



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Estudio Ultraestructural, Citoquímico e
Inmunocitoquímico de Dinoflagelados
Simbiontes de Anémonas con Énfasis
en el Núcleo”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

RAQUEL GONZÁLEZ PÉREZ

Tutora:

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
González
Pérez
Raquel
15178110
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300111219
2. Datos del tutor
Dra.
Olga Margarita
Echeverría
Martínez
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Gerardo Hebert
Vázquez
Nin
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Olga Margarita
Echeverría
Martínez
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Patricia
Rivas
Manzano
7. Datos sinodal 5
M. en C.
María del Pilar
Torres
García
8. Datos del trabajo escrito
Estudio ultraestructural, citoquímico e inmunocitoquímico de dinoflagelados simbiotes de anémonas con énfasis en el núcleo.
64 p
2008

Agradecimientos

Esta Tesis se elaboró en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y la asesoría del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, a quienes agradezco profundamente el constante apoyo y guía, así como también los consejos y el conocimiento que me brindaron durante la realización de este trabajo y en el salón de clases.

A la M. en C. Silvia Juárez por su incondicional ayuda técnica en la realización de los cortes del material biológico y en cada una de las técnicas inmunocitoquímicas y de contraste citoquímico empleadas en la metodología de este trabajo.

A la M. en C. María Luisa Escobar, por la orientación brindada durante la elaboración del contraste específico de las Regiones del Organizador Nucleolar (AgNOR) para microscopía óptica y electrónica.

A Ernestina Ubaldo, por su guía en la elaboración del contraste específico para DNA con Amina de Osmio y por sus consejos prácticos.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez, a la Dra. Patricia Rivas y a la M. en C. María del Pilar Torres, por la revisión crítica de esta tesis y sus sugerencias.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron en mi formación académica, y a todos los que me brindaron su ayuda, amistad y cariño durante esta etapa de mi vida.

GRACIAS.

Dedicatorias

A mis padres Cristina y Alejandro por su apoyo incondicional durante cada etapa de mi vida y por los consejos que han contribuido en mi formación como persona, gracias por ser tan estrictos, generosos y comprensivos.

A mis hermanos Armando, Andrea y Alejandro por los momentos memorables que hemos vivido y por ser parte importante de mi vida.

A mis Abuelas, Tíos, Tías, Primos y Primas por sus constantes muestras de cariño y por enseñarme el lado divertido de la vida.

A las personas que ya no se encuentran conmigo, Arturo Ducolomb por brindarme su amistad y tener una personalidad única y a Guadalupe Espino por su inolvidable carisma, sinceridad y bondad.

“Todo poder proviene de adentro, y por consiguiente está bajo nuestro propio control”

Robert Collier

“Cualquier cosa que la mente pueda concebir, puede ser lograda”

W. Clement Stone

“La imaginación lo es todo. Es la vista previa de lo que la vida va a traer”

Albert Einstein

“Tu creas tu propio universo sobre la marcha”

Winston Churchill

“Da el primer paso con fé, no tienes que ver todas las escaleras, tan sólo da el primer paso”

Martín Luther King

Índice	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
2. 1 NÚCLEO CELULAR.....	3
2. 1. 1 Cromatina.....	3
2. 1. 2 Partículas Ribonucleoprotéicas (RNPs).....	4
• Fibras Pericromatinianas (FPC).....	4
• Gránulos Pericromatinianos (GPC).....	4
• Fibras Intercromatinianas (FI).....	4
• Gránulos Intercromatinianos (GI).....	5
• Cuerpos Espiralados (CE).....	5
• Nucleolo.....	6
2. 2 DINOFLAGELADOS.....	6
2. 2. 1 Características Nucleares.....	9
2. 2. 2 Cromosomas.....	12
2. 2. 3 Ciclo Celular.....	15
2. 2. 4 Partículas Ribonucleoprotéicas (RNPs).....	18
2. 2. 5 Transcripción.....	19
III. OBJETIVO	21
IV. MATERIAL Y MÉTODO	22
4. 1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	22
4. 2 PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	22
4. 3 PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	24
4. 4 TÉCNICAS DE CONTRASTE GENERAL.....	24
4. 4. 1 Contraste general con Azul de Toluidina.....	24
4. 4. 2 Contraste general con Acetato de Urnilo y Citrato de Plomo.....	24
4. 5 TÉCNICAS DE CONTRASTE CITOQUÍMICO.....	25
4. 5. 1 Contraste preferencial de RNPs con Acetato de Urnilo- EDTA- Citrato de Plomo.....	25
4. 5. 2 Contraste preferencial de DNA con Ácido Fosfotúngstico (PTA).....	25
4. 5. 3 Contraste específico para DNA con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).....	26

4. 5. 4 Contraste específico para DNA con Amina de Osmio.....	26
4. 5. 5 Contraste específico de las Regiones del Organizador Nucleolar (AgNOR) para microscopía óptica y electrónica.....	27
4. 6 ESTUDIO MORFOMÉTRICO.....	27
4. 7 TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.....	28
4. 7. 1 Inmunolocalización de DNA, Z-DNA y proteínas Sm en cortes ultrafinos para microscopía electrónica.....	28
V. RESULTADOS.....	30
5. 1 CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE <i>Symbiodinium sp.</i>	32
5. 2 ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE <i>Symbiodinium sp.</i>	35
5. 3. CARACTERIZACIÓN DEL NÚCLEO DE <i>Symbiodinium sp.</i>	37
5. 3. 1 Características ultraestructurales.....	37
5. 3. 2 Cromatina.....	37
5. 3. 3 Partículas Ribonucleoprotéicas (RNPs).....	45
5. 3. 4 Nucleolo.....	49
VI. DISCUSIÓN.....	51
VII. CONCLUSIÓN.....	57
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	59

I. RESUMEN

Los dinoflagelados son protistas unicelulares que forman el phylum Pyrrophyta y presentan características nucleares que han sido tema de diversas investigaciones en el campo de la biología celular, molecular y evolutiva como son: la ausencia de proteínas histonas, un alto contenido de DNA formando cromosomas en un estado líquido cristalino y permanentemente condensados durante todo el ciclo celular, la conservación intacta de la envoltura nuclear durante la mitosis y huso mitótico extranuclear.

La mayor parte de las investigaciones enfocadas al núcleo de dinoflagelados se han realizado en organismos de vida libre, por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar las características nucleares de *Symbiodinium sp.*, una especie simbiote de anémonas, a nivel de microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

La técnicas de contraste generales realizadas con azul de toluidina y con acetato de uranilo - citrato de plomo se utilizaron para describir las características de la relación simbiótica y la ultraestructura general de *Symbiodinium sp.*, también se realizó un estudio morfométrico en MO para conocer su tamaño celular y nuclear.

La ultraestructura del núcleo de *Symbiodinium sp.*, se estudió con técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas. Para caracterizar el arreglo del DNA se realizaron contrastes preferenciales con PTA y específicos con Amina de Osmio y DAPI, al igual que inmunolocalizaciones electrónicas con los anticuerpos AntiDNA y AntiZ-DNA.

Para estudiar las ribonucleoproteínas (RNPs) se realizó un contraste preferencial con acetato de uranilo- EDTA- citrato de plomo y la inmunolocalización con el anticuerpo Y12 para snRNPs. El nucleolo se describió con la técnica específica para las regiones del organizador nucleolar (AgNOR).

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: A) La simbiosis entre *Symbiodinium sp.*, y su hospedero se distribuye de manera abundante en los tentáculos de la anémona, B) El tamaño celular de *Symbiodinium sp.*, es de 9 μm , este valor se encuentran en el rango descrito para dinoflagelados simbiotes, C) La morfología y ubicación de sus cloroplastos, pirenoides, vacuolas digestivas y núcleo son semejantes a las descritas en otras especies de dinoflagelados simbiotes y de vida libre, D) El núcleo de *Symbiodinium sp.* mide 3 μm , su morfología es arriñonada y el DNA se arregla en forma de cromosomas ovalados, compactados y bandeados, con asas de DNA en su periferia transcripcionalmente activas, E) Las RNPs del núcleo de *Symbiodinium sp.*, son parecidas a las de especies de vida libre y se distribuyen en dos regiones: en la región pericromosomal se encuentran fibras y gránulos pericromatinianos, aquí se lleva a cabo la transcripción y el procesamiento del RNAm, en la región extracromosomal se encuentran RNPs polimórficas de diferente tamaño, por último, F) El nucleolo se ubica en la periferia y posee un componente fibrilar denso altamente argirofílico.

Se concluyó que las características ultraestructurales del núcleo de *Symbiodinium sp.* son muy parecidas a las de especies de vida libre y confirman que las RNPs del phylum Pyrrophyta tienen una organización estructural y funcional semejante a la de eucariontes superiores.

II. INTRODUCCIÓN

El núcleo celular es un compartimento limitado por una cisterna interrumpida por poros, contiene el material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (DNA), y los componentes necesarios para la transcripción de la información genética en ácido ribonucleico (RNA), para el procesamiento del RNA y, eventualmente para la duplicación del DNA (Vázquez – Nin et al., 2003).

El núcleo celular ha sido tema de numerosas investigaciones entre las cuales destacan las enfocadas en las estructuras involucradas en los eventos nucleares de la expresión genética incluyendo la transcripción, el “splicing” y el transporte del RNA pre-mensajero (Puvion & Puvion., 1996). Tales investigaciones se han realizado en núcleos interfásicos de animales, plantas, hongos y protistas, en los cuales se observan estructuras que contienen RNA y DNA con una distribución espacial similar entre los primeros tres grupos, y una mayor diversidad entre los protistas (Jiménez et al., 1989).

2. 1 NÚCLEO CELULAR

2. 1. 1 Cromatina

La cromatina es el arreglo básico del DNA nuclear con proteínas histonas y no histonas, las histonas son las responsables de formar el nivel más básico de organización cromosomal, el nucleosoma, el cual está formado por un filamento de DNA enrollado en un octámero de histonas (un par de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4). Los nucleosomas se encuentran conectados por puentes de 20 a 80 pares de bases (pb) para formar lo que se conoce como “collar de perlas” o fibra de 10 nanómetros (nm). En un segundo nivel de condensación, una quinta histona (H1) se une a los nucleosomas compactándolos para formar una fibra de 30 nm de diámetro llamada solenoide, cada vuelta de un solenoide contiene seis nucleosomas con una molécula de H1 asociada a cada unidad nucleosomal. El solenoide se enrolla sobre sí mismo para formar una fibra más gruesa de cromatina, la que, a su vez, se organiza en asas (Alberts et al., 2002). Actualmente, aunque aún se desconoce mucho de la organización de la cromatina, se empieza a entender la organización de las fibras de solenoides y de las asas de cromatina, durante la interfase y la mitosis.

En los núcleos interfásicos de la mayoría de los eucariontes se distinguen dos tipos de cromatina, la cromatina compacta o heterocromatina y la cromatina extendida o eucromatina. La heterocromatina se encuentra en forma de gránulos o cúmulos y los genes que la constituyen no se expresan en la célula. La eucromatina se encuentra formada por delgados filamentos de DNA y sus genes se expresan potencialmente (Vázquez –Nin et al., 2003).

2. 1. 2 Partículas Ribonucleoprotéicas (RNPs)

En 1969 Wilhelm Bernhard caracterizó por primera vez una nueva clase de estructuras ribonucleoprotéicas (RNPs) diferentes al nucleolo (Figura 1), desarrolló una técnica de contraste preferencial en la que se utiliza el ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) como un agente quelante (Puvion & Puvion., 1996), y con la cual describió las siguientes cinco RNPs no nucleolares:

- **Fibras pericromatinianas (FPC).** Se ubican en la periferia de la cromatina compacta, se describen como la expresión morfológica del RNA recién sintetizado; llegan a medir hasta 120 nanómetros (nm) de largo y son estructuras de 3 a 5 nm de grosor (Monneron & Bernhard, 1969; Bernhard, 1969; Puvion & Puvion., 1996).
- **Gránulos pericromatinianos (GPC).** Se localizan cercanos a grumos de cromatina compacta, miden de 30 a 50 nm de diámetro y presentan un centro denso a los electrones constituido por RNA en forma de fibrillas de 2 a 3 nm de diámetro, las cuales se enrollan formando los gránulos (Vázquez – Nin et al., 2003), poseen un halo claro alrededor de aproximadamente 25 nm de diámetro y funcionan como almacén y/o transporte intranuclear del RNA mensajero (Monneron & Bernhard, 1969).
- **Fibras intercromatinianas (FI).** Representan el RNA recién sintetizado libre en el nucleoplasma o de migración al citoplasma (Puvion & Puvion., 1996).

- **Gránulos intercromatinianos (GIC).** Son gránulos de 20 a 25 nm de diámetro, polimorfos y a veces continuos con fibrillas, se encuentran agrupados en cúmulos dentro de la región intercromatiniana. Son el almacén de la maquinaria de “splicing” (Monneron & Bernhard, 1969; Puvion & Puvion., 1996; Vázquez – Nin et al., 2003).
- **Cuerpos espiralados (CE).** Agregados esféricos de 0.3 a 0.5 micrómetros (μm) de diámetro, son formados por fibras de 40 a 60 nm de espesor y están situados en la región intercromatiniana, en ellos se han encontrado tanto componentes relacionados con el procesamiento del RNA pre-mensajero, como proteínas nucleolares (Monneron & Bernhard, 1969; Vázquez – Nin et al., 2003).

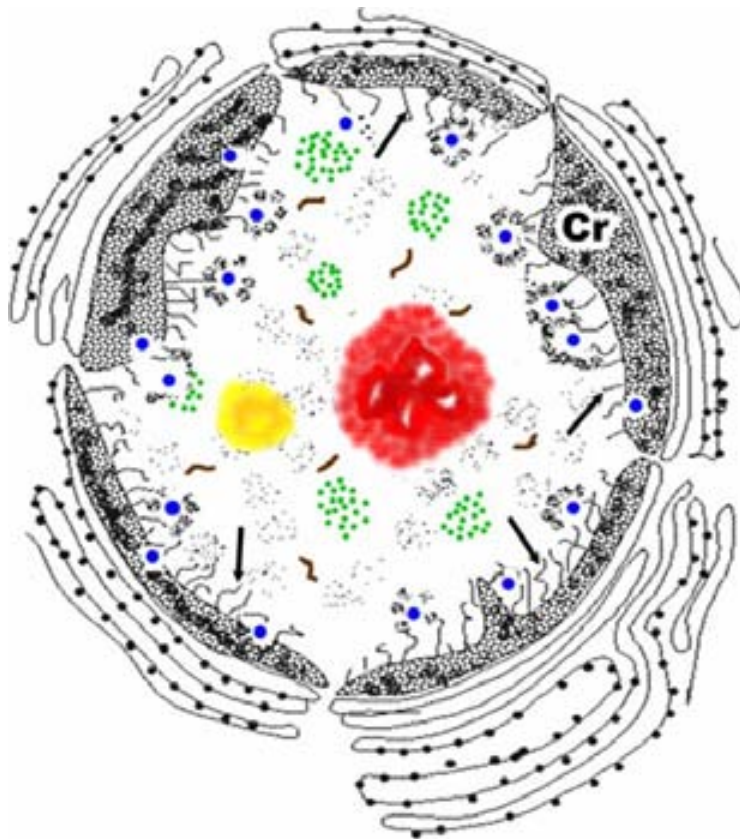


Figura 1: Esquema del núcleo interfásico de una célula eucarionte representando la distribución de las estructuras ribonucleoprotéicas. Cromatina (Cr); Gránulos Pericromatinianos (■ azul); Fibras Pericromatinianas (→); Gránulos Intercromatinianos (■ verde); Fibras Intercromatinianas (■ rojo); Nucleolo (■ rojo) y Cuerpo Espiralado (■ amarillo). Imagen modificada de *Fine Structural Organization of the Interphase Nucleus in Some Mammalian Cells*. Monneron & Bernhard, 1969.

