

LONGEVIDAD PROTOPLÁSMICA *

VIDA DE LOS PROTOZOARIOS

GARY N. CALKINS

Profesor de Protozoología de la Universidad de Columbia, N. Y.

Ya han transcurrido más de dos siglos desde que el naturalista holandés, Leeuwenhoek, descubrió el incógnito mundo microscópico de los animales protozoarios. Desde entonces acá hanse estudiado y descrito muchos miles de especies nuevas, cuya variedad de formas, estructuras y actividades ejerce una constante fascinación sobre la curiosidad de los observadores.

No obstante el escaso tamaño de los protozoarios, cuyas dimensiones oscilan entre un dieciseisavo a un veinticincoavo de milésima de pulgada, cada uno de estos seres minúsculos es por sí solo una unidad protoplásmica independiente, auto-reproductiva, con todos los caracteres de un organismo unicelular. Son muy pocos los observadores que gusten lanzar su imaginación a considerar la historia retrospectiva de cualquiera de estas pequeñas partículas de substancia viviente, y son muy pocos también los que se paran a meditar que esta materia protoplásmica ha venido ininterrumpidamente animada de impulso vital desde que comenzó la Vida sobre el mundo, venciendo posibles obstáculos, y posee la facultad de continuar viviendo indefinidamente en lo por venir. A este fenómeno maravilloso es al que denominamos "Longevidad protoplásmica", y a él hemos de ceñir nuestra meditación en este artículo, considerando principalmente los factores que gobiernan la longevidad de los protozoarios.

Los principios por que se rige la vida de los protozoarios son los mismos que gobiernan toda la vida animal, desde el ser más rudimentario hasta el hombre, pues el protoplasma es idéntico en todos ellos y posee los mismos atributos; pero estos organismos unicelulares son más fáciles de estudiar que los otros, y los factores que en ellos influyen son más evidentes.

* Conferencia pronunciada en la Escuela de Medicina Tropical de la Universidad de Puerto Rico, el 28 de febrero de 1935.

Recibida en redacción el 29 de abril, 1935.

Antes de discutir las influencias modificadoras de la longevidad protoplásmica, hemos de considerar un asunto de gran importancia, que es el concepto de la organización del protoplasma. Todos reconocemos a primera vista una estrella de mar, un erizo, un pez, un sapo o una rana, un reptil, un ave o un mamífero. Cada uno de estos seres tiene para nosotros una fisionomía, que reconocemos en el acto, pues constituye la forma externa, la estructura adulta del animal; pero nadie se pára a reflexionar que cada una de estas formas de vida animal procede de una diminuta porción de substancia protoplásmica, de una célula madre, el óvulo, cuyo tamaño no es mayor que el de un protozoo. Estas estructuras adultas son, propiamente, las *organizaciones derivadas* que han llegado a nosotros a través de un proceso de crecimiento y diferenciación que se ha verificado en el curso evolutivo de una sola célula madre, de un óvulo primigenio. El protoplasma contenido en un óvulo posee dentro de sí lo que en otra ocasión hemos llamado *organización fundamental* de las especies. De esta organización fundamental se deriva el desarrollo evolutivo de cada especie, hasta llegar a su forma adulta y a sus organizaciones secundarias. Es, pues, evidente que el óvulo o la estrella de mar se diferencia tanto del óvulo del erizo como este animal se diferencia de aquél; empero, con todo y con eso, los óvulos de ambas especies de animales son tan parecidos que únicamente un zoólogo especializado puede distinguir uno de otro. A más de eso, la organización fundamental de cada uno de estos óvulos es de tal suerte que, cuando se les somete a idénticos estímulos medioambientales, producen siempre un mismo tipo de organización secundaria (derivada), lo que hace que los miembros pertenecientes de la misma especie animal sean siempre iguales unos a otros. Si los estímulos cambian, cambia asimismo la organización y se producen entonces estructuras anormales o monstruosas.

La idea que queremos destacar con especial relieve es que existe exactamente la misma diferencia entre la organización fundamental y la organización derivada en cada una de las especies que llamamos protozoarios. Así, por ejemplo, en el Grabado 1A puede verse un quiste de protozoo ciliado, *Stylonychia mytilus*, que es, al igual que un óvulo, una diminuta esfera de protoplasma homogéneo nucleado, encerrado

en una cápsula impermeable. Son muchísimos los protozoarios que poseen quistes semejantes, que en muchas ocasiones apenas puede diferenciarlos uno de otro un zoólogo experimentado. Estas esferillas de substancia protoplásmica homogénea poseen cada una su plan de organización fundamental, característico de su especie; y cada una de ellas, sin que haya sido fertilizada, se desarrolla hasta quedar convertida en un organismo movable que llega a la edad adulta después de haber absorbido agua y oxígeno. Véase en el Grabado 1B cómo emerge del quiste de *Stylonychia* el organismo adulto. Las estructuras derivadas, incluyendo el macronúcleo, la zona de las membranelas bucales, los cirros, la boca, la vacuola contráctil, y otros más, se han engendrado todos de la organización fundamental preexistente en el quiste. En la organización fundamental estaban prefijadas estas estructuras fundamentales, las únicas que podían derivarse de ella, de la misma manera que de un óvulo de una perra no puede salir más que un perro. En otras palabras, las organizaciones fundamentales de las distintas especies son completamente diferentes, pero semejantes en la misma especie. Y lo mismo sucede en un metazoario, en que los óvulos son partículas de plasma germinal contenido dentro de la organización derivada, que en un protozoario en que el plasma germinal u organización fundamental está contenido dentro de la organización derivada, protegida y alimentada por ella. Esto puede verse fácilmente en el Grabado 2A que representa un ciliado, el *Dileptus anser*, y B, un *Stentor polymorphus*. Ambos pertenecen a dos grupos de ciliados completamente distintos. Si separamos del centro de cada uno de ellos una pequeña partícula con parte del núcleo, estas dos partículas se convierten en dos esferillas sin perder absolutamente nada de su estructura original. Ambas aparecen exactamente iguales, como si fueran quistes desprovistos de cápsulas, y, al parecer, están compuestos de substancia protoplásmica homogénea (Grab. 2a y 2b). Si las colocamos en un medio nutritivo, una de ellas dará de sí un *Dileptus* y la otra un *Stentor*. Así, pues, en lo que se refiere a la organización fundamental y a la organización derivada, tanto los protozoarios como los metazoarios son iguales.

Veamos ahora los factores que regulan la longevidad protoplásmica. El ejemplar joven de *Stylonychia* que acaba de

emerger de su quiste, reacciona ante los estímulos medioambientales, se mueve enérgicamente, aprehende su alimento que lo constituyen bacterias y otras partículas minúsculas que son digeridas en una especie de estómago que el *Stylonychia* acaba de improvisarse para su uso, en donde los alimentos quedan sometidos a la acción de fermentos digestivos, uno de éstos pepsinoide, puesto que actúa en un medio ácido, y el otro tripsinoide, ejerciendo su acción en presencia de un medio alcalino. Como resultado de esta acción digestiva que han sufrido los alimentos, éstos se han transformado en productos aminoácidos y polipéptidos que se distribuyen por toda la masa protoplásmica, que recibe así las pequeñas cantidades de elementos que necesita para su regeneración y para el crecimiento del pequeño organismo. Cuando éste llega a su tamaño normal, se detiene el crecimiento. Este fenómeno se da en todos los organismos conocidos, y podemos, por tanto, inferir de aquí que el organismo en cuestión ha satisfecho sus necesidades nutritivas y está saciado.

Cada organismo defiende en su vida individual la organización fundamental de toda la especie; y, para que esta vida se cumpla, es absolutamente necesario que tenga lugar dentro de un medio ambiente apropiado, a expensas del cual han de verificarse las funciones metabólicas. El período metabólico y de crecimiento del organismo, acondicionado al medio, constituye una de las fases—constructiva, anabólica—*de la que depende la longevidad protoplásmica, la cual podríamos regular si regulásemos la adecuación del organismo al medio que le rodea.* En el caso del *Stylonychia*, cuando el organismo alcanza el punto de repleción o saciedad, el organismo debería detenerse en su evolución y el protoplasma no podría continuar viviendo si no desarrollase alguna otra nueva actividad. Entonces tiene lugar la segunda fase evolutiva—fase catabólica—en la que el organismo se reproduce por división. Como resultado de esta actividad catabólica, casi todas las estructuras de la organización derivada pasan a formar parte de la organización fundamental.

Describamos someramente lo que sucede en este momento al macronúcleo y a los órganos de locomoción. El macronúcleo, que es la estructura celular que tiene más importancia en el metabolismo, no es absorbido por la organización fundamental, sino por el contrario, permanece en toda su inte-

gridad, evolucionando independientemente, con leves variantes en su línea evolutiva en los diferentes tipos de ciliados. En el *Uroleptus mobilis* existen ocho macronúcleos, todos los cuales se reorganizan de la misma manera. Los macronúcleos jóvenes se caracterizan por los gránulos de cromatina fuertemente pigmentados que poseen. Después de transcurridas varias horas de actividad metabólica aparecen en cada núcleo gránulos de diferentes clases que no se tiñen como los de cromatina y que se hidrolizan conforme a la reacción nuclear de Feulgen (Grab. 3 a). Después de ocho horas de actividad estos gránulos, que nosotros hemos denominado "Gránulos X", se aglomeran en el tercio anterior de cada uno de los ocho macronúcleos, actuando entonces como agentes catalíticos, produciendo un surco o hendidura en el núcleo (Grab. 3 b) dividiéndole en dos porciones. La porción situada en la parte anterior de la hendidura contiene gránulos de cromatina de aspecto distinto a los existentes en la porción posterior. El fragmento anterior de cada uno de los ocho núcleos se desprende y es absorbido por el citoplasma, y las porciones nucleares que quedan se unen entre sí (Grab. 3 c) y forman un sólo núcleo asociado (Grab. 3 d).

Este proceso que acabamos de describir representa indudablemente la reorganización nuclear, que de una manera semejante, o con leves variaciones, se manifiesta también en todas las especies ciliadas antes de la división nuclear, de tal manera que el macronúcleo verifica una especie de limpieza en cada período de su división y los gránulos cromáticos recuperan su vigor. Algunos ciliados verifican este mismo proceso formando unas "fajas de reorganización" que actúan como agentes catalíticos, pasan a través del macronúcleo y hacen variar los gránulos de cromatina que adquieren entonces un vigor juvenil (Grab. 4).

Con los órganos de locomoción sucede otro tanto. En la base de cada uno aparece un pequeño brote saliendo de la organización fundamental. Según va creciendo, el órgano de la motilidad viejo va reduciéndose de tamaño debido a la reabsorción del protoplasma, acabando por desaparecer y siendo suplantado por uno nuevo derivado de la organización fundamental. Cuando estos procesos han terminado la célula se parte en dos células jóvenes, cada una provista de una serie completa de órganos de locomoción proporcionados

a su tamaño y con un macronúcleo reorganizado también. Así pues, la división celular y sus actividades catalíticas forman el segundo factor influyente en la longevidad del protoplasma, uno de los más importantes, y por medio del protoplasma se rejuvenece.

El problema consiste ahora en averiguar si estos dos factores—el medio ambiente en el que se verifica la función metabólica y la división nuclear—bastan para mantener indefinidamente la vida del protoplasma del protozooario. Ya Weismann, hace más de media centuria, creía que de estos dos factores dependía la vida protoplásmica, lo cual es cierto en cuanto se refiere a los flagelados, pero no es así en la inmensa mayoría de los protozoarios, ni en los infusorios, rizópodos y esporozoarios. Para poder precisar este asunto hemos tenido que recurrir al método de determinación de cultivos por aislamiento, que pasaremos a describir ahora lo más brevemente posible. Trataré de una serie de experimentos con el *Uroleptus mobilis* que hemos llevado a cabo durante muchos años.

Procedíamos aislando un sólo ejemplar procedente de un quiste, o resultante de conjugación celular, en una pequeña gota de un medio nutritivo, cuyo valor habíamos determinado antes experimentalmente. Depositábamos la gotita que contenía el protozooario en la cámara húmeda, y al cabo de 24 horas encontrábamos ocho ejemplares en la misma gota, cinco de los cuales aislábamos cuidadosamente en un recipiente distinto cada uno. Al día siguiente separábamos un nuevo ejemplar de cada una de las cinco colonias formadas, y poníamos los restantes en un recipiente mayor (un platillo de Sirácusa, p. ej.) conteniendo bastante cantidad del medio nutritivo en el cual los organismos efectuaban su multiplicación con entera libertad hasta que llegaban a varios centenares. Esta multiplicación constituye propiamente una prueba biológica experimental del proceso de formación quística o de conjugación celular, de la cual habremos de tratar más adelante. Continuamos verificando estas operaciones, aislando el organismo día tras día, durante varios meses, hasta un año aproximadamente, o hasta tanto que el espécimen primitivamente aislado, y toda su progenie, había experimentado más de 360 divisiones sucesivas. Ahora bien, el proceso de división no nos basta de ninguna manera para mantener la

vitalidad del protoplasma, pues conforme iba progresando durante este período, se hacía más lento hasta que, finalmente, cesaba, y fenecía el protoplasma (véase Grab. 5). Los individuos de las últimas divisiones eran con frecuencia anormales y presentaban el macronúcleo repleto de "Gránulos X".

Resulta bastante difícil poder establecer comparaciones sobre la vitalidad de las distintas fases del proceso de división por la simple inspección de las anotaciones numéricas diarias. Para poder compararlas es necesario calcular el número de divisiones por término medio, por períodos iguales de tiempo, de 10 días, por ejemplo. Al cabo de treinta períodos de diez días, o después de este tiempo, las series divisionales de *Uroleptus mobilis* se computan entre sí para formar una curva en la cual las ordenadas representan el promedio de divisiones ocurridas en diez días y las abcisas los períodos de tiempo, de diez cada uno. La gráfica así formada arranca desde el primer período de diez días y las divisiones alcanzan un promedio de 18, aproximadamente, y va descendiendo gradualmente hasta llegar a cero. Ello demuestra evidentemente que la vitalidad de la partícula de protoplasma que utilizamos para el experimento había perdido gran parte de su vitalidad original, sin que pudiera evitarlo el proceso divisional con que procurábamos conservarla. (Grab. 5).

Según dijimos antes, hemos venido experimentando con esta substancia protoplásmica por espacio de muchos años, obteniendo siempre partículas de protoplasma derivadas del primer espécimen individual que habíamos aislado al principio. A pesar de que el protoplasma obtenido de cultivos perece siempre al cabo de un año, poco más o menos, pudimos realizar nuestros experimentos gracias a las constataciones de los procesos de enquistamiento y conjugación que verificamos.

Transcurridos 20 ó 30 días de haber aislado en cultivos algunos organismos, empiezan a desarrollarse los quistes, y poco tiempo después, éstos alcanzan el 90 por ciento del total. El enquistamiento—o "endomixis", según la terminología de Woodruff y Erdmann, 1914—es el tercer factor regulador de la longevidad protoplásmica. El proceso catalítico se verifica de una manera mucho más íntima y profunda en la endomixis que en la simple división o partición celular. Todos los ór-

ganos motiles de la organización secundaria o derivada desaparecen absorbidos, en tanto que los ocho macronúcleos se fragmentan en diminutas partículas para desaparecer después también por absorción, desapareciendo el agua y los materiales de desecho y subsistiendo únicamente la organización fundamental como una masa homogénea provista de un núcleo, circundada por una membrana quística impermeable. Los quistes así formados pueden entonces soportar un desecamiento por espacio de meses, o aún años, sin perecer, de tal manera que, si se les vuelve a colocar en un medio nutritivo, recobran su actividad y continúan evolucionando hasta dar de sí nuevos organismos absolutamente normales. Aparecen en ellos macronúcleos de neoformación salidos del micronúcleo, el cual es, sin duda alguna, el firme depositario de la organización fundamental, del que se forman las organizaciones derivadas. De todo ello resulta un protoplasma renovado, juvenil, pleno de potencia vital, que puede multiplicarse, dividiéndose unas 360 veces, al cabo de las cuales perece.

Nosotros hemos podido conservar vivo uno de estos quistes durante unos seis meses después de haber salido de la serie original. Pusímosle entonces en el mismo medio nutritivo que habíamos utilizado antes para la obtención de la serie original. Durante este mismo semestre la vitalidad de la serie original había ido decreciendo gradualmente, desde diecisiete divisiones en 10 días a dos en el mismo espacio de tiempo. La cantidad de protoplasma salida del quiste poseía una vitalidad que puede representarse por veinte divisiones en el curso de diez días. Eso, sin dejar de ser el mismo protoplasma de la serie original, con la única diferencia de haber sufrido una reorganización radical. He aquí, pues, un tercer factor regulador de la longevidad, en el cual la catalisis actúa sobre el órgano más importante en el proceso metabólico, o sea, sobre el macronúcleo.

La época en que puede sobrevenir el enquistamiento es de poca duración en el ciclo vital de cada serie. El protoplasma continúa dividiéndose en la serie original, pero cada vez con menos energía y, tarde o temprano, aparece otra forma de proceso catalítico. En ella toma parte la cubierta cortical de cada uno de los organismos, la cual sufre ciertas modificaciones, sobre todo en la región bucal. El ectoplasma,

que tiene una consistencia relativamente sólida, se licúa y dos organismos se ponen en contacto en el sitio donde ha desaparecido el ectoplasma, fundiéndose los organismos en un punto determinado. A este proceso de apareamiento se le denomina conjugación. La fusión parcial de los organismos sirve de estímulo al micronúcleo que reacciona entonces dividiéndose a su vez. A estas nuevas divisiones del micronúcleo las denominamos divisiones de madurez. El micronúcleo de cada organismo se parte tres veces y la última da lugar a la formación de dos pronúcleos, uno de los cuales permanece *in situ* y el otro emigra a través del puente de substancia protoplásmica, penetra en el otro organismo y se funde con el pronúcleo allí existente (Grab. 6). Esto, como se ve, es un proceso de fertilización mutua. La conjugación tarda en verificarse unas 24 horas, y después que se han fundido los pronúcleos (anfimixis) los dos organismos se separan. Entonces pasan 3 ó 4 días durante los cuales los macronúcleos primitivos se fragmentan y desaparecen absorbidos en el citoplasma. Fórmase después un nuevo macronúcleo por efecto de la división del núcleo de fertilización, y el nuevo organismo, reorganizado ya, está dispuesto para dividirse por primera vez al cabo de unos 5 días.

La conjugación es, pues, el cuarto factor que gobierna las fases que determinan la longevidad protoplásmica, de efectos semejantes a los producidos por la endomixis en el momento del enquistamiento, y merced a los cuales la substancia protoplásmica envejecida queda vivificada. El alcance de este rejuvenecimiento puede apreciarse en una serie cuyo protoplasma solamente se divide una vez en espacio de 43 días. Los elementos que forman esta serie se conjugan entonces y, después de ello, ambos elementos empiezan a dividirse a razón de 75 divisiones cada una en ese mismo tiempo.

Tras la conjugación con sus fenómenos anfimíxicos, sucede igual que tras los fenómenos endomíxicos: rejuvenecimiento del protoplasma. La única diferencia entre unos fenómenos y otros consiste en que con la conjugación se unen los micronúcleos, pero las dos células de donde proceden sólo se unen temporal y parcialmente; en cambio, con la endomixis no se produce la fusión y unión nuclear. Para que el rejuvenecimiento tenga lugar después de la conjugación ni siquiera es necesario la anfimixis. Esto ha podido demostrarse repe-

tidas veces con el *Uroleptus mobilis*, separando las dos células en los primeros momentos después de conjugadas, lo cual puede hacerse fácilmente, cortando con un escalpelo el istmo que une ambos elementos por su polo anterior (Grab. 6). Después de libertados, cada uno de estos elementos puede sembrarse separadamente, observándose entonces que el proceso de reorganización continúa ininterrumpidamente en todas sus partes, como si ambos elementos estuvieran aún unidos. La reorganización se verifica de una manera perfecta así como también la renovación de la vitalidad protoplásmica. No ha habido anfimixis, o sea, fusión pronuclear, sino que hemos convertido la anfimixis en endomixis por un artificio experimental.

Estos cuatro factores que hemos mencionado—medio ambiente a propósito y metabolismo, división celular, endomixis y conjugación—bastan ahora para que el protoplasma conserve indefinidamente su fuerza vital. El secreto consiste en restaurar la organización derivada, reformándola y transformándola en una organización fundamental. Esto se consigue en parte con la división celular, y de manera más perfecta por medio de la endomixis y de la conjugación.

Para resumir, comparemos ahora brevemente la vida de los protozoarios con la de los metazoarios. La organización fundamental de estos últimos se encuentra en el plasma germinal del óvulo y en las células espermáticas; en ambos elementos la organización fundamental es imperecedera, pero en la mayoría de los casos, dichos elementos tienen que acoplarse para continuar viviendo. El óvulo después de fecundado experimenta una serie de divisiones sucesivas, mediante las cuales fabrica millones de células, todas ellas características y con funciones específicas, según sea la especie superior animal a que pertenezcan. La organización derivada, o adulta, al igual que un sólo ejemplar de ciliado, posee una potencia vital limitada. Cuando ésta se acaba la organización derivada termina y el individuo muere de senectud. El plasma germinal, u organización fundamental, que está sostenido, entretenido y protegido por la organización derivada, perece con la primera. Pero mientras esto llega, durante la vida del individuo han salido del cuerpo de éste elementos celulares provistos de plasma germinal que perpetúan la organización fundamental en la descendencia. No

sucede lo mismo en los metazoarios, pues éstos son incapaces de absorber la organización derivada dentro de la fundamental y dar lugar a un nuevo ser, lo cual, como hemos visto, es lo que diferencia esencialmente los seres unicelulares de los metazoarios. Como dijo Weismann hace más de cincuenta años, la muerte natural del individuo con su organización especial derivada es la condena que el metazoario debe cumplir por el privilegio de disfrutar una organización especializada.

R. L. trad.