

MECANISMOS DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA PROLIFERACION CELULAR DE LOS DINOFLAGELADOS MARINOS *Prorocentrum lima* Y *Prorocentrum triestinum*: 2-USO DE LECTINAS IN VITRO.*

ANGELES AGUILERA¹, SONSOLES GONZALEZ-GIL¹, ELISABETH GONZALEZ DE CHAVARRI¹, VICTORIA LOPEZ-RODAS¹, EDUARDO COSTAS¹

ABSTRACT: Angeles Aguilera¹, Sonsoles González-Gil¹, Elisabeth González de Chavarri¹, Victoria López-Rodas¹ and Eduardo Costas¹. Biological control mechanisms of the marine dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum triestinum*: 2-Use of lectins in vitro.

The effects of different lectins (Concanavalin A, Phaseolus vulgaris, Phaseolus limensis, Phytolacca americana, and Erythrina cristagalli) on dinoflagellate proliferation were analyzed in axenic clonal cultures of *Prorocentrum triestinum* Schüller and *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. According with the hypothesis concerning a universal mechanism controlling the cell division cycle in all the eukaryotic cells, apparently dinoflagellates respond to lectins like mammalian cells do. Some of the lectins assayed, Erythrina cristagalli, Phaseolus vulgaris, and Phytolacca americana increased cell yield and acclimated maximal growth rates of *P. triestinum*. On the contrary, only Erythrina cristagalli and Phaseolus vulgaris increased statistically significant the cell yield of *P. lima*. The presence of lectins in many marine organisms and its abundance in macrophyta, suggest that lectins could play a significant, positive or negative, role in the occurrence and proliferation of dinoflagellates, specially in epiphytic dinoflagellates as *P. lima*.

Key words: Lectins, Growth Factors, Dinoflagellates, *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum triestinum*.

RESUMEN: Angeles Aguilera¹, Sonsoles González-Gil¹, Elisabeth González de Chavarri¹, Victoria López-Rodas¹ y Eduardo Costas¹. Mecanismos de control biológico de la proliferación celular de los dinoflagelados marinos *Prorocentrum lima* y *Prorocentrum triestinum*: 2-Usos de lectinas in vitro.

Se analizaron los efectos de diferentes lectinas (Concanavalin A, Phaseolus vulgaris, Phaseolus limensis, Phytolacca americana y Erythrina cristagalli) sobre la proliferación de dinoflagelados en cultivos clonales axénicos de *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge y *Prorocentrum triestinum* Schüller. De acuerdo con la hipótesis que supone que un mecanismo universal controla el ciclo de división celular en todas las células eucariotas, aparentemente los dinoflagelados responden a las lectinas en la misma forma a como lo hacen las células de mamífero. Algunas de las lectinas ensayadas, Erythrina cristagalli, Phaseolus vulgaris y Phytolacca americana incrementaron de forma estadísticamente significativa la densidad celular en *P. triestinum*, mientras que para *P. lima* solo tuvieron actividad mitógena Erythrina cristagalli y Phaseolus vulgaris. La presencia de lectinas en numerosos organismos marinos y su abundancia en los macrofitos, sugieren que las lectinas podrían jugar un papel significativo, tanto positivo como negativo, en la aparición y proliferación de dinoflagelados, especialmente en los epifitos como *P. lima*.

Palabras claves: Lectinas, Factores de crecimiento, Dinoflagelados, *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum triestinum*.

¹ Genética. Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 MADRID.

* Trabajo financiado por los proyectos IN 89-0163 y PS 89-0014, así como por la FCAECC.

INTRODUCCION

Los dinoflagelados se encuentran entre los protistas más estudiados tanto por su importancia en los ecosistemas costeros (Margalef 1989) como por su relevante papel en el origen de las células eucariotas (Costas & López-Rodas 1991a) o por su interés aplicado debido a la toxicidad que presentan algunas de sus especies (Yasumoto 1990). Tradicionalmente se asume que las proliferaciones masivas tan características de los dinoflagelados son el resultado de la compleja interacción de factores físicos del medio, como corrientes, mareas o eutrofización, o de factores biológicos como ritmos endógenos, control de germinación de quistes, etc... (Fraga & Prego 1989, Figueiras 1989, Margalef 1989, Costas *et al.*, 1990, Taylor 1990).