Nucleolo. Es un cuerpo nuclear fácil de reconocer por su gran densidad y tamaño, además es el sitio de síntesis y procesamiento del pre-rRNA y del ensamblado de las subunidades del ribosoma. La ultraestructura nucleolar muestra centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular. El nucleolo se encuentra constituido por genes rDNA, proteínas, rRNA y sus precursores, además de diferentes UsnoRNA. En eucariontes superiores, durante la mitosis el nucleolo se disgrega y se reorganiza en telofase alrededor de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) (Vázquez – Nin et al., 2003).

En contraste con las plantas y los animales, los protistas no poseen un patrón común en su estructura nuclear, sin embargo, todos los protistas que han sido estudiados tienen una envoltura nuclear con poros y un nucleolo fácilmente identificable. La estructura, el arreglo y el tamaño de las partículas RNP y la cromatina de los núcleos en interfase, son muy variables entre cada phylum, por lo tanto, los trabajos realizados en este campo son una aproximación más que puede conducir hacia la comprensión en la investigación de las relaciones filogenéticas de los protistas (Jiménez et al., 1989).

2. 2 DINOFLAGELADOS

Los Dinoflagelados son protistas microscópicos unicelulares que forman el phylum Pyrrophyta, un grupo monofilético muy diversificado, ubicado dentro de los Alveolados los cuales tienen como grupo hermano a los Ciliados y a los Apicomplexanos (Saldarriaga et al., 2004; Wong & Kwok, 2005). El phylum Pyrrophyta se encuentra constituido por dos clases, *Dinophyceae* con más de 4 000 especies de vida libre y *Syndinophyceae* con alrededor de 40 especies parásitas y simbiontes (Moreno et al., 2005). Viven principalmente en aguas superficiales marinas pero también se les puede encontrar en aguas dulces o salobres, alrededor del 90% de las especies son marinas (Van Den Hoek et al., 1995). En condiciones favorables algunas especies de dinoflagelados de vida libre como *Alexandrium tamarense* pueden reproducirse fácilmente y formar grandes grupos que tornan las aguas superficiales de color rojo debido las neurotoxinas que producen, tales eventos son comúnmente llamados

mareas rojas y suelen ser venenosas para muchos tipos de animales provocando la muerte en cadena de organismos marinos (Hackett et al., 2004; Hackett et al., 2005).

La adaptación de los dinoflagelados a una gran variedad de ambientes se ve reflejada en su diversidad de formas, tipos de nutrición y un enorme registro fósil que data de varios millones de años atrás. Algunos dinoflagelados forman asociaciones simbióticas con muchos invertebrados marinos, y especialmente, las interacciones con Cnidarios de la clase Antozoa (corales, anémonas, zoantidos y gorgonias) son las responsables de la formación de arrecifes coralinos los cuales albergan un cuarto de la biodiversidad marina. Los dinoflagelados que se distribuyen abundantemente en los tentáculos y en el disco oral de los antozoos, son organismos fotosintéticos comúnmente llamados zooxantelas, un término que se aplica específicamente a los integrantes del género *Symbiodinium* (Davy & Turner, 2003; Hackett et al., 2004; Furla et al., 2005).

La asociación entre invertebrados marinos como las anémonas y los dinoflagelados del género *Symbiodinium* revela un largo proceso de adaptaciones evolutivas (ecológicas, fisiológicas, estructurales y moleculares) que han contribuido a la supervivencia de ambos organismos. Por una lado, *Symbiodinium* actúa como una fuente de energía para su hospedero proporcionándole nutrientes que no se encuentran de manera abundante en los arrecifes debido a la competencia que ejerce la gran cantidad de organismos que viven en este hábitat, y por otra parte, las anémonas proporcionan a *Symbiodinium* un ambiente seguro en el cual pueden llevar a cabo su nutrición autótrofa y una proliferación exitosa, todo lo anterior indica que se mantiene una translocación considerable y bidireccional de nutrientes entre ambos participantes (Toller et al., 2001; Whitehead & Douglas, 2003; Furla et al., 2005; Pochon et al., 2006).

El tipo de asociación simbiótica que ocurre entre *Symbiodinium* y los antozoos se conoce como endocitobiótica, pues en ésta un organismo vive dentro del citoplasma celular de otro organismo. Se ha descrito que existen dos membranas que separan a *Symbiodinium* del sistema gastrovascular del antozoo, la primera es la membrana

simbiosomal que lo separa del citoplasma del hospedero y la segunda es la membrana celular propia del hospedero (Farmer et al., 2001; Wakefield & Kempf, 2001).

Las asociaciones entre antozoos y *Symbiodinium* implican varias limitaciones para el hospedero: (a) los requerimientos fotosintéticos de *Symbiodinium* limitan al cnidario a una zona de alta radiación solar en el océano, lo cual requiere el desarrollo de mecanismos de defensa contra el daño que provocan los rayos ultravioleta (UV), (b) debido a la localización intracelular de *Symbiodinium*, el hospedero debe abastecerlo con CO₂ para que realice la fotosíntesis y con nitrógeno inorgánico y fosfato para la biosíntesis de compuestos orgánicos, y (c) el oxígeno producido por el simbiote durante la fotosíntesis lleva a la hiperoxia en los tejidos del hospedero (Furla et al. 2005). Ante estas limitaciones, se han desarrollado adaptaciones evolutivas paralelas entre los protagonistas de estas asociaciones que finalmente los benefician, por ejemplo, arriba del 50% del carbono fijado por *Symbiodinium* puede transferirse hacia el hospedero y ser convertido principalmente en lípidos y proteínas (Hackett et al., 2004), también moléculas como la glucosa, el glicerol y la alanina liberadas por el simbiote son aprovechadas por el hospedero durante la respiración y el crecimiento (Graham & Wilcox, 2000; Whitehead & Douglas, 2003), por su parte *Symbiodinium* aprovecha las sustancias de desecho del hospedero como el nitrógeno en forma de amonio y urea, el fósforo orgánico en forma de glicerolfosfato y aminoácidos sulfuros como la cisteína (Dodge, 1987; Van Den Hoek et al., 1995).

Los miembros de la división Pyrrophyta tienen una composición citoplasmática típica de eucariontes (Alverca et al., 2006), son generalmente caracterizados por tener clorofila a y c, β- caroteno, ficobilinas y una o más de las xantofilas: peridina, neoperidina, fucoxantina, dinoxantina y neodinoxantina (Spector, 1984; Morden & Sherwood, 2002; Yoon et al., 2005). El producto principal de reserva de los Dinoflagelados es el almidón, el cual es sintetizado y almacenado fuera de los cloroplastos, los lípidos es otro producto importante de reserva (Van Den Hoek et al., 1995).

Los análisis filogenéticos moleculares sugieren que los dinoflagelados del género *Symbiodinium* surgieron aproximadamente hace 50 millones de años durante el Eoceno temprano y la mayoría de los linajes existentes se diversificaron a partir del Mioceno medio, hace aproximadamente 15 millones de años (Pochon et al., 2006). En la actualidad se sabe que dicho género se encuentra representado por un grupo diverso de linajes genéticos mayor a 23 en todo el mundo (Rowan & Powers, 1992; Rodríguez, 2003).

2. 2. 1 Características nucleares

Los dinoflagelados son eucariontes verdaderos que poseen características nucleares similares tanto morfológicas como moleculares y bioquímicas, pero grandes diferencias con respecto al núcleo de otros eucariontes (Saldarriaga et al., 2004). También poseen características únicas dentro de su ciclo celular y en los patrones de síntesis de DNA (Soyer - Gobillard et al., 1990).

El núcleo celular de los dinoflagelados varía en forma, tamaño, contenido de DNA y número de cromosomas, tanto en especies de vida libre como en especies simbiotes (LaJeunesse et al., 2005). Los dinoflagelados poseen diferentes morfologías nucleares (Figura 2), como la típica forma ovalada (*Crypthecodinium cohnii*, *Oxyrrhis marina* y *Amphidinium carterae*), la tetragonal (*Gymnodinium lalitae*), la triangular (*Gymnodinium dodgei*), la arriñonada (*Glenodinium oculatu* y *Alexandrium fundyense*) y la forma de U o V (*Peridinium cinctum*, *Prorocentrum micans* y *Gonyaulax spp.*) (Spector, 1984; Alverca et al., 2006).

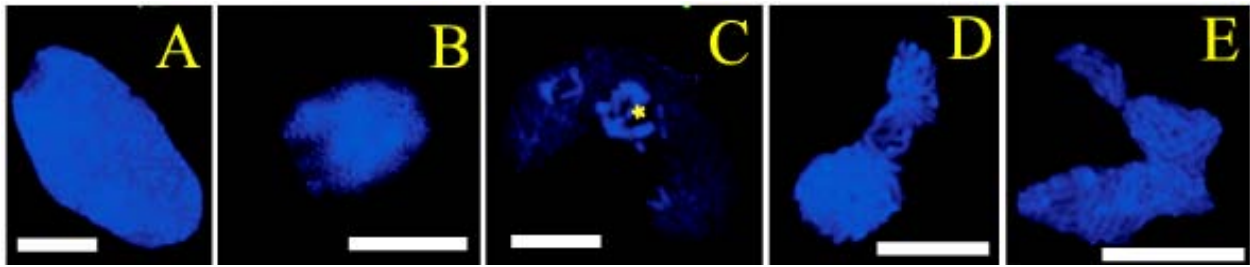


Figura 2: Micrografías ópticas de cinco núcleos de especies de vida libre contrastados con DAPI. **(A)** *Akashiwo sanguinea* y **(B)** *Amphidinium cartera* poseen un núcleo ovalado. Barras de escala 8 μm y 4 μm respectivamente. **(C)** *Alexandrium lusitanicu* y **(D)** *Alexandrium fundyense* poseen núcleos de forma arriñonada, el nucleolo (*) sin contraste, se encuentra rodeado por cromosomas específicamente contrastados. Barras de escala 8 μm . **(E)** *Prorocentrum micans*, con núcleo en forma de V. Barra de escala 20 μm . Imagen tomada y modificada de *Topology of splicing and snRNP biogenesis in dinoflagellate nuclei*. Alverca et al., 2006.

Los dinoflagelados poseen características nucleares que no se observan en otros grupos de eucariontes como son la conservación intacta de la envoltura nuclear durante la división celular (Bhaud et al., 2000) y la organización del DNA empaquetado en forma de cromosomas, que junto con el nucleolo se mantienen permanentemente condensados durante todo su ciclo celular (Spector, 1984).

Los cromosomas de los dinoflagelados son haploides con excepción del género *Noctiluca* que en etapa vegetativa sus cromosomas son diploides (Santos & Coffroth, 2003). Por otra parte, arriba del 60% de las secuencias génicas de los dinoflagelados son repetitivas y no codificantes, su contenido de DNA es muy variable y oscila en una rango de 1.5 a 400 pico gramos por núcleo (pg/n), que comparado con el de otros eucariontes es muy alto pues en algunas plantas se suelen encontrar valores que oscilan alrededor de los 40 pg/n y en células humanas el contenido de DNA es de aproximadamente 5.6 pg/n (Spector, 1984; Bhaud et al., 2000; Saldarriaga et al., 2004; Moreno et al., 2005; Alverca et al., 2006).

Los dinoflagelados poseen un alto contenido de las bases guanina y citosina (G+C) esto se ha atribuido a la presencia de secuencias genómicas metiladas (Rizzo, 1987), las cuales constituyen aproximadamente el 70% de su genoma (Moreno et al, 2005),

tales como la 5-hidroximetiluracilo (5-HOMeU) que sólo poseen los dinoflagelados y que reemplaza del 12-70% de la timina (Hackett et al., 2004), la N⁶-metiladenina que sustituye a la adenina y la 5-metilcitosina que ocupa el lugar de la citosina (González, 1988), se ha propuesto que estas bases representan un vestigio neutral de un mecanismo que operó en una etapa temprana de su evolución (Spector, 1984).

Los análisis bioquímicos y ultraestructurales realizados en núcleos de dinoflagelados confirman la ausencia de proteínas histonas, este rasgo es único de este grupo puesto que diversos análisis filogenéticos los clasifican como eucariontes verdaderos del grupo de los alveolados, como los ciliados y apicomplexanos que poseen histonas, esto indica la posibilidad de que los dinoflagelados perdieron las histonas en algún momento de su evolución, lo cual resulta sorprendente debido a que las mutaciones en estas proteínas aun las más puntuales son letales en plantas y animales actuales (Vázquez – Nin et al., 2003).

La relación entre la cantidad de proteína y la cantidad de DNA que existe en el núcleo de dinoflagelados oscila en un rango de 1:10 muy diferente a la de otros organismos eucariontes cuya relación es 1:1 y en procariontes 1:1.75 (Bhaud et al., 2000; Moreno et al., 2005; Chan & Wong, 2007).

Aunque el DNA de los cromosomas de los dinoflagelados perdió las histonas y nucleosomas, los cromosomas contienen una pequeña cantidad de proteínas básicas que han sido llamadas “histone-like” (HLP), estas proteínas de unión al DNA se encuentran dentro del rango de peso molecular de las histonas y son básicas por su alto contenido de lisina, se ha especulado que tiene una función reguladora en la transcripción (Rizzo, 2002). Las HLPs se han localizado en la periferia de los cromosomas (un sitio transcripcionalmente activo), por ejemplo, en investigaciones inmunocitoquímicas realizadas con HLPs de *Cryptothecodinium cohnii* (HCC) revelaron su localización en las asas extracromosomales durante la fase G1 (donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas) y dispersas en los cromosomas durante la mitosis, así como en las regiones del organizador nucleolar (Wong & Kwok, 2005).

La ubicación y concentración de las proteínas HCC en el núcleo podría organizar las asas de DNA extracromosomal en diferentes topologías, debido a que se ha descubierto que una alta concentración de HCC condensa eficientemente el DNA lo que haría posible el plegamiento del DNA que se encuentra transcribiéndose en la periferia cromosomal (Chan & Wong, 2007) demostrando que las HLPs se encuentran involucradas en la expresión genética.

Las investigaciones realizadas sobre su estructura genética revelan la ausencia de TATA box o de secuencias consenso en sus promotores, así como una gran cantidad de DNA con genes individuales que contienen regiones repetitivas y múltiples copias de genes en tándem (Moreno et al., 2005).

2. 2. 2 Cromosomas

Los cromosomas poseen una morfología redonda u ovalada y se encuentran permanentemente condensados durante todo el ciclo celular, lo que representa una diferencia significativa con respecto a los cromosomas de eucariontes superiores, los cuales sólo se encuentran condensados durante la división nuclear; otro grupo con cromosomas claramente discernibles durante todos su ciclo celular es Euglenophyta (Van Den Hoek et al., 1995).

La morfología y la estructura de los cromosomas de Dinoflagelados es quizá la característica más prominente que poseen en el núcleo. En cortes ultrafinos observados en microscopia electrónica de transmisión (MET), estos cromosomas muestran un arreglo con elementos granulares y fibrilares, los filamentos de DNA de aproximadamente 2.5 nm de diámetro dan una apariencia “bandeada” al cromosoma con una periodicidad de 110 ± 10 nm (Spector, 1984; Van Den Hoek et al., 1995), pero no se observa un patrón como el bandeo Q, G o C característico de los cromosomas metafásicos de eucariontes superiores (Soyer - Gobillard et al., 1990).

El número de cromosomas del phylum Pyrrophyta varía ampliamente, desde 4 en *Syndinium borgerti* hasta 325 en *Endodinium chattoni*, generalmente los dinoflagelados

de vida libre contienen más cromosomas que los simbioses. El tamaño cromosomal varía en un rango de 0.5 a 1 μm de diámetro y cerca de los 15 μm de largo (Spector, 1984; LaJeunesse et al., 2005). Los cálculos realizados en reconstrucciones nucleares tridimensionales de 5 especies del género *Symbiodinium* indicaron el número de cromosomas por núcleo haploide; en *S. microadriaticum* subespecie *microadriaticum* 97, en *S. microadriaticum* subespecie *condylactis* 98, en *S. kawagutii* 26, en *S. pilosum* 78 y en *S. goreauii* 74 (LaJeunesse et al. 2005).

En la especie diploide *Pyrocystis lunula* se realizó el primer cariograma en el cual los cromosomas fueron arreglados de acuerdo a su morfología (V, Y o J) y a su tamaño, así se contaron 49 pares de cromosomas: el 1, 2 y 4 con forma V, el 15, 46 y 47 con forma Y, y todos los demás con forma J (Seo & Fritz, 2006).

Se han detectado altos niveles de metales de transición como hierro, níquel, cobre y Zinc en la cromatina lo que sugiere que estos elementos pueden ser parte estructural importante de los cromosomas tomando el lugar de las histonas que normalmente se unen a la carga negativa del grupo fosfato de las moléculas de DNA (González, 1988). Dichos metales se encuentran en un estado dinámico y se ha propuesto que la condensación cromosomal permanente puede estar relacionada con una interacción metaloproteína-DNA. Por otra parte, también se han encontrado los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} que juegan un importante papel en la estabilización cromosomal (Taylor, 1987).

La peculiar estructura de los cromosomas de Dinoflagelados ha llamado la atención de varios investigadores que han propuesto modelos para explicar la forma en que son compactados tomando en cuenta su apariencia en MET. El modelo más aceptado es el de Bouligand (Figura 3) en el cual propone que el patrón arqueado de los cromosomas es el resultado de una serie de discos paralelos equidistantes formados por moléculas de líquido cristalino en fase colestérica (genéticamente inactivo) cuya orientación describe una hélice que gira continuamente hacia la izquierda a lo largo de un eje (colestérico). En cada disco se superponen los filamentos de DNA con la misma orientación de las moléculas en fase colestérica, por lo tanto cuando se realizan cortes

oblicuos en este tipo de estructuras se manifiesta una serie de arcos dentro de cada disco debido a las orientaciones sucesivas de las moléculas de DNA.

El modelo de Bouligand posee tres propiedades que son requeridas para la función del DNA: puede concentrar grandes cantidades de DNA, es una estructura fluida (favorece la segregación) y mantiene un orden entre las moléculas de DNA (el cual es requerido en ciertas reacciones) (Leforestier & Livolant, 1993; Bouligand & Norris, 2001).

Los cromosomas de dinoflagelados poseen asas laterales hacia el nucleoplasma donde las concentraciones de DNA son mucho más bajas que en el cuerpo del cromosoma (González, 1988; Bhaud et al., 2000; Moreno et al., 2005; Alverca et al., 2006). La fase de líquido cristalino colestérico observada en los cromosomas de dinoflagelados puede teóricamente minimizar la compactación después de la replicación y por lo tanto, facilitar la segregación de los cromosomas (Wong & Kwok, 2005).

Tomando en cuenta la ultraestructura cromosomal de los dinoflagelados, se pueden reconocer dos zonas: una transcripcionalmente inactiva constituida por el DNA que forma el cuerpo del cromosoma y una región periférica difusa que contiene el DNA activo de la transcripción, en esta última se pueden observar asas de DNA que entran y salen del cromosoma, las curvaturas de dichas asas requieren un sistema para neutralizar localmente las cargas electronegativas, el cual puede ser donado por proteínas de unión al DNA ricas en aminoácidos básicos que ya han sido aisladas del genoma de dinoflagelados (Mínguez et al., 1994).

Se ha propuesto que la topoisomerasa tipo II encontrada en dinoflagelados probablemente participe en la formación de las asas de DNA periféricas o en la organización de los cromosomas (Mak et al., 2005).

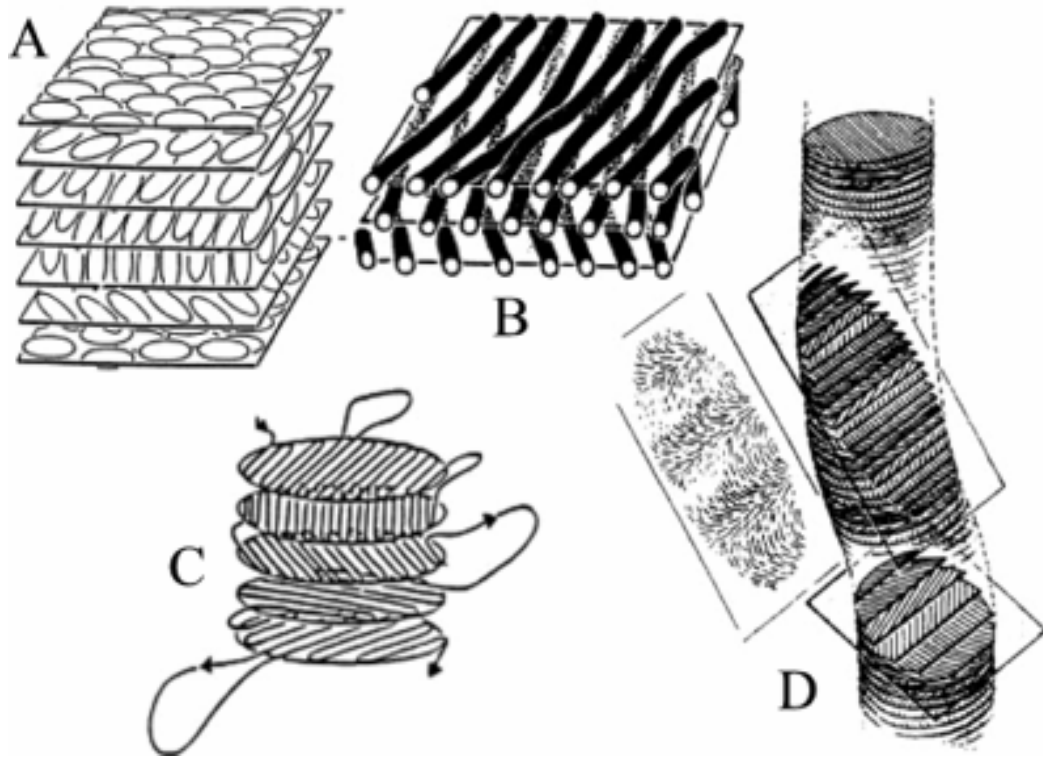


Figura 3: Interpretación del arreglo ultraestructural de los cromosomas de dinoflagelados. **(A)** serie de planos formados por moléculas de líquido cristalino colestérico, la orientación de las moléculas describen una hélice que gira hacia la izquierda. **(B)** filamentos de DNA que se superponen en cada plano y que toman la misma orientación de las moléculas. **(C)** asas de DNA que salen de cada disco apilado. **(D)** serie de discos con filamentos de DNA en una continúa rotación hacia la izquierda. En cortes oblicuos se observa el patrón arqueado característico de los cromosomas de dinoflagelados. Imagen tomada y modificada de *Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states*. Bouligand & Norris, 2001.

2. 2. 3 Ciclo celular

El ciclo celular de dinoflagelados de vida libre ha sido estudiado utilizando la sincronización de crecimiento celular conjugada con inhibidores de la síntesis de DNA (Bhaud et al., 2000). En el caso de dinoflagelados simbiotes las investigaciones se han realizado en sistemas modelo hospedero-simbionte (*Myrionema ambionse* - *Symbiodinium*) en donde se manipulan los periodos de luz-oscuridad y la alimentación para estudiar el crecimiento celular de *Symbiodinium* (Fitt, 2000). Los resultados han

demostrado que los dinoflagelados llevan acabo el ciclo de vida típico de eucariontes superiores con las fases G1-S-G2-M y siguen un ritmo circadiano en el cual la división celular ocurre principalmente al final de la fase oscura y el crecimiento y biosíntesis de muchas proteínas ocurre durante la fase de luz correspondiente a la fase G1 del ciclo celular (Wong & Kwok, 2005).

Las fases del ciclo celular de dinoflagelados se caracterizan por poseer cromosomas con morfologías específicas, aunque el alto grado de compactación del DNA en el genoma de los dinoflagelados y la ausencia de histonas y nucleosomas pone en duda como se lleva acabo la replicación y/o la transcripción del genoma en estos organismos. En eucariontes superiores estos procesos dependen ampliamente de la estructura dinámica de la cromatina y de los nucleosomas (Bhaud et al., 2000). A pesar de las publicaciones que describen el ciclo celular de dinoflagelados, la sucesión precisa de los cambios en la morfología de los cromosomas se mantiene aún desconocida.

Bhaud en el 2000 describió la ultraestructura de los cromosomas durante el ciclo celular de dinoflagelados de la especie *Cryptothecodinium cohnii* utilizando cultivos sincronizados y un bloqueador de la fase S temprana que inhibe la actividad de la DNA polimerasa. El núcleo en interfase posee numerosos cromosomas condensados y bandeados, también se distingue fácilmente el nucleolo con una apariencia similar a la de eucariontes superiores con zonas fibrilares y granulares (Dodge, 1987; Sluiman, 1993). Las células en la fase G1 temprana poseen un bajo contenido de DNA, cromosomas con su morfología típicamente arqueada y los límites entre los cromosomas y el nucleoplasma son de una apariencia ondulada, además posee numerosas asas de DNA que salen del centro del cromosoma hacia el nucleoplasma el cual es denso y granular. La fase G1 tardía es similar a la G1 temprana, pero el DNA que forma los cromosomas se observa mucho más condensado, el aspecto ondulado de los límites cromosomales es ausente y con pocas las asas de DNA periféricas. Durante la fase S se observan cromosomas con diferentes morfologías que en secuencia describen como un cromosoma compactado en fase G1 es parcialmente descondensado, cabe recalcar que dicha fase es muy corta. Los cromosomas en la fase G2 se encuentran muy condensados y con un

doble número de arcos en comparación con los cromosomas que se encuentran en la fase G1, además no se observa una apariencia granular en el nucleoplasma (Bhaud et al., 2000).

La mitosis de los dinoflagelados es característica del grupo debido a que la envoltura nuclear se mantiene intacta y los cromosomas se unen a ella, la envoltura nuclear se invagina y forma canales citoplasmáticos que atraviesan el núcleo (Oakley & Dodge, 1974), éstos contienen los microtúbulos del huso mitótico extranuclear que se disponen en el mismo lugar en que se encuentran unidos los cromosomas, pero del lado citoplasmático (Figura 4). Como consecuencia de este arreglo estructural, el huso mitótico no se encuentra en contacto directo con los cromosomas, como sucede en otros eucariontes, puesto que se encuentran separados por la envoltura nuclear (Kubai & Ris, 1969; Bhaud et al., 2000; Yeung et al., 2000). Debido a lo anterior se ha propuesto que la segregación de cromátidas hermanas podría darse por movimientos de la envoltura nuclear (Oakley & Dodge, 1974), el reciente descubrimiento de que la separación cromosomal en bacterias es mediada por la actina, abrió la posibilidad de tal proteína nuclear puede jugar un papel importante durante la mitosis de dinoflagelados (Wong & Kwok, 2005).

Se cree que la profase comienza antes de la formación de los canales citoplasmáticos con el alargamiento y separación parcial de los cromosomas en sus formas típicas en V o Y. Bhaud describió por primera vez un alineamiento de los cromosomas tipo metafase en el cual el núcleo muestra una apariencia plana antes de la segregación, el alineamiento es en varios planos alrededor de canales citoplasmáticos. Durante la anafase y la telofase se da la separación completa de las cromátidas hermanas y el nucleolo es la estructura que se divide hasta el final antes de que se formen las dos células hermanas, pero este es un proceso que aún no ha sido bien estudiado (Bhaud et al., 2000; Seo & Fritz, 2006). Los resultados del estudio de la función de la topoisomerasa II en el ciclo celular de los dinoflagelados, demuestran que durante la fase G2/M dicha enzima actúa como promotor en la segregación de los cromosomas durante la mitosis (Mak et al., 2005).

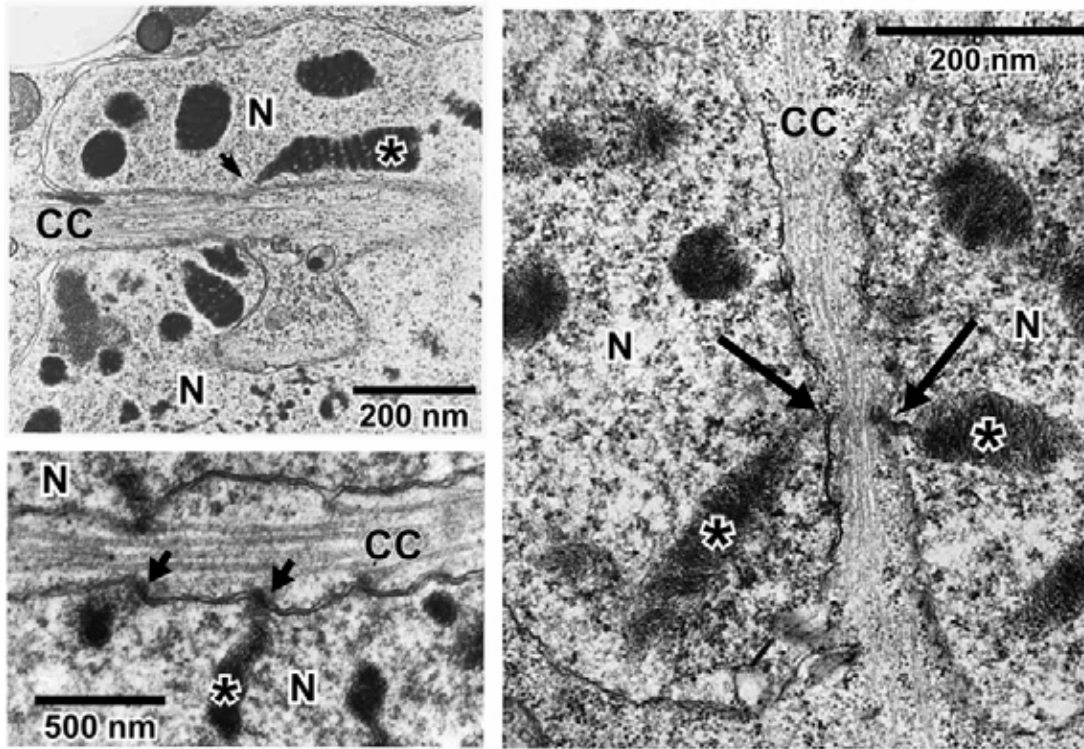


Figura 4: Mitosis de dinoflagelados. En las tres micrografías electrónicas se observan los canales citoplasmáticos (CC) que atraviesan los núcleos dividiéndolos en dos células hermanas, durante este proceso los cromosomas (*) se mantienen unidos a la envoltura nuclear (→). Imágenes tomadas y modificadas de: *Morphology and behaviour of chromosomes during the cell cycle and mitosis*. Bhaud et al., 2000; *Division in the dinoflagellate Gyrodinium cohnii (Schiller). A New Type of Nuclear Reproduction*. Kubai & Ris, 1969; *Kinetochores associated with the nuclear envelope in the mitosis of Dinoflagellate*. Oakley & Dodge, 1974.

2. 2. 4 Partículas Ribonucleoprotéicas (RNPs)

Los trabajos ultraestructurales, citoquímicos, y autorradiográficos (González, 1988; Echeverría et al., 1993; Moreno et al., 2005; Alverca et al., 2006) enfocados al estudio del núcleo de dinoflagelados revelan que las RNPs (Partículas ribonucleoprotéicas) que se encuentran en el nucleoplasma de los dinoflagelados, difieren en morfología y tamaño con las observadas en el núcleo de animales, plantas y hongos.

Las RNPs de dinoflagelados se han estudiado utilizando la técnica de contraste preferencial desarrollada por Bernhard W. en 1969, de esta manera se ha podido observar que en la periferia de los cromosomas se localizan fibras y gránulos pericromatinianos, estos últimos con un diámetro de 30-50 nm y rodeados por un halo blanco, los cuales se pueden encontrar aislados o en grupos. También existen gránulos extracromosomales dispersos en el nucleoplasma, estos son de menor tamaño y llegan a formar pequeños grupos, por otra parte, utilizando técnicas de inmunolocalización (Alverca et al., 2006) se ha comprobado la presencia de estructuras que poseen RNAs pequeños nucleares (U1 a U6) tales como los cuerpos de espiralados o de Cajal cuyo número varía en un rango de 1 a 23 dependiendo de la especie y el estado fisiológico de la célula (Alverca et al., 2006).

2. 2. 5 Transcripción

Tomando en cuenta las diferencias nucleares de los dinoflagelados se puede llegar a pensar que la organización, regulación y la expresión de genes podrían ser diferentes a la de otros eucariontes, pero se ha encontrado que la topología de la transcripción en dinoflagelados es similar a la de eucariontes superiores, puesto que evidencias experimentales y observacionales (González, 1988; Soyer - Gobillard et al., 1990; Echeverría et al., 1993; Moreno et al., 2005; Alverca et al., 2006) apoyan fuertemente la idea de que la transcripción en dinoflagelados ocurre en los filamentos de DNA periféricos del cromosoma, proceso similar al de eucariontes superiores en donde la transcripción se da al borde de la cromatina compacta, sitio en el que se encuentran las fibras pericromatinianas (Puvion & Puvion., 1996).

La existencia de compartimentos subnucleares, específicos para la transcripción y la biogénesis de snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) en dinoflagelados, ha sido estudiada utilizando inmunofluorescencia y MET. Estos estudios han mostrado la presencia de proteínas (histone-like), factores de transcripción y actina nuclear en las asas de DNA que salen de los cromosomas, lo que sugiere que cumplen con una función importante en la remodelación, la transcripción y el “splicing” del RNA (Alverca et al., 2006).

El tamaño de las RNPs no nucleolares encontradas en el núcleo de dinoflagelados simbioses es muy pequeño (González, 1988), si se les compara con las RNPs de eucariontes superiores, por ejemplo, las partículas más grandes que se han encontrado en los dinoflagelados simbioses llegan a medir hasta 12 nm, mientras que en eucariontes superiores estas partículas llegan a medir hasta 0.5 μm , existen casos en que las RNPs de dinoflagelados de vida libre son ultraestructuralmente muy parecidas a las observadas en animales y plantas como es el caso de los cuerpos espiralados que alcanzan tamaños grandes, por ejemplo, en especies como *Akashiwo sanguinea* y *Alexandrium lusitanicum* llegan a medir 0.5 μm (Alverca et al., 2006).

III. OBJETIVO

Caracterización del núcleo de dinoflagelados simbiontes utilizando técnicas ópticas ultraestructurales, citoquímicas e inmunocitoquímicas.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

4. 1 Material Biológico

Se utilizaron Dinoflagelados simbiotes de anémonas (Figura 5), que fueron colectadas en el arrecife coralino de la Isla Santiaguillo en el estado de Veracruz, México.

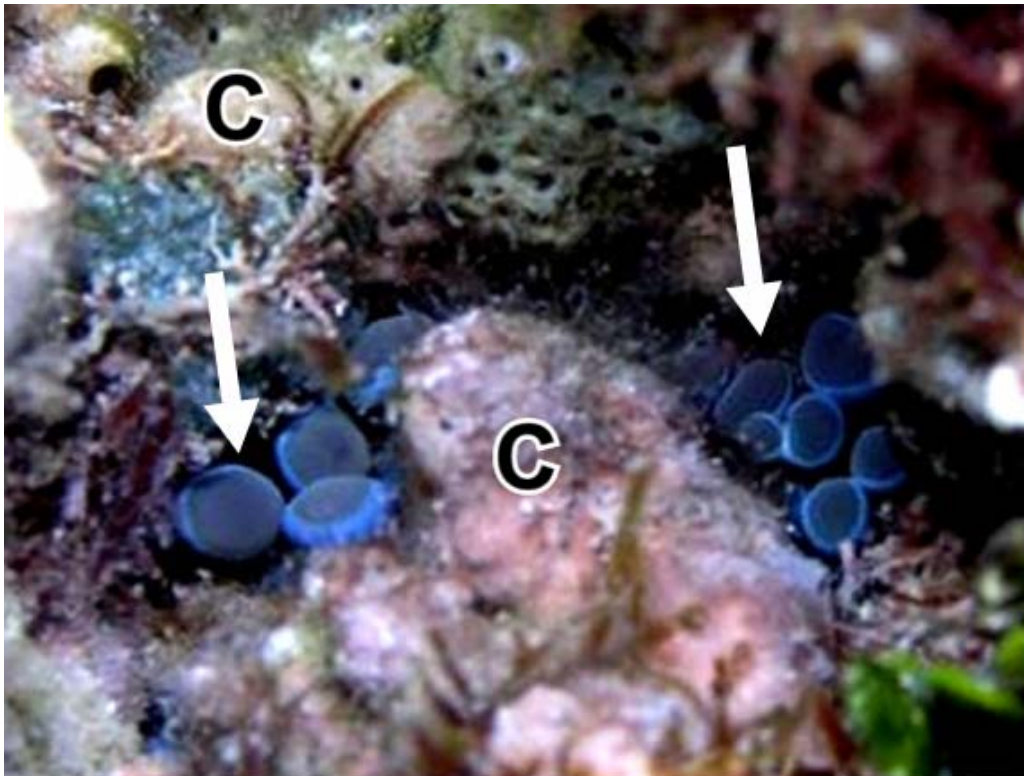


Figura 5: Arrecife coralino. Las anémonas (→) forman parte importante del ecosistema arrecifal, se fijan al sustrato en zonas de alta iluminación solar e intercambian nutrientes con otros organismos como los corales (C).

4. 2 Procesamiento para Microscopía Electrónica

Las anémonas colectadas fueron fragmentadas en trozos pequeños y procesadas de dos maneras para obtener bloques incluidos en resina epóxica y en resina acrílica, los dos protocolos que se siguieron se describen en la figura 6.

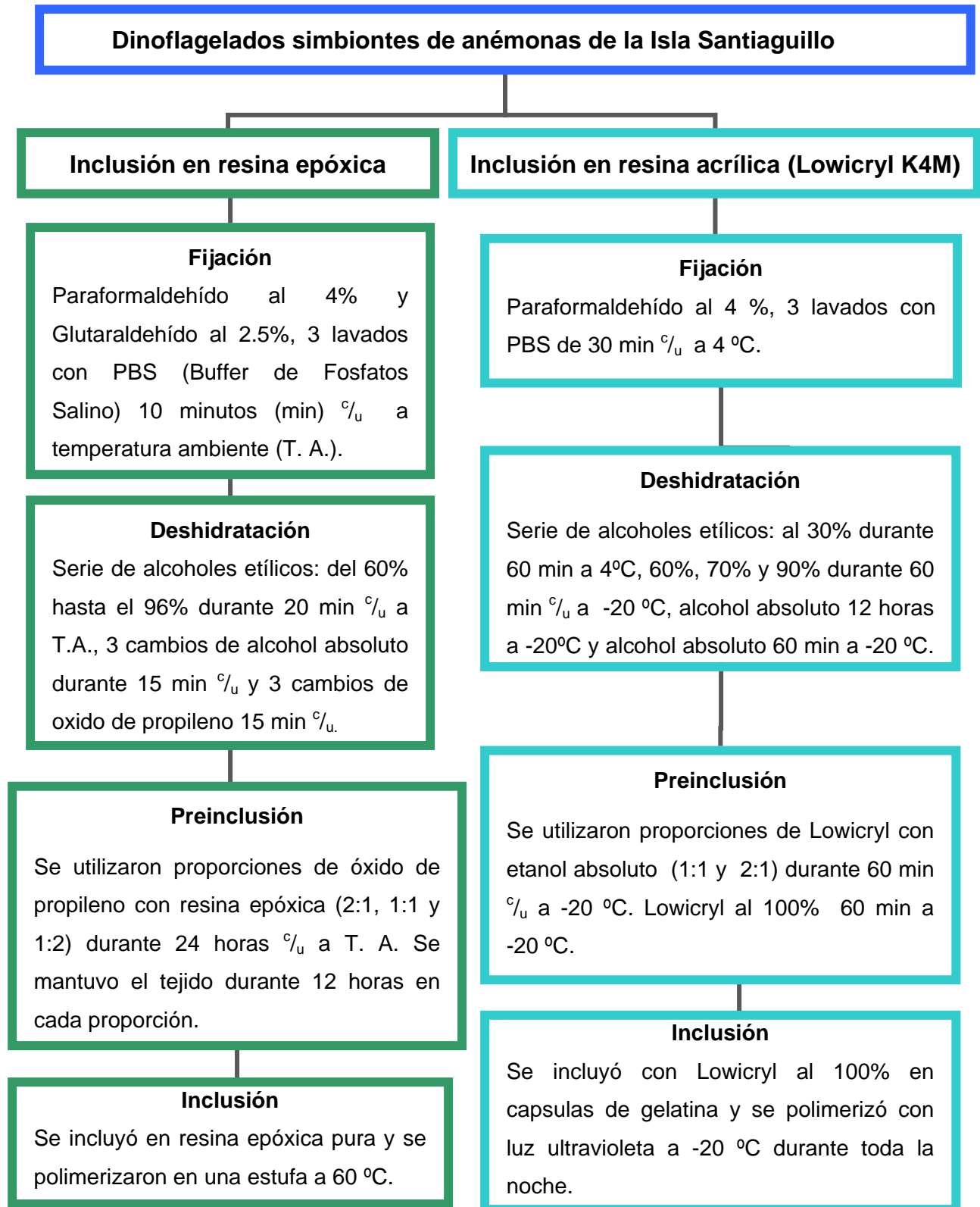


Figura 6: Esquema general del procesamiento de material biológico para microscopía electrónica.

Los bloques incluidos en ambas resinas se cortaron en un ultramicrotomo Leica, se obtuvieron cortes semifinos de aproximadamente 250 nm de espesor y se montaron en portaobjetos para realizar el estudio morfométrico, también se sacaron cortes ultrafinos de 60 - 90 nm los cuales se montaron en diferentes tipos de rejillas (cobre, níquel y oro) para realizar el estudio citoquímico e inmunocitoquímico.

4. 3 Procesamiento para Microscopía Óptica

Las anémonas fueron fragmentadas en trozos pequeños y procesadas de la siguiente manera: la fijación fue con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos por 2 horas a 4°C, se realizaron 3 lavados con PBS, después se deshidrató con etanol gradual (70, 80 y 90%) por 30 minutos cada uno y dos cambios de etanol absoluto. Posteriormente, se colocaron las muestras en las siguientes sustancias: alcohol- xilol (30 minutos), aceite de cedro- xilol (1 hora), xilol (15 minutos), parafina-xilol (1 hora) a 60°C, parafina pura 1 (1 hora) a 60°C, parafina pura 2 (1 hora) a 60°C y finalmente el tejido se incluyó en bloques de parafina.

Los bloques se cortaron en secciones de 1 a 2 μm de grosor y se montaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina para evitar que se desprendan durante su manejo.

4. 4 Técnicas de Contraste General

4. 4. 1 Contraste general con Azul de Toluidina

Los cortes semifinos incluidos en resina epóxica que se montaron en los portaobjetos fueron contrastados de la siguiente manera: se les agregó una gota de azul de toluidina y se calentaron hasta que apareciera un halo alrededor de la gota, posteriormente se lavaron con agua destilada y se montaron con medio de montaje Entellan.

4. 4. 2 Contraste general con Acetato de Uranilo y Citrato de plomo

En esta técnica se utilizan compuestos químicos con elementos de elevado número atómico y sales con poca capacidad de ionizarse. Estos compuestos se unen a las proteínas y a los ácidos nucleicos contrastando la mayoría de los componentes celulares, sin manifestar ninguna especificidad (Vázquez - Nin & Echeverría, 2000).

Para realizar este tipo de contraste se utilizaron rejillas de cobre con cortes ultrafinos incluidos en resina epóxica, primero se contrastaron con Acetato de Uranilo por 20 min dentro de una caja de petri con algodón húmedo y protegidas de la luz, posteriormente se lavaron por goteo con agua destilada y se contrastaron con Citrato de Plomo en una caja de petri con "lentejas" de hidróxido de sodio durante 10 min, después se lavaron por goteo con agua destilada y se dejaron secar.

4. 5 Técnicas de Contraste Citoquímico

Las técnicas de contraste citoquímico que se utilizan para observar la ultraestructura celular suelen ser de dos tipos (preferencial y específica).

4. 5. 1 Contraste preferencial de RNP con Acetato de Uranilo- EDTA- Citrato de Plomo

Entre los métodos que se utilizan para obtener el contraste preferencial de solo ciertas estructuras, se encuentra la técnica que desarrolló Bernhard W. en 1968, la cual se basa en el uso clásico de sales como el uranilo, el EDTA (Acido-etilen-diamino-tetracético) como agente quelante y el plomo.

Utilizando estas sustancias los componentes celulares que contienen ribonucleoproteínas son contrastados y las deoxiribonucleoproteínas pierden el contraste sin ser extraídas. Este contraste preferencial se realizó utilizando rejillas de cobre con cortes ultrafinos incluidos en resina epóxica, las cuales fueron contrastadas con Acetato de Uranilo durante 6 min, se lavaron con agua destilada y después se flotaron en EDTA (agente quelante) durante 1 min, se lavaron con agua destilada y se contrastaron con Citrato de Plomo durante 7 min, al final se lavaron con agua destilada.

4. 5. 2 Contraste preferencial de DNA con Ácido Fosfotúngstico (PTA)

La técnica de contraste que se realiza con PTA, fue propuesta por el Dr. Gerardo H. Vázquez - Nin como un método muy simple cuyo resultado es el contraste preferencial de deoxirribonucleoproteínas (DNP's) en estado compacto y extendido; se basa en el uso de medios de inclusión hidrofílicos como es el caso del glicolmetacrilato (GMA) y el Lowicyl y la utilización del PTA como un agente contrastante (Vázquez - Nin et al.,

1973). Para obtener este contraste se utilizaron rejillas de cobre con cortes ultrafinos incluidos en resina acrílica (Lowicryl K4M), se colocaron sobre la solución de PTA con un pH de 2 durante 30 min a T. A., por último se lavaron suavemente con agua destilada.

4. 5. 3 Contraste específico para DNA con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

El DAPI es un colorante fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol, forma puentes de hidrógeno con la doble cadena de DNA, por lo tanto, se utiliza para la tinción específica del núcleo en células vivas y fijadas, para la contra-tinción en inmunofluorescencias realizadas en material humano y botánico, y en citometría de flujo. Este tipo de contraste se realizó en cortes incluidos en parafina los cuales se desparafinaron con xilol e hidrataron con etanol gradual (del 100 al 30%) hasta llegar a agua destilada, posteriormente se lavaron con PBS durante 3 min y se les agregó la solución de DAPI (Boehringer, 10 microgramos/mililitro) durante 5 min, se lavaron con PBS y se montaron con medio de montaje para fluorescencia DAKO.

4. 5. 4 Contraste específico para DNA con Amina de Osmio

Un método que también se utiliza para contrastar DNA de una forma específica es el que se realiza con una solución de Amina de Osmio y dióxido de azufre después de una hidrólisis con Acido clorhídrico en cortes incluidos tanto en resinas epóxicas como en acrílicas (Vázquez - Nin et al., 1995). Para realizar esta técnica se utilizaron rejillas de oro con cortes ultrafinos un poco gruesos (de 90 a 100 nm) incluidos en resina epóxica, primero se hidrolizaron en una solución 5N de ácido clorhídrico durante 30 min a T. A., posteriormente se lavaron por inmersión con agua destilada, se contrastaron con Amina de Osmio dentro de cápsulas cerradas durante toda la noche a 4°C en absoluta oscuridad y al final se lavaron con agua destilada por goteo.

4. 5. 5 Contraste específico de las Regiones del Organizador Nucleolar (AgNOR) para microscopía óptica y electrónica

La tinción de plata que contrasta regiones del organizador nucleolar (AgNOR), es ampliamente utilizada para la evaluación de la función nucleolar, puesto que el AgNOR corresponde a los sitios de transcripción del RNA ribosomal, las modificaciones de los RNA transcritos y su ensamble en ribosomas funcionales (Lindner, 1993).

El contraste para microscopía óptica se realizó en cortes desparafinados (como se describió anteriormente), se incubaron en una solución 2:1 de nitrato de plata al 50% y gelatina durante 45 min a T. A., siempre protegidos de la luz, al final los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se montaron con medio de montaje DAKO.

Para microscopía electrónica se utilizaron rejillas de níquel con cortes ultrafinos incluidos en resina acrílica (Lowicryl K4M), éstas rejillas se incubaron por 10 minutos en una solución igual a la descrita para microscopia óptica, por último se lavaron con agua destilada.

4. 6 Estudio Morfométrico

El estudio morfométrico se realizó a nivel de microscopía óptica, después de calibrar el microscopio con la ayuda de un ocular y una reglilla micrométrica, se obtuvieron imágenes a un aumento de 100X de cortes semifinos incluidos en epón y contrastados con azul de toluidina. En cada micrografía se midieron en milímetros, el tamaño celular de cada Dinoflagelado y el tamaño de los núcleos, tomando como criterio los diámetros más grandes. Posteriormente, se realizó la conversión de milímetros (mm) a micrómetros (μm) de los datos obtenidos, tomando como base que 2.5 mm equivalen a 1 μm , por último, se procesaron en el programa *Statistical Product for Service Solutions* (SPSS) para obtener la estadística descriptiva pertinente.

4. 7 Técnicas Inmunocitoquímicas

Con las técnicas inmunocitoquímicas, muchas proteínas y otras moléculas antigénicas se pueden localizar utilizando la especificidad que otorga la reacción entre un antígeno y su anticuerpo, lo que se llama inmunolocalización. El anticuerpo primario es a su vez detectado por un segundo anticuerpo el cual fue desarrollado contra las gammaglobulinas del animal que produjo el primer anticuerpo. Este procedimiento se puede emplear a nivel de MO o de ME, en este último caso hará que se pueda detectar una marca electrodensa sobre los tejidos puesto que el segundo anticuerpo debe estar acoplado a algún marcador como es el oro coloidal. La marca electrodensa sobre los tejidos representada con granos de oro puede tener distintos tamaños que varían entre 2 y 30 nm de diámetro (Vázquez - Nin & Echeverría, 2000).

4. 7. 1 Inmunolocalización de DNA, Z-DNA y proteínas Sm en cortes ultrafinos para microscopia electrónica

Las inmunolocalizaciones se realizaron en cortes ultrafinos incluidos en resina acrílica (Lowicryl K4M) y montados en rejillas de níquel, los anticuerpos primarios fueron diluidos en PBS - Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1mg/ml - Tween 20 al 0.05% (5 µl/10 ml) a las siguientes concentraciones: Anti-DNA (Mouse monoclonal, IgM, PROGEN) diluido 1:10, reacciona con todas las formas de DNA nativo y desnaturalizado, el Anti- Z-DNA (Sheep polyclonal, IgG, Abcam) diluido 1:25, se ha detectado especialmente en secuencias purina-pirimidina alternantes (CGCGCGCG) o en secuencias en las que alguna base, especialmente las citosinas, se han modificado por bromación o metilación lo cual hace que lo relacionen con el control de la expresión genética durante la transcripción (Rich & Zhang, 2003). Por último, el Anti- Y12 (Mouse monoclonal, IgG, NeoMarkers) diluido 1:1, reconoce antígenos Sm ribonucleoprotéicos que junto con los RNAs pequeños nucleares (U1, U2, U4, U5 y U6) forman el “spliceosoma” que participa en el “splicing” del pre-mRNA.

Para comenzar, cada rejilla se dejó flotando en suero normal de cabra (NGS) diluido 1:100 en PBS durante 5 minutos para bloquear sitios inespecíficos, posteriormente se

incubaron en el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS - BSA - Tween dentro de una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.

Las rejillas se lavaron con PBS - Tween 0.02% por goteo y se flotaron durante 10 minutos en PBS, posteriormente se realizó un segundo bloqueo con NGS durante 3 minutos y se incubaron en el segundo anticuerpo durante 1 hora, en el caso del Anti-DNA se utilizó Goat Anti-Mouse (GAM) IgM de 12 nm (Jackson) diluido 1:10 en PBS, para el Anti- Z- DNA se utilizó Donkey Anti-Sheep (DAS) IgG de 12 nm (Jackson) diluido 1:20 en PBS y para el Y-12 se utilizó GAM IgG de 18 nm (Jackson) diluido 1:20 en PBS. Las rejillas se lavaron con PBS durante 10 minutos y después con agua destilada otros 10 minutos. El contraste se hizo con Acetato de Uranilo durante 1 minuto.

Todas las rejillas que se obtuvieron de las técnicas de contraste y de las inmunolocalizaciones se observaron y fotografiaron en el microscopio electrónico JEM 1010, Jeol.

V. RESULTADOS

En esta investigación se observó la simbiosis entre una anémona y *Symbiodinium sp.*. La anémona como un animal diblástico posee dos capas epiteliales, el ectodermo que se encuentra en contacto con el medio marino y el endodermo que se encuentra del lado de la cavidad gastrovascular del antozoo, ambas capas se encuentran separadas por la mesoglea (Figura 7) (Furla et al., 2005).

En las imágenes ópticas de los cortes transversales realizados a los tentáculos de las anémonas, se puede observar la manera en que los dinoflagelados ocupan casi la totalidad de la cavidad tentacular, se les suele encontrar de manera abundante por debajo de la mesoglea, formando la población celular más grande de la capa endodérmica o gastrodermis (Figura 7), la cantidad de dinoflagelados va disminuyendo conforme se acercan al centro de la cavidad tentacular, se ha calculado que un milímetro cuadrado de tejido hospedero puede contener aproximadamente de 1 a 2 millones de dinoflagelados (Graham & Wilcox, 2000).

La gran cantidad de organismos simbioses que se encuentran en los tentáculos, es debido a que en esta zona el hospedero recibe directa y prolongadamente la energía solar y, por lo tanto, es el lugar en donde los dinoflagelados reciben la mayor cantidad de fotones, los cuales son utilizados durante la fotosíntesis.

La estrecha relación que guarda *Symbiodinium sp.*, con su hospedero (Figura 8) resulta en beneficios importantes para ambos, ya que mientras el simbiote contribuye a la nutrición del hospedero fijando dióxido de carbono y liberando oxígeno, el hospedero libera nitrógeno en forma de urea y amonio el cual es aprovechado por el simbiote (Van Den Hoek et al., 1995; Furla et al., 2005).

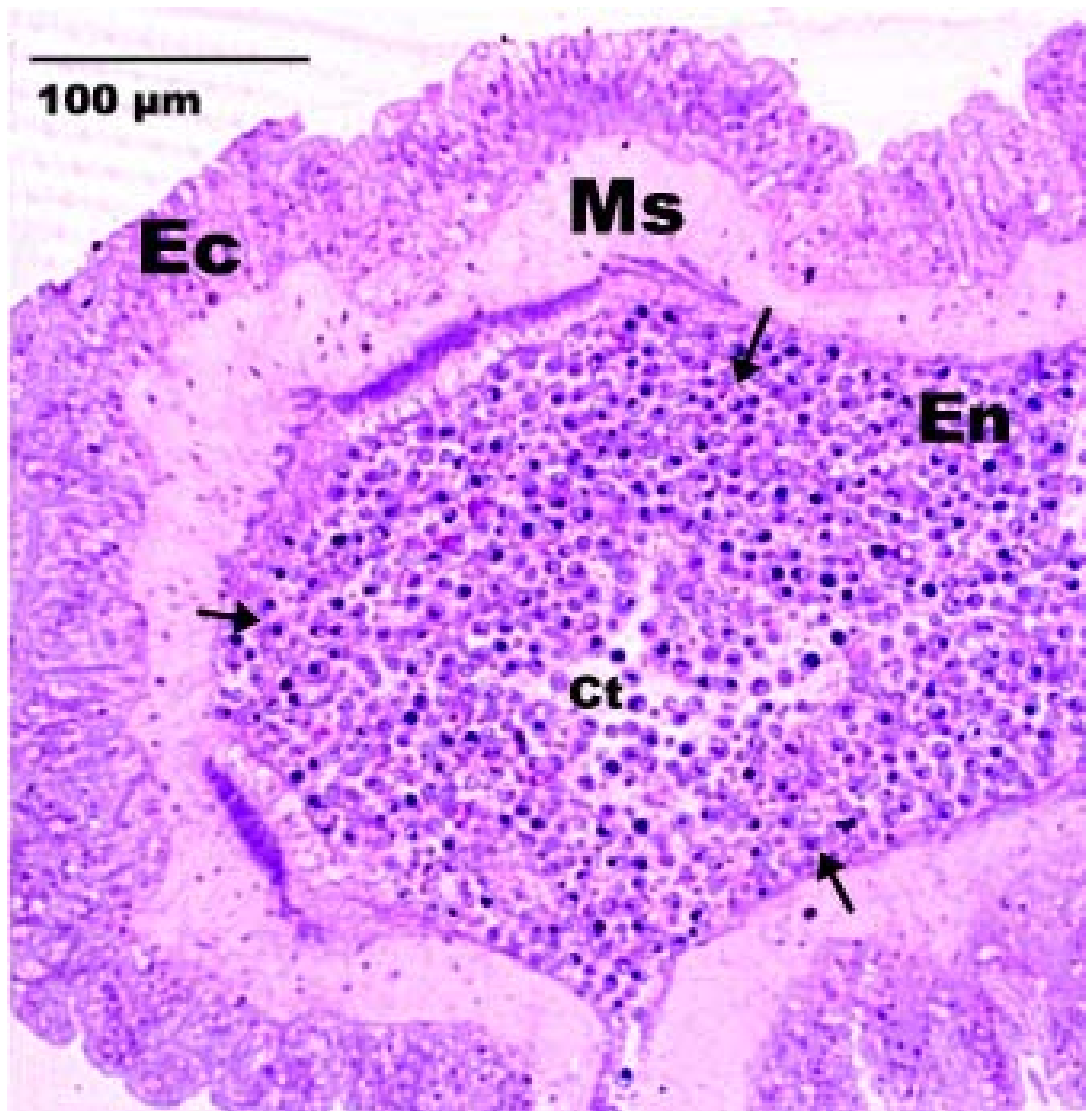


Figura 7: Microscopía óptica contrastada con Azul de Toluidina. Corte transversal del tentáculo de una anémona. Ectodermo (Ec), Mesoglea (Ms), Endodermo (En), Dinoflagelados (→), Cavity tentacular (Ct).

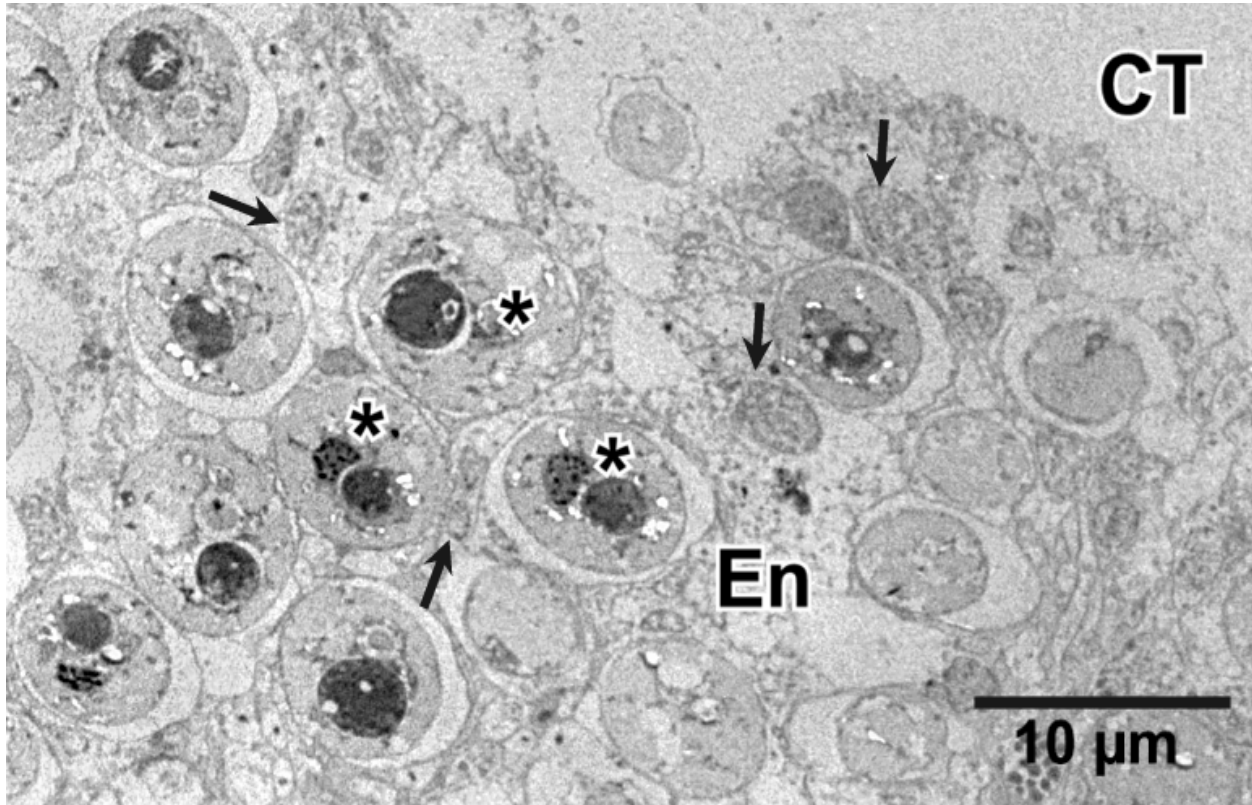


Figura 8: Micrografía electrónica contrastada con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. Se puede observar la estrecha relación entre *Symbiodinium sp.* y las células endodermales de la anémona. Endodermo (En), núcleo de las células Endodermales (→), *Symbiodinium sp.* (*), Cavidad Tentacular (CT). 2000X.

5. 1 Características Ultraestructurales de *Symbiodinium sp.*

La ultraestructura de *Symbiodinium sp.* (Figura 9), muestra los cloroplastos ubicados hacia la periferia celular, tienen forma alargada y varios tilacoides en su interior orientados de forma paralela al eje mayor del organelo. El núcleo ocupa una posición central y es de forma arriñonada, se puede distinguir la envoltura nuclear, los cromosomas compactados, un nucleoplasma fibrogranular y un prominente nucleolo siempre con una posición hacia la periferia nuclear.

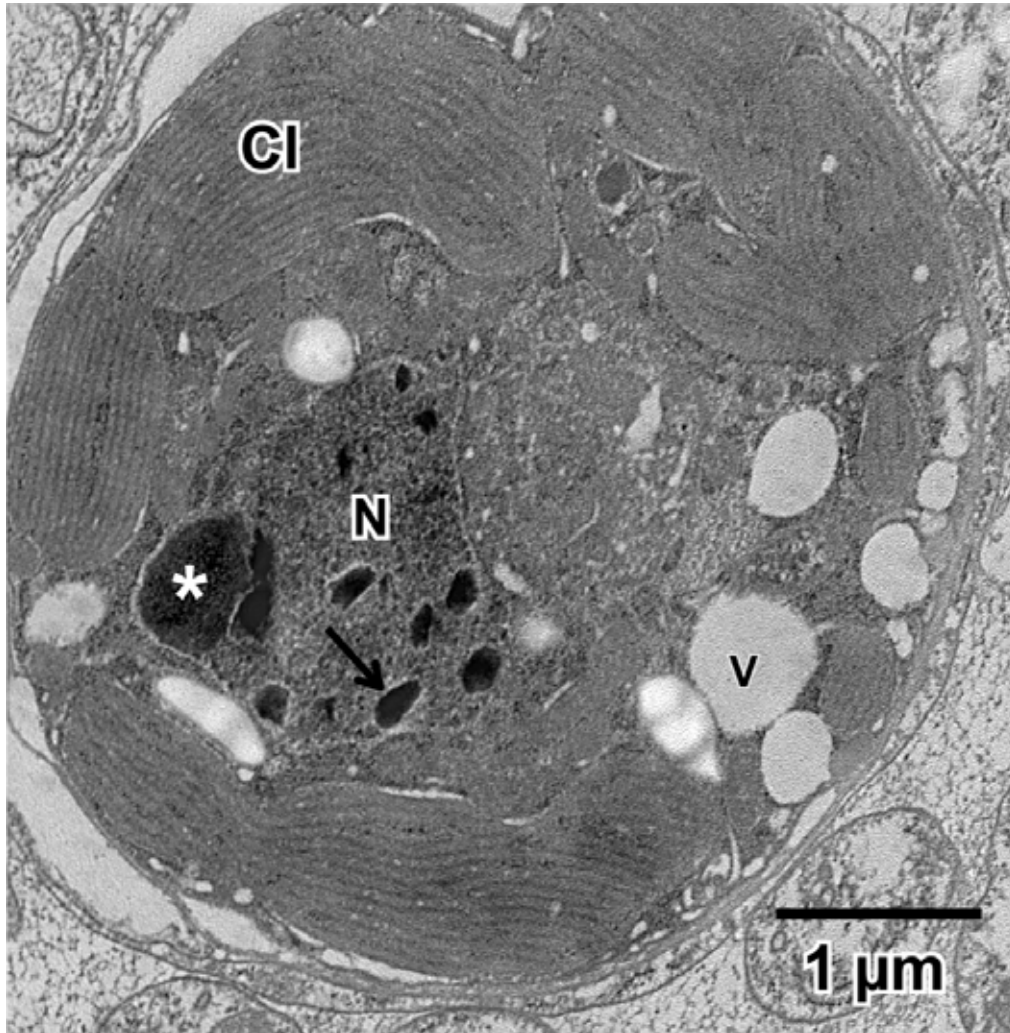


Figura 9: Micrografía electrónica contrastada con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. Ultraestructura característica de *Symbiodinium* sp. con cloroplastos (Cl) hacia la periferia, núcleo (N) con cromosomas condensados (→), nucleolo (*) y varias vacuolas (V) 25 000X.

Otros organelos de gran tamaño son el pirenoide y las vacuolas digestivas (Figura 10A). El pirenoide es de forma redonda y posee un halo blanco alrededor constituido por polisacáridos, es un organelo que se encuentra delimitado por una membrana que es continua con la membrana de los cloroplastos (Figura 10B). Aunque al pirenoide se le han atribuido varias funciones, su rol específico con el cloroplasto es aún desconocido.

El pirenoide se ha definido como una estructura que puede servir como (a) un sitio para almacenar almidón, (b) un almacén temporal de productos primarios fotosintéticos, y (c) un sitio de producción de la enzima almidón sintasa responsable de la conversión de la glucosa en almidón (Spector, 1984; Dodge, 1968).

Las vacuolas digestivas de *Symbiodinium sp.*, son los organelos que aparecen más oscuros en los métodos de contraste habituales. Poseen una elevada autofluorescencia y generalmente tienen un tamaño mayor al del pirenoide. Se sugiere que las vacuolas digestivas son estructuras temporales de acumulación en las que se han encontrado microcuerpos y ribosomas, por lo tanto, se cree que son cuerpos llenos de productos de la autólisis. Las vacuolas digestivas se mueven hacia la superficie celular y liberan su contenido al exterior (Taylor, 1987).

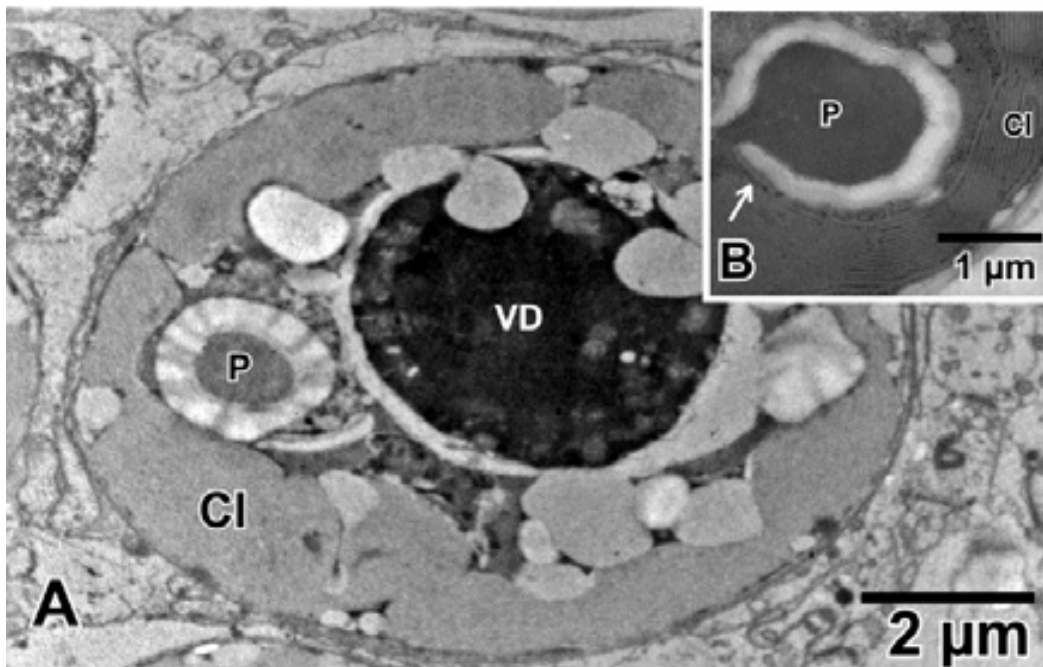


Figura 10: Micrografías electrónicas contrastadas con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. **(A)** Corte transversal de *Symbiodinium sp.*, en donde se distinguen la vacuola digestiva (VD), el pirenoide (P) y los cloroplastos (Cl). 10 000X. **(B)** Pirenoide (P) delimitado por una continuación de la membrana (→) de los cloroplastos (Cl). 15 000X.

5. 2 Estudio Morfométrico de *Symbiodinium sp.*

En las micrografías ópticas que se tomaron a los tentáculos de las anémonas procesadas, se encontró una población abundante de dinoflagelados en la capa endodérmica con un núcleo bien contrastado y varios cromosomas en su interior (Figura 11), el tamaño celular de cada dinoflagelado se midió en una muestra representativa de la población (N=141), y el tamaño nuclear se midió en una muestra (N=162).

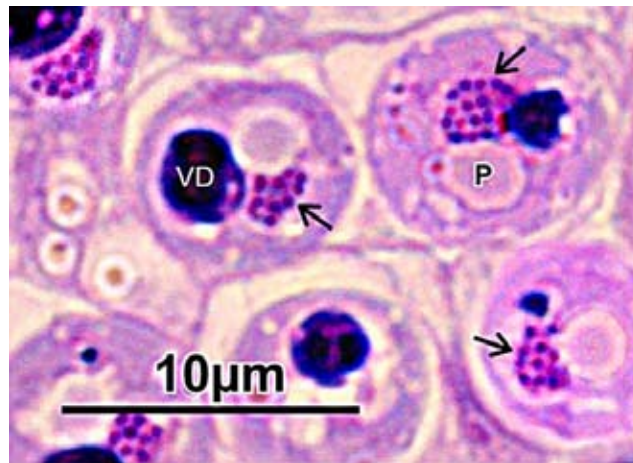


Figura 11: Micrografía óptica contrastada con Azul de Toluidina. Corte transversal del tentáculo de una anémona, se pueden observar dinoflagelados del género *Symbiodinium sp.*, con tres de sus organelos celulares; el núcleo con cromosomas condensados (→), el pirenoide (P) con su halo blanco y la vacuola digestiva (VD) de gran tamaño y muy contrastada. 100X.

Con respecto al tamaño celular de *Symbiodinium sp.*, los datos poseen una distribución normal (Figura 12) con una media de 9 μm y una desviación estándar de 0.73, mientras que los valores del tamaño nuclear se distribuyen con una media de 3 μm y una desviación estándar de 0.31. La información obtenida de este estudio morfométrico se resume en la tabla 1.

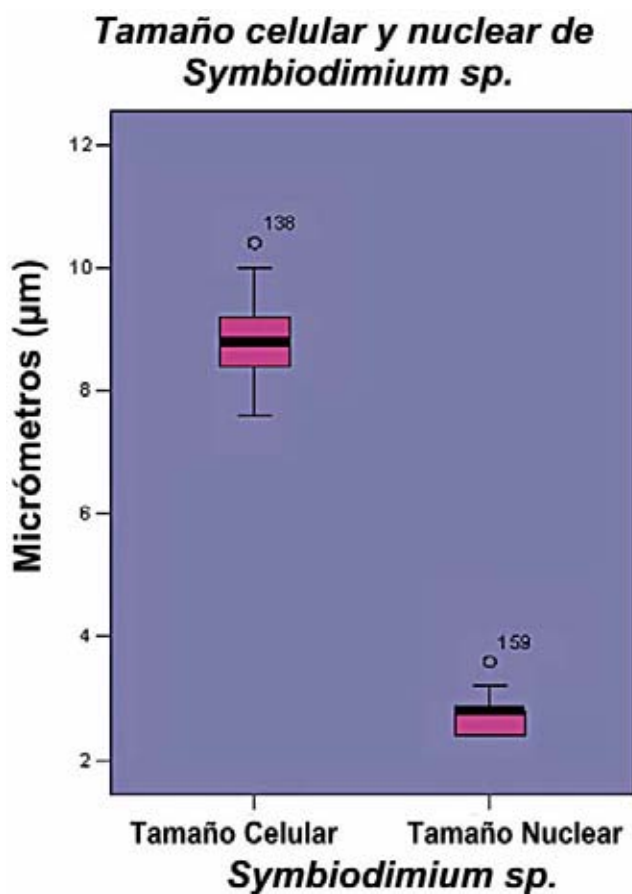


Figura 12: Gráfica que muestra la distribución de los datos de las dos variables medidas en *Symbiodinium sp.*

	N	Valor Mínimo (µm)	Valor Máximo (µm)	Media (µm)	Desviación Estándar
Tamaño Celular de <i>Symbiodinium sp.</i>	141	7.6	10.4	9	0.7301
Tamaño Nuclear de <i>Symbiodinium sp.</i>	162	2.4	3.6	3	0.3170

Tabla 1: Estadística descriptiva de las dos variables medidas. Se muestra el rango en el que oscilan los datos, la media que corresponde a cada variable y su desviación estándar.

5. 3. Caracterización del Núcleo de *Symbiodinium sp.*

5. 3. 1 Características Ultraestructurales

La tinción estándar con acetato de uranilo-citrato de plomo muestra el núcleo celular de *Symbiodinium sp.*, delimitado por la envoltura nuclear, con sus cromosomas de forma ovalada típicamente compactados y bandeados, también se puede observar el nucleoplasma con partículas polimórficas de diferente tamaño (Figura 13).

El nucleolo en todos los casos se observó adosado a la periferia nuclear, su composición se asemeja a la de eucariontes superiores ya que se une intensamente a los agentes de contraste y posee regiones fibrilares y granulares, en esta especie no se detectaron centros fibrilares. Es común que al nucleolo se le encuentre en contacto con cromosomas que posiblemente posean regiones del organizador nucleolar (Figura 14).

5. 3. 2 Cromatina

La tinción con DAPI contrastó específicamente el núcleo de *Symbiodinium sp.* (Figura 15A), su forma es arriñonada y dependiendo del plano en el que se corte puede verse redondo u ovalado (Figura 15B).

La tinción con ácido fosfotúngstico contrasta la cromatina compacta y extendida, en los cromosomas no se observan detalles ultraestructurales como el bandeo, pero en su periferia hay finos filamentos de cromatina irradiados hacia el espacio extracromosomal, por otra parte, es posible distinguir el espacio que ocupa el nucleolo, negativo a esta técnica (Figura 16).

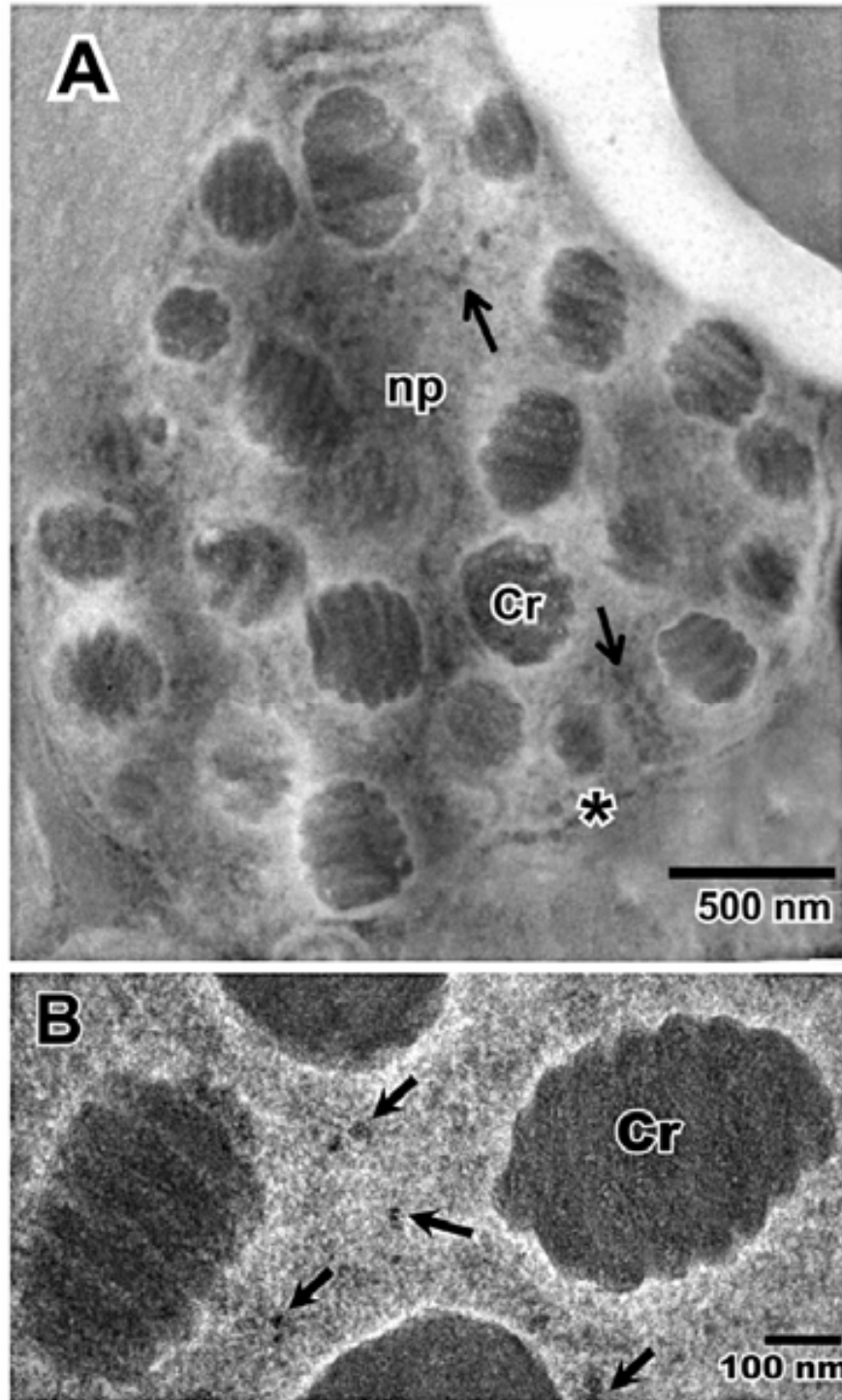


Figura 13: Contraste general con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. **(A)** Núcleo celular de *Symbiodinium sp.* Membrana nuclear (*), cromosomas bandeados cortados en diferentes planos (Cr), y nucleoplasma (np) con partículas (→) polimórficas de diferente tamaño. 40 000X. **(B)** Cromosomas bandeados (Cr) con filamentos en su periferia y nucleoplasma con partículas polimórficas (→). 100 000X.

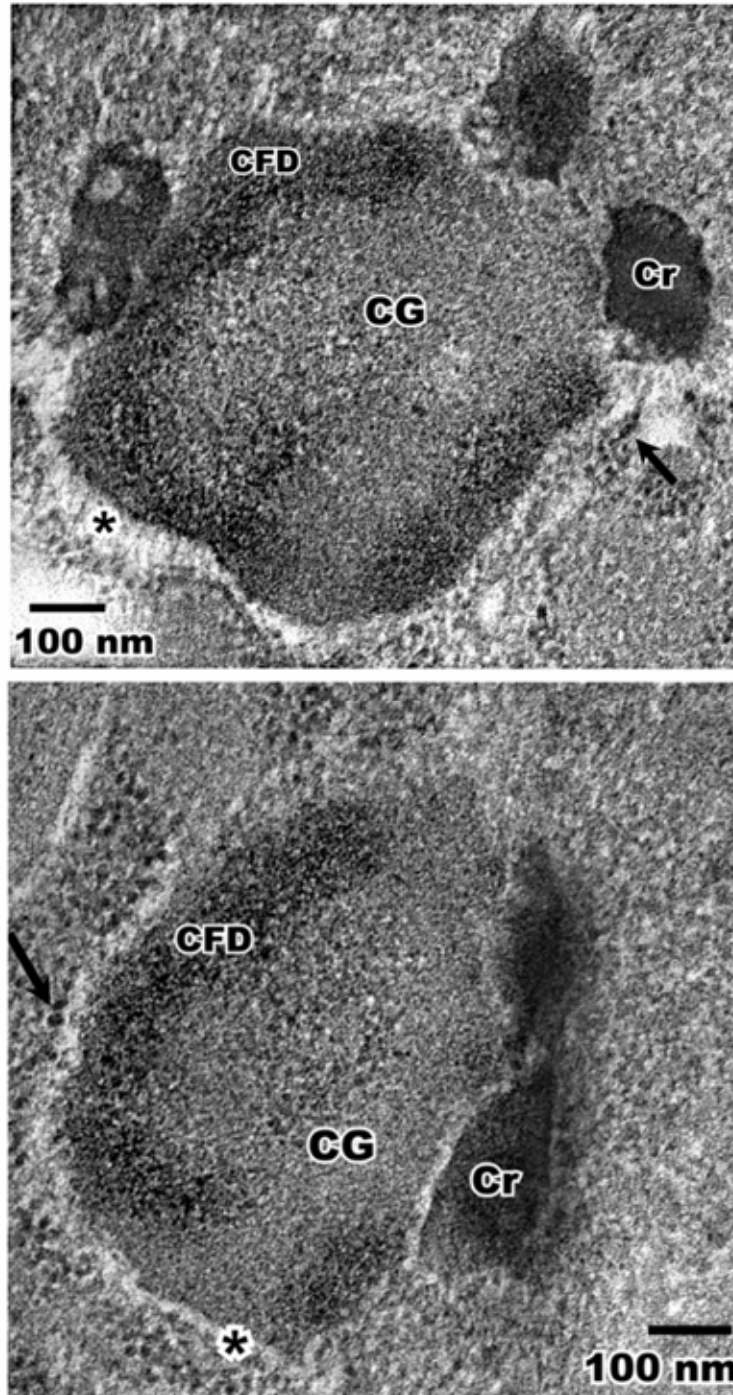


Figura 14: Tinción con Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo. Nucleolos adosados a la envoltura nuclear con sus componentes fibrilar denso (CFD) y granular (CG), es común ver cromosomas (Cr) en la periferia nucleolar. Se pueden observar ribosomas (→) adosados a la envoltura nuclear (*). 120 000X.

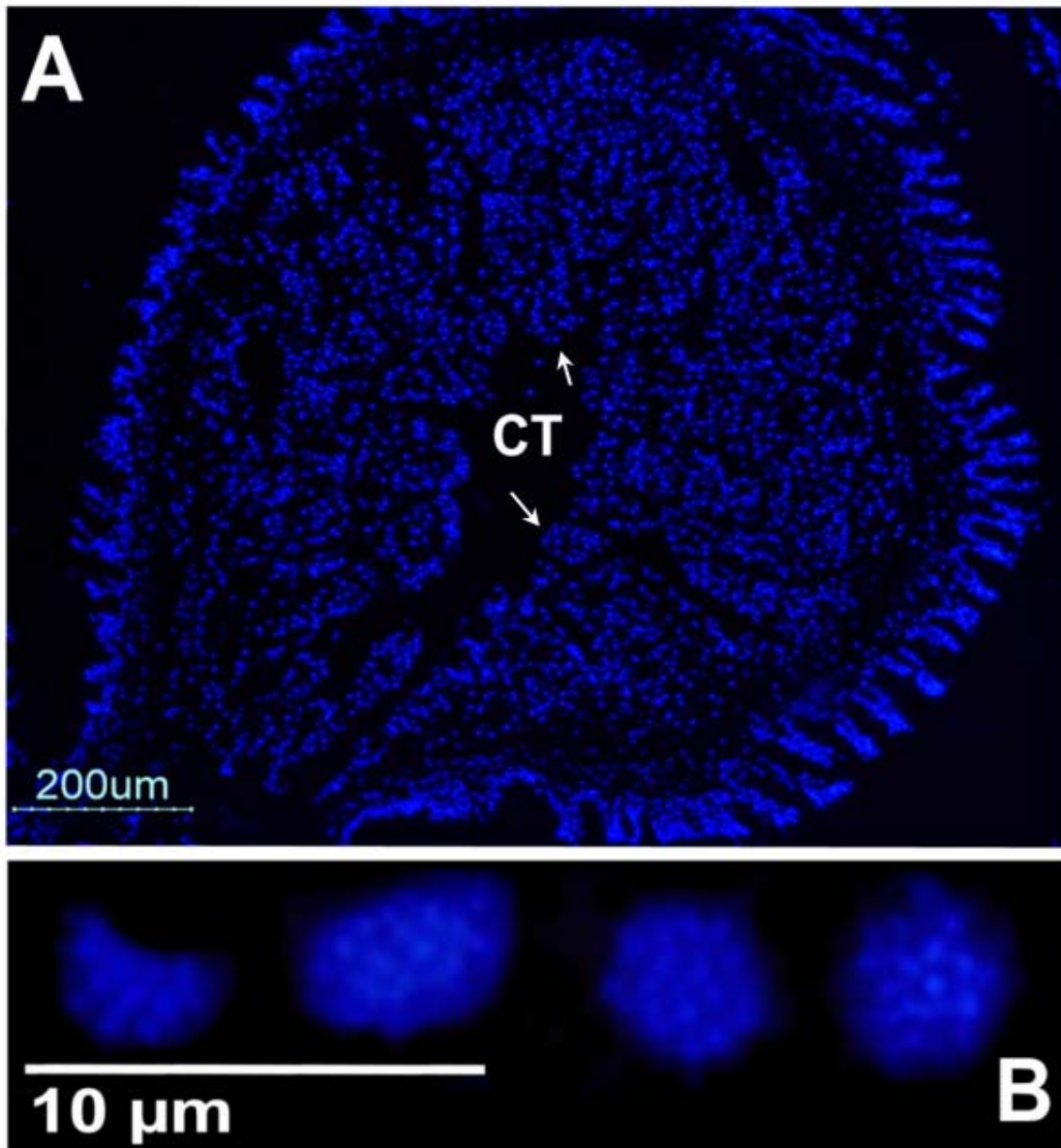


Figura 15: Micrografía óptica teñida con DAPI. **(A)** Tentáculo cortado en forma transversal, cada punto azul (→) en la cavidad tentacular (CT) corresponde a un núcleo de *Symbiodinium sp.* **(B)** Núcleo arriñonado de *Symbiodinium sp.* cortado en diferentes planos. Los puntos brillantes dentro de éste pertenecen a los cromosomas compactados.

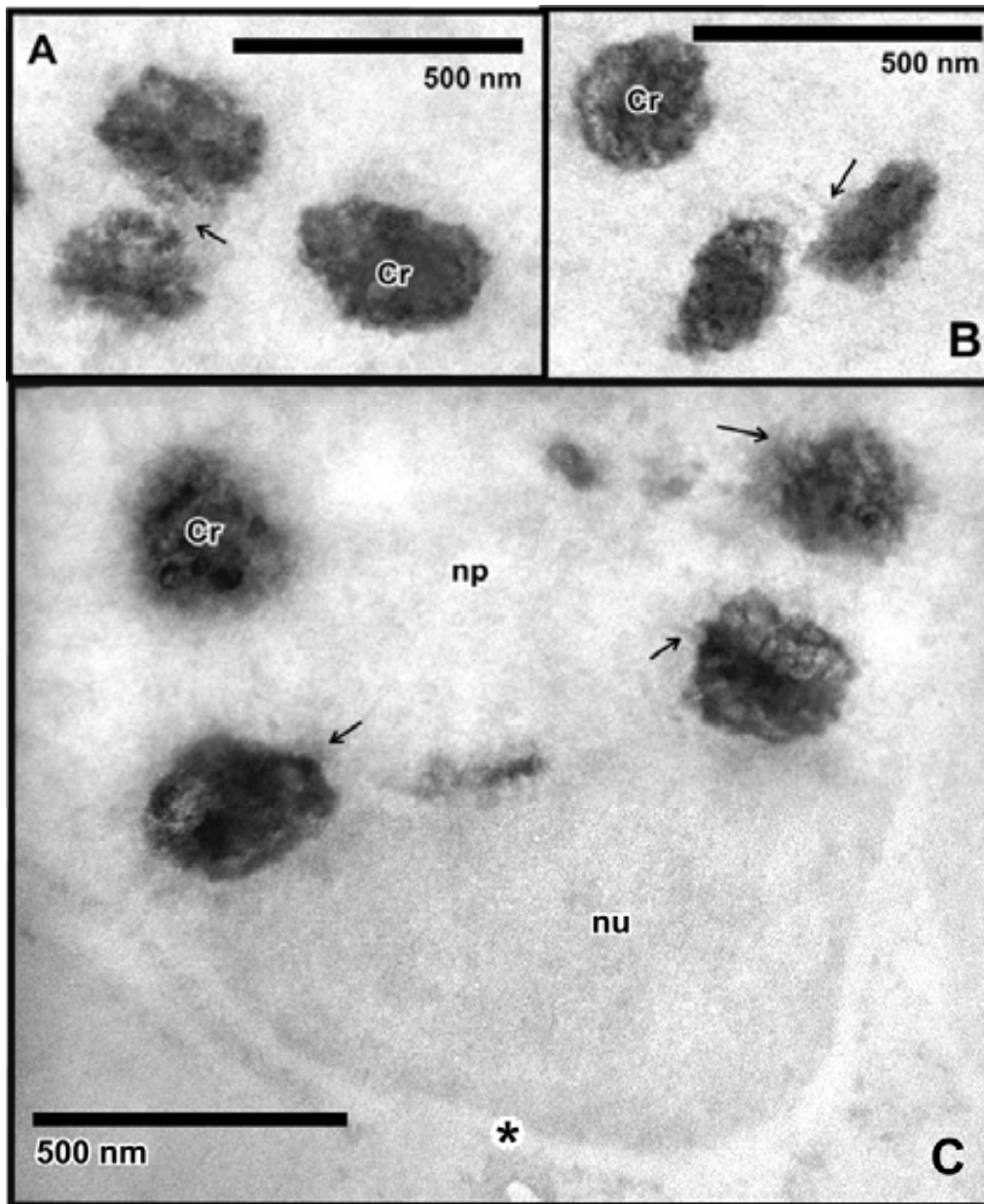


Figura 16: Contraste preferencial para DNA con PTA. **(A y B)** Cromosomas (Cr) con fibras de DNA (→) irradiadas hacia el espacio extracromosomal. 50 000X. **(C)** Sección nuclear en donde se distinguen fibras de cromatina laxa que rodean a los cromosomas (→), el nucleoplasma (np) y el nucleolo (nu) adosado a la envoltura nuclear (*) se encuentran negativos a la técnica. 60 000X.

Debido a la elevada sensibilidad y especificidad de la tinción con Amina de Osmio únicamente el DNA de los cromosomas adquiere contraste, dejando el nucleoplasma y los componentes extranucleares prácticamente sin tinción (Figura 17A). En imágenes a gran aumento es posible visualizar de una forma más clara la apariencia bandeada de los cromosomas proporcionada por la disposición de los filamentos de DNA (Figuras 17D, 17E y 17F).

Los espacios que se observan entre el DNA cromosomal posiblemente son ocupados por las moléculas del líquido cristalino que contribuyen a la morfología característica de los cromosomas. Estos espacios son más pequeños que los que se observan en otras especies de dinoflagelados de vida libre como *Amphidinium carterae* (Bouligand & Norris, 2001; Alverca et al., 2006). Por otra parte, también se observan fibras de DNA descondensadas que se extienden desde el interior de los cromosomas hacia el nucleoplasma (Figuras 17B, 17C, 17D, 17E y 17F).

Los cromosomas que se ubican cercanos al nucleolo se encuentran en un estado menos compacto, comparados con los que se encuentran en el nucleoplasma, e incluso algunos ya se encuentran parcialmente dentro de este compartimento (Figuras 17B y 17C).

La inmunolocalización de DNA en el núcleo interfásico de *Symbiodinium sp.*, marca de forma positiva zonas electrodensas correspondientes a los cromosomas compactos y bandeados, no existe una densidad significativa de marca en el nucleoplasma demostrando que todo, o al menos, la mayor parte de los filamentos de DNA se encuentran empaquetados dentro del cromosoma.

Las partículas de oro coloidal aparecen esparcidas en toda la superficie cromosomal, y en la mayoría de los casos, se encuentran en mayor cantidad en la zona central y disminuyen hacia la periferia (Figura 18).

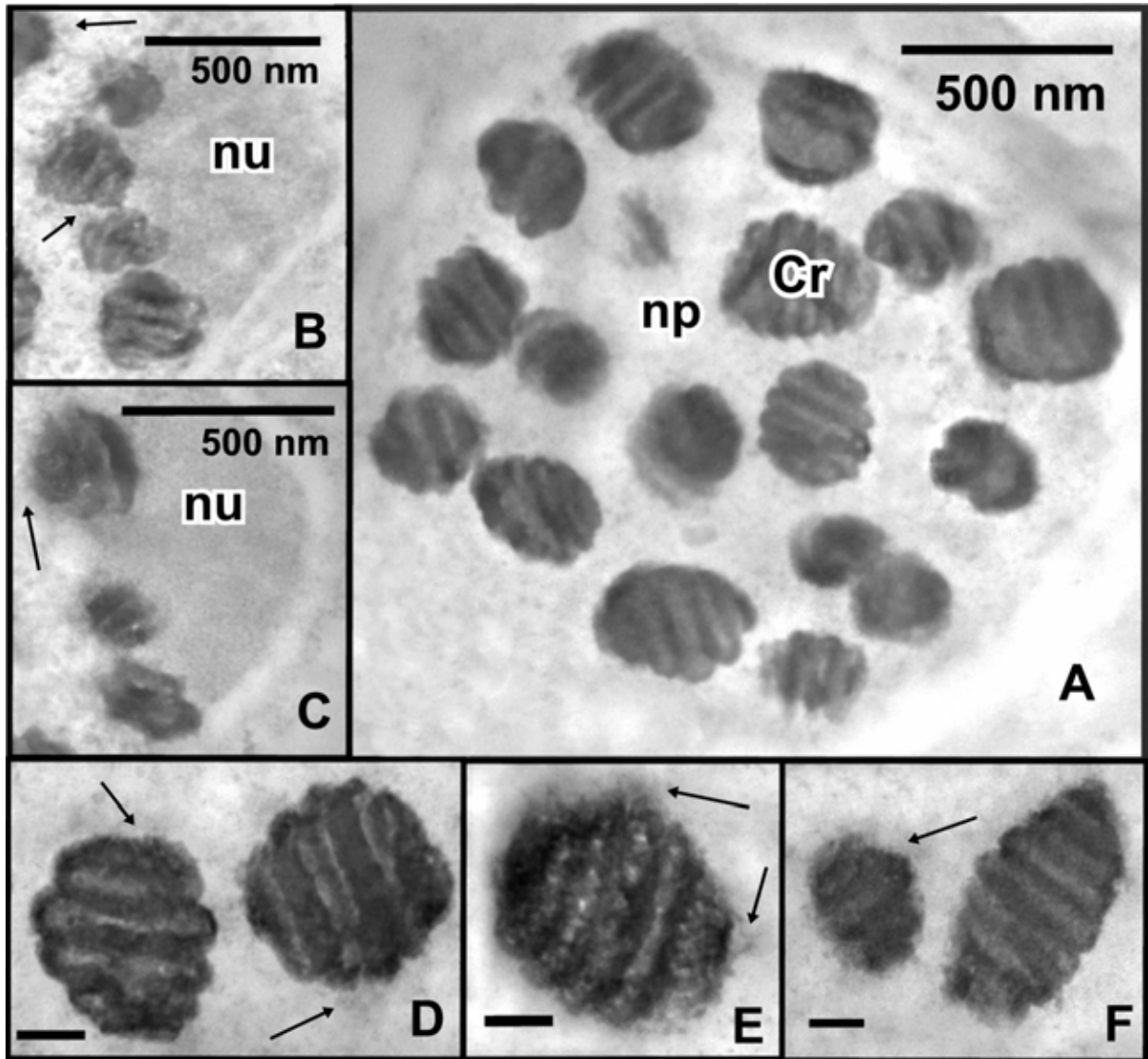


Figura 17: Contraste específico para DNA con Amina de Osmio. **(A)** Núcleo celular con cromosomas bandeados (Cr) y nucleoplasma (np) totalmente sin contraste. 60 000X. **(B y C)** Cromosomas ocupando parcialmente el nucleolo (nu) y con fibras de DNA en su periferia (→). 50 000X y 60 000X respectivamente. **(D, E y F)** Cromosomas bandeados dentro de los cuales existen espacios que posiblemente ocupan las moléculas del líquido cristalino, se puede distinguir mejor el DNA (→) descondensado en la región pericromosomal. 100 000X, 100 000X y 80 000X respectivamente. Barras de escala 100nm.

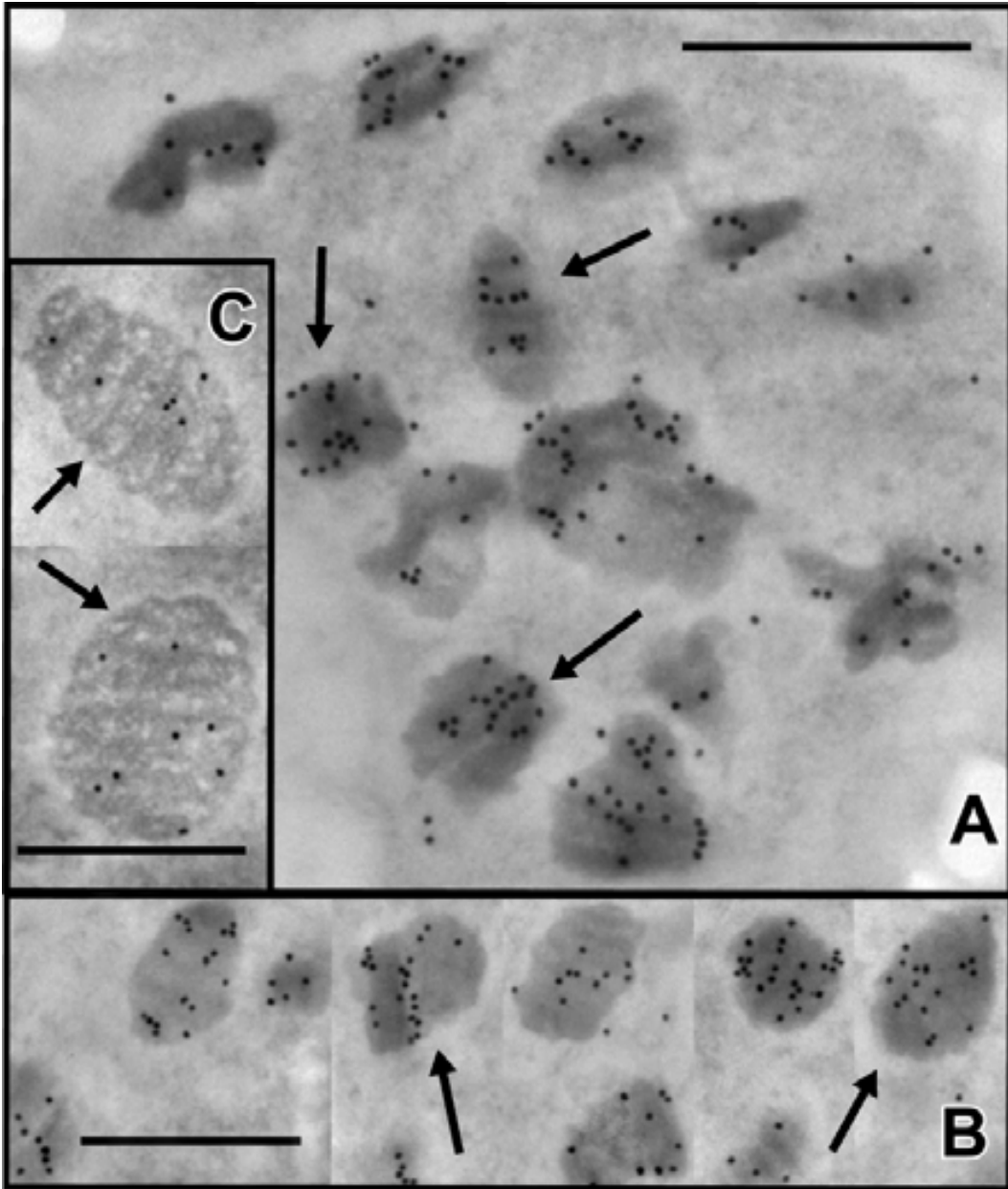


Figura 18: Inmunolocalización de DNA. **(A, B y C)** Núcleo interfásico de *Symbiodinium sp.* Se observan partículas de oro coloidal sobre los cromosomas (→). 60 000X, 50 000X y 50 000X respectivamente. Barras de escala 500 nm.

La inmunolocalización de Z-DNA marcó las zonas periféricas de los cuerpos cromosomales (Figura 19) confirmando la presencia de DNA con esta conformación en los sitios en donde se encuentran fibras y granos pericromatinianos rodeados por un típico halo claro (Alverca et al., 2006).

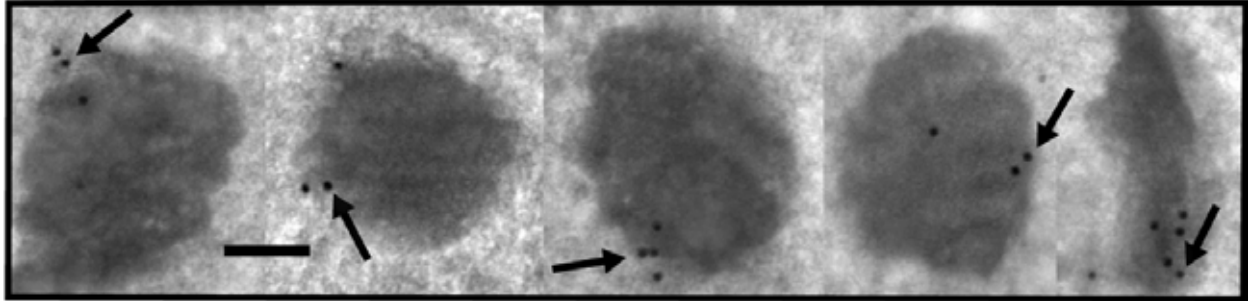


Figura 19: Inmunolocalización de Z-DNA. Las partículas de oro coloidal se distribuyen especialmente en la zona pericromosomal (→).10 000X. Barra de escala 100nm.

5. 3. 3 Partículas Ribonucleoprotéicas (RNPs)

La técnica para la tinción de RNPs realizada con Acetato de Uranilo- EDTA- Citrato de Plomo, contrasta fuertemente el nucleolo con sus componentes fibrilar denso y granular, al igual que una gran cantidad de gránulos polimórficos que se encuentran dispersos de manera homogénea en la región intercromatiniana y llegan a formar cúmulos de aproximadamente 50 nm de diámetro. Los cromosomas compactos se encuentran totalmente desteñidos y con un halo oscuro en su periferia. En la región pericromatiniana es posible distinguir finas fibras ribonucleoprotéicas saliendo de los cromosomas hacia el nucleoplasma y gránulos pericromatinianos semejantes a los que se encuentran en eucariontes superiores pero de un tamaño menor que oscila en un rango de 10 a 25 nm de diámetro (Figura 20).

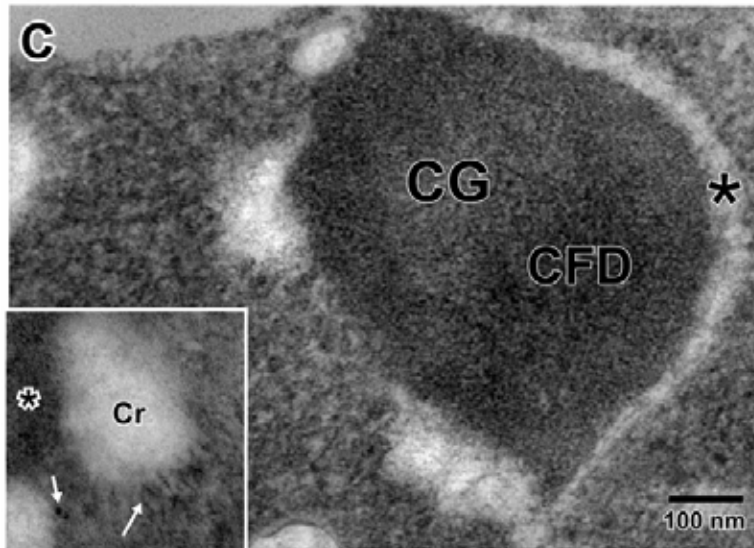
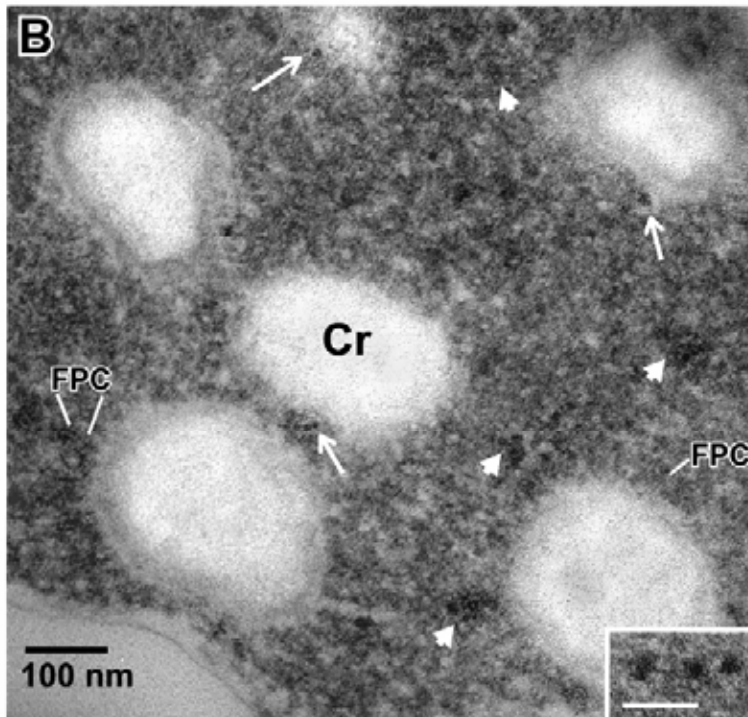
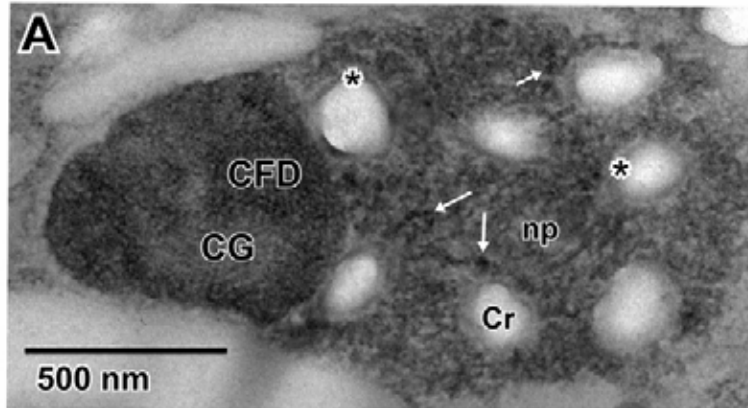


Figura 20: Contraste preferencial para RNPs. **(A)** Núcleo de *Symbiodinium sp.*, se observan cromosomas (Cr) blanqueados con una halo oscuro en su periferia (*). El nucleolo con sus dos componentes, el fibrilar denso (CFD) y el granular (CG) aparece muy contrastado, y en el nucleoplasma (np) se encuentra la presencia de RNPs (→). 60,000X.

(B) Cromosomas (Cr) con fibras pericromatinianas (FPC) saