de 28 Phyla; Margulis y Schwartz en 1982 consideraban también 28 Phyla;

finalmente Corliss en 1984 incluye 45 Phyla (a continuación se dan las referencias en el mismo orden en que se mencionaron los autores de las clasificaciones: Whittaker, 1969; Whittaker y Margulis, 1978; Margulis y Schwartz, 1982 y Corliss, 1984). Algunos autores opinan que el monofilétismo debe incluso llegar a nivel de Reino, por lo que se han propuesto sistemáticas de siete y nueve Reinos (Cavalier-Smith, 1978; 1981, respectivamente); otros, para evitar la heterogeneidad filética han propuesto esquemas en donde a los protistas no se les considera como categoría taxonómica, sino solamente como nivel de organización, ocupando un estado de transición hacia los Reinos más complejos, o bien un esquema de 19 Reinos en donde se evita al máximo la construcción de Reinos polifiléticos o artificiales (Leedale, 1974).

Resumiendo, al Reino Protista no debe considerársele como una agrupación de miniplantas, minianimales, minihongos ni como combinaciones químéricas. Sus aproximadamente 120,000 especies no deben ser vistas como un conjunto realizado por exclusión o como transición entre los procariontes y los eucariontes más complejos.

Es pertinente, para tener un concepto más claro de los taxa que se incluyen dentro de este Reino, aunque algunos autores discrepen en algunos puntos, presentar su diagnosis, así como los Phyla contenidos en él según Corliss: "Organismos eucariontes sin tejidos diferenciados. Predominantemente unicelulares en organización y de tamaño microscópico. Pocos miembros sin ciliales, cenocíticos, cenobiales o multicelulares (generalmente en forma de filamentos, hifas, colonias, cenobios o talos), pero sin presentar diferenciación en tejidos. El tamaño macroscópico es alcanzado en muy pocos miembros, pero sin poseer tejidos netamente diferenciados, y no existen formas vasculares. Los organismos móviles (frecuentemente biciliados, ciliados o con pseudópodos en alguna etapa del ciclo de vida), son más numerosos y con mayor distribución que los sésiles. Existen todos los tipos de nutrición. Las crestas mitocondriales son tubulares, lamelares o discoidales. Tienen las rutas metabólicas del ácido amino-adípico y del ácido diaminopimélico para la síntesis de la lisina. La meiosis puede ser gamética, cigótica o esporica. Aproximadamente con 120,000 especies, actuales y extintas."

Los Phyla que según la sistemática propuesta por Corliss en 1984 deben incluirse en el Reino Protista son:

Rizópodos

- Phylum Karyoblastea Margulis, 1974
 - Amoebozoa Lühe, 1913
 - Acrasia van Tieghem, 1880
 - Eumycetozoa Zopf, 1885
 - Plasmodiophorea, Zopf 1985
 - Granuloreticulosa De Saedeleer, 1934
(*Incert.sed.*: Xenophyophora Schulze, 1904)

Mastigomicetos

- Hyphochytridiomycota Sparrow, 1959
- Oomycota Winter, 1879
(*Incert.sed.*: Chytridiomycota Sparrow, 1959)

Clorobiontes

- Chlorophyta Pascher, 1914
- Prasinophyta Christensen, 1962
- Conjugatophyta Engler, 1892
- Charophyta Rabenhorst, 1863

Euglénidos

- Euglenophyta Pascher, 1931
- Kinetoplastida Honigberg, 1963
(*Incert.sed.*: Pseudociliata Corliss y Lipscomb, 1982)

Rodofitas

- Rhodophyta Rabenhorst, 1863

Criptomonadidos

- Cryptophyta Pascher, 1914

Coanoflagelados

- Choanoflagellata Kent, 1880

Cromobiontes

- Chrysophyta Pascher, 1914
- Haptophyta Christensen, 1962
- Bacillariophyta Engler y Gild, 1924
- Xanthophyta Allorge en Fritsch, 1935
- Eustigmatophyta Hibberd y Leedale, 1970
- Phaeophyta Kjellman, 1891
(*Incert.sed.*: Proteromonadea Grassé en Grassé, 1952
Bicosoecidea Grassé y Deflandre en Grassé, 1952
Heterochloridea Chadeffaud, 1950)

Labirintomorfos

- Labyrinthulea Cienkowski, 1867
- Thraustochytriacea Sparrow, 1943

Polimastigotos

- Metamonadea Grassé en Grassé, 1952
- Parabasalia Honigberg, 1973

Paraflagelados

- Opalinata Wenyon, 1926

Actinópodos

- Heliozoa Haeckel, 1866
- Taxopoda Fol, 1883
- Acantharia Haeckel, 1879
- Polycystina Ehrenberg, 1839
- Phaeodaria Haeckel, 1879

Dinoflagelados

- Peridinea Ehrenberg, 1830
- Syndinea Chatton, 1920
(*Incert.sed.*: Ebridea Deflandre en Grassé, 1952
Ellobiophyceae Loeblich III, 1970
Acritarcha Evitt, 1963)

Ciliados

Ciliophora Doflein, 1901

Esporozoa

Sporozoa Leuckart, 1879

(*Incert.sed.*: Perkinsida Levine, 1978)

Microsporidios

Microsporidia Balbiani, 1882

Haplosporidios

Haplosporidia Caullery y Mesnil, 1899

Mixosporidios

Myxosporidia

(*Incert.sed.*: Actinomyxidea Stolc, 1899

Marteiliidea Desportes y Ginsburger-Vogel, 1977

Paramyxidea Chatton, 1911).

(Corliss, 1984).

I.4b).-RELACIONES FILOGENETICAS DE LOS PROTISTAS CON LOS REINOS MAS COMPLEJOS.

Un hito importante en la evolución de los organismos, al menos antropocéntricamente hablando, lo constituye la transición de los protistas hacia los Reinos más complejos, es decir, de la unicelularidad hacia la pluricelularidad, o mejor dicho, de la diferenciación celular incipiente a la diferenciación tisular. Algunas de las fuerzas evolutivas principales que condujeron al aumento de tamaño y a la multicelularidad en los eucariontes son:

- a).-La competencia por la luz en los organismos fotosintéticos.
- b).-La competencia por las presas en los depredadores.
- c).-La dispersión de las esporas por las corrientes de aire.

La tendencia hacia la multicelularidad que posteriormente conduciría a la diferenciación tisular es en realidad una continuación de la aparición y especialización de los organelos dentro de la célula eucarionte. Esta multicelularidad y posterior diferenciación tisular permitiría la explotación de patrones diferenciales de la actividad genética a nivel celular, y a nivel multicelular a la adquisición de numerosos tejidos, órganos y patrones estructurales que permitirían explotar más eficientemente medios ambientes en los cuales los organismos unicelulares o quedaban excluidos o bien su adaptación a ellos era mínima.

En los organismos unicelulares determinados genes presentan actividad en un tiempo determinado y otros en otro tiempo, por lo que la variabilidad está fuertemente limitada. Existen evidentemente ventajas para este tipo de funcionamiento del genoma, ya que si bien la variabilidad y por ende la especialización están limitadas en los organismos unicelulares, poseen una más rápida respuesta genética a las condiciones externas (es decir presentan un potencial adaptativo alto). Asimismo, para que se produzca la diferenciación y especialización tiene que haber un aumento considerable del tamaño que solamente podrá adquirirse con la obtención de una estructura bucal permanente, producto ésta de hábitos de depredación activos. Este es el caso de los animales, pero recuérdese que son éstos los que mayor diferenciación tisular presentan (Hanson, 1977). Estas fuerzas dieron lugar, en muchas ocasiones, a casos de evolución convergente de la multicelularidad y a otras adaptaciones en gran cantidad de eucariontes lejanamente emparentados (Cavalier-Smith, 1978).

A continuación se analizan las relaciones filogenéticas propuestas entre algunos grupos de protistas y los Reinos más complejos.

Origen de las plantas.

Para determinar el origen de las plantas se ha tenido en cuenta al complejo de pigmentos fotosintéticos y a los productos de reserva como los caracteres de mayor peso filogenético. Los únicos protistas que comparten con

las plantas la posesión de clorofilas "a" y "b" como los principales pigmentos fotosintéticos y al almidón como el principal producto de reserva, son las clorofitas y la carofitas; estas últimas se encontraban antiguamente comprendidas dentro de las clorofitas, pero debido a las considerables diferencias en la estructura de los órganos reproductores, se procedió a colocarlas en un taxón independiente.

Los taxa de Charophyta, Zygnematales y *Klebsormidium* presentan en común con las plantas un huso mitótico abierto, además de que la citocinesis es efectuada por un fragmoplasto que prolifera a partir de un huso interzonal persistente; ambos grupos poseen la enzima glucolato oxidasa, y finalmente, las células móviles tienen los undulipodias insertados lateralmente y asociados con sólo una banda ancha de microtúbulos adyacentes. En contraposición, en la mayoría de las clorofitas (exceptuando a las Zygnematales) la citocinesis es efectuada por el ficoplasto, que es un sistema de microtúbulos perpendiculares al eje del huso reciente y a los microtúbulos del fragmoplasto; además, carecen de la enzima glucolato oxidasa y tienen en cambio la enzima glucolato deshidrogenasa. Por último, las células móviles presentan un sistema de undulipodias insertado en la región anterior y se encuentra asociado con cuatro inserciones microtubulares en forma de cruz (Stewart y Mattox, 1975).

Los autores que sostienen que fue un ancestro perteneciente al grupo de las clorofitas el que dio lugar a las plantas, consideran que un organismo unicelular con dos undulipodias tipo *Chlamydomonas* sufrió una radiación evolutiva que derivó en tres ramas o líneas evolutivas básicas. La primera de ellas, la línea volvocina está integrada por organismos coloniales, en donde cada una de las células de la colonia conserva la morfología del ancestro tipo *Chlamydomonas*. La segunda línea es la sifonada, la cual se encuentra compuesta por "algas" con células plurinucleadas o cenocíticas. Tanto la línea volvocina como la sifonada tuvieron un éxito evolutivo limitado al no dar lugar a nuevos patrones estructurales. En cambio la tercera línea, la tetrasporina tuvo mayor éxito y es la que con mayor probabilidad dio lugar a las plantas. Esta línea evolutiva comprende a organismos con estructura filamentosas, ramificada o uniseriada, o bien a organismos cuya organización básica es el talo. Con respecto a los organismos con talo ("algas"), se ha propuesto una serie de complejidad gradual creciente para explicar la evolución de los organismos fotosintéticos con diferenciación tisular (plantas): talo biseriado → talo monostromático → talo foliáceo → talo parenquimatoso (Scagel y col., 1980; Bold y col., 1980; Zimmermann, 1976).

Se ha postulado también que el origen de las plantas se debió, probablemente, al establecimiento de una asociación simbiótica entre una "alga" ancestral semiacuática y un hongo acuático del tipo de los Oomycetes (Pirozynski y Malloch, 1975).

Origen de los animales.

Las teorías que explican el origen de los metazoarios pueden centrarse en tres principales puntos de partida.

La teoría sincitial propuesta por Hadži en 1953 y Hanson en 1958. Esta teoría plantea que un ancestro ciliado multinucleado sufrió una compartimentalización interna, dando así lugar a los primeros metazoarios bilaterales. Así, los organismos de simetría radial se derivaron secundariamente a partir de los organismos bilaterales. Estos autores consideran que los ciliados poseen varias características que son de esperarse para los ancestros protistas de los metazoarios, como son: tendencia hacia la simetría bilateral; presencia permanente de cinetias y citostomas, aunada a una gran complejidad cortical, lo que les permitió a estos organismos desarrollar hábitos de depredación muy activos; la posesión de varios núcleos somáticos en los taxa de ciliados menos evolucionados, lo que junto con los hábitos de depredación activos les permitió desarrollar un mayor tamaño. Finalmente, evolucionaron compartimientos internos con lo que pudieron continuar así la tendencia hacia el aumento de tamaño. Las principales objeciones formuladas contra esta teoría son: la carencia en la ontogenia de los metazoarios menos complejos de secuencias que apoyen estas presunciones filogenéticas; por otro lado, esta teoría no explica el hecho de que todos los metazoarios tengan espermatozoides con flagelos eucariontes (Barnes, 1977).

La segunda teoría es la colonial, la cual propone que los metazoarios derivaron a partir de flagelados coloniales. Fue propuesta primeramente por Haeckel en 1874, quien afirmaba que la colonia de flagelados era hueca. Poco después, en 1877, Metschnikoff sugiere que la colonia bien podría haber sido sólida. Finalmente, Hyman en 1940, conciliatoriamente explica el origen de los metazoarios partiendo de una colonia hueca que por migración de células al interior, se transforma en un organismo de estructura sólida. Este metazoario ancestral hipotético de forma ovoidea y simetría radial presenta una gran similitud con la larva plánula de los celentéreos, por lo que se le ha denominado ancestro planuloide. Así, los organismos de simetría bilateral tuvieron su origen en organismos de simetría radial. Según Haeckel la ontogenia de los metazoarios constituye la principal evidencia de esta hipótesis. De esta manera el estadio de blástula representaría a la colonia de flagelados hueca y la gástrula a la posterior invaginación de la colonia

hueca, formándose así una colonia de doble pared. También, la presencia universal en los metazoarios de espermatozoides con flagelos eucariontes constituye una evidencia fuerte de su origen a partir de protistas flagelados (Clark, 1964). Finalmente, la teoría polifilética sostiene que al menos existen dos formas básicas posibles para alcanzar la multicelularidad en los animales: la primera, a partir de la integración de una colonia, en donde las células tienden a suprimir su autonomía y a desarrollar especializaciones celulares e interconexiones apropiadas para la transformación de una colonia en un organismo multicelular con su propia individualidad; la otra posibilidad consiste en la evolución de la multicelularidad a partir de un organismo unicelular multinucleado y altamente diferenciado que sufrió una compartimentalización interna o celularización, pero en este caso, la coordinación y la conexión de las diferentes partes no se perderían, sino que se ampliarían al aumentar la complejidad del organismo. En este sentido, la mayoría de los autores han considerado a las esponjas como una línea evolutiva muerta que probablemente tiene sus orígenes en la agrupación de zooflagelados parecidos a los coanoflagelados. Por otra parte, el ciliado ancestral evolucionó, por un lado hacia los grupos más complejos o evolucionados de ciliados, y por el otro dio lugar a los turbeláridos y a otros metazoarios bilaterales. Sin embargo, es difícil precisar el origen de otros grupos de metazoarios como los cnidarios, los ctenóforos y los mesozoarios (Hanson, 1977). Asimismo, según otros autores resulta bastante artificial el agrupamiento dentro de los animales de grupos como los Porifera, Archaeocytha, Placozoa y Mesozoa, habiéndose derivado los dos primeros, sino es que todos, independientemente a partir de los protistas (Whittaker y Margulis, 1978).

Origen de los hongos.

La idea de que los hongos se encuentran estrechamente relacionados con las "algas" es bastante antigua, Brown en 1847 creía que representaban un grupo colateral de las "algas", mientras que Pringsheim en 1858 afirmaba que eran "algas". Posteriormente se reconoció que eran una entidad taxonómica y filética diferente; sin embargo, algunos autores como Gäumann en 1926 sugieren que se derivaron de las "algas" monofiléticamente (Martin, 1955), mientras otros, más específicamente, de un ancestro "algal" tipo Rhodophyta (Cavalier-Smith, 1978). El origen polifilético a partir de las "algas" es sustentado por varios autores, mismos que sugieren que los hongos más complejos, Ascomycota y Basidiomycota, y probablemente también los Laboul-

beniomycota y Zygomycota, hayan derivado de un ancestro "algal" tipo Rhodophyta, basándose principalmente en evidencias morfológicas (Denison y Carroll, 1966; Demoulin, 1974; Müller y Loeffler, 1976).

Otros autores, poniendo mayor énfasis en la condición heterótrofa y en determinadas características de los Myxomycota y los Acrasiomycota, derivaron monofiléticamente, Martin en 1932 y Heim en 1952, y polifiléticamente, Moreau en 1954, a los hongos de ancestros tipo "protozoarios". Sin embargo otros autores como Atkinson en 1902, conciliaron ambas posiciones sugiriendo que además de un posible "algal", algunos grupos pudieron haberse originado a partir de organismos heterótrofos unicelulares (Cifuentes, 1984).