No cabe duda que los factores físicos desempeñan un papel fundamental, hasta el punto que muchas especies productoras de mareas rojas de los géneros *Dinophysis* o *Gymnodinium* presentan tasas de división relativamente bajas en condiciones normales y muy similares a las de otras microalgas que no producen mareas de este tipo. Por otra parte, los factores biológicos que regulan la división celular están siendo cada vez más estudiados en dinoflagelados (Costas & Varela 1988, Edmunds 1988, Wyatt & Reguera 1989). Un análisis en profundidad de los mecanismos que controlan la regulación del ciclo celular en organismos eucariotas, indica la existencia de un control riguroso y preciso de la división celular, modulado por factores de crecimiento, y por genes y productos génicos que responden a dichos factores de crecimiento (Goustin *et al.* 1986, Cantley *et*

al. 1991, North 1991). Los mecanismos que regulan la división celular parecen ser universales para todas las células eucariotas (Nurse 1990, Cantley *et al.* 1991, North 1991). Incluso microalgas pertenecientes a diferentes Phyla (Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Conjugatophyceae, Dinophyceae) responden ante la presencia de factores de crecimiento animales y mitógenos específicos, incrementando de forma estadísticamente significativa sus tasas de división (Costas & López-Rodas 1991a, López-Rodas *et al.* 1991, 1992).

En este sentido las tasas de reproducción de los dinoflagelados se ven considerablemente incrementadas por la presencia en el medio de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (Costas & López-Rodas 1991a) o de mitógenos específicos que actúan por la vía de los inositol-fosfato como los ésteres de forbol (Costas & López-Rodas 1991a), tanto en dinoflagelados Dinophyceae del género *Alexandrium* (Costas & López-Rodas 1991a) como en dinoflagelados Desmophyceae del género *Prorocentrum* (López-Rodas *et al.* 1992).

De entre las moléculas que pueden intervenir en el control de la división celular destacan las lectinas. Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que presentan unas propiedades muy peculiares: son capaces de unirse de forma específica, no covalente y reversible a azúcares de membrana. Todas las lectinas presentan dos o más sitios de unión para un mismo azúcar, lo que les confiere la propiedad de poder aglutinar células y la capacidad de reaccionar con conjugados glicoproteícos (Wu *et al.* 1988).

En la actualidad, debido a sus particulares características que permiten una fácil visualización mediante microscopía de fluorescencia o electrónica, son empleadas en numerosos campos de la ciencia que abarcan desde la biología molecular hasta la microbiología clínica. Así, se utilizan para mostrar cambios en la arquitectura de la superficie celular (Alves & Colli 1974), como marcadores del estado de diferenciación de las células, así como en la detección de células infectadas por virus, bacterias y parásitos (Aitchison *et al.* 1986).

Desde hace tiempo se conoce la actividad tanto mitógena como citotóxica que presentan numerosas lectinas sobre líneas celulares de mamíferos (Hart 1980, Damjanov 1987, Slifkin & Doyle 1990). Recientemente hemos estudiado la influencia de una lectina (Concanavalin A) sobre los mecanismos de control de la sincronía de la división celular en el alga conjugada filamentosa *Spirogyra insignis* (Hassall) Kutz (Costas & López-Rodas 1991b).

Aunque las primeras lectinas se aislaron de vegetales, en la actualidad se sabe que casi todos los seres vivos las producen y, además, son abundantes en el medio marino, especialmente en macroalgas de donde han sido aisladas recientemente (Slifkin & Doyle 1990). Así parece interesante analizar los efectos mitógenos o citotóxicos de las lectinas sobre los dinoflagelados. En este trabajo, estudiamos los efectos de ciertas lectinas sobre la proliferación de dos especies de dinoflagelados, uno de ellos, *Prorocentrum lima* Ehrenberg, bentónico y que prolifera epifito sobre macroalgas, y el otro, *Prorocentrum triestinum* Schiller,

planctónico. Este trabajo continúa la línea de estudio de los mecanismos de control biológico de la proliferación de dinoflagelados marinos, iniciada recientemente con el estudio del efecto de factores de crecimiento y mitógenos sobre estas mismas especies de dinoflagelados (López-Rodas *et al.* 1992).

MATERIAL Y METODOS

El material biológico y de laboratorio, las técnicas empleadas y el diseño experimental, son básicamente similares a los desarrollados en nuestro reciente trabajo sobre los efectos de factores de crecimiento y mitógenos en la proliferación de estos mismos dinoflagelados (López-Rodas *et al.* 1992), por lo cual se comentan de forma resumida.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Un clon de *P. lima* procedente de la bahía de La Coruña y otro de *P. triestinum* procedente de la colección del Instituto Español de Oceanografía de Vigo fueron aislados a partir de una sola célula vegetativa haploide y cultivados en placas de Petri con 20 ml de agua de mar enriquecida con medio f/2 sin silicatos (Guillard, 1975). Los clones se mantuvieron en cámaras de cultivo a temperatura constante de 20 ± 1 °C, una intensidad lumínica de $50 \mu\text{Eins m}^{-2} \text{sg}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12 horas de luz-oscuridad. Para conseguir mantener los cultivos axénicos, se trataron con 150 mg/l de Penicilina y 100 mg/l de Estreptomicina en pulsos de 6 horas.

Los clones se conservaron en el tiempo mediante transferencias seriadas de un inóculo de $10^4 \pm 10^2$ células a me-

dio fresco cada 15 días. Fueron cultivados en condiciones de asepsia rigurosa comprobándose la ausencia de bacterias mediante chequeos periódicos del cultivo con técnicas de epifluorescencia previa tinción con naranja de acridina (Costas 1986, 1990, Costas *et al.* 1988).

DESARROLLO EXPERIMENTAL:

Previamente a la realización del experimento, los clones crecieron en medio artificial ASPM f/2 (Guillard 1975) para eliminar cualquier posible traza de lectinas o mitógenos procedentes del agua de mar.

Para comprobar el posible efecto mitógeno de las lectinas sobre los cultivos de *P. lima* y *P. triestinum*, seis replicados de cada clon fueron cultivados bajo las mismas condiciones experimentales que se mencionaron anteriormente en placas multiensayo de 10 ml con agua de mar artificial ASPM f/2 (Guillard 1975) suplementándose el medio con las siguientes lectinas:

- Concanavalin A (CON A, SIGMA) 64 µgr/ml.
- Phytolacca americana (PWM, SIGMA) 25 µgr/ml.
- Erythrina cristagalli (ECA, SIGMA) 0,5 µgr/ml.
- Phaseolus vulgaris (PHA, SIGMA) 10 µgr/ml.
- Phaseolus limensis (LBL, SIGMA) 10 µgr/ml

Además dispusimos de un control no suplementado con lectinas. Los replicados se mantuvieron a lo largo de toda la experiencia en cámaras de cultivo bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas anteriormente.

Para estimar el efecto de las diferentes lectinas se realizaron 20 recuentos

celulares diarios durante 13 días consecutivos en un hemocitómetro (Stein 1973). El número de recuentos fue estimado mediante la técnica de las medias progresivas de Williams (1977) obteniéndose así un error inferior al 5% en todos los casos. El volumen de las muestras llevadas a recuento fue despreciable (0,9 10⁻³ ml en cada recuento), no provocando una disminución apreciable en el volumen total de cultivo.

Como método para estimar la tasa de reproducción, utilizamos el modelo de Crow & Kimura (1970) para determinar la proliferación de una población celular como divisiones y muertes distribuidas aleatoriamente de forma continua, calculando el parámetro de crecimiento maltusiano m en divisiones por día usando la expresión: $N_t = N_0 e^{mt}$ donde, N_t es el número de células en el tiempo t , N_0 el número de células en el tiempo 0 y t , el tiempo en días.

Determinamos las máximas tasas de reproducción aclimatadas en la fase de mayor crecimiento exponencial que correspondió a 4 días, en el caso de *P. triestinum* y a 10 días para *P. lima*. Experimentos previos en los que filmamos en video y visualizamos a cámara rápida la cinética de crecimiento de estos clones, nos llevaron a elegir este modelo que ajustaba perfectamente a las características del crecimiento de estos clones.

Antes de empezar las valoraciones experimentales, se esperó a que los cultivos estuviesen aclimatados.

Las valoraciones estadísticas se realizaron comparando las tasas de reproducción obtenidas en cada una de las

lectinas con las obtenidas en los controles no sometidos a lectinas, utilizando para ello, la prueba estadística no paramétrica

de la U de Man-Whitney (Man & Whitney 1947).

