
APORTACIONES DE LA INVESTIGACION EN *Tetrahymena* A LA FARMACOLOGIA Y A LA RADIOBIOLOGIA

IRENE VASCONCELOS D.* y RODOLFO FÉLIX E.*

* Departamento de Radiobiología y Genética. Instituto Nacional de Energía Nuclear.

INTRODUCCIÓN

Entre los hallazgos iniciales sobre los procesos que intervienen en la reparación del daño inducido en el ADN en sistemas biológicos, están los aportados por Setlow y Carrier (1964) en *Escherichia coli*. La síntesis que ocurre durante la reparación que tiene lugar posteriormente a la exposición de *E. coli* a la luz ultravioleta (UV), a la adición al medio de cultivo de mostaza nitrogenada, y de nitrosoguanidina fue demostrada por Pettijhon y Hanawalt (1964), y por Hanawalt y Haynes (1965).

En la actualidad es bien conocido que el cambio molecular inducido por la UV es reparado por el proceso definido como fotoreactivación, cuyo esquema general se obtuvo gracias a las conclusiones derivadas de la experimentación en el mismo sistema bacteriano. Por otra parte, el mecanismo de reparación en la obscuridad, descubierto por Setlow y Carrier (1964), consiste en que durante la ocurrencia del daño inicial inducido en el ADN por la exposición a la luz UV, tiene lugar un bloqueo en la replicación normal del ADN por la formación de dímeros de pirimidina, que son posteriormente separados del ácido nucleico, por enzimas específicas. Setlow y Carrier (1964), Boyce y Howard-Flanders (1964), y Howard-Flanders y Boyce (1966), denominaron a este mecanismo "reparación por escisión", en el que la región del ADN escindida es reemplazada subsecuentemente por los nucleótidos complementarios de la hélice no modificada. Pettijhon y Hanawalt (1964) obtuvieron evidencias físicas sobre la sucesión de las etapas señaladas en dicho proceso mediante el análisis por gradientes de densidad del ADN, comparando a la replicación semiconservativa normal, con la no conservativa del sistema, que tiene lugar durante la reparación.

Otros autores, como Mouton y Fromageot (1971), realizaron experimentos con el fin de demostrar la interferencia sobre los procesos de reparación *in vivo* que muestran algunos agentes químicos, dentro del modelo propuesto por Setlow (1963) y por Howard-Flanders y Boyce (1966). La demostración de Mouton (1971a) se basó en la inhibición de la reparación en la obscuridad, resultante del bloqueo que tiene lugar en el crecimiento, posteriormente a la exposición a la luz UV, por la luteosquirina, la cafeína y la rugulosina, en los mutantes de la cepa *E. coli* HCR—, UVR—, EXCR—.

Mouton (1971b) demostró que la acción antirreparadora de la luteosquirina se debe a la inhibición de la actividad de la polimerasa 1 del ADN, señalando que *E. coli* no es el sistema ideal para investigar la acción antirreparadora de dicha sustancia, ya que observó que la luteosquirina no penetra fácilmente la pared celular de la célula bacteriana. Esta propiedad, es probablemente resultante de la presencia demostrada de iones Mg^{++} en la pared celular bacteriana, que posibilitan la formación del complejo luteosquirina-Mg, que es insoluble. El mismo autor propuso a *Tetrahymena pyriformis* como un sistema biológico idóneo para la investigación sobre los mecanismos de reparación, puesto que se trata de un protozooario ciliado adaptable a la mayoría de las técnicas bacteriológicas, que se puede desarrollar en medios completamente axénicos. Otras características de este eucarionte, que facilitan el trabajo experimental son las siguientes: la longitud del segmento escindido del ADN después de irradiación con la luz U.V. es considerablemente más largo que el demostrado en *E. coli* (Brunk y Hanawalt, 1969; Mouton, 1971a); la absorción de los pigmentos amarillos (Ls) a través de su citosoma, tiene lugar efectivamente, por lo que no hay problemas derivados de la permeabilidad de la membrana, que pudieran interferir con el efecto antirreparador de la Ls posterior a la irradiación con la luz U.V. Otra propiedad utilizable de *T. pyriformis*, consiste en que algunas de las modificaciones morfológicas internas y externas resultantes de la irradiación son identificables fácilmente bajo el microscopio (Mouton, 1971b). La elección del nuevo modelo biológico fue ampliamente aceptado por varios autores, quienes prosiguieron sus investigaciones dando preferencia a *T. pyriformis*, después de ensayar otros microorganismos en experimentos similares. Por otra parte, las técnicas radiobiológicas empleadas para la investigación en protozoarios fueron establecidas por Lwoff desde 1932.