Basándose en su heterotrofia lisotrófica (presentada por pocos eucariontes) se ha postulado para los hongos un origen a partir de eucariontes lisotróficos, a excepción de los Myxomycota y los Acrasiomycota, los cuales presentan una heterotrofia fagotrófica (Cifuentes, 1984).

Hay que remarcar que algunos taxa como los Chytridiomycota, Myxomycota, Plasmodiophoromycota, Oomycota, Labyrinthulamycota e Hyphochytridiomycota, además de ser considerados como hongos por algunos autores, también son considerados por otros como pertenecientes al Reino Protista o Protocista (Margulis y Schwartz, 1982; Corliss, 1984).

A partir de algunas características del huso mitótico se ha sugerido que los Ascomycota y los Basidiomycota tienen ancestros con undulipodias vía los Chytridiomycota. Asimismo, según la reconstrucción de la evolución de la mitosis basándose en los postulados de la teoría de la endosimbiosis, la mayoría de los eucariontes unicelulares y todos los pluricelulares tienen ancestros con undulipodias. Además, características estructurales de las crestas mitocondriales, así como la ruta metabólica del ácido α -aminoadípico para la síntesis de la lisina, sugieren una relación filética estrecha entre los Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Stewart y Mattox, 1980). Por el hecho de que los Oomycota e Hiphochytridiomycota utilicen la ruta metabólica del ácido diaminopimélico para la síntesis de la lisina y de que tengan celulosa en su pared celular, se les ha relacionado con las clorofitas y las plantas (Cifuentes, 1984).

Aunque existen semejanzas entre los diferentes taxa del Reino Fungi, la gran cantidad de diferencias inducen a pensar que sea un grupo altamente polifilético, cuyos orígenes se remontan a la aparición de los diferentes tipos de nutrición en los eucariontes (Cifuentes, 1984).

Como se observa, la gran problemática existente para el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre los taxa del Reino Fungi, y de éste con otros Reinos, se debe en gran parte a la reducida cantidad de hongos encontrados en los yacimientos fosilíferos.

I.4c).-RELACIONES FILOGENETICAS DE LOS GRUPOS DE PROTISTAS ESTUDIADOS.

La dificultad de establecer posibles relaciones filogenéticas tomando en cuenta uno o varios caracteres de los diferentes taxa del Reino Protista, puede apreciarse al comparar la diversidad de puntos de vista, algunos de ellos antagónicos. A continuación se presentan las relaciones filogenéticas de mayor aceptación para los taxa estudiados en el presente trabajo:

O. Cryptomonadida.

a).-Por el hecho de poseer ficobilinas como pigmentos fotosintéticos secundarios se les ha relacionado con las cianobacterias y las rodofitas, pero se apartan de ellas por tener undulipodias además de otros caracteres estructurales. Por otro lado tienen como pigmentos fotosintéticos primarios a las clorofilas "a" y "c", lo que los relaciona con los dinoflagelados (Scagel y col., 1980).

b).-Por las características de su huso mitótico y de la ultraestructura de las crestas mitocondriales se les relaciona con Euglenida, Kinetoplastida, Animalia y Plantae (Stewart y Mattox, 1980).

c).-Otros autores consideran que son organismos bastante aislados filogenéticamente por lo que han sido elevados al taxón de Phylum (Margulis y Schwartz, 1982; Corliss, 1984) e incluso hasta para constituir un Reino aparte (Leedale, 1974; Cavalier-Smith, 1978; 1981). La teoría de la endosimbiosis propone, al igual que para los demás eucariontes fotosintéticos, que éstos se originaron por adquisición secundaria de los plástidos (Margulis, 1981). Otros autores consideran que a partir de eucariontes unicelulares fotosintético se originaron los protistas heterótrofos por pérdida secundaria de los cloroplastos (Taylor, 1976; Hanson, 1976, 1977).

d).-Pascher en 1914, los incluía en la División Pyrrhophyta; pero este agrupamiento no se ve apoyado por un análisis estructural y bioquímico detallado. Ambos poseen undulipodia con mastigonemas (de diferente tipo); paredes internas (de diferente composición); poseen clorofila "C₂" y producen almidón como sustancia de reserva. Sin embargo difieren en las características nucleares (estructurales y moleculares), cloroplásticas (estructura y complejo de pigmentos carotenoides), mitocondriales y en los tricocistos (Taylor, 1980).

e).-Se les considera una rama que divergió bastante temprano de la "línea evolutiva" que conduce a las plantas (Taylor, 1976).

O. Euglenida.

a).-Poseen en común con Chlorophyta, Charophyta y Plantae las clorofilas "a" y "b"; pero difieren mucho en la organización celular y en las subs-

tancias de reserva(paramilo y grasas)(Bold y col.,1980).

b).-Algunos lo consideran un taxón sin relaciones filogenéticas estrechas con otros grupos,por lo que ha sido elevado al nivel de Phylum(Corliss, 1984) e incluso a nivel de Reino(Cavalier-Smith,1978;1981).

c).-Dillon en 1963,los agrupa con Dinoflagellida en el Subreino Euglenophytaria.Sus características comunes son:cromosomas condensados en el período interfásico y nucleolo persistente en la división celular; flagelos con mastigonemas;posesión de estructuras que se cree sean homólogas del aparato flagelar como las bandas estriadas de los dinoflagelados y las varillas paraflagelares de los euglénidos;paredes internas;envoltura del cloroplasto con tres membranas;agrupamiento de los tilacoides en grupos de tres y similitud estructural de los mucocistos y los tricocistos.Sin embargo,difieren en el complejo de pigmentos fotosintéticos;productos de reserva;carencia de las histonas comunes de los eucariontes en los dinoflagelados;huso mitótico interno en los euglénidos;composición de la pared y estructura de las crestas mitocondriales(Taylor,1980).

d).-Por las propiedades antigénicas de la tubulina de los undulipodias se encuentran estrechamente relacionados con el Orden Kinetoplastida(Acloutte y col., 1984).

e).-Por algunos caracteres citológicos es probable que Euglenida haya derivado de Kinetoplastida por medio de la simbiosis de un organismo fotosintético con un Kinetoplastida;sin embargo otros caracteres citológicos los relacionan aunque más lejanamente,con Dinoflagellida(Kivic y Walne,1984).Además la relación de Euglenida con Kinetoplastida se establece con base en el alto grado de secuencias homólogas que presentan para el citocromo c y para el ARNr 5S(Corliss,1984).

f).-Por otro lado se cree que se separaron tempranamente de la "línea evolutiva" hacia las plantas(Taylor,1976).

g).-La longitud extremadamente corta del ARNr 28S de *Euglena* sugiere que estos organismos tienen una posición evolutiva cercana al origen de los eucariontes.Sin embargo,el ARNr 16S es anormalmente largo,siendo 1.3 veces mayor que el de las especies más evolucionadas.Estas anomalías en las longitudes de los ácidos ribonucleicos de los euglénidos pueden ser interpretadas como que estos organismos divergieron tempranamente de la "línea evolutiva principal" de los eucariontes antes de que las moléculas encargadas de la traducción llegaran a su estado óptimo de funcionamiento y por lo tanto de estabilidad(Carlin,1980).

O. Kinetoplastida

a).-Se les relaciona con Euglenida por los anteriores argumentos, pero a diferencia de lo postulado por Kivic y Walne en 1984, se ha considerado que los Kinetoplastida pudieron haber derivado de los euglénidos por pérdida de los cloroplastos (Taylor, 1976).

O. Amoebida

a).-La poca homología encontrada en la secuenciación de los ARNr 5S en varios organismos de este Orden (con respecto a ellos mismos), comparada con la gran homología que existe entre los organismos del Reino Animalia, sugiere que este Orden se separó tempranamente de la "línea evolutiva principal" de los eucariontes (Luehrsen y col., 1982).

b).-Por algunas peculiaridades de la estructura del núcleo celular interfásico (Wise y Goldstein, 1972), así como en las fases del ciclo celular (Makhlin, 1979), pueden ser organismos con una historia evolutiva antigua.

c).-Por su poca complejidad estructural son colocados en la base del "árbol evolutivo" de los eucariontes (Cavalier-Smith, 1978; Nanney, 1980; Margulis, 1981 y McQuade, 1983); como "protoalgas" fotosintéticas ameboides sin flagelos (Cavalier-Smith, 1978); al inicio de una secuencia que va desde los organismos ameboides → ameboflagelados → ameboflagelados sexuales → organismos que adquirieron cloroplastos vía simbiosis con procariontes fotosintéticos (McQuade, 1983); la secuencia ameboides + undulipodia + mitocondria + cloroplasto, adquirido por asociaciones simbióticas, y en este orden, es establecida por Margulis (Margulis, 1981).

d).-Por otra parte, los organismos ameboides son considerados "líneas evolutivas" muertas que no pudieron haber dado lugar a los Phyla de metazoarios (Hanson, 1976).

O. Dinoflagellida

a).-La presencia natural de una quinta base en el ADN, el 5-hidroximetiluracilo, puede sugerir una cierta primitividad en este grupo (Galleron, 1984).

b).-Los dinoflagelados presentan caracteres ancestrales comunes con los procariontes, sin embargo se encuentran sobre el nivel de los procariontes en términos de organización; pero por debajo de los demás eucariontes. Esto apoya la hipótesis de Loeblich formulada en 1976 y que establece que la evolución de los dinoflagelados es independiente de la de los demás eucariontes, por lo que algunos autores los denominan mesocariontes (Herzog y col., 1984).

- c).-El descubrimiento de que algunos taxa de Dinoflagellida considerados primitivos presentan una gran complejidad estructural en el núcleo, permite cuestionar el carácter de eucariontes "inferiores" y revalorizar su estado evolutivo (Soyer, 1981).
- d).-Los vínculos estrechos propuestos entre los procariontes y los dinoflagelados no son apoyados por la ultraestructura nuclear, por lo que se puede afirmar que son eucariontes verdaderos (Spector y Triemer, 1981).
- e).-Por varios hechos, entre los que se destaca un huso mitótico cuyos microtúbulos permanecen en el exterior de la membrana nuclear, así como por presentar una membrana nuclear y nucleolo que permanecen íntegros en el curso de la división celular, se sugiere que los dinoflagelados se encuentran en una posición basal de la "línea evolutiva principal" de los eucariontes (Stewart y Mattox, 1980).
- f).-Se separaron tempranamente de la "rama evolutiva" de Haptophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta, Eustigmatophyta, Chrysophyta y Phaeophyta (Taylor, 1976; Nanney, 1980).
- g).-El hecho de que algunos dinoflagelados tengan varillas paraflagelares sugiere una relación filogenética estrecha con Euglenida (Kivic y Walne, 1984); además de las ya mencionadas en el inciso "c" del Orden Euglenida (Taylor, 1980).
- h).-Ha sido propuesto que el origen de los Phyla Cnidaria y Ctenophora se debió a la subdivisión de grandes dinoflagelados depredadores no fotosintéticos y multinucleados como *Polykrikos* (Cavalier-Smith, 1978).
- i).-Corliss en 1975 y Taylor en 1978, han sugerido relaciones filogenéticas estrechas entre los dinoflagelados y los ciliados por la similitud que existe entre la corteza de Ciliophora y las estructuras alveolares de Dinoflagellida, ambos tienen crestas mitocondriales tubulares, además de que la fisión oblicua de Dinoflagellida es similar a la poco usual fisión transversal de Ciliophora; sin embargo, no existen evidencias de similitud en la estructura nuclear, aunque ambos contienen una gran cantidad de ADN por célula (Taylor, 1980).
- j).-Han sido colocados en el Reino Corticoflagellata junto con los esporozoarios, metamonadidos, opalínidos, ciliados, mesozoarios y con los eumetazoarios, basándose en características tales como su sistema de microtúbulos corticales altamente desarrollado, su modo fagocitario de nutrición, una fuerte tendencia a desarrollar estructuras corticales repetitivas, además de núcleos múltiples y carencia de mastigonemas tubulares

(Cavalier-Smith, 1978).

Phylum Ciliophora.

a).-Se ha propuesto que los ciliados dieron origen a los organismos multicelulares bilaterales. Para establecer lo anterior, se ha tomado en cuenta la presencia de estructuras tales como su aparato de ingestión permanente; el hecho de ser depredadores activos; su gran tamaño; poseer una gran complejidad estructural, además de su tendencia hacia la polaridad celular (Hanson, 1976; 1977).

b).-Se ha sugerido que el incremento de tamaño y la gran complejidad de los ciliados son el primer paso hacia la multicelularidad, seguido por la compartimentalización; sin embargo, la secuenciación del citocromo c, los estudios hechos sobre la histona H4 (que es la más conservativa a través de la evolución) y sus peculiares características nucleares, sugieren que fueron de los primeros eucariontes en separarse de los demás después solamente de los amébios, los oomicetos y las rodofitas y casi simultáneamente de los dinoflagelados (Nanney, 1980).

c).-Ciertas características de los mesozoarios sugieren una relación filogenética estrecha con los ciliados, estas son: abundancia de cilios en todos los estadios del ciclo de vida; un macronúcleo en la célula axial de los organismos adultos similar al de los ciliados; ciclo de vida simple; porcentaje de G+C (guanina-citosina) del ARNr del 40%, similar a los valores encontrados en *Tetrahymena* y muy diferentes a los valores encontrados en los demás eucariontes; porcentaje de G+C del ADN del 23%, similar a los valores encontrados en *Tetrahymena* y *Paramecium* y muy diferente a los valores de los protistas flagelados y de los eucariontes pluricelulares (Lapan y Morowitz, 1972).

d).-Las propiedades antigénicas de la tubulina de los cilios son similares a las de los flagelos de Dinoflagellida y de Cryptomonadida (Acloutte y col., 1984); además de las relaciones filogenéticas propuestas en los incisos "i" y "j" del Orden Dinoflagellida.

e).-Muchos autores siguen considerando a los taxa incluidos en el Phylum Ciliophora como pertenecientes a una unidad taxonómica y filogenética natural (Raikov, 1976; Nanney, 1980; Bardele, 1981; Small y Linn, 1981), excepto Corliss (Corliss, 1984), quien excluye el género *Stephanopogon*, perteneciente a los Gymnostomatida, y lo eleva a nivel de Phylum Pseudociliata. Esto contrasta notablemente con la tendencia creciente de considerar al Phylum Sarcocystophora como un agrupamiento heterogéneo

y polifilético y por lo tanto artificial (Leedale, 1974; Cavalier-Smith, 1981; Margulis y Schwartz, 1982; Kivic y Walne, 1983; Corliss, 1984). Lo anterior puede apreciarse al ver la diversidad de puntos de vista en cuanto a las relaciones filogenéticas de los diferentes taxa de este Phylum. f).-En los ciliados existe una relativa homogeneidad de los puntos de vista en cuanto a la posición evolutiva que ocupan los taxa trabajados. Corliss en 1961, Jankowski en 1973, Hanson, 1977 y Bardele en 1981, proponen que Gymnostomatida, en donde se ubica a los organismos de Cyrtophorina, se encuentran en la base del "árbol" filogenético de los ciliados; estos Gymnostomatida dieron origen, entre otros a los Hymenostomatida, de los que se sugiere partieron los Peritrichida (Hanson, 1977; Bardele, 1981).

g).-Las primeras desviaciones con respecto al código genético universal, si se exceptúan las encontradas en el genoma de las mitocondrias, son las encontradas para los genes del macronúcleo de los ciliados que codifican para proteínas corticales. Las secuencias codificadoras de estos genes contienen los tripletes TAA y TAG, los cuales universalmente son utilizados para la terminación de mensajes, en este caso éstos codifican para aminoácidos, probablemente la glutamina o el ácido glutámico. Los tripletes que normalmente codifican para la glutamina son el CAA y el CAG. El que sean los ciliados los únicos eucariontes que presentan desviaciones al código genético, pone de relieve el aislamiento filogenético propuesto para este grupo con base en otros caracteres (Caron y Meyer, 1985; Preer y col., 1985).

II.-OBJETIVOS.

Tomando como base el estudio de la ultraestructura general del núcleo celular interfásico del grupo de los mamíferos placentarios, grupo considerado esencialmente monofilético (Kielan-Jaworowska, 1980), se propusieron como metas para este estudio los siguientes puntos:

- a).-El análisis cualitativo comparativo de la ultraestructura general del núcleo celular interfásico en organismos pertenecientes a taxa de dos Phyla de protistas que presentan el mayor potencial evolutivo (definido como la diversidad de hábitats que ocupan, número de especies y proximidad filogenética con los ancestros de los organismos de los Reinos más complejos), dichos taxa son: el Phylum Sarcomastigophora y el Phylum Ciliophora, según la sistemática propuesta por Levine y col., en 1980 (Levine y col., 1980).
- b).-Caracterizar morfológicamente a las partículas ribonucleoproteicas intranucleares y tratar de determinar, si es posible, la génesis y el trayecto evolutivo de estas partículas en los taxa mencionados.
- c).-Determinar si existe alguna correlación entre el grado de homogeneidad o heterogeneidad ultraestructural y el carácter de polifiletismo generalmente atribuido a algunos taxa del Reino Protista, principalmente al Phylum Sarcomastigophora (Leedale, 1974; Cavalier-Smith, 1981; Kivic y Walne, 1983 y Corliss, 1984). Es decir, ver la utilidad que puede tener la ultraestructura del núcleo interfásico como indicador de relaciones evolutivas. Hay que señalar que la estructura del núcleo celular en división ya ha sido utilizada por Heath en 1980 para el establecimiento de relaciones filogenéticas en los protistas (Margulis, 1981). También se ha utilizado con estos propósitos algunas características del macronúcleo de los ciliados: su desarrollo o formación; cantidad de ADN que contiene y la forma en que se lleva a cabo la duplicación diferencial de algunos fragmentos del genoma (Raikov, 1976). Sin embargo, este es el primer trabajo en que se utiliza la ultraestructura del núcleo celular interfásico para la reconstrucción de la filogenia de los protistas.

III.-MATERIAL Y METODO.

Se eligieron para su estudio varios taxa de dos Phyla del Reino Protista que se considera presentan el mayor potencial evolutivo. Estos son, según la clasificación de Levine (Levine y col., 1980), los siguientes:

Phylum Sarcomastigophora	
Orden Cryptomonadida	<i>Cryptomonas</i> sp.
Orden Euglenida	<i>Euglena variabilis</i>
Orden Kinetoplastida	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Orden Amoebida	<i>Entamoeba invadens</i>
Orden Dinoflagellida	*

Phylum Ciliophora	
Orden Cyrtophorida	Sub.O. Chlamyodontina
Orden Hymenostomatida	<i>Paramecium</i> sp.
Orden Peritrichida	<i>Vorticella</i> sp.

Las cepas de los organismos de los Ordenes Kinetoplastida y Amoebida fueron proporcionadas por el Dr. Mario Castañeda Morales del Laboratorio de Biología del Desarrollo, I.I.B.M., U.N.A.M. y por el Dr. Angel Arroyo Begovich del Instituto de Investigaciones en Fisiología Celular, U.N.A.M., respectivamente. Los organismos del Orden Dinoflagellida fueron proporcionados por el M. en C. Luis Felipe Jiménez García, del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Fac. Ciencias, U.N.A.M.. Estos últimos habían sido encontrados como endosimbiontes en el endodermo de anémonas recolectadas en Isla Sacrificios, Ver.. Para los demás organismos se realizaron cultivos preferenciales no axénicos, agregando una muestra de agua del Lago de Chapultepec a extractos de lechuga, arroz, lentejas y paja; los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (Tabla 1).

El procesamiento de los organismos para su utilización en microscopía electrónica, consistió en añadir 0.4ml de glutaraldehído (al 70%) a 10ml del medio de cultivo, para llegar a una concentración final del agente fijador del 2.5%. Transcurridos 15min el material fue centrifugado, en una centrífuga DYNAC modelo 0065, a una velocidad promedio de 2000 a 2300rpm, cuya equivalencia en fcr (fuerza centrífuga relativa), se encuentra comprendida en un rango que va de 900 a 1060. Una vez centrifugado el material, se desechó el sobrenadante, agregándose enseguida ovoalbúmina de huevo diluída al 50% en agua destilada como agente cementante. Posteriormente, para la fijación y sobre todo para que la ovoalbúmina polimerice y se facilite la manipulación del botón, se añadió glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodil.

*El estado confuso de la sistemática de los dinoflagelados endosimbiontes de cnidarios, impidió la determinación de estos organismos.

lato de sodio 0.19M, pH 7.2, y se esperó 1h, transcurrida la cual se desechó el fijador y se desprendió el botón.

Para la observación de las partículas ribonucleoproteicas, el material biológico fue deshidratado en una serie gradual de alcoholes etílicos. Como agente intermediario se utilizó óxido de propileno. Finalmente la inclusión se llevó a cabo en resina epóxica, la cual polimerizó manteniéndose dentro de una estufa a 60°C durante 24hrs.

Por otra parte, para la observación en microscopía electrónica de la disposición de la cromatina, los botones biológicos fueron también deshidratados, pero en este caso el agente deshidratante utilizado, también en series graduales, fue el glicolmetacrilato (GMA). La inclusión del material biológico se realizó también en la misma sustancia, y la polimerización de la misma se efectuó bajo una lámpara de luz ultravioleta durante 24hrs.

Previamente a las observaciones en microscopía electrónica se realizó una prospección del material en microscopía fotónica, para lo cual se obtuvieron cortes de 190 a 240nm, en un ultramicrotomo Sorvall MT-2, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina disuelto en bórax al 1%.

Para microscopía electrónica, se obtuvieron cortes ultrafinos de un grosor de 60 a 90nm. Estos cortes fueron montados en rejillas de cobre cubiertas de una membrana electrotransparente, de formvar.

En algunos taxa la disposición de la cromatina pudo apreciarse con microscopio fotónico. En este caso fue utilizada la tinción específica de Feulgen para cortes de resina epóxica de un grosor de .5 a 1.5µ. Dichos cortes se hidrataron con una serie gradual de concentración decreciente de alcoholes etílicos. Posteriormente, fueron sometidos a hidrólisis durante 1h en HCl 5N. Después de esto, permanecieron 1/2h en el reactivo de Schiff y finalmente fueron sometidos a tres baños sulfurosos de 1min cada uno.

Para la observación de la ultraestructura general del núcleo, los cortes de los organismos incluidos en resina epóxica se contrastaron con acetato de uranilo del 3 al 5% (10min) y con citrato de plomo al .3% (durante 5min).

Para apreciar la disposición fina de la cromatina, se utilizó la técnica de contrastación preferencial para microscopía electrónica (ácido fosfotúngstico al 3% en HCl 1N a pH 2.3), para cortes en glicolmetacrilato (Vázquez-Nin y col., 1973).

Las partículas ribonucleoproteicas fueron puestas en evidencia, en microscopía electrónica, utilizando la técnica de contrastación regresiva preferencial, la cual emplea como contrastantes el acetato de uranilo del 3 al 5% (de 2 a 3min), el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 14.8% pH 7 a

7.2(18 a 60min)y finalmente el citrato de plomo al .3%(lmin)(Bernhard, 1969).Después del contacto con cualquiera de los agentes contrastantes, los cortes fueron ejuagados con agua bidestilada;todo ello en cajas de Petri con una atmósfera saturada de humedad,para evitar la evaporación de las soluciones contrastantes,y con lentes de hidróxido de sodio para eliminar el dióxido de carbono y evitar que reaccione con el citrato de plomo.

Para el análisis cualitativo y morfométrico de las diversas estructuras, se obtuvieron micrografías electrónicas en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss M-9,con un incremento final de 8,000 a 56,000 aumentos.

Para el análisis estadístico del diámetro de los gránulos pericromatianos se utilizó el análisis de varianza.

IV.-RESULTADOS.

En el estudio del núcleo celular interfásico de algunos taxa del Reino Protista, la característica más sobresaliente es la gran diversidad que presentan en cuanto a su ultraestructura general. Asimismo, la ultraestructura nuclear de los taxa revisados, a excepción de los Ordenes Cryptomonadida y Kinetoplastida, difiere grandemente del patrón ultraestructural común para todos los Phyla de animales estudiados. Las principales diferencias encontradas con respecto a la ultraestructura del núcleo de los animales son:

Cromatina:

(Ver tablas 2 y 3).

- a).-No existe ni cromatina perinucleolar, ni cromatina adyacente a la membrana nuclear (a excepción de los Ordenes Cryptomonadida y Kinetoplastida).
- b).-En los Ordenes Dinoflagellida y Euglenida, la mayor parte de la cromatina se encuentra condensada en los cromosomas interfásicos. Además, en el núcleo del Orden Euglenida existe una red fibrillogranular cromatínica.
- c).-En el Orden Amoebida no existe cromatina condensada (heterocromatina).
- d).-La cromatina transcripcionalmente activa de los ciliados, la que se encuentra en el macronúcleo, se encuentra condensada en cuerpos esféricos.

Estructuras ribonucleoproteicas:

(Ver tabla 4).

- a).-En el nucleolo de los protistas, los componentes fibrilares y granulares se encuentran tan íntimamente entrelazados que no es posible visualizar zonas en donde predomine alguno de estos constituyentes (a excepción del nucleolo del Orden Peritrichida). Todos los nucleolos carecen de la estructura nucleolonemal (ver tabla 5). Ambas características las comparten con el nucleolo de los animales invertebrados, pero no así con el de los animales vertebrados (Jiménez-García, 1985).
- b).-Los gránulos pericromatinianos encontrados tienen un diámetro menor que el de los animales (a excepción de los del Orden Cryptomonadida) (ver tabla 6). Además, existen diferencias estadísticamente significativas para el diámetro de los gránulos pericromatinianos entre los diferentes taxa estudiados (ver tablas 7 y 8 e histograma 1).
- c).-Las fibras pericromatinianas se encuentran en la mayoría de los taxa trabajados. Una excepción la podrían constituir los Ordenes Dinoflagellida, Euglenida y Amoebida, ya que las características estructurales de la cromatina transcripcionalmente activa de estos grupos (Sigeo, 1984 y Magnaval y col., 1979), impide visualizar, con la técnica de contrastación de Bernhard la existencia de estas estructuras.

- d).-Carecen de los gránulos intercromatinianos típicos,característicos del núcleo de los animales vertebrados(una posible excepción parecería constituir la el Orden Cryptomonadida).
- e).-Existen en la mayoría de los taxa fibras intercromatinianas,la excepción a esto la constituyen los Ordenes Hymenostomatida y Peritrichida, en los cuales el nucleoplasma contiene muy pocas estructuras electrodensas.
- f).-No se encontraron ni cuerpos espiralados ni cuerpos nucleares.Estas estructuras,hay que remarcarlo,se han observado solamente en células de mamíferos (en determinado tipo de células los CE,y en determinado estado metabólico los CN).

Por último,el tiempo óptimo de empleo de los diferentes contrastantes(sobre todo el del EDTA) varía mucho con respecto al grupo trabajado(ver tabla?).Asimismo,el tiempo de contrastación óptimo para el EDTA es bastante mayor al promedio utilizado para el caso de los animales.

A continuación se describen con más detalle las características ultraestructurales más sobresalientes de cada uno de los taxa trabajados:

Phylum Sarcostigophora.

Orden Cryptomonadida.

Nucleolo grande,central,único,de estructura homogénea(sin zonas en donde predomine alguno de los constituyentes fibrilogramulares ,presenta zonas claras u homogéneas en donde los constituyentes fibrilogramulares son escasos,sin cromatina perinucleolar.Los gránulos pericromatinianos de este Orden son los de mayor tamaño entre los taxa de protistas trabajados:425±57Å.Existen fibras pericromatinianas y fibras intercromatinianas.Por otra parte,presentan estructuras similares a los gránulos intercromatinianos.No presentan ni cuerpos espiralados ni cuerpos nucleares.En cuanto a la cromatina,ésta se encuentra homogéneamente distribuída en el núcleo;no existe cromatina perinucleolar,pero sí cromatina adyacente a la membrana nuclear.La ultraestructura general del núcleo de estos organismos,junto con los del Orden Kinetoplastida,es la más similar a la de los animales y plantas(Figura 1).

Orden Dinoflagellida.

Nucleolo único,excéntrico(colocado en la periferia del núcleo),sin segregación de sus componentes fibrilogramulares,sin cromatina perinucleolar.El diámetro de los gránulos pericromatinianos de este Orden es el menor para los protistas estudiados:130±27Å.Las fibras pericromatinianas no se pueden apreciar con la técnica de contrastación regresiva para las partículas ribonucleoproteicas,ya que al parecer la cromatina transcripcionalmente activa no se encuentra en los cromosomas interfásicos(Sigee,1984).Existen fibras intercromatinianas.No existen las

demás estructuras ribonucleoproteicas características del núcleo de los mamíferos: gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares. La cromatina se encuentra condensada en cromosomas bandeados en el período interfásico; tales cromosomas se encuentran circunscritos por una envoltura de naturaleza desconocida (Figura 2).

Orden Euglenida.

Nucleolo único, central, grande, sin separación (o segregación) de sus constituyentes fibrilogramulares, sin cromatina perinucleolar. El diámetro de los gránulos pericromatinianos es de: $159 \pm 26 \text{ \AA}$. Con la técnica de contrastación de Bernhard es difícil poner en evidencia la existencia de las fibras pericromatinianas, ya que al parecer la cromatina transcripcionalmente activa no se encuentra ubicada en los cromosomas interfásicos (Magnaval y col., 1979). Se encontraron fibras intercromatinianas. No se encontraron ni cuerpos espiralados ni cuerpos nucleares; pero se encontraron otras estructuras ribonucleoproteicas al parecer exclusivas de estos eucariontes; unos gránulos con un diámetro de $880 \pm 180 \text{ \AA}$ y fibras en forma de U de $617 \pm 151 \text{ \AA}$ (desde la base hasta los extremos de la U). La mayor parte de la cromatina se encuentra condensada en los cromosomas interfásicos, los cuales difieren de los de Dinoflagellida en que no se encuentran bandeados y de que no presentan la envoltura de naturaleza desconocida que los circunscribe. Además existe una red fibrilogramular positiva al PTA, cuyos gránulos tienen un diámetro promedio de $547 \pm 149 \text{ \AA}$. No existe ni la cromatina perinucleolar ni la cromatina adyacente a la membrana nuclear (Figura 3).

Orden Kinetoplastida.

Nucleolo único, central, ocupa gran parte del volumen nuclear, homogéneo en estructura, con cromatina perinucleolar. Los gránulos pericromatinianos tienen un diámetro de $263 \pm 41 \text{ \AA}$. Existen fibras pericromatinianas y fibras intercromatinianas. No se encuentran los gránulos intercromatinianos, los cuerpos espiralados y los cuerpos nucleares. La cromatina se encuentra homogéneamente distribuida en el área nuclear; existe cromatina perinucleolar y cromatina adyacente a la membrana nuclear (Figura 4).

Orden Amoebida.

Los nucleolos, múltiples, en este Orden ocupan una posición atípica para los eucariontes; se encuentran adyacentes a la membrana nuclear, formando una lámina casi continua; presentan una ligera segregación de sus componentes fibrilogramulares; los componentes granulares de los nucleolos tienen un diámetro de 199 \AA . Los gránulos pericromatinianos tienen un diámetro de $278 \pm 42 \text{ \AA}$. Con la técnica de contrastación empleada no es posible apreciar la existencia de las fibras pericromatinianas (aunque éstas estructuras se encuentran en la periferia de la cromatina).

tina condensada), debido a que la cromatina se encuentra totalmente descondensada. Existen fibras ribonucleoproteicas distribuidas por todo el nucleoplasma. No existen gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares. Se encontraron unas vesículas en el nucleoplasma de naturaleza desconocida que no presentan conexión con el citoplasma. La cromatina en este grupo se encuentra en forma eucromatínica (Figura 5).

Phylum Ciliophora.

En este Phylum se estudió solamente el macronúcleo, ya que es el que presenta la actividad transcripcional.

Orden Cyrtophorida.

El macronúcleo elipsoide se encuentra adyacente al micronúcleo, cubriéndolo parcialmente. Este macronúcleo presenta dos zonas claramente discernibles: la región periférica u ortómero, la cual contiene tanto a los cuerpos esféricos de cromatina como a los nucleolos; y la región central o parámero, desprovista de cuerpos electrodensos masivos y que contiene a gran parte de las estructuras ribonucleoproteicas. Los nucleolos, como se mencionó anteriormente, se encuentran en la región periférica, presentando una estructura principalmente granular, en algunas ocasiones, presentan zonas claras en donde no existen componentes fibrilogramulares. Los gránulos pericromatinianos tienen un diámetro promedio de $144 \pm 24 \text{ \AA}$. Existen fibras pericromatinianas y fibras intercromatinianas. No se encontraron gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares. Sin embargo, existen cúmulos de fibras ribonucleoproteicas en la región central o parámero, de $1126 \pm 160 \text{ \AA}$. La cromatina, situada en la región periférica, se encuentra concentrada en esferas muy electrodensas que resisten parcialmente la descontratación con el EDTA. Las esferas de cromatina tienen un diámetro promedio de $3532 \pm 194 \text{ \AA}$. Sin cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana nuclear (Figura 6).

Orden Hymenostomatida.

Existen numerosos nucleolos de estructura homogénea, algunas veces se encuentran ubicados preferentemente en la periferia del macronúcleo (adyacentes a la membrana macronuclear). Se encontraron unas estructuras esféricas granulares de naturaleza desconocida, probablemente proteica, asociadas generalmente a varios nucleolos; estas estructuras son medianamente electrodensas. Los gránulos pericromatinianos tienen un diámetro promedio de $182 \pm 37 \text{ \AA}$. Existen fibras pericromatinianas. No existen fibras intercromatinianas, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares. El nucleoplasma carece casi totalmente de estructuras electrodensas (a excepción de las fibras y gránulos pericromatinianos que se proyectan radialmente a partir de los cuerpos esféricos de cromatina). Los cuerpos esféri-

cos de cromatina tienen un diámetro promedio de $1520 \pm 520 \text{ \AA}$ y se encuentran homogéneamente distribuidos por todo el núcleo. No existe ni cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana del macronúcleo (Figura 7).

Orden Peritrichida.

El macronúcleo tiene forma cilíndrica y ocupa gran parte del volumen celular. Los nucleolos, a diferencia de los grupos mencionados, presentan sus componentes fibrilogramulares perfectamente separados, teniendo cada nucleolo varios organizadores nucleolares. Los gránulos pericromatinianos tienen un diámetro de $194 \pm 35 \text{ \AA}$. Sí existen fibras pericromatinianas. No se encontraron fibras intercromatinianas, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares. Al igual que el Orden Hymenostomatida, en el nucleoplasma hay una baja densidad de estructuras. La cromatina se encuentra concentrada en cuerpos esféricos de $3500 \pm 720 \text{ \AA}$ y se distribuye homogéneamente por todo el macronúcleo. No existe cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana nuclear (Figura 8).

Tabla 1. Se muestran los medios de cultivo utilizados para los taxa de protistas trabajados.

Grupo	Infusión de
Orden Cryptomonadida	Paja
Orden Euglenida	Lechuga, Arroz
Orden Cyrtophorida	Lenteja
Orden Hymenostomatida	Paja
Orden Peritrichida	Paja

Tabla 2. Se muestran las características más notables de la cromatina de los taxa del Phylum Ciliophora estudiados.

Taxa	Características de la cromatina
Phylum Ciliophora	
Orden Cyrtophorida	La cromatina del macronúcleo se encuentra solamente en la región periférica del mismo, u ortómero; se encuentra concentrada en cuerpos esféricos de un diámetro de $3532 \pm 194 \text{Å}$. No existe ni cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana nuclear.
Orden Hymenostomatida	La cromatina del macronúcleo se encuentra concentrada en cuerpos esféricos de un diámetro promedio de $1520 \pm 520 \text{Å}$, homogéneamente distribuidos. No existe ni cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana nuclear.
Orden Peritrichida	La cromatina del macronúcleo se encuentra en cuerpos esféricos de un diámetro promedio de $3500 \pm 820 \text{Å}$. No existe ni cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana nuclear.

Tabla 3. Se muestran las características más notables de la cromatina de los taxa del Phylum Sarcomastigophora estudiados.

Taxa	Características de la cromatina
Phylum Sarcomastigophora	
Orden Cryptomonadida	No existe cromatina perinucleolar. La cromatina se encuentra tanto adyacente a la membrana nuclear, como homogéneamente distribuída en el nucleoplasma.
Orden Dinoflagellida	La cromatina se encuentra concentrada en los cromosomas interfásicos bandeados; tales cromosomas están circunscritos por una envoltura de naturaleza desconocida. No existe ni cromatina perinucleolar ni cromatina adyacente a la membrana nuclear.
Orden Euglenida	La mayor parte de la cromatina se encuentra condensada en los cromosomas interfásicos. A diferencia de los del Orden anterior, estos cromosomas no están bandeados y carecen de una envoltura. Existe una red fibrillogranular positiva al PTA. Los gránulos de esta red tienen un diámetro promedio de $547 \pm 139 \text{Å}$.
Orden Kinetoplastida	Existe cromatina perinucleolar y cromatina adyacente a la membrana nuclear. La cromatina restante se encuentra homogéneamente distribuída en el nucleoplasma.
Orden Amoebida	Toda la cromatina se encuentra en forma completamente descondensada (eucromatina); es decir no existe heterocromatina.

Tabla 4. Se muestran las estructuras ribonucleoproteicas observadas en los taxa de protistas trabajados. n, significa el número de núcleos analizados; N, nucleolo; GPC, gránulos pericromatinianos; GIC, gránulos intercromatinianos; FPC, fibras pericromatinianas; FIC, fibras intercromatinianas; CE, cuerpos espiralados; CN, cuerpos nucleares; G, gránulos; U, fibras en forma de U; CFC, cuerpos fibrilares centrales; + o -, presencia o ausencia de las estructuras; i, gránulos pericromatinianos atípicos (carecen generalmente de halo); ¿?, estructuras de difícil apreciación con la técnica de contrastación para ribonucleoproteínas empleada.

Taxa	n	N	GPC (en Å)	GIC	FPC	FIC	CE	CN	Otros (en Å)
<i>Sarcomastigophora</i>									
Cryptomonadida	15	+	425	+	+	+	-	-	-
Dinoflagellida	22	+	130	-	¿?	+	-	-	-
Euglenida	11	+	159	-	¿?	+	-	-	G 880 ± 179
Kinetoplastida	12	+	263	-	+	+	-	-	U 617 ± 151
Amoebida	12	+	278	-	¿?	+	-	-	V
<i>Ciliophora</i>									
Cyrtophorida	18	+	144	-	+	+	-	-	CFC 1127 ± 160
Hymenostomatida	24	+	182 i	-	+	-	-	-	-
Peritrichida	16	+	194 i	-	+	-	-	-	-

Tabla 5. Se muestran algunas de las características nucleolares de los taxa de los Phyla Sarcomastigophora y Ciliophora.

Taxa	Características nucleolares
Phylum Sarcomastigophora	
Orden Cryptomonadida	Uno; central; sin segregación de sus componentes fibrilogramulares; con zonas homogéneas en donde son escasos los componentes fibrilogramulares.
Orden Dinoflagellida	Uno; excéntrico; sin segregación de sus componentes fibrilogramulares.
Orden Euglenida	Uno; central; sin segregación de sus componentes fibrilogramulares.
Orden Kinetoplastida	Uno; central; sin segregación de sus componentes fibrilogramulares; ocupa gran parte del volumen nuclear.
Orden Amoebida	Muchos; periféricos, adyacentes a la membrana nuclear, formando una lámina casi continua; segregación parcial de sus componentes.
Phylum Ciliophora	
Orden Cyrtophorida	Varios; situados en la región periférica del macronúcleo u ortómero; esféricos; segregación parcial de sus componentes; con zonas claras u homogéneas.
Orden Hymenostomatida	Varios; los mayores ocupan generalmente una posición periférica en el macronúcleo; sin segregación de sus componentes.
Orden Peritrichida	Varios; segregación notable de sus componentes fibrilogramulares, encontrándose los constituyentes fibrilares en la periferia de los numerosos organizadores nucleolares y los constituyentes granulares ocupando la mayor parte del área nucleolar.

Tabla 6. Se muestra la media y la desviación estándar para el diámetro de los gránulos pericromatinianos (sin halo), de los taxa estudiados.

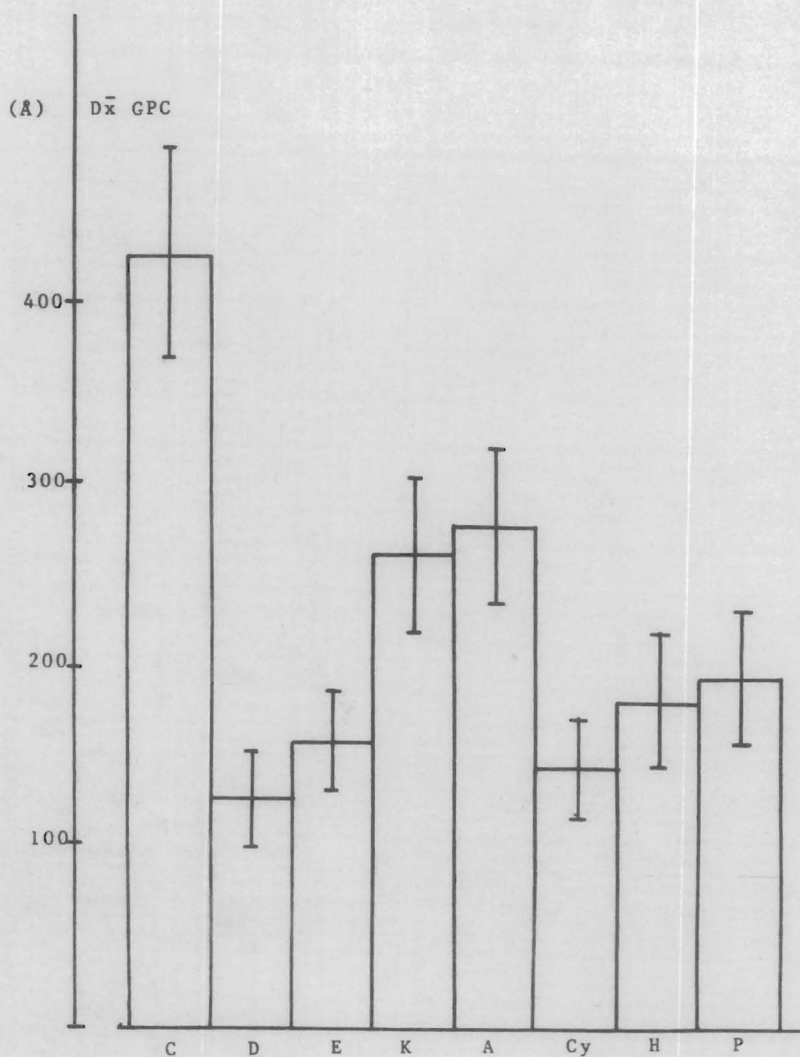
Taxa	n	\bar{X} (en Å)	Desviación estándar
Phylum Sarcomastigophora			
Orden Cryptomonadida	82	425	57.1
O. Dinoflagellida	25	130	26.9
O. Euglenida	69	159	25.9
O. Kinetoplastida	64	263	41.3
O. Amoebida	174	278	42.4
Phylum Ciliophora			
O. Cyrtophorida	61	144	23.6
O. Hymenostomatida	75	182	36.8
O. Peritrichida	148	194	35.0

Tabla 7. Se muestra el análisis de varianza para el diámetro de los gránulos pericromatianos (GPC), sin halo, de los taxa del Phylum Sarcostigophora. La presente tabla muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de varianzas
Entre los grupos	6290058.5	3	2096686.1	21.6 ⁺⁺⁺
Dentro de los grupos	7382013.7	76	97131.7	

Tabla 8. Se muestra el análisis de varianza para el diámetro de los gránulos pericromatinianos (GPC), sin halo, de los taxa del Phylum Ciliophora. La presente tabla muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de varianzas
Entre los grupos	1617731.6	2	806716	26.5 ⁺⁺⁺
Dentro de los grupos	1731324.6	57	30374.1	



Gráfica 1. Histograma que representa el diámetro promedio de los gránulos pericromatinianos de los diferentes taxa trabajados. C, Cryptomonada; D, Dinoflagellida; E, Euglenida; K, Kinetoplastida; A, Amoebida; Cy, Cyrtophorida; H, Hymenostomatida; P, Peritrichida.

Tabla 9. Se muestra el tiempo de contrastación para cada una de las soluciones contrastantes, con el fin de hacer resaltar al máximo las estructuras ribonucleoproteicas.

Taxa	Acetato de uranilo (min)	EDTA (min)	Citrato de plomo (min)
Phylum			
Sarcomastigophora			
Orden			
Cryptomonadida	2	45-60	1
Dinoflagellida	3	10-18	2
Euglenida	3	18	2
Kinetoplastida	2	25	1
Amoebida	2	25-45	1
Phylum Ciliophora			
Orden			
Cyrtophorida	2	45-60	1
Hymenostomatida	2	45-60	1
Peritrichida	3	35-45	2

Tabla 10. Se muestran las jerarquías taxonómicas que tienen los grupos de protistas trabajados en las sistemáticas de Kudo y col., 1964(a), y de Levine y col., 1980(b).

Phylum	Subphylum	Superclase	Clase	Subclase	Orden
(a) Protozoa	Sarcomastigophora	Mastigophora	Phytomastigophorea		Cryptomonadida Dinoflagellida Euglenida
			Zoomastigophorea		Kinetoplastida
		Sarcodina	Rhizopodea	Lobosia	Amoebida
	Ciliophora		Ciliatea	Holotrichia	Gymnostomatida Hymenostomatida
				Peritrichia	Peritrichida
(b) Sarcomastigophora	Mastigophora		Phytomastigophorea		Cryptomonadida Dinoflagellida Euglenida
			Zoomastigophorea		Kinetoplastida
	Sarcodina	Rhizopoda	Lobosea		Amoebida
Ciliophora			Kinetofragminophorea	Hypostomatia	Cyrtophorida
			Oligohymenophorea	Hymenostomatia	Hymenostomatida
				Peritrichia	Peritrichida

Tabla 11. Se muestran las jerarquías taxonómicas que tienen los grupos de protistas trabajados en las sistemáticas de Small y Lynn, 1981(a), Margulis y Schwartz, 1982(b), y Corliss, 1984(c).

Phylum	Subphylum	Clase	Subclase	Orden
(a) Ciliophora	Postciliodesmatophora			
	Rhabdophora			
	Cyrtophora	Phyllopharyngea	Phllopharyngia	Cyrtophorida
		Oligohymenophorea	Hymenostomia	Hymenostomatida
		Peritrichia	Peritrichida	
<hr/>				
(b) Dinoflagellata				
	Euglenophyta			
	Cryptophyta			
	Rhizopoda			
	Zoomastigina			
	Ciliophora			
<hr/>				
(c) Amoebozoa				
	Kinetoplastida			
	Euglenophyta			
	Cryptophyta			
	Syndinea			
	Ciliophora			
	Pseudociliata			

Figura 1. Núcleo celular interfásico de un criptomonadido (*Cryptomonas* sp.). Contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo; se muestra el nucleolo (N), la cromatina (C) y los gránulos pericromatinianos. Aproximadamente 19,360 X.

Figura 2. Núcleo celular interfásico de un dinoflagelado. Contrastado con PTA; se muestran los cromosomas interfásicos bandeados (C). Aproximadamente 27,060 X.

Figura 3. Núcleo celular interfásico de un euglénido (*Euglena variabilis*). Contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo; se muestra el nucleolo (N), los cromosomas interfásicos (C), los gránulos (G) y los gránulos pericromatinianos. Aproximadamente 21,120 X.

Figura 4. Núcleo celular interfásico de un kinetoplástido (*Trypanosoma cruzi*). Contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo; se muestra el nucleolo (N), la cromatina (C) y los gránulos pericromatinianos (GPC). Aproximadamente 48,400 X.

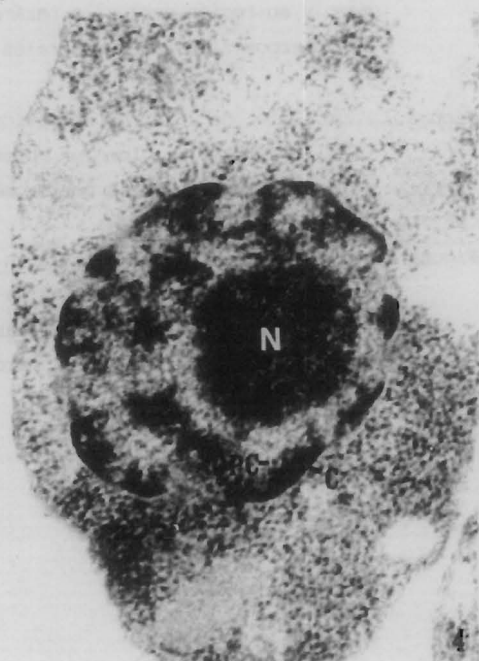
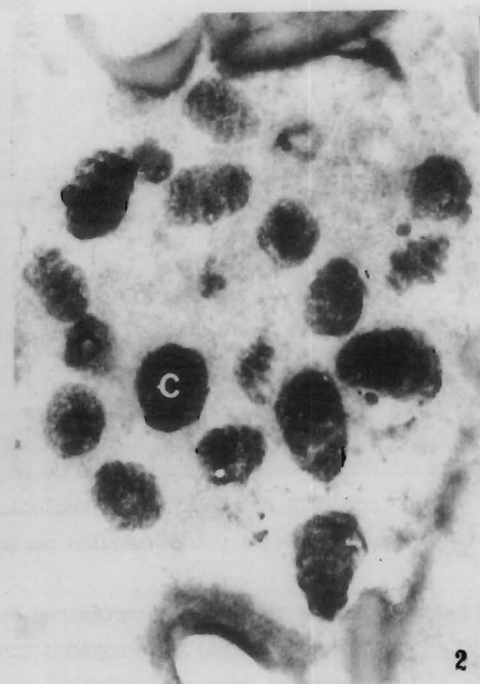
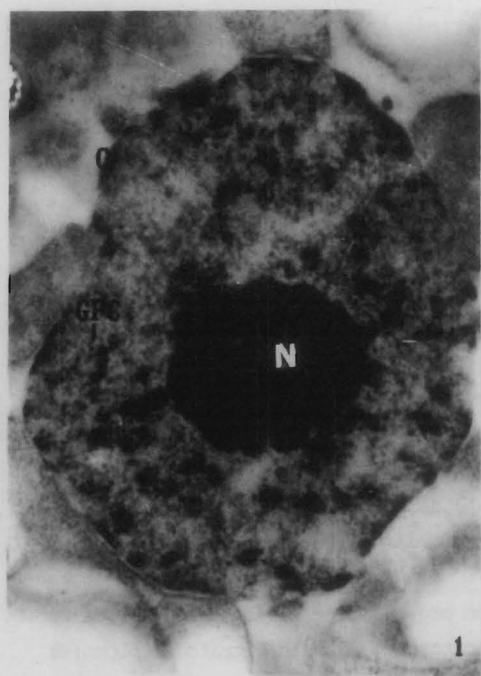


Figura 5. Núcleo celular interfásico de un amévido (*Entamoeba invadens*). Contrastado con EDTA; se muestran los nucleolos (N), la matriz ribonucleoproteica (M), las vesículas (V) y los gránulos pericromatinianos (GPC). Aproximadamente 24,640 X.

Figura 6. Núcleos celulares interfásicos de un organismo del Orden Cytrophorida (Sub.O. Chlamyodontina). Contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo; se muestra el micronúcleo (MN), el macronúcleo con su región periférica u ortómero y su región central o parámero (P), la cromatina del macronúcleo (C) y los cuerpos fibrilares centrales del parámero (CFC). Aproximadamente 14,080 X.

Figura 7. Macronúcleo de un himenostomatido (*Paramecium* sp.) Contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo; se muestran los nucleolos (N), la cromatina (C), las esferas (E) y las fibras pericromatinianas (FPC). Aproximadamente 19,360 X.

Figura 8. Núcleo celular interfásico de un peritriquido (*Vorticella* sp.). Contrastado con EDTA; se muestra la cromatina descontrastada (C), los nucleolos (N), los organizadores nucleolares (ON), las fibras pericromatinianas (FPC) y los gránulos pericromatinianos (GPC). Aproximadamente 15,840 X.

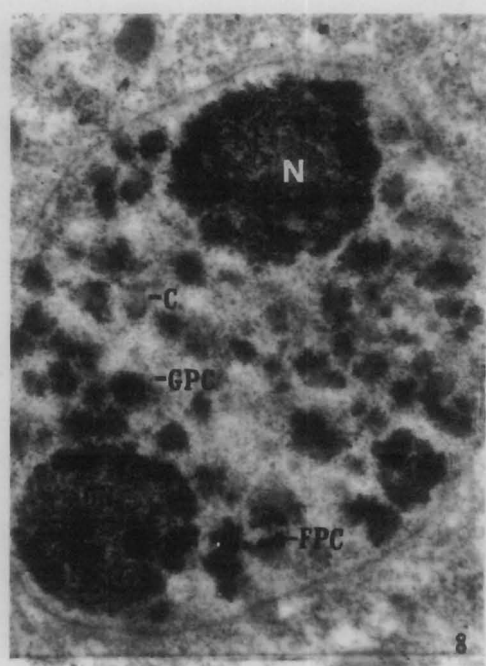
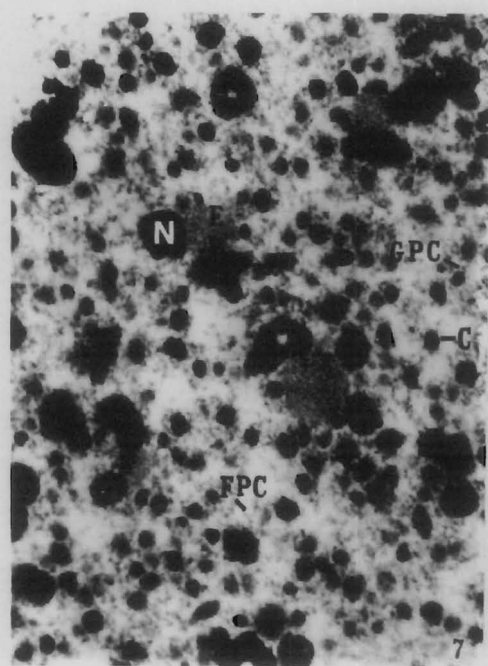
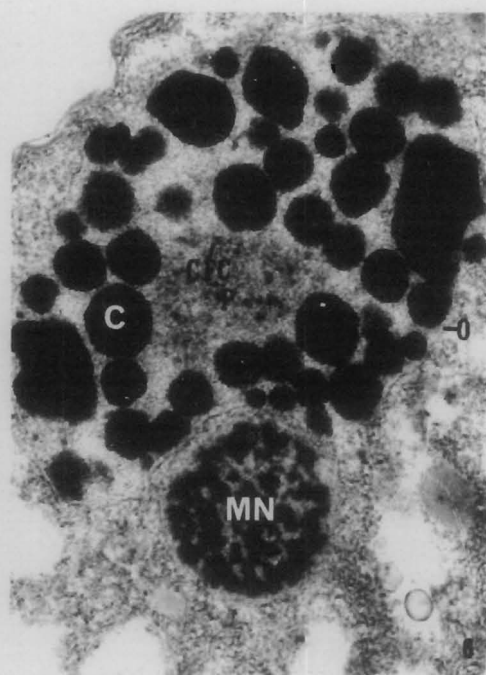
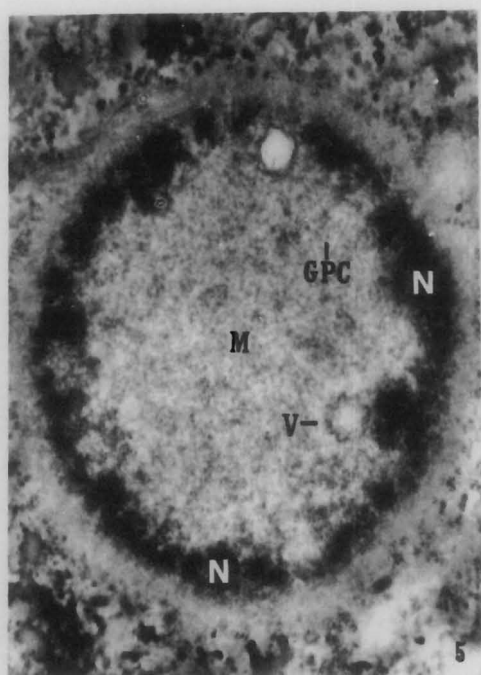
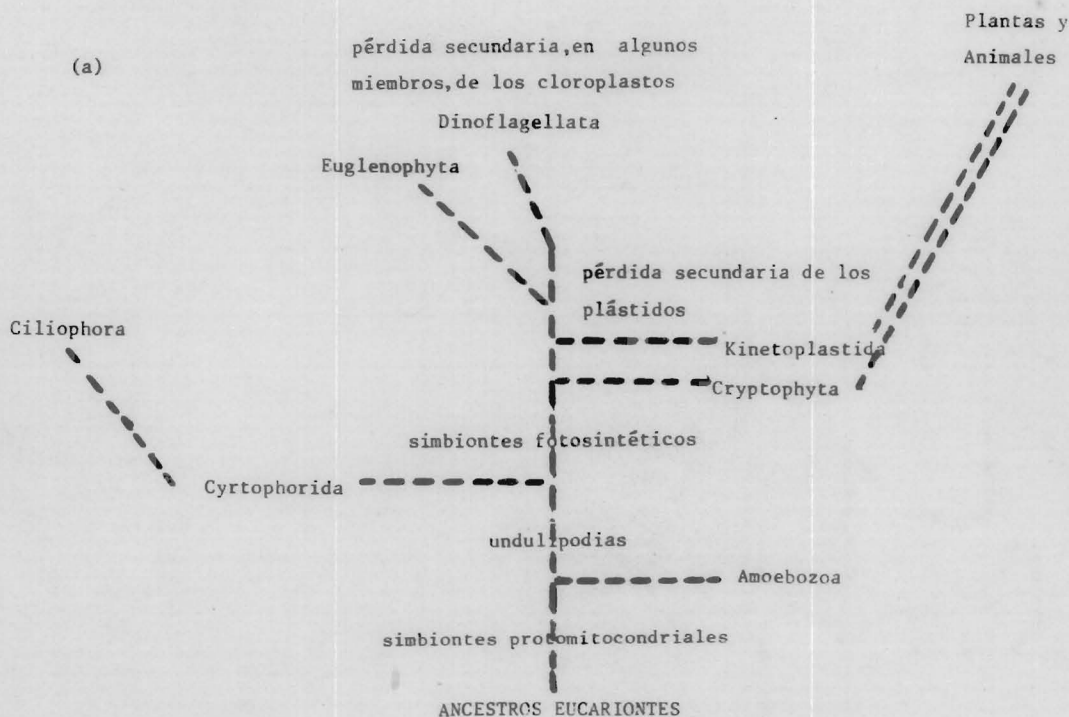


Figura 9. Se muestran las relaciones evolutivas hipotéticas (a) y la sistemática (b), propuesta para los grupos de protistas trabajados con base en la ultraestructura del núcleo celular interfásico.



(b)

Reino	Phylum
Protista	Amoebozoa
	Euglenophyta
	Kinetoplastida
	Cryptophyta
	Dinoflagellata
	Cyrtophorida
	Ciliophora
	Hymenostomatida
	Peritrichida

V.-DISCUSION.

Es necesario enfatizar que el estudio llevado a cabo de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares en diferentes taxa del Reino Protista fue realizado con una técnica de contrastación regresiva preferencial por lo que, los resultados obtenidos son de carácter morfológico. Para tener un panorama más claro de las funciones que se llevan a cabo en estas partículas es necesario complementar los estudios morfológicos con técnicas de autorradiografía, bioquímica e inmunocitoquímica, y además estudiar el núcleo de estos organismos en diferentes estados metabólicos.

La presencia del nucleolo en todos los taxa de protistas trabajados, confirma lo indispensable que puede ser esta estructura para la síntesis y procesamiento del ARNpre-r (la única excepción en los eucariontes la encontramos en *Pelomyxa palustris*, la cual no tiene nucleolo pero sí sintetiza ARNr). El que el nucleolo de los protistas, al igual que el de los animales invertebrados (Jiménez-García, 1985), carezca de las zonas o centros fibrilares y granulares, además de la estructura nucleolonemal característica de los nucleolos de los animales vertebrados, puede ser un indicador de diferencias cualitativas o cuantitativas en el procesamiento del ARNpre-r. La presencia en la mayoría de los taxa de protistas de las fibras y gránulos pericromatinianos, y extrapolando la información obtenida acerca de la función de estas partículas en los mamíferos, así como el hecho de que estas estructuras se encuentren también en plantas (López-Zamorano, en prensa) y animales (Jiménez-García 1985), sugiere que estas estructuras representan en los eucariontes el substrato morfológico en donde se almacena, transporta y procesa el ARNpre-m (Elizundia y col., 1985).

El hecho de que las fibras pericromatinianas no se hayan detectado en los Ordenes Dinoflagellida, Euglenida y Amoebida, puede deberse a las características muy peculiares de la estructura y función de su cromatina. En los dos primeros Ordenes, la cromatina transcripcionalmente activa se encuentra en forma totalmente descondensada y sin conexión con los cromosomas interfásicos, los cuales son transcripcionalmente inactivos (Sigee, 1984; Magnaval y col., 1979). En contraposición, la periferia de la cromatina condensada de los animales presenta una actividad transcripcional intensa; es en la región periférica de la cromatina condensada donde se encuentran las fibras pericromatinianas, las cuales contienen ARNpre-m de marcaje rápido (Nash y col., 1975). En el Orden Amoebida, la cromatina se encuentra en forma totalmente descondensada, por lo cual es imposible detectar con la técnica empleada, al igual que para los dos Ordenes anteriormente mencionados, las estructuras que contienen el ARNpre-m de marcaje rápido. Para sol-

ucionar este problema en los tres Ordenes, sería de gran utilidad el empleo de la técnica de autorradiografía de pulso breve.

La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros de los gránulos pericromatinianos de los diferentes taxa de protistas trabajados, comparada con la no existencia de tales diferencias en el diámetro de los GPC en los invertebrados (Jiménez-García, 1985); además de que el diámetro promedio de los GPC en los protistas sea bastante menor al de todos los animales estudiados, puede deberse a diferencia cualitativas o cuantitativas en el procesamiento del ARNpre-m (entre los taxa de protistas y de estos con respecto a los animales). Es interesante comparar la gran diferencia existente en el diámetro de los gránulos pericromatinianos de taxa con antigüedades evolutivas bastante separadas. Por ejemplo, compárese el diámetro de los gránulos pericromatinianos de los amébidos, que se cree se originaron casi simultáneamente con el inicio de la eucariogénesis, con el diámetro del de los dinoflagelados, que se originaron a finales del Paleozoico. O bien, compárese el diámetro de los gránulos pericromatinianos de los protistas con el de los animales. Con ésto, es probable que en el transcurso de la evolución hayan ocurrido cambios cuantitativos y/o cualitativos en el procesamiento postranscripcional del ARNpre-m. Por otra parte, el hecho de que los GPC de los Ordenes Hymenostomatida y Peritrichida generalmente no posean halo, puede deberse a la falta de contraste ocasionado por la escasez de estructuras electrodensas en el nucleoplasma.

Para el caso de los taxa que no presentan fibras intercromatinianas, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares, puede sugerirse que las rutas metabólicas en las que se encuentran involucrados estas estructuras o no existen y aparecieron tardíamente en el proceso evolutivo de los eucariontes, o bien las hay alternativas. Como las que se han encontrado en *Escherichia coli*, en donde en condiciones *in vitro* y sin contaminantes proteicos, se observó que una especie de ARN realizaba cortes enzimáticos a los precursores de las moléculas del ARNt de tirosina con la especificidad correcta. Es decir, una molécula de ARN ejecuta funciones enzimáticas que se creía que eran realizadas únicamente por las proteínas. Sin embargo, en condiciones *in vivo*, estas moléculas de ARN enzimático interactúan con un cofactor proteico para formar un complejo enzimático que presenta una mayor velocidad de reacción y un rango más amplio de substratos (Guerrier-Takada y Altman, 1984). Este podría ser el caso en los protistas trabajados en donde no se detectaron algunos de los complejos ribonucleoproteicos involucrados en el procesamiento postranscripcional del ARNpre-r. Es decir, que si en vez de que hubieran complejos ribonucleoproteicos se encontraran solamente complejos de ARN catalítico, lo más probable es de que la técnica de contrastación preferencial para ribo-

nucleoproteínas resultara ineficaz para ponerlos en evidencia. Apoyando esta suposición se encuentra el hecho de que Kruger y col. en 1982 encontraron un precursor del ARNr en *Tetrahymena* que podía llevar a cabo reacciones enzimáticas (Guerrier-Takada y Altman, 1984).

Las diferencias notables en cuanto al tiempo de utilización del EDTA para la descontratación de la cromatina, entre los taxa de protistas y de estos con respecto al de los animales, probablemente pueda correlacionarse con diferencias estructurales (grados de compactación) o con diferencias bioquímicas de las proteínas asociadas al ADN.

La forma de la disposición de cromatina condensada en los protistas difiere bastante de la encontrada en los animales; en los primeros, la heterocromatina tiende a formar cuerpos regulares, mientras que en los últimos ésta se dispone en cúmulos irregulares.

Este estudio considera que la ultraestructura del núcleo celular interfásico puede ser un indicador de relaciones filogenéticas entre los diferentes taxa del Reino Protista, ya que a pesar de ser una estructura altamente conservativa es suficientemente variable dentro de este grupo, en contraste de lo que sucede en los animales (Jiménez-García, 1985). Otras características por la que se le puede estudiar para dilucidar relaciones filogenéticas es su amplia distribución (está presente en todos los eucariontes) y además es lo suficientemente compleja (con lo cual se facilita la determinación de los grados de homología).

Sin embargo, es factible que se pueda obtener más provecho de la ultraestructura del núcleo celular interfásico para la determinación de relaciones filogenéticas, si en vez de circunscribirse al estudio morfológico comparativo en dos dimensiones, se estudiara tridimensionalmente, reconstruyéndolo por medio de cortes seriados. Esta suposición se basa en las evidencias proporcionadas por trabajos recientes, de la existencia de una especie de andamiaje nuclear o matriz nuclear de naturaleza compleja, una de cuyas funciones es proporcionar un mayor orden en la disposición de las diversas estructuras nucleares. Puede por lo tanto parecer lógico, en vista de la gran heterogeneidad ultraestructural encontrada entre los taxa de protistas, que un estudio tridimensional pueda determinar patrones arquitecturales característicos para cada grupo que sean susceptibles a análisis cuantitativos más detallados y por lo tanto, se puedan determinar más fácilmente los grados de homología entre grupos.

Algunos aspectos de la relaciones filogenéticas de los grupos trabajados que pueden discutirse con base en la ultraestructura comparada del núcleo son:

- a).-La gran heterogeneidad ultraestructural encontrada entre los taxa de protistas trabajados, sobre todo entre los grupos del Phylum Sarcomastigophora, contrasta notablemente con la homogeneidad que existe en el núcleo de diversos Phyla de animales (Jiménez-García, 1985) o de las plantas (López-Zamorano, en prensa), lo que puede correlacionarse con:
- I.-El carácter de polifiletismo propuesto por numerosos autores para el Reino Protista, y sobre todo para el Phylum Sarcomastigophora (Leedale, 1974; Whittaker y Margulis, 1978; Cavalier-Smith, 1978 y 1981; Margulis y Schwartz, 1982; Kivic y Walne, 1983 y Corliss, 1984) y en menor proporción para el Phylum Ciliophora (Corliss, 1984). Esto contrasta con lo afirmado por la sistemática más ampliamente aceptada para los "protozoarios", la cual considera que los Ordenes Cryptomonadida, Dinoflagellida, Euglenida, Kinetoplastida y Amoebida tienen un ancestro común (Levine, 1980).
- II.-Un mayor tiempo de evolución de los protistas [1,400 millones de años (Vidal, 1984)] contra los 700 millones de años para los invertebrados más antiguos (Barnes, 1977).
- III.-El factor unicelularidad o pluricelularidad puede afectar de una manera aún no determinada la variabilidad ultraestructural de los núcleos. Podría ser debido a que el medio extracelular de los organismos pluricelulares (a excepción de los estratos epidérmicos) sea más homogéneo, lo que no es así para un organismo unicelular que se enfrenta a condiciones medioambientales muy cambiantes y por lo tanto es factible que esto podrá provocar tasas de variabilidad mayores. Aunque no se puede descartar que sea la ultraestructura nuclear la que haya impedido o facilitado a algunos eucariontes su paso hacia la pluricelularidad.
- IV.-Se ha observado que el estado metabólico de los organismos altera cuantitativamente, más no cualitativamente la ultraestructura del núcleo celular interfásico (Vázquez-Nin y col., 1978; Echeverría y col., 1980; Jiménez-García, 1983). Es por lo tanto, difícil pensar que la gran heterogeneidad ultraestructural del núcleo entre los taxa de protistas pueda atribuirse solamente a diferencias de los estados metabólicos de los organismos. Además de que no sea éste el caso para la ultraestructura comparada del núcleo de los animales y las plantas (en donde se encuentra una gran homogeneidad ultraestructural del núcleo en todos los taxa de animales y plantas trabajados a pesar de los diferentes estados metabólicos en que se encontraban cuando fueron estudiados).
- b).-La ultraestructura del núcleo de los Ordenes Cryptomonadida y Kinetoplas

tida es la más similar a la de los eucariontes pluricelulares. Esto podría sugerir que estos Ordenes tengan una cercanía filogenética estrecha con el(o los) ancestro(s) de las plantas y animales. Con respecto a esta afirmación se podría objetar que los criptomonadidos divergieron bastante temprano de la "línea" evolutiva que va hacia las plantas, debido a las características de su juego de pigmentos fotosintéticos accesorios. Por ésto mismo (la presencia de cloroplastos) y por poseer flagelos con mastigonemas no se les ha asociado al origen de los animales. No obstante por la estructura de sus crestas mitocondriales, y por el tipo de huso mitótico que presentan, se les ha relacionado con Chlorophyta, Kinetoplastida, Plantae y Animalia. Además, la presencia de un surco de inserción flagelar, la carencia de pared celular y el hecho de que muchos de sus miembros sean fagótrofos, se han tomado como pruebas de que los criptomonadidos tuvieron un ancestro no fotosintético antes de la adquisición de los cloroplastos vía simbiosis.

Con respecto al Orden Kinetoplastida, no se le ha tenido en cuenta para explicar el origen de los Reinos más complejos debido a varios de sus caracteres citológicos como: la presencia del cinetoplasto; la varilla paraxial; flagelos con mastigonemas, y por ser la mayoría de sus miembros parásitos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la estructura de las crestas mitocondriales, el huso mitótico, y en el caso de los bodónidos (O. Kinetoplastida), su vida libre, los relacionan con los Reinos más complejos.

Las relaciones filogenéticas cercanas propuestas para los Ordenes Cryptomonadida y Dinoflagellida con base en que ambos poseen undulipodias (de diferentes tipos); paredes internas (de diferente composición); clorofila C_2 y por tener almidón como producto de reserva, no se correlaciona ni con la ultraestructura nuclear ni con respecto a la naturaleza de sus histonas, sus cloroplastos (estructura y complejo de pigmentos fotosintéticos carotenoides), la estructura de las crestas mitocondriales y a la estructura de los tricocistos. En el Orden Dinoflagellida no existe ni la cromatina perinucleolar ni la cromatina adyacente a la membrana nuclear; además, la heterocromatina se encuentra condensada en cromosomas interfásicos bandedados, los cuales están circunscritos por una envoltura de naturaleza desconocida. En el Orden Cryptomonadida los gránulos pericromatinianos son los de mayor diámetro entre los taxa trabajados (caen dentro del rango de los gránulos pericromatinianos de los animales); también se encontraron estructuras similares

a los gránulos intercromatinianos y la cromatina(al igual que en animales y plantas)se encuentra concentrada en cúmulos irregulares.

En cuanto a las relaciones filogenéticas sugeridas para Kinetoplastida y Euglenida(Acloutte y col.,1984;Corliss,1984) tampoco son apoyadas por la ultraestructura nuclear.La diferencia existente entre ambos grupos es que en el Orden Euglenida la mayor parte de la heterocromatina se encuentra en los cromosomas interfásicos no bandeados,además de que carecen de la envoltura característica de Dinoflagellida.Por otra parte, el Orden Euglenida posee dos tipos de partículas ribonucleoproteicas y uno cromatínico que no se encuentran en ninguno de los taxa trabajados. En contraposición,la heterocromatina en Kinetoplastida se encuentra en cúmulos irregulares y existen tanto la cromatina perinucleolar como la adyacente a la membrana nuclear.

- c).-La ultraestructura tan peculiar del Orden Euglenida{no solamente de *E.variabilis*,sino también de *E.gracilis*(Moyne y col.,1975)},corroborra su aislamiento filogenético,propuesto con base en otros caracteres,por lo que ha sido elevado a nivel de Phylum(Corliss,1984) e incluso a nivel de Reino(Cavalier-Smith,1978;1981).
- d).-Debido a que el Orden Amoebida no presenta cromatina condensada{no solamente *Entamoeba invadens* sino también en *Amoeba proteus*(Wise y Goldstein,1972),*A.discoides*,*A.amazonas* y *A.dubia*(Flickinger,1974)},y que los nucleolos múltiples ocupan una posición periférica en el núcleo(formando una lámina casi continua adyacente a la membrana nuclear;al menos en *E.invadens*,*A.proteus*,*A.discoides* y *A.amazonas*),características únicas para los eucariontes,se puede pensar que estas evidencias apoyan la hipótesis de que el grupo de los amebidos se separó tempranamente de la "línea evolutiva principal" de los eucariontes(Cavalier-Smith,1978;Nanney,1980;Margulis,1981 y McQuade,1983).
- e).-La ultraestructura del macronúcleo de los ciliados, en el que se llevan a cabo los procesos transcripcionales,es muy diferente a la de los núcleos de los demás eucariontes.Es por esto que parece muy improbable que los ciliados más evolucionados hayan dado lugar a organismos multicelulares(tal como lo expresa Hanson en 1977),constituyendo una excepción los mesozoarios,los cuales son multicelulares y se cree que derivaron de los ciliados más evolucionados(Lapan y Morowitz,1972).Se considera que los ciliados más evolucionados son aquellos cuyo macronúcleo es poliploide,y los menos evolucionados aquellos que son homocariontes: O.Primociliata,o que tienen macronúcleos diploides:O.Karyorelictida(Rai

kov,1976).A pesar de que los tres grupos de ciliados trabajados tienen en común la presencia de un micronúcleo(generativo) y de un macronúcleo (somático),existen muchas diferencias ultraestructurales en los macronúcleos de estos taxa,lo que podría sugerir una historia evolutiva antigua para los ciliados;es decir,dichos organismos se separaron tempranamente de la "línea evolutiva principal" de los eucariontes(Nanney,1980).

f).-Con base en la gran homogeneidad ultraestructural del núcleo celular interfásico de varios Phyla de invertebrados y taxa de vertebrados(Jiménez-García,1985) y de varios Phyla de plantas(López-Zamorano,en prensa),y en la gran heterogeneidad ultraestructural del mismo encontrada en los grupos de protistas trabajados,sugerimos que esto se correlaciona fuertemente con el origen polifilético(a nivel de Phyla) propuesto para el Reino Protista.Por lo tanto se propone,para ser congruentes con lo antes expuesto,que la sistemática de Levine y col. de 1980 para los "protozoarios" es obsoleta y es conveniente que se abandone como se hizo con la sistemática de Kudo y col. de 1964.La filogenia y sistemática que se piensa refleja lo más fielmente las enormes diferencias ultraestructurales del núcleo celular interfásico de los protistas trabajados se presenta en la figura 1a,b.Compárese ésta con las categorías taxonómicas de las sistemáticas de Kudo y col.,Levine y col.,y con las de Small y Lynn de 1981 para los ciliados,Margulis y Schwartz de 1982 y Corliss de 1984 para los protistas en general(tablas 10 y 11).

Este polifiletismo propuesto con base en la ultraestructura del núcleo celular interfásico se correlaciona con el propuesto con base en numerosos caracteres como:composición del complejo de pigmentos fotosintéticos y estructura de los cloroplastos; química de las reservas alimenticias;estructura de las crestas mitocondriales;aparato mitótico;sistema fotosensorial;estructura de los undulipodias,así como el sistema de microtúbulos asociado a ellos;composición de bases de los ácidos nucleicos;secuenciación de los ácidos ribonucleicos ribosomales;secuenciación de proteínas como las histonas y el citocromo c.El que algunos autores defiendan el monofiletismo de los protistas puede deberse a la impresión que da la morfología similar a *grosso modo* de un buen número de ellos(más o menos ovoidea);sin embargo,esto puede deberse al fenómeno de convergencia evolutiva producido por habitar un medio ambiente muy homogéneo y similar(el acuático).Esto sería como decir que los numerosos Phyla de invertebrados acuáticos vermiformes como los:Platyhelminthes,Nemertinea,Gastrotricha,Nematoda,Acanthocephala,Nemathomorpha,Gnathostomulida,Annelida,Pogonophora,Sipunculida y Hemichordata,son monofiléticos por tener una morfología superficialmente similar (vermiforme).

Con respecto a los ciliados,éstos también podrían representar otro caso de conver-

gencia evolutiva. Aunque desde hace mucho tiempo se ha considerado a los ciliados como básicamente monofiléticos, han surgido ciertas discrepancias en varias sistemáticas propuestas con respecto a la de Levine y col. de 1980. Por ejemplo, Levine y col. no consideran que existan categorías taxonómicas en el Phylum Ciliophora mayores que la de las Clases, por lo que los taxa de ciliados tienen una estrecha cercanía filogenética. Sin embargo, Small y Lynn en 1981 incluyen en su sistemática a tres Subphyla y Corliss en 1984 excluye al género *Stephanopogon* de los ciliados y lo coloca en un Phylum aparte, el Phylum Pseudociliata.

Como se revisó anteriormente, una de las tendencias evolutivas de los eucariontes es la del aumento de tamaño. Este aumento de tamaño se ha obtenido por dos vías diferentes. La de los ciliados mediante la obtención de estructuras que permitieran hábitos de depredación muy activos (como las cinetias y el citostoma), así como la adquisición de varios núcleos somáticos o un núcleo somático con miles de copias de pequeños fragmentos del genoma para tener una actividad transcripcional intensa. La otra vía es la de la multicelularidad, la cual se ha alcanzado independientemente por numerosos taxa: varios taxa de protistas o protoctistas multicelulares, las plantas, los hongos, los animales (en éstos por lo menos ha habido tres líneas diferentes: los mesozoarios, las esponjas y los demás animales).

Podría ser que los ciliados como en el caso de la convergencia evolutiva de los organismos multicelulares, contengan a varios taxa que adquirieron la ciliarización independientemente. Baste recordar las grandes diferencias que existen en el grado de ploidismo del núcleo somático (macronúcleo), su desarrollo y la forma en que se multiplican los fragmentos del genoma dentro de él (Raikov, 1976), y las enormes diferencias en la ultraestructura del macronúcleo de Cyrtophorida con respecto a la de Hymenostomatida y Peritrichida, y de éstos dos últimos en su nucleolo.

Para determinar de qué manera afecta el factor unicelularidad o pluricelularidad a la ultraestructura de núcleo celular interfásico, podrían estudiarse series de organismos que presentan grados crecientes de complejidad (mayor cantidad de células), pero que tengan relaciones filogenéticas estrechas, como en el caso de la serie volvocina de Chlorophyta:

Chlamydomonas → *Gonium* → *Pandorina* → *Eudorina* → *Pleodorina* → *Volvox*.

(menor cantidad de células → mayor cantidad de células)

O en el caso de la serie de las clorofitas filamentosas, que presentan interacciones celulares más íntimas (recuérdese que los volvocidos son todos organismos coloniales):

Ulothrix (filamento uniseriado) → *Stigeoclonium* (filamento ramificado) → *Percusa*

ria(talo biseriado)→ *Monostroma*(talo monostromático)→ *Ulva*(talo foliáceo)→ *Frittschiella*(talo parenquimatoso).

También este factor podría estudiarse en organismos que presentan alternancia de estadios unicelulares y pluricelulares como en Acrasiomycota y en Myxomycota.

Otro aspecto a explorar podría constituirlo el estudio de la ultraestructura nuclear en series de organismos representativos de las principales innovaciones estructuro-funcionales de los eucariontes(según Margulis).

Pelomyxa palustris(organismo ameboideo; sin undulipodias;sin mitocondrias;sin cloroplastos;sin mitosis verdadera y sin meiosis.)→ Amoebida(organismos ameboides;sin undulipodias;con mitocondrias; sin cloroplastos;sin sexualidad.)→ Acrasiomycota(organismos ameboides en el estadio unicelular;algunos con undulipodias sin cloroplastos;sin sexualidad y con tendencia a formar estructuras pluricelulares.)→ Myxomycota(organismos ameboflagelados en el estadio unicelular; sin cloroplastos;con sexualidad y con tendencia a formar estructuras pluricelulares.)→ Organismos con cloroplastos,pero de diferente origen(Chlorophyta;Prasinophyta;Conjugatophyta;Charophyta;Glaucophyta;Euglenophyta;Rhodophyta;Cryptophyta;Chrysophyta;Haptophyta;Bacillariophyta;Xanthophyta;Eustigmatophyta;Phaeophyta.).

Si se considera que los cloroplastos de las células eucariontes fotosintéticas surgieron como resultado de una endosimbiosis mutualista y que,posteriormente hubo un intercambio del genoma de ambos simbios,sería interesante estudiar organismos fotosintéticos y no fotosintéticos con gran cercanía filogenética;este es el caso,precisamente,de los Ordenes Euglenida y Dinoflagellida,los cuales contienen organismos fotosintéticos,osmótrofos y fagótrofos.Por otra parte,podrían investigarse las diferentes estrategias ultraestructurales que adoptan los organismos endoparásitos ante un medio ambiente hostil y en cierta manera homogéneo,que al menos funcionalmente, en *Trypanosoma*,adopta(el genoma) mecanismos que aumentan la variabilidad estructural de los elementos glucoproteicos antígenicos de la membrana celular para burlar al sistema inmunológico del huésped(Donelson y Turner, 1985).Teniéndose en cuenta lo anterior sería conveniente realizar comparaciones de la ultraestructura nuclear entre organismos parásitos y de vida libre que tengan un ancestro común,como es el caso de los tripanosomátidos y los bodónidos del Orden Kinetoplastida,y entre los miembros del Orden Amoebida *Amoeba proteus* y *Entamoeba invadens*.

Asimismo podrían estudiarse taxa parásitos, pero con diferentes ancestros, como los esporozoarios, microsporidios, haplosporidios y mixosporidios, para dilucidar si en ellos existe el fenómeno de convergencia evolutiva por encontrarse en hábitats similares. A su vez, podría verse en qué grado el medio ambiente puede moldear la ultraestructura nuclear en los organismos unicelulares.

Por último, sería de gran utilidad trabajar con los mesozoarios, los cuales se cree que representan el grado intermedio entre la unicelularidad y la pluricelularidad, y que, para algunos autores constituyen la conexión entre los ciliados y los organismos pluricelulares bilaterales.

VI.-CONCLUSIONES.

- La ultraestructura general del núcleo celular interfásico en los protistas es muy heterogénea, lo que contrasta con la gran homogeneidad ultraestructural encontrada en diversos Phyla de animales y plantas.
- La técnica de contrastación regresiva preferencial para las partículas ribonucleoproteicas es eficaz para los grupos de protistas estudiados. Sin embargo, es necesario mencionar que los tiempos de contrastación empleados para el EDTA son bastante mayores que los utilizados para plantas y animales.
- Todos los organismos presentan nucleolo y gránulos pericromatinianos. La ultraestructura nucleolar de los protistas difiere de la de los mamíferos en cuanto a la carencia de zonas o centros fibrilares y granulares, y a la falta de la estructura nucleolonemal. Es por tanto parecida a la de los animales invertebrados.
El diámetro de los gránulos pericromatinianos de los protistas, a excepción del Orden Cryptomonadida, es bastante menor al promedio del de los animales. Asimismo, este diámetro es muy variable entre los protistas.
- No en todos los grupos se encuentran las fibras pericromatinianas, fibras intercromatinianas y gránulos intercromatinianos.
- No se encontraron cuerpos espiralados ni cuerpos nucleares.
Se propone que:
 - En los protistas no existe un patrón ultraestructural común para el procesamiento del ARNpre-m y del ARNpre-r.
- La gran heterogeneidad ultraestructural tanto general como ribonucleoproteica, encontrada en los Phyla de protistas estudiados puede correlacionarse con el origen polifilético propuesto para estos taxa (sobre todo para el Phylum Sarcodina). Aunque, hay que enfatizar, no es posible descartar que esta heterogeneidad sea debida al hecho de que los protistas tengan un mayor tiempo de evolución (1,400 millones de años) contra los 700 millones de años para los animales invertebrados más antiguos; o bien, debida a que en el caso de los organismos pluricelulares, el medio ambiente extracelular (a excepción de los estratos epidérmicos) es más homogéneo que el de los organismos unicelulares, que se enfrentan a un medio ambiente más cambiante, y que por lo tanto puede favorecer tasas de evolución mayores.
- Al carecer los protistas de los gránulos intercromatinianos típicos, partículas que se cree intervienen en el procesamiento postranscripcional del ARNpre-r, es posible que las rutas metabólicas en las que intervienen

estas partículas, o no existan o las haya alternativas.

Finalmente, y a manera de justificación se considera al núcleo como un organelo que puede ser utilizado, a nivel ultraestructural, para el establecimiento de relaciones filogenéticas; debido a que es una estructura altamente conservativa (pero lo suficientemente variable), tiene amplia distribución (se encuentra en todos los eucariontes), y además es lo suficientemente compleja.

*Solamente en el caso de los protistas, ya que en los animales y plantas el núcleo es una estructura muy homogénea.

VII.-REFERENCIAS.

- 1.-Acloutte,A.,M.Claissé and J.Cance(1984):Tubulin evolution:an electrophoretic and immunological analysis.Origins of Life,13(3/4):169-176.
- 2.-Albarracín-Teulón,A.(1983):La teoría celular.Alianza Editorial,S.A.,España,p.298.
- 3.-Alberts,B.,D.Bray,J.Lewis,M.Raff,K.Roberts and J.D.Watson(1983):Molecular biology of the cell.Garland Publishing,Inc.,U.S.A.,p.460.
- 4.-Banerjee,A.K.(1980):5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids.Microb.Rev.,44(2):175-205.
- 5.-Bardele,C.F.(1981):Functional and phylogenetic aspects of the ciliary membrane:a comparative freeze-fracture study.BioSystems,14:403-421.
- 6.-Barnes,R.D.(1977):Zooloía de los invertebrados.Interamericana,México,p.826.
- 7.-Berezney,R.and D.S.Coffey(1975):Nuclear protein matrix,association with newly synthesized DNA.Science,189:291-293.
- 8.-Berezney,R.and D.S.Coffey(1977):Nuclear matrix,isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei.J.Cell Biol.,73:616-637.
- 9.-Berger,J.D.(1979):Introductory remarks.Symposium:organization and regulation of the macronuclear DNA of ciliates,31st annual meeting.J.Protozool.,26(1):1-2.
- 10.-Berger,J.D.(1979):Regulation of macronuclear DNA content in *Paramecium tetraurelia*.J.Protozool.,26(1):18-28.
- 11.-Bernhard,W.(1969):A new staining procedure for electron microscopical cytology.J.Ultrastr.Res.,27:250-265.
- 12.-Bogorad,L.(1975):Evolution of organelles and eukaryotic genomes.Science,188:891-898.
- 13.-Bold,H.C.,C.J.Alexopoulos and T.Delevoryas(1980):Morphology of plants and fungi. Harper and Row Publishers,New York,p.819.
- 14.-Bouvier,D.,J.Hubert,A.-P.Seve and M.Bouteille(1982):RNA is responsible for the three-dimensional organization of nuclei matrix proteins in HeLa cells.Biol.Cell, 43:143-146.
- 15.-Brunel,C.,Sri Widada,M.N.Lelay,P.Jeanteur,J.P.Liautard(1981):Purification and characterization of a simple ribonucleoprotein particle containing small nucleoplasmic RNA(snRNP)as a subset of RNP containing heterogenous nuclear RNA(hnRNP) from HeLa cells.Nucleic Acids Res.,9:815-830.
- 16.-Buchwalow,I.B.and E.Unger (1977):Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. Exptl.Cell Res.,106:139-150.
- 17.-Carlin,R.K.(1980):Poly(A):A new evolutionary probe.J.Theor.Biol.,82:353-362.
- 18.-Caron,F.and E.Meyer(1985):Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus?.Nature,314(14):185-188.
- 19.-Castañeda,M.(1984):Biología del envejecimiento Y de *Trypanosoma cruzi*.En Martus celli,J.y col.(Ed.),Camino de la biología fundamental,pp.77-100,U.N.A.M.,México.

- 20.-Cavalier-Smith,T.(1975):The origin of nuclei and of eukaryotic cells.Nature,256: 463-468.
- 21.-Cavalier-Smith,T.(1978):The evolutionary origin and phylogeny of microtubules,mitotic spindles and eukaryot flagella.BioSystems,10:93-114.
- 22.-Cavalier-Smith,T.(1981):Eukaryote Kingdoms:seven or nine.BioSystems,14:461-481.
- 23.-Cervera,J.and M.R.Montero(1980):Effects of thermic shock on HEp-2 cells.III.Accumulation of perichromatin granules.J.Ultrastr.Res.,71:1-13.
- 24.-Cervera,J.,M.Alamar,A.Martínez and J.Renau-Piqueras(1983):Nuclear alterations induced by cadmium chloride and l-canavanine in HeLa S3 cells.Accumulation of perichromatin granules.J.Ultrastr.Res.,82:241-263.
- 25.-Cifuentes-Blanco,J.(1984):Los hongos:¿plantas o animales?.Ciencias,1(5):10-15.
- 26.-Clark,R.B.(1964):Dynamics in metazoan evolution.The origin of the coelom and segments.Oxford University Press,Great Britain,p.370.
- 27.-Comings,D.E.and A.S.Wallack(1978):DNA-binding properties of nuclear matrix proteins. J.Cell Sci.,34:233-246.
- 28.-Cook,P.R.and I.A.Brazell(1976):Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA.J.Cell Sci.,22:303-324.
- 29.-Corliss,J.O.(1984):The Kingdom Protista and its 45 Phyla.BioSystems,17:87-126.
- 30.-Crick,F.(1979):Split genes and RNA splicing.Science,204:264-271.
- 31.-Chaly,N.,G.Setterfield,J.G.Kaplan and D.L.Brown(1983a):Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes.I-Ultrastructural changes during stimulation by concanavalin A.Biol. Cell,57:275-284.
- 32.-Chaly,N.,G.Setterfield,J.G.Kaplan and D.L.Brown(1983b):Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes.II.-Cytochemistry and autoradiography during stimulation by concanavalin A.Biol.Cell,49:968-975.
- 33.-Das,N.K.,J.Micou-Eastwood,G.Ramamurthy and M.Alfert(1970):Sites of synthesis and processing of ribosomal RNA precursor within the nucleolus of *Urechia caupo* eggs. Proc.Nat.Acad.Sci.,67:968-975.
- 34.-Daskal,Y.,L.Komaromy and H.Busch(1980):Isolation and partial characterization of perichromatin granules.Exptl.Cell Res.,1266:39-46.
- 35.-Daskal,Y.Perichromatin granules.En Busch,H.(Ed.),The cell nucleus,vol.VIII,chapt.3, p.117-137.Academic Press,U.S.A.,1981.
- 36.-Davidson,E.H.and R.J.Britten(1979):Regulation of gene expression:possible role of repetitive sequences.Science,204:1052-1059.
- 37.-Demoulin,V.(1974):The origin of Ascomycetes and Basidiomycetes.The case for a red ancestry.Bot.Rev.,40(3):315-335.
- 38.-Denison,W.C.and G.C.Carroll(1966):The primitive Ascomycete:a new look at an old problem.Mycologia,58:249-269.
- 39.-Derenzini,M.,F.Novello and A.Pession-Brizzi(1978):Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural pattern.Exptl.Cell Res.,112:443-454.

- 40 .-Derenzini, M., A. Pession-Brizzi and F. Novello (1981): Relationship between ribonucleo-protein particles containing heterogenous RNA and ultrastructure and function of chromatin in purified rat hepatocyte nuclei. *J. Ultrastr. Res.*, 77:66-82.
- 41 .-Derenzini, M., D. Hernandez-Verdun and M. Bouteille (1983): Visualization of a repeating subunit organization in rat hepatocyte chromatin fixed *in situ*. *J. Cell Sci.*, 61: 137-149.
- 42 .-De Robertis, E.D.P., F.A. Saez y E.M.F. De Robertis (1977): *Biología celular*. El Ateneo, Argentina, p. 528.
- 43 .-Doerder, F.P. (1979): Regulation of macronuclear DNA content in *Tetrahymena thermophila*. *J. Protozool.*, 26(1):18-28.
- 44 .-Doerfler, W. (1983): DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:93-124.
- 45 .-Donelson, J.E. and M.J. Turner (1985): How the trypanosome changes its coat. *Sci. Am.*, 252(2):32-39.
- 46 .-Echeverría, O.M., G. Zavala, A. Benítez and G.H. Vázquez-Nin (1980): Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cell of the rat. *Biol. Cellulaire*, 39:139-142.
- 47 .-Elizundia-Alvarez, J.M., L.F. Jiménez-García, O.M. Echeverría y G.H. Vázquez-Nin (1985): Evolución de protoctistas y animales. Un enfoque estructural de evolución nuclear. XVI Congreso nacional de microbiología, p. 38. Asociación Mexicana de Microbiología, México, 1985.
- 48 .-Ellis, J. (1983): Mobile genes of chloroplasts and the promiscuity of DNA. *Nature*, 304: 308-309.
- 49 .-Fakan, S. and W. Bernhard (1973): Nuclear labelling after prolonged 3H-uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exptl. Cell Res.*, 79:431-444.
- 50 .-Felsenfeld, G. (1978): Chromatin. *Nature*, 271:115-122.
- 51 .-Finch, J.T. and A. Klug (1976): Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 73(6):1897-1901.
- 52 .-Flickinger, C.J. (1974): The fine structure of four species of *Amoeba*. *J. Protozool.*, 21:59-68.
- 53 .-Flint, S.J. Processing of mRNA precursors in eukaryotic cells. En Apirion, D. (Ed.), *Processing of RNA*, chapt. 7, pp. 155-179. CRC press, Inc., U.S.A., 1984.
- 54 .-Frenster, J.H. (1981): Ultrastructure and function of heterochromatin and euchromatin. En Busch, H. (Ed.). *The cell nucleus*, vol. I, chapt. 12, pp. 565-580. Academic Press, New York, 1981.
- 55 .-Furuichi, Y., A. La Fiandra and A.J. Shatkin (1977): 5'-terminal structure and mRNA stability. *Nature*, 266:235-239.
- 56 .-Gajkowska, B., E. Puvion and W. Bernhard (1977): Unusual perinucleolar accumulation of ribonucleoprotein granules induced by camptothecin in isolated liver cells. *J. Ultrastr. Res.*, 60:335-347.

- 57.-Galleron,C.(1984):The fifth base:a natural feature of dinoflagellate DNA.Origins of Life,13(3/4):195-203.
- 58.-Gaubatz,J.,R.Hardison,J.Murphy,M.E.Eichner and R.Chalkey(1978):The role of H1 in the structure of chromatin.Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, XLII:265-271.
- 59.-Ghosh,S.(1976):The nucleolar structure.Int.Rev.Cytol.,44:1-28.
- 60.-Glaessner,M.F.(1985):The dawn of animal life.A biohistorical study.Cambridge University Press.Great Britain,p.244.
- 61.-Granboulan,N.et P.Granboulan(1965):Cytochimie ultrastructurale du nucléole.Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et de noyau.Exptl.Cell Res.,38:604-619.
- 62.-Gray,M.W.and W.F.Doolittle(1982):Has the endosymbiont hypothesis been proven?. Microb.Rev.,46(1):1-42.
- 63.-Guerrier-Takada,C. and S.Altman(1984):Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vitro*.Science,223(4633):285-286.
- 64.-Hanson,E.D.(1976):Major evolutionary trends in animal protists.J.Protozool.,23(1):4-12.
- 65.-Hanson,E.D.(1977):The origin and early evolution of animals.Wesleyan University Press,Middletown,U.S.A.,p.670.
- 66.-Heinhorst,S. and J.M.Shively(1983):Encoding of both subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase by organelle genome of *Cyanophora paradoxa*.Nature,304:373-374.
- 67.-Hervás,J.P.,J.Villegas,D.Crespo and M.la Farga(1980):Coiled bodies in supraoptic nuclei of the rat hypothalamus during the postnatal period.Am.J.Anat.,159:447-454.
- 68.-Herzog,M.,S.von Boletzky and M.O.Soyer(1984):Ultrastructural and biochemical nuclear aspects of eukaryote classification:independent evolution of the dinoflagellates as a sister group of the actual eukaryotes?.Origins of Life,13(3/4):205-215.
- 69.-Jackson,D.A.,S.J.McCready and P.R.Cook(1981):RNA is synthesized at the nuclear cage.Nature,292:552-555.
- 70.-Jiménez-García,L.F.(1983):Estudio de las variaciones cuantitativas de la cromatina durante la diferenciación y maduración neuronal.Tesis de Licenciatura,Biología,Facultad de Ciencias,U.N.A.M.,México.
- 71.-Jiménez-García,L.F.(1985):Evolución nuclear en animales.Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico. Tesis de Maestría en Ciencias,Biología,Facultad de Ciencias,U.N.A.M.,México.
- 72.-Kielan-Jaworowska,Z.(1980):Les premiers mammifères.La Recherche,11(108):146-155.

- 73.-Kimura,M. and T.Ohta(1973):Eukaryotes-prokaryotes divergence estimated by 5S ribosomal RNA sequences.Nat.New Biol.,243:199.
- 74.-Kivic,P.A.and P.L.Walne(1983):Algal photosensory apparatus probably represent multiple parallel evolutions.BioSystems,16:31-38.
- 75.-Kivic,P.A.and P.L.Walne(1984):An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida.Origins of Life,13(3/4):268-288.
- 76.-Kleinsmith,L.J.(1981):Phosphorylation of nonhistone proteins.En Busch,H.(Ed.), The cell nucleus,vol.VI,chapt.4,pp.222-254.Academic Press,New York,1981.
- 77.-Knoll,A.H.(1985):Patterns of evolution in the Archean and Proterozoic Eons.Paleobiology,11:53-64.
- 78.-Kolata,G.B.(1980):Genes in pieces.Science,207:25.
- 79.-Kourilsky,P.y G.Gachelin(1985):La organización de la información genética.Mundo Científico,4(8):718-727.
- 80.-Kozak,M.(1983):Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes,eucaryotes and organelles.Microb.Rev.,49(1):1-45.
- 81.-Lapan,E.A.and H.Morowitz(1972):The Mesozoa.Sci.Am.,239(12):94-101.
- 82.-Leedale,G.F.(1974):How many are the Kingdoms of organisms?Taxon,23(2/3):261-270.
- 83.-Levine,N.D.,J.O.Corliss,F.E.G.Cox,G.Deroux,J.Grain,B.M.Honigberg,G.F.Leedale,A.R.Loeblich,J.Lom,D.H.Lynn,E.G.Merinfeld,F.C.Page,G.Poljansky,V.Sprague,J.Vávra and F.G.Wallace(1980):A newly revised classification of the protozoa.J.Protozool.,27:37-58.
- 84.-Lewin,B.(1983):Genes.John Wiley and Sons,U.S.A.,pp.395-433
- 85.-Long,E.O.and I.B.Dawid(1980):Repeated genes in eukaryotes.Ann.Rev.Biochem.,49:727-764.
- 86.-López-Zamorano,B.(en prensa).Tesis de Doctorado en Ciencias,Biología,Facultad de Ciencias,U.N.A.M.,México.
- 87.-Luehrsen,K.R.,D.C.Eubanks and G.E.Fox(1982):Phylogenetic relationships between three species of free living amoeba.J.Protozool.,29(3):498.
- 88.-Magnaval,R.,O.Bertaux and R.Valencia(1979):Hetero-and euchromatin of synchronous *Euglena* cells.Exptl.Cell Res.,121:251-265.
- 89.-Makhlin,E.E.,M.V.Kudryavtseva and B.N.Kudryavtsev(1979):Peculiarities of changes in DNA content of *Amoeba proteus* nuclei during interphase.A cytofluorometric study.Exptl.Cell Res.,118:143-150.
- 90.-Margulis,L.(1981):Symbiosis in cell evolution.Life and its environment on early Earth.W.H.Freeman and Co.,U.S.A.,p.419.
- 91.-Margulis,L.and K.V.Schwartz(1982):Five Kingdoms.W.H.Freeman and Co.,U.S.A.,p.338.
- 92.-Martin,G.W.(1955):Are fungi plants?Mycologia,XLVII(6):779-792.
- 93.-McGhee,J.D.and G.Felsenfeld(1980):Nucleosome structure.Ann.Rev.Biochem.,49:1115-1156.

- 94.-McQuade,A.B.(1983):Origins of the nucleate organisms II.BioSystems,16:39-55.
- 95.-Mirre,C.and A.Stahl(1981):Ultrastructural organization sites of transcription and distribution of fibrillar centers in the nucleolus of the mouse oocyte.J.Cell Sci.,48:105-126.
- 96.-Monneron,A.and W.Bernhard(1969):Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells.J.Ultrastr.Res.,27:266-288.
- 97.-Morris,R.N.(1980):Chromosome structure and the molecular biology of mitosis.En Gooday,G.W.y col.(Ed.),The eukaryotic microbial cell.The society for general microbiology,symposium 30.,pp.41-76.Cambridge University Press,Great Britain,1980.
- 98.-Moyne,G.,O.Bertaux and E.Puvion(1975):The nucleus of *Euglena*.I.An ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis* Z.J.Ultrastr.Res.,52:362-376.
- 99.-Moyne,G.and E.Puvion(1976):Visualization of transcriptional activity in the cell nucleus.Sixth European Congress on Electron Microscopy Jerusalem:14-19.
- 100.-Moyne,G.,R.E.Nash and E.Puvion(1977):Perichromatin granules in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide.Biol.Cellulaire,30:5-16.
- 101.-Müller,E.y W.Loeffler(1976):Micología.Omega,España,p.345.
- 102.-Nagl,W.(1979):Condensed interphase chromatin in plant and animal cell nucleus: fundamental differences.Pl.Syst.Evol.,Suppl.,2:247-260.
- 103.-Nanney,D.L.and R.M.Preparata(1979):Genetic evidence concerning the structure of the *Tetrahymena thermophila* macronucleus.J.Protozool.,26(1):2-9.
- 104.-Nanney,D.L.(1980):Experimental ciliatology.John Wiley and Sons,U.S.A.,p.304.
- 105.-Nash,R.E.,E.Puvion and W.Bernhard(1975):Perichromatin fibrils as components of rapid labeled extranucleolar RNA.J.Ultrastr.Res.,53:395-405.
- 106.-Nevens,J.R.Poly(A) in eukaryotic mRNA.En Apirion,D.(Ed.),Processing of RNA,chapt. 6,pp.133-150.CRC Press,Inc.,U.S.A.,1984.
- 107.-Oudet,P.,J.E.Germond,M.Bellard,C.Spadafora and P.Chambon(1978):Nucleosome structure.Phil.Trans.R.Soc.Lond.B.,283:241-258.
- 108.-Paul,J.,E.J.Zollner,R.S.Gilmour and G.DBirnie(1978):Properties of transcriptionally active chromatin.Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology,XLII: 597-603.
- 109.-Petrov,P.and W.Bernhard(1971):Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus.J.Ultrastr.Res.,35:386-402.
- 110.-Petrov,P.and C.E.Sekeris(1971):Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observations.Exptl.Cell Res., 69:393-401.
- 111.-Pickett-Heaps,J.(1974):The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. BioSystems,6:37-48.

- 112 .-Pirozynski, K.A. and D.W. Malloch (1975): The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems*, 6:153-164.
- 113 .-Preer Jr., J.R., L.B. Preer, B.M. Rudman and A.J. Barnett (1985): Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. *Nature*, 314 (14):188-190.
- 114 .-Prescott, D.M., K.G. Murti and C.J. Bostock (1973): Genetic apparatus of *Stylonychia* sp.. *Nature*, 242:596-601.
- 115 .-Puvion, E., G. Moyne and W. Bernhard (1976): Action of 3' deoxyadenosine (cordycepin) on the nuclear ribonucleoproteins of isolated liver cells. *J. Microscopie Biol. Cell*, 25:17-32.
- 116 .-Puvion, E. and G. Moyne. *In situ* localization of RNA structures. En Busch, H. (Ed.), *The cell nucleus*, vol. VIII, chapt. 2, pp. 86-87. Academic Press, U.S.A., 1981.
- 117 .-Puvion, E., F. Puvion-Dutilleul and E.H. Leduc (1981): The formation of nucleolar perichromatin granules. *J. Ultrastr. Res.*, 76:181-190.
- 118 .-Puvion, E. (1982): Presence of RNA in the interchromatin granules of cells treated with dichlorobenzimidazole riboside (DRB). *Biol. Cell*, 43:147-150.
- 119 .-Puvion, E., A. Viron and F.X. Xu (1984): High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB-treated cells. *Exptl. Cell Res.*, 152:357-367.
- 120 .-Raff, R.A. and H.R. Mahler (1972): The nonsymbiotic origin of mitochondria. *Science*, 177:575-582.
- 121 .-Raikov, I.B. (1976): Evolution of macronuclear organization. *Ann. Rev. Genet.*, 10:413-440.
- 122 .-Raikov, I.B. et G. Morat (1977): Etude autoradiographique de la synthèse de l'ADN et de l'ARN dans les noyaux du cilié *Loxodes magnus* Stokes. *Protistologica*, XIII:391-399.
- 123 .-Recher, L., J. Whitescarver and L. Briggs (1969): The fine structure of a nucleolar constituent. *J. Ultrastr. Res.*, 29(1-4):1-14.
- 124 .-Recher, L., J.A. Sykes and H. Chan (1976): Further studies on the mammalian cell nucleolus. *J. Ultrastr. Res.*, 56:152-163.
- 125 .-Rizzo, P.J. (1981): Comparative aspects of basic chromatin proteins in dinoflagellates. *BioSystems*, 14:433-443.
- 126 .-Rizzo, P.J., M. Jones and S.M. Ray (1982): Isolation and properties of isolated nuclei from the Florida red tide dinoflagellate *Gymnodinium breve* (Davis). *J. Protozool.*, 29(2):217-222.
- 127 .-Scagel, R., R. Bandoni, G. Rouse, W.B. Schofield, J. Stein y T. Taylor (1980): *El Reino Vegetal*. Omega, España, p. 659.
- 128 .-Schopf, J.W. (1978): La evolución de las células primitivas. *Investigación y Ciencia*, (26):58-75.

- 129.-Sekeris,C.E.,J.Niessing(1975):Evidence for the existence of a structural RNA component in the nuclear ribonucleoprotein particles containing heterogenous RNA.Biochem. Biophys.Res.Comm.,62:642-650.
- 130.-Sigeo,D.C.(1984):Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes.BioSystems,16:323-330.
- 131.-Small,E.B.and D.H.Lynn(1981):A new macrosystem for the Phylum Ciliophora Doflein, 1901.BioSystems,14:387-401.
- 132.-Smetana,K.,J.Lejnar,A.Vlastiborova and H.Busch(1971):On interchromatinic dense granules of mature human neutrophil granulocytes.Exptl.Cell Res.,64:105-112.
- 133.-Smetana,K.and H.Busch.The nucleolus and nucleolar DNA.En Busch,H.(Ed.),The cell nucleus,vol.I,chapt.2,pp.75-147.Academic Press,U.S.A.,1981.
- 134.-Smith,H.C.and R.Berezney(1980):DNA polymerase α is tightly bound to the nuclear matrix of actively replicating liver.Biochem.Biophys.Res.Comm.,97:1541-1547.
- 135.-Soyer,M.O.(1981):Presence of intranuclear micro-cables in a primitive dinoflagellate protist:morphological description and discussion of their possible evolutionary significance.BioSystems,14:299-304.
- 136.-Spector,D.L.and R.E.Triemer(1981):Chromosome structure and mitosis in the dinoflagellates:an ultrastructural approach to an evolutionary problem.BioSystems,14: 289-298.
- 137.-Spector,D.L.,W.H.Schrier and H.Busch(1983):Immunoelectron microscopic localization of SnRNPs.Biol.Cell,49:1-10.
- 138.-Stewart,K.D.and K.R.Mattox(1975):Comparative cytology,evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls A and B.Bot.Rev.,41(1):105-134.
- 139.-Stewart,K.D.and K.Mattox(1980):Phylogeny of phytoflagellates.En Cox,E.R.(Ed.), Phytoflagellates,pp.433-462.Elsevier/North-Holland,New York,1980.
- 140.-Sunkara,P.S.,D.A.Wright and P.N.Rao(1979):Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S.A.,76(6):2799-2802.
- 141.-Swift,H.(1963):Cytochemical studies on nuclear fine structure.Exptl.Cell Res., Suppl.,9:54-67.
- 142.-Tanaka,T.and T.Oda(1976):Configurational changes in rat liver nuclear chromatin and nucleoli caused by dissociation and reassociation of Fl histone.Exptl.Cell Res.,103:143-149.
- 143.-Taylor,F.J.R.(1976):Flagellate phylogeny:a study in conflict.J.Protozool.,23(1): 28-40.
- 144.-Taylor,F.J.R.(1980):On dinoflagellate evolution.BioSystems,13:65-108.
- 145.-Valkov,I.,G.Moyne et R.Robineaux(1974):Etude morphométrique de certaines structures nucléoprotéiques des noyaux de lymphocytes cultivés *in vitro* en présence

- de phytohemaglutinine. Eur. J. Immunol., 4:570-577.
- 146.-Van Eekelen, C.A.G. and W.J. van Venrooij (1981): HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. J. Cell Biol., 88:554-563.
- 147.-Van Valen, L.M. and V.C. Maiorana (1980): The Archaeobacteria and eukaryotic origins. Nature, 287:248-250.
- 148.-Vázquez-Nin, G.H. and W. Bernhard (1971): Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. J. Ultrastr. Res., 36:848-860.
- 149.-Vázquez-Nin, G.H., B. Chávez and C. Tomas-Martín (1973): A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. J. Microscopy, 16:243-246.
- 150.-Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría, E. Molina and J. Fragoso (1978): Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. Acta Anat., 102:308-318.
- 151.-Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría and J. Pedron (1979): Ultrastructural and autoradiographic study of the effects of bleomycin on the interphase nuclei of cultured normal cells. Cancer Res., 39:4218-4223.
- 152.-Vázquez-Nin, G.H., J.A. Ortega-Rangel and O.M. Echeverría (1980): Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. Biol. Cellulaire, 39:143-146.
- 153.-Vidal, G. (1984): The oldest eukaryotic cells. Sci. Am., 250(2):32-41.
- 154.-Vogelstein, B., D.M. Pardoll and D.S. Coffey (1980): Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. Cell, 22:79-85.
- 155.-Wassef, M. (1979): A cytochemical study of interchromatin granules. J. Ultrastr. Res., 69:121-133.
- 156.-Whittaker, R.H. (1969): New concepts of Kingdoms of organisms. Science, 163:150-160.
- 157.-Whittaker, R.H. and L. Margulis (1978): Protist classification and the Kingdoms of organisms. BioSystems, 10:3-18.
- 158.-Wise, G.E. and L. Goldstein (1972): Localization and characterization of chromatin within the interphase nucleus of *Amoeba proteus* by means of *in situ* centrifugation and radioautography. Chromosoma (Berl.), 36:176-192.
- 159.-Wise, G.E., A.R. Stevens and D.M. Prescott (1972): Evidence of RNA in the helices of *Amoeba proteus*. Exptl. Cell Res., 75:347-352.
- 160.-Woese, C.R. and G.E. Fox (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary Kingdoms (Archaeobacteria/Eubacteria/Urkyote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77(11):5088-5090.
- 161.-Woese, C.R. (1981): Archaeobacteria. Sci. Am., 244(6):94-106.
- 162.-Zillig, W., K.O. Stetter, R. Schnabel and M. Thomm (1985): DNA-dependent RNA polymerases of the archaeobacteria. En The Bacteria, vol. VIII, chapt. 11, p.499-523. Academic Press, New York.
- 163.-Zimmermann, W. (1976): Evolución vegetal. Omega, España, p.176.