Tabla 1: Tasas máximas de reproducción (media±desviación típica) en divisiones por día *Prorocentrum triestinum* y *Prorocentrum lima* en medios suplementados con lectinas y en los controles sin suplementación.

Table 1: Acclimated maximal growth rates (mean±standard deviation) in doubling day⁻¹ of *Prorocentrum triestinum* and *Prorocentrum lima* clones under lectins supplemented culture media and unsupplemented controls.

CONTROL	Erythrina cristagalli	Phaseolus limensis	Concanav. A	Phaseolus vulgaris	Phytolacca americana
<i>P. triestinum</i>					
Pt-1	1,07 ± 0,02	1,19 ± 0,01*	1,10 ± 0,03	1,07 ± 0,03	1,24 ± 0,01*
<i>P. lima</i>					
Pl-1	0,49 ± 0,01	0,54 ± 0,02*	0,45 ± 0,01#	0,51 ± 0,02	0,54 ± 0,01*

* Lectinas que incrementaron significativamente la tasa de reproducción de los dinoflagelados.

Lectinas que disminuyeron significativamente la tasa de reproducción de los dinoflagelados.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 quedan reflejadas las tasas de reproducción máximas aclimatadas de las dos especies de dinoflagelados analizadas, tanto en medios suplementados con lectinas como en los controles.

En el caso de *P. triestinum* se observa un incremento estadísticamente significativo de su tasa de división cuando el medio de cultivo es suplementado con *Erythrina cristagalli* ($p < 0,01$), *Phaseolus vulgaris* ($p < 0,01$) y *Phytolacca americana* ($p < 0,05$), no observándose ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a la tasa de división del control cuando el clon creció en presencia de *Phaseolus limensis* ($p > 0,05$) y Concanavalin A ($p > 0,05$). De las 5 lectinas ensayadas 3 presentan ac-

ción mitógena cuando se suplementan con ellas los cultivos de *P. triestinum*. El efecto mitógeno más acusado se aprecia en *Phaseolus vulgaris*, que incrementa la tasa de reproducción de *P. triestinum* en un 15% si la comparamos con el control. La tasa de reproducción se incrementa un 11% si se suplementan los cultivos con *Erythrina cristagalli* y un 5% si la suplementación se hace con *Phytolacca americana*.

Los resultados obtenidos para *P. lima* quedan reflejados, de igual manera, en la Tabla I, difiriendo bastante con respecto a los anteriores. Para esta especie, de las 5 lectinas ensayadas sólo *Erythrina cristagalli* y *Phaseolus vulgaris* incrementan debilmente la tasa de reproducción en *P. lima*, de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$ para ambos casos).

Los replicados suplementados con Concanavalin A no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en sus tasas de reproducción con respecto a la obtenida para el control. Por su parte *Phytolacca americana* y *Phaseolus limensis* disminuyen de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$ y $p < 0,05$ respectivamente) las tasas de reproducción de los replicados suplementados con estas lectinas con respecto a la del control.

Tradicionalmente se asume que las condiciones ambientales de tipo físico como luz, temperatura, nutrientes, turbulencias, etc., son las que regulan la proliferación de las poblaciones naturales de dinoflagelados. Sin embargo, durante la última década, se han desarrollado algunas aproximaciones relativas a la existencia de mecanismos de autocontrol biológico. Se han descrito mecanismos de reloj biológico que controlan el ritmo circadiano de microalgas (revisado por Edmunds 1983, 1988, Anderson & Keafer 1987, Costas & Varela 1988, 1989, Costas *et al.* 1990), se han propuesto mecanismos de tipo Gaiano que controlarían la aparición de los blooms de dinoflagelados (Wyatt & Reguera 1989) y se han encontrado fenómenos de envejecimiento en algas unicelulares similares a los existentes en células de mamíferos (Costas & López-Rodas 1991c).

En este sentido, cada vez existen más evidencias sobre la existencia de un mecanismo de control de la división celular basado en factores de crecimiento, que sería universal a todos los organismos tanto procariotas como eucariotas (Nurse 1990, Cantley *et al.* 1991, Costas & López-Rodas 1991a, López-Rodas *et al.*

1991, North 1991).

Por otro lado, muchas lectinas son capaces de inducir mitosis en numerosas líneas celulares de mamíferos y también parecen participar en el control del ciclo celular de organismos filogenéticamente menos evolucionados como los dinoflagelados, produciendo complejas respuestas en su proliferación. De esta forma, mientras que unas lectinas actúan como potentes mitógenos, otras parecen ser citotóxicas, e incluso algunas no parecen tener efecto sobre la proliferación de este tipo de organismos (Slifkin & Doyle 1990).

De esta manera, *Erythrina cristagalli*, *Phaseolus vulgaris* y *Phytolacca americana*, provocan un aumento significativo de la proliferación celular en *P. triestinum*. Por el contrario, en *P. lima*, *Erythrina cristagalli* y *Phaseolus vulgaris* son las lectinas que incrementan la tasa de reproducción en este organismo, mientras que Concanavalin A no afecta aparentemente al crecimiento de este clon. Debemos destacar el hecho de que *Erythrina cristagalli* aumente de forma estadísticamente significativa la densidad celular en las dos especies de dinoflagelados ya que es, de las cinco lectinas ensayadas, la única en la que no se ha descrito actividad mitógena en líneas celulares de mamífero. Este efecto mitógeno que presentan las lectinas en estas dos especies de dinoflagelados, podría estar estrechamente relacionado con la presencia de receptores de membrana para factores de crecimiento en la superficie celular de estos organismos, al igual que ocurre en las células eucariotas más evolucionadas, hecho que han puesto de manifiesto recientes estudios (López-

Rodas *et al.* 1991, 1992).

Hay que tener en cuenta que los receptores para factores de crecimiento presentan en su dominio extracelular numerosos restos glucídicos a los que se unirían las lectinas, siempre de forma específica, las cuales actuarían como análogos del factor de crecimiento correspondiente activando la vía inositol-fosfato e induciendo la proliferación celular, de igual manera a lo que ocurriría en presencia del factor de crecimiento correspondiente.

Sin embargo, no todas las lectinas ensayadas presentan un efecto mitógeno acusado, sino que también pueden tener una acción citotóxica. Así, tenemos el caso de *Phytolacca americana* y *Phaseolus limensis*, cuya presencia en el medio de cultivo de *P. lima* disminuye de forma drástica su crecimiento, obteniéndose en ambos casos una tasa de reproducción muy inferior a la del control. Este tipo de efectos citotóxicos han sido ampliamente descritos, existiendo numerosas sustancias que al presentar un efecto antagónico al de los factores de crecimiento o bien, al aparecer en concentraciones elevadas en el medio, reducen drásticamente el crecimiento celular (Matsunami *et al.* 1990, Reuse *et al.* 1990, Traxler *et al.* 1991). Este tipo de sustancias, como los sulfobenzoil-nitrostirenos o la decoína, inhiben la actividad tirosinkinasa de los receptores para factores de crecimiento provocando un "desacoplamiento" en la señal de transducción y una inhibición drástica del crecimiento celular.

neas celulares de mamíferos, siendo empleadas de forma habitual como agentes terapéuticos (Slifkin & Doyle 1990). El mecanismo molecular por el que ejercen este efecto en la actualidad no es concluyente. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de las sustancias citotóxicas inhiban el crecimiento celular mediante la inactivación de receptores de membrana, parece sugerir que las lectinas con actividad citotóxica pudieran seguir este mismo tipo de mecanismos.

Esta dependencia de los dinoflagelados por sustancias mitógenas como los factores de crecimiento (Costas & López-Rodas 1991a) o por lectinas, podría tener importantes consecuencias a nivel ecológico. El origen y el papel de estas sustancias en el medio marino es desconocido por el momento, aunque es un hecho comprobado que numerosas lectinas son producidas por organismos marinos como la lectina de *Erythrina cristagalli* sintetizada por corales, la lectina de *Ptilota plumosa* producida por algas rojas o las sintetizadas por *Ulva lactuca* o *Codium fragile* (Slifkin & Doyle 1990). Del mismo modo, algunas bacterias y microalgas sintetizan y liberan al medio en que se encuentran factores de crecimiento (Soong 1980, Morotomi *et al.* 1990, Slifkin & Doyle 1990). La abundancia de organismos productores de lectinas y de factores de crecimiento, sugiere que las lectinas podrían ser factores de crecimiento que jugarían algún papel, tanto positivo como negativo, en la proliferación de dinoflagelados, especialmente en las especies que crecen epifíticamente sobre macrofitas u otros organismos productores de lectinas.

De la misma manera, muchas lectinas presentan un efecto citotóxico en lí-

El incremento o disminución de la

proliferación celular que provocan las lectinas al ser añadidas al medio de cultivo sugiere que este tipo de moléculas actúan siguiendo las mismas vías de segundos mensajeros que los factores de crecimiento. En este sentido, sería interesante estudiar el modo en que las lectinas se unen a los receptores de membrana, ya

que un mejor conocimiento de los mecanismos por los que actúan abriría, sin duda, nuevas e innovadoras perspectivas en la caracterización, identificación y evolución de los receptores membranales de los dinoflagelados, organismos que hasta el momento han ocupado una posición filogenética controvertida.

LITERATURA CITADA

- Aitchison, E.J.; Lambert, P.A. & I.D. Farrell. 1986. Antigenic composition of an endocarditis-associated isolate of *Streptococcus faecalis* and identification of its glycoprotein antigens by ligand blotting with lectins. *Journal of Medical Microbiology* 21: 161-167.
- Alves, M.J. & W. Colli. 1974. Agglutination of *Trypanosoma cruzi* by concanavalin A. *Journal of Protozoology* 21: 575-578.
- Andreson, D.M. & B.A. Keafer. 1987. An endogenous annual clock in toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature* 325:616-617.
- Cantley, L. C.; Auger, K.R.; Carpenter, C.; Duckworth, B.; Graciani, A.; Kapeller, R. & S. Soltoff. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281-302.
- Costas, E. 1986. Ultraestructura cromosómica de dinoflagelados: consideraciones evolutivas. Ph. D. Universidad de Santiago de Compostela.
- Costas, E. 1990. Genetic variability in growth rates of marine dinoflagellates. *Genetica* 83: 99-102.
- Costas, E. & M. Varela. 1988. Evidence of an endogenous circannual rhythm in growth-rates in dinoflagellates. *Chronobiologia* 15:1-4.
- Costas, E. & M. Varela 1989. An circannual rhythm in cysts formation and growth rates in the dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* (Stein). *Chronobiologia* 16: 265-270.
- Costas, E.; Bao, R.; Maneiro, E.; Rodríguez, B.; Larrañaga, A. & M. Varela 1988. Cultivos experimentales de microalgas marinas. *Informes Técnicos del Instituto Español de Oceanografía* 62: 22 pp.
- Costas, E.; Navarro, M. & V. López-Rodas. 1990. An environment-synchronized internal clock controlling the annual cycle of dinoflagellates. In: E. Graneli (ed), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science Publishing. pp: 280-283.
- Costas, E. & V. López-Rodas. 1991a. On growth factors, cell division cycle and the eukaryotic origin. *Endocytobiosis and Cell Research* 8:89-92.
- Costas, E. & V. López-Rodas 1991b. Persistence of cell division synchrony in *Spirogyra insignis* (Gamophyceae): membrane proteoglycans transmitting synchronizing information through generations. *Chronobiologia International* 8(2): 85-92.

- Costas, E. & V. López-Rodas. 1991c. Evidence for an annual rhythm in cell ageing in *Spirogyra insignis* (Chlorophyceae). *Phycologia* 30(6): 597-599.
- Crow, F.J. & M. Kimura. 1970. In: Harper & Row (eds), *An introduction to population genetics theory*, 591 pp. New York.
- Damjanov, I. 1987. Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Laboratory Investigation* 57: 5-20.
- Edmunds, L.N. 1983. Chronobiology at the cellular and molecular levels: models and mechanisms for circadian timekeeping. *American Journal of Anatomy* 168: 389-431.
- Edmunds, L.N. 1988. In: *Cellular and molecular basis of biological clocks*, 497 pp. Springer Verlag, New York.
- Figueiras, F.G. 1989. Formación y mantenimiento de las purgas de mar en las Rías Bajas. *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas* 4: 73-84.
- Fraga, F. & R. Prego. 1989. Condiciones hidrográficas previas a la purga de mar. *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas* 4: 21-44.
- Goustin, A.S.; Leaf, E.B.; Shipley, G.D. & H.L. Moses. 1986. Growth factors and cancer. *Cancer Research* 46: 1015-1029.
- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W. Smith & M. Chanley (eds), *Culture of marine invertebrate animals*. pp. 26-60. Plenum Publ. Co. New York.
- Hart, D.A. 1980. Lectins in biological systems: applications to microbiology. *American Journal Clinical Nutrition* 33: 2416-2425.
- López-Rodas, V.; Navarro M.; De la Campa, L.; Gonzalez Chavarri, E.; Gonzalez-Gil, S.; Aguilera, A.; Segura, R. & E. Costas. 1991. Tras las pistas de los primeros mecanismos de control de la división celular: Una aproximación evolutiva. En: F. Chavarria (ed), *Cronocancerología*, Fundación Científica A.É.C.C. pp: 94-108. Madrid.
- López-Rodas, V.; González-Gil, S.; Aguilera, A. & E. Costas. 1992. Mecanismos de control biológico de la proliferación de dinoflagelados: 1-Factores de crecimiento y mitógenos. *Scientia Marina* 56(4):293-299.
- Mann, H.B. & D.R. Whitney 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annual Mathematical Statistic* 11:367-392.
- Margalef, R. 1989. Condiciones de aparición de la purga de mar y presiones de selección sobre sus componentes. *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas* 4: 13-20.
- Matsunami, K.R.; Campion, S.R.; Niyogi, S.K. & A. Stevens. 1990. Analogs of human Epidermal Growth Factor which partially inhibit the growth factor-dependent protein-tyrosine kinase activity of the Epidermal Growth Factor receptor. *Fase Journal* 264(1):105-108.
- Morotomi, M.; Guillen, G. Logerfo, P. & I.B. Weinstein. 1990. Production of diacylglycerol, an activator of protein kinase C, by human intestinal microflora. *Cancer Research* 50:3595-3599.
- North, G. 1991. Starting and stopping. *Nature* 351: 604-605.

- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-507.
- Reuse, S.; Maenhaut, C. & J.E. Dumont. 1990. Regulation of protooncogenes c-fos and c-myc expressions by protein tyrosine, protein kinase C, and cyclic AMP mitogenic pathways in Dog primary thyrocytes: A positive and negative control by cyclic AMP on c-myc expression. *Experimental Cell Research* 189: 33-40.
- Slifkin, M. & R.J. Doyle. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Review* 3(3): 197-218.
- Soong, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: G. Shelef & J. Soeder (eds), *Algae Biomass*. pp. 97-103. Elsevier. Amsterdam.
- Stein, J.R. 1973. Growth Measurements. In: Stein, J.R. (ed). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. pp. 289-376. Cambridge University Press.
- Taylor, J.F. 1990. Red tides, brown tides and other harmful algal blooms; The view into 1990's. In: E. Graneli, B. Sundstron, L. Edler, D.M. Anderson (eds), *Toxic Marine Phytoplankton*, pp. 527-533. Elsevier Sci. Publ. Co. New York.
- Traxler, P.M.; Wacker, O.; Bach, Ha.L.; Geissler, J.F.; Kump, W.; Meyer, T.; Renegass, U.; Roeser, J.L. & N. Lyndon. 1991. Sulfonylbenzoyl-Nitrostyrenes: Potential bisubstrate type inhibitors of the EGF receptor tyrosine protein kinase. *Journal of Medical Chemist* 34:2328-2337.
- Williams, M. 1977. Stereological techniques for electron microscopic morfometry. In: M. Hayat (ed), *Principles and techniques of electron microscopy*, pp. 1-226. Elsevier Sci. Publ. Co. New York.
- Wu, A.M.; Sugii, S. & A. Herp. 1988. A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Advance Experimental Medical Biology* 288: 819-847.
- Wyatt, T. & B. Reguera. 1989. ¿Ha alcanzado el cultivo de mejillón en Galicia su masa crítica?. *Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas*. 4:63-71.
- Yasumoto, I. 1990. Marine microorganism toxins-an overview. In: E. Graneli, B. Sundstron, L. Edler, D.M. Anderson (eds), *Toxic Marine Phytoplankton*, pp. 3-10. Elsevier Sci. Publ. Co New York.