Brunk y Hanawalt (1969) reportaron asimismo, procesos de reparación en la obscuridad, del ADN en *T. pyriformis*, opinando que dicho microorganismo es un sistema biológico muy apropiado, cuya colocación sistemática queda situada entre la de las bacterias y la de las células de mamíferos. Otra propiedad intrínseca del protozooario citado, consiste en que su sensibilidad al efecto antirreparador de algunas drogas es mayor que la que muestran las

células de mamíferos *in vierto*. Con apoyo en los puntos de vista anteriores algunos autores corroboran la opinión de Schroeder *et al.* (1969), quienes consideran a *T. pyriformis* como el material biológico ideal para las investigaciones sobre la reparación en la oscuridad, por su posición filogenética intermedia entre los protocariontes y los organismos eucariontes.

En su hábitat natural, *T. pyriformis* está constantemente expuesto a la luz solar, ya que vive normalmente en la superficie de los estanques y de los ríos dulceacuícolas, por lo que su supervivencia está condicionada por su notable resistencia natural contra la inactivación por luz UV.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA LUZ VISIBLE

En el lapso de la última década han proliferado las investigaciones sobre *T. pyriformis*, que ocupan un lugar prominente dentro del campo de la radiobiología. Las radiaciones naturales, como la luz solar y los rayos cósmicos, a las que están expuestos los protozoarios en su microcosmos, constituyen un factor determinante de su conducta. Giese (1967) realizó un conjunto de experimentos en los que sometió a diversos protozoarios a la acción de radiaciones de distinta longitud de onda, incluyendo desde la luz UV hasta las radiaciones infrarrojas y a las ondas de radio.

Entre los efectos que observaron está el incremento de la temperatura intracelular, atribuible al "calor producido por la fricción del movimiento iónico inducido en las células por la alternancia rápida del campo de la onda" (Giese, 1967).

Es relevante citar a Grotthus (1818), quien demostró que consecuentemente a la absorción de la luz visible se promueven reacciones fotoquímicas y fotobiológicas, que son a su vez eventos desencadenantes de efectos fotodinámicos algunos de los que pueden modificar a la permeabilidad de la membrana. Este proceso requiere que se cumplan dos condiciones, a saber, que están presentes ciertos pigmentos, ya que la concentración de los mismos incrementa la fotosensibilidad, y la presencia del oxígeno que posibilita la fotooxidación. Posteriormente se observó que la acción fotodinámica no afecta únicamente a la célula de un modo superficial, dado que se modifican notablemente la viscosidad celular, la fotosensibilidad, la radiosensibilidad, la frecuencia con que ocurre la división celular y otros aspectos observables del comportamiento celular.

Un efecto ampliamente investigado de la luz visible en los microorganismos, es la fototaxia, que se ha explorado detalladamente en aquellos protozoarios que tienen manchas oculares, en los que la magnitud de la respuesta depende tanto de la intensidad, como de la longitud de onda de la luz empleada (Wichterman, 1972).

Los períodos de exposición a la luz visible afectan al ritmo circadiano de los protozoarios, efecto que es más notable en los que son fotosintéticos como *Gonyaulax sp.* y *Euglena sp.* (Wichterman, 1972.) Por otra parte, en los protozoarios que no son fotosintéticos como *Paramecium sp.*, las reacciones de apareamiento y de conjugación dependen de la duración que tienen los períodos de iluminación alternados con los de oscuridad completa.

EFFECTO BIOLÓGICO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

La contribución aportada por la investigación en protozoarios al estudio de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes es considerable. Como resultado de la exposición a radiaciones ionizantes tienen lugar dos mecanismos interdependientes conocidos como el efecto directo y el efecto indirecto, tratados históricamente con la considerable extensión que se requirió, dentro de la discusión de la teoría del blanco. El efecto general del oxígeno presenta durante la irradiación y durante la reparación, al nivel celular y al nivel molecular, recibió la valiosa contribución procedente de los estudios desarrollados en *T. pyriformis*. (Giese, 1967; Kalnii, 1967; Wichterman, 1972).

Otro resultado derivado de la incidencia de la radiación ionizante, fue el reportado por Giese (1967) quien investigó el efecto fotoquímico que las ondas de radio tienen en la célula. Dicho efecto fue explorado con anterioridad por Kalher *et al.* (1929), quienes concluyeron que en la paramecia no se manifiesta bajo cierto umbral, dado que se integran dentro del protozoario pequeñas zonas de calor por el movimiento de los iones, que deben sobrepasar un volumen crítico en el ámbito intracelular no electrolítico.

Gracias a los avances de la tecnología y del perfeccionamiento de la instrumentación, a partir de la segunda mitad del siglo pasado se desarrollaron investigaciones en una relación exponencial a la fecha, sobre el efecto biológico de las radiaciones ionizantes en varios sistemas biológicos. Schaudinn (1899) reportó el efecto de los rayos X sobre algunos rasgos conductuales de los protozoarios, debido a las alteraciones en el funcionamiento normal de los organelos locomotores.

Otros autores se refirieron a la variación en la radiosensibilidad presente entre los individuos del mismo clone, abundando los estudios comparativos entre las modificaciones resultantes en las curvas de supervivencia, y en los valores de la dosis letal media (DL50).

Back y Halberstaedter (1954) realizaron investigaciones sobre la supervivencia posterior a la irradiación en *P. caudatum*, encontrando que la gran variabilidad en la DL50 puede ser explicada en términos de la propia variación biológica del infusorio al nivel individual. Las manifestaciones concomitantes a la expresión de la radioresistencia, tienen relación asimismo, con la diferencia entre el tamaño del micronúcleo y del macronúcleo, así como con el grado de ploidía a del micronúcleo. Mortimer (1958) y Wells (1960) concluyeron que los infusorios portadores de un micronúcleo diploide son los más radioresistentes. Otro efecto que modifica a la radiosensibilidad del infusorio es el cambio en la viscosidad del protoplasma, evidente durante la división celular.

Williams (1968) reportó que la irradiación de cultivos sincronizados de *Spathidium spatula*, con dosis menores que la DL50, produce un aumento anormal del volumen celular, efecto que es debido, a su vez, a la inhibición de la división celular. Wichterman (1948) estudió el bloqueo de la división celular posterior a la exposición a los Rayos X, que tiene lugar tanto en los ciliados como en los rizópodos. Otros autores determinaron el efecto diferencial de las radiaciones correspondientes a los estadíos específicos del ciclo celular. Kalnii (1967) reportó las diferencias en la radiosensibilidad de *Amoeba sp.* durante varias de las etapas de su ciclo de vida. Los trabajos en *Paramecium sp.* señalan que, durante la fase de división, la radiosensibilidad es mayor. Giese (1967), Sparrow *et al.* (1970) y Wichterman (1972) demostraron que la inhibición de la mitosis resulta más efectiva si el período de irradiación coincide con el estadio interfásico denominado G2.

Un efecto de los rayos X, que es trascendente desde el punto de vista genético, consiste en la eliminación del micronúcleo de los ciliados. Kimbal (1949) sometió a *Paramecium* a dosis altas y repetitivas de radiación ionizante logrando mediante este procedimiento eliminar eventualmente al micronúcleo, efecto que se corroboró posteriormente en *T. pyriformis* y en *T. corlessi*.

La pérdida de micronúcleo conduce a cepas mutantes, sin reproducción sexual, ni desarrollo de las formas de resistencia características cuando las condiciones del medio son extremadamente desfavorables. En contraste con la desaparición de los micronúcleos consecutiva a la aplicación de radiaciones ionizantes, el macronúcleo no es afectado en su morfología.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Con respecto a la acción que ejerce la luz UV sobre los protozoarios, se cuenta con algunas generalizaciones extrapolables a otros niveles de la organización celular, ya que se ha demostrado que para que los efectos de la luz UV tengan lugar, se requiere su incidencia directa sobre la célula, incluyéndose entre los múltiples efectos reportados, la formación de peróxidos en el citoplasma, la sensibilización consecutiva al calor, la citolisis irreversible precedida por cambios morfológicos característicos y el retardo de la fisión celular. La exposición a las ondas más cortas de la luz UV alteran significativamente al ritmo de la reproducción (Brunk y Hanawalt, 1967).

Otro efecto biológico general de la luz UV es la fotoreactivación, que es un proceso que se investigó originalmente en los sistemas bacterianos, demostrándose posteriormente su ocurrencia en los hongos, en los protozoarios, en las células de algunos vertebrados, y en las células de vertebrados *in vierto* (Schroeder *et al.* 1969; Giese, 1967). La fotoreactivación ocurre conjuntamente con la inhibición temporal de algunas de las funciones celulares. Giese (1967) reporta que dicho efecto está asociado a alteraciones en la síntesis de las proteínas y que asimismo, es un proceso que produce indirectamente modificaciones en varios aspectos del comportamiento de los protozoarios.

Entre los experimentos iniciales sobre la fotoreactivación están los de Schroeder *et al.* (1969), Goda *et al.* (1967), Kurnik *et al.* (1950); quienes postularon y demostraron la existencia de una enzima que participa en la reparación de los daños inducidos por la luz UV *in vitro*.

Francis y Whiston (1969) estudiaron la desaparición de los dímeros de pirimidina en *T. pyriformis* irradiada con luz UV concluyendo que la monomerización, es una reacción enzimática inducida por la exposición a la luz fotoreactivante. La producción de dímeros de timina en el ADN está asociada asimismo a los procesos de mutación y muerte celular (Francis y Whiston, 1969).

Otra modalidad que se ha demostrado en la reparación de los daños inducidos por la luz UV es la reparación por escisión o reparación en la obscuridad. El modelo derivado de las investigaciones en *E. coli*, fue comprobado

por diversos autores en *T. pyriformis* (Brunk y Hanawalt, 1967; Howard-Flanders y Boyce, 1966; Mouton, 1971a; Setlow, 1967) Los trabajos de Brunk y Hanawalt (1967), conjuntamente con los de Calkins (1966) comprobaron la hipótesis en favor de que la reparación por escisión en *T. pyriformis* sigue un patrón similar al que tiene lugar en *E. coli*.

ASPECTOS ENZIMÁTICOS DE LA REPARACIÓN

Para la caracterización de la síntesis enzimática de la polimerasa 1 del ADN, Keiding y Westergaard (1971) expusieron a *T. pyriformis* tanto a la acción de la luz UV como a la de electrones acelerados, postulando que la inducción de la polimerasa 1 del ADN, es una síntesis *de novo*, que constituye una de los eventos fundamentales que tienen lugar durante la reparación del ADN, ya que la síntesis de dicha enzima coincide con el bloqueo de la división celular, que es a su vez, la etapa durante la que se efectúa la extensa reparación del ADN en dicha especie, retornando a su normalidad los niveles de síntesis de la polimerasa citada al reanudarse la división celular. Los mismos autores localizaron en las mitocondrias a la enzima o fracciones enzimáticas inducidas *de novo* por los agentes citados. Keiding y Westergaard (1971) expusieron a *T. pyriformis* a la acción de la radiación ionizante y a la de la luz UV concluyendo que el daño en el ADN mitocondrial, es más acentuado que el que tiene lugar en el ADN nuclear.

Otros autores como Kneser *et al.* (1965), Calkins (1967), Chou *et al.* (1968), y Mouton (1971b), investigaron el efecto de algunos agentes químicos incluyendo a la luteosquirina, a la quinacrina, a la rugulosina y a la cafeína, durante los procesos de reparación del daño inducido por la luz UV reportando el efecto radioquímico que tienen tanto la luteosquirina como la quinacrina en *T. pyriformis*.

Los resultados obtenidos a la fecha en las abundantes investigaciones sobre la biología y sobre la radiobiología de *T. pyriformis* tienen en algunos casos relevancia a los humanos, dado que son múltiples los componentes ambientales, físicos o químicos que pueden afectar a la salud, que es posible investigar, tanto cualitativa como cuantitativamente en dicho protozoario. De esta manera, se han aclarado en el laboratorio los efectos de algunos agentes medicinales en un microorganismo idóneo para tales propósitos, mediante experimentos relativamente sencillos, como los reportados por: Dysart y Corliss, 1960 (colcemida y colchicina), Clancy, 1968 (fosfato de cloroquina, fosfato de primaquina, sulfato de quinina y otras), Wunderlich y Peyk, 1969 (colcemida y colchicina), Nathan y Frieman, 1961 (clorpromazina), Hwang *et al.*, 1964 (dimetilsulfóxido a bajas temperaturas), Concklin y Chou, 1972 (quinacrina y quinina), Mouton, 1971a (rugulosina, cafeína, luteosquirina y quinacrina).

LA QUIMIOTERAPIA DE LA MALARIA EN RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

La quinina es el agente preventivo y curativo empleado desde la mayor antigüedad para el tratamiento de la malaria, a pesar de que son conocidos sus efectos al nivel celular que justifican su clasificación como un agente citotóxico general. Hahn *et al.* (1966) descubrieron que la quinina interfiere en algunas de las reacciones de la polimerasa del ADN y del ARN *in vitro*, proponiendo que se forma un complejo entre el ADN y la quinina mediante enlaces de hidrógeno. Concklin *et al.* (1969) proporcionaron datos experimentales en favor de que la acción de la quinina es resultante del bloqueo de las fuentes de la energía que requiere la síntesis bioquímica, atribuyendo a la interferencia con la síntesis del ADN y de las proteínas, los efectos secundarios.

Scherbaum y Zeuthen (1954) elaboraron un procedimiento para la sincronización de los cultivos de *T. pyriformis*, que simplificó la prueba sobre los efectos que tienen algunas de las drogas, ya sea sobre el crecimiento o sobre la división celular. El procedimiento fue aplicado para la investigación de los posibles síntomas producidos por varias substancias empleadas como agentes curativos (Lazarus *et al.*, 1964; Lee *et al.*, 1959; Mita *et al.*, 1965; Scherbaum y Loefer, 1964; Singer *et al.*, 1960).

Existen formas de malaria producidas por *Plasmodium falciparum* que son prevenidas o curadas radicalmente por las drogas antimaláricas convencionales (Hickman *et al.*, 1966). En especial, el aislamiento de líneas de *P. falciparum* que son resistentes a la cloroquina ha impulsado a la búsqueda de drogas más potentes, así como a la investigación sobre los postulados involucrados en la prevención y en la curación de la malaria causada por las líneas resistentes de *P. falciparum*. Hahn *et al.* (1966) seleccionaron a *Bacillus megaterium* como un organismo de prueba adecuado para el estudio de la acción de la cloroquina. Posteriormente Ciak y Hahn (1967) aclararon la acción de la quinacrina en *E. coli*. No obstante, la experimentación con estos organismos de prueba depende de las limitaciones que ofrecen los métodos convencionales, por lo que Chou *et al.* (1968) investigaron extensivamente a la quinacrina y a otros medicamentos antimaláricos cuando se añaden al medio de cultivo de *T. pyriformis*, con el propósito de proponer a dicho infusorio como un sistema general de prueba, aplicable a estudios posteriores, considerando además, que *T. pyriformis* es un protozoario, como lo son los parásitos que causan la malaria.

Los resultados obtenidos por Chou y Ramanathan (1968), demuestran que la quinacrina a la concentración de 12 microgramos por mililitro interfiere en la división celular sincronizada. Como el momento de la adición de la droga es crítico, se han determinado cuando menos dos fases específicas durante el período de recuperación posterior a la adición de la quinacrina a las células sincronizadas. El patrón de inhibición de la dactomicina en *T. pyriformis* es similar al que tiene lugar en *E. coli* tratada con quinacrina, por lo que es probable que esta sustancia interrumpa la división celular en *Tetrahymena* al interferir con la síntesis de los ácidos nucleicos.

Concklin *et al.* (1971) estudiaron los efectos derivados de la adición de la quinina, de la cloroquina, de la primaquina y de la quinacrina, sobre la incorporación del ^{14}C (Timidina ^{14}C , uridina ^{14}C y aminoácidos ^{14}C) en cultivos sincronizados de *T. pyriformis*. La quinacrina impide la incorporación tanto de la timidina como la de la uridina, puesto que esta droga interfiere directamente la síntesis del ADN y del ARN, mientras que la quinina, la cloroquina y la primaquina impiden indirectamente la incorporación de los precursores citados al ADN, al ARN y a las proteínas, respectivamente.

En la actualidad, los trabajos sobre la biología, la genética y la radiobiología de los eucariontes son complementados significativamente por los hallazgos demostrados en *T. pyriformis*, que por su misma abundancia no se incluyeron en el presente contexto.

BIBLIOGRAFÍA

- BACK A. Y L. H. HALBERSTAEDTER, 1945. Influence of biological factors on the form of Roentgen-ray survival curves. Experiments on *Paramecium caudatum*. *Amer. J. Roengenol.* 54: 290-295.
- BOYCE R. P. y P. HOWARD-FLANDERS, 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51: 226.
- BRUNK C. F. y P. C. HANAWALT, 1967. Repair of damage DNA in a eucaryotic cell: *Tetrahymena pyriformis*. *Science*. 158 (3801): 663-664.
- , 1969. The nature of the excision-repair region in the DNA from a eucaryotic organisms, *Tetrahymena pyriformis*, *Rad. Res.* 38: 285-295.
- CLAK J. y F. E. HAHN, 1967. Quinacrine (atebrine): Mode of action, *Science* 156: 655.
- CALKINS J., 1966. The dose-response relation for the photoreactivation of ultraviolet inactivated stationary phase *Tetrahymena pyriformis*, *Photochem. Photobiol.* 5: 787-795.
- , 1967. Similarities in the radiation response of *Escherichia coli* and *Tetrahymena pyriformis*. *Int. J. Radiat. Biol.* 13 (3): 283-288.
- CHOU S. C. Y S. RAMANATHAN, 1968. Quinacrine: Site of inhibition of synchronized cell division in *Tetrahymena*. *Life Science* 7 part II: 1053-1062.
- y W. C. CUTTING, 1968. Quinacrine: Inhibition of synchronized cell division in *Tetrahymena*. *Pharmacology*, 1: 60-64.
- CLANCY C. F., 1968, The lethal effect of certain antimalarial drugs on *Tetrahymena pyriformis*. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.* 17 (3): 359-363.
- CONKLIN K. A., S. C. CHOU Y S. RAMANATHAN, 1969. Quinine: effect on *Tetrahymena pyriformis*, I.—Inhibition of synchronized cell division and site of action. *Pharmacology*. 2: 247-256.
- , S. C. CHOU Y P. HEU, 1971. Quinine: Effect on *Tetrahymena pyriformis*. III.— Energetics of isolated mitochondria in the presence of quinine and other antimalarial drugs. *Biochem Pharmacol.* 20: 1877-1882.
- y S. C. CHOU, 1972. The effect of antimalarial drugs on uptake and incorporation of macromolecular precursors by *Tetrahymena pyriformis*. *The J. of Pharmacol. and Exp. Therap.* 180 (1): 158-166.
- DYSART M. P. y J. O. CORLISS, 1960. Effect of colchicine and colcemide on fission rate and macromolecular structure in *T. limacis* *J. of protozool.* 7 Suppl: 10.
- FRANCIS A. A. y G. L. WHISTON, 1969. Ultraviolet-induced pyrimidine dimers in *Tetrahymena pyriformis*. *In vivo*

- photoreactivation. *Biochem. Biophys. Acta*, 179: 254-257,
- GIESE A. C., 1967. Effects of radiation upon protozoa. *Chem. T. Research in Protozool.* 2: 267-356.
- GOODAL *et al.*, 1967. *J. of Protozool.* 16, Suppl. 16: 11.
- GROTTHUS, 1818. *Chem. T. Research in Protozool.* 2: 276.
- HAHN F. E., R. L. O BRIEN, J. CIAK, J. L. ALLISON y J. G. OLCNICK, 1966. Studies on modes of action of chloroquine, quinacrine and quinine and on chloroquine resistance, *Milit. Med., Suppl. Ad.* 131: 1071,
- HANAWALTH P. C. y R. H. HAYNES, 1965. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 19: 462.
- HICKMAN R. L., W. S. GOCHANUR, J. D. MARSHALL Jr., y N. B. GUILLOUD, 1966. Drug resistant *Plasmodium falciparum* in the chimpanzee. *Milit. Med. Suppl. ad.* 131: 935.
- HOWARD-FLANDERS P. y R. P. BOYCE, 1966. DNA repair and genetic recombination: Studies on mutants of *Escherichia coli* defective in these processes. *Rad. Res. Suppl.* 6: 156 184.
- HWANG S., F. E. DAVIS y M. T. ALEXANDER, 1964. Freezing and viability of *Tetrahymena pyriformis* in dymethylsulfoxide. *Science*, 144: 64-65.
- KAHLER, H., K. W. CHALKLEY y C. VOETLIN, 1929. The nature of the effect of a high-frequency electric field upon *Paramecium*. *U.S. Publicity Health Report*, 44: 338-347.
- KALN, II R. 1967. Radiosensitivity of ameba depending on the irradiation conditions and the stage of the cell cycle. *Tsitologiya*, 9: 1537-1542.
- KEIDING, J., y O. WESTERGAARD, 1971. Induction of DNA polymerase activity in irradiated *Tetrahymena pyriformis* cells. *Exp. Cell. Res.* 64: 317-322.
- KIMBALL R. F., 1949. Inheritance of mutational changes induced by radiation in *Paramecium aurelia*. *Genetics* 34: 412-424.
- KNESER H., METZGER K. y W. SAVERBIER, 1965. *Virology*, 27: 213.
- KURNICK *et al.*, 1950. An *in vitro* study of photoreactivating enzymes of *Tetrahymena pyriformis* *J. of Protozool.* 16, Suppl. 16: 11.
- LAZARUS L. H., M. R. LEVY y O. H. SCHERBAUM, 1964. Inhibition of synchronized cell division in *Tetrahymena* by actinomycin D. *Exp. Cell. Res.* 36: 672,
- LEE K. H., Y. O. YUZURIHA y J. J. EILER, 1959. Studies on cell growth and cell division. II. Selective activity of chloroamphenicol and azaserine on cell growth and cell division. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.* 48: 470.
- LWOFF A., 1932. Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires: 42. *Mason, Paris.*
- MITA T., R. TOKVZEN, F. FUKNOKA y W. NARAHARA, 1965. Effect of 4-nitroquinoline 1-oxide and related compounds on normally and synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*. *G. L. Gann*, 56: 293.
- MORTIMER B. K., 1958. Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat. Res.*, 9: 312-326.
- MOUTON R. F., 1971a. DNA-repair inhibitors and carcinogenesis. *First. Europ. Bioph. Con.* 14: 241-250.
- , 1971b. DNA-repair inhibitors and carcinogenesis: inhibition of post-UV irradiation growth in the dark of *Tetrahymena pyriformis*, by caffeine and the oncogenic mycotoxin luteoskyrin. *Altman H. Symp. Med. Holchst.*: 197-212.
- y P. FROMAGEOT, 1971. Inhibition of post-UV irradiation growth in the dark of *Tetrahymena pyriformis* by caffeine and the oncogenic mycotoxin luteoskyrin. *FEBS Letters* 15 (1): 45-48.
- NATHAN H. A. y W. FRIEDMAN, 1961. Chlorpromazine affects permeability of resting cells of *Tetrahymena*

pyriformis. *Science* 135: 793-794.

PETTIJHON P. y P. HANAWALT, 1964. Evidence for repair-replication of ultraviolet damage DNA in bacteria. *J. Mol. Biol.* 9: 395-410.

SCHAUDINN F., 1899. Über den Einfluss der Röntgenstrahlen auf Protozoen, *Pflügers Arch. d. ges. Physiol.* 77: 29-43.

SCHERBAUM O. H. Y J. B. LOEFER, 1964. Biochemistry and Physiology of Protozoa. vol. III: 9-59. Academic Press, N. York. 1964.

—y E. ZEUTHAN, 1954. Induction of synchronous cell division in mass cultures of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res* 6: 221.

SCHROEDER E. W., V. P. MESKILL y J. G. GERNER, 1969. An *in vitro* study of photoreactivating enzymes of *Euglena gracilis* and *Tetrahymena pyriformis*. *J. of Protozool.* 16, Suppl. 16: 11.

SETLOW R. B., 1963. Molecular changes responsible for ultraviolet inactivation of the biological activity of DNA. *Science*, 142: 291-307.

—, 1967. *Comprehensive Biochem.* 27: 157-209.

—y W. L. CARRIER, 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51: 226.

SINGER, W., K. H. LEF y J. J. EILER, 1960. The biological action of cellular depressant and situmulant. IV *J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.* 49: 90.

SPARROW A. H., S. S. SCHWEMMER y E. E. KLUG, 1970. Long term survival of 13 species of woody plants under chronic 60 gamma irradiation *IVth. Int. Cong. Radiat. Res. (Evian) by R. Bellanger and Son. A La Ferte-Bernard (Sarthe) France.* Abs. 802.

WELLS C., 1960. *J. Cell. Comp. Physiol.* 55: 207.

WICHTERMAN 1948. The biological effects of X rays on mating types and conjugation of *Paramecium bursaria*. *Biol. Bull.* 94. 113-127.

WICHTERMAN R., 1972. Biological effects of ionizing radiations on protozoa: Some discoveries and unsolved problems. *Bioscience* 22 (5): 281-289.

WILLAMS D. F., 1968. Sensitivity of *Spathidium spathula* *J. Protozool* 9: 119-122.

WUNDERLICH F. Y D. PEYK, 1969. Antimitotic agents and macronuclear division of ciliates. 1.-Colchicine and colcemide in exponentially growing cultures of *Tetrahymena pyriformis* *G. L. Jg. Heft.* 5: 285-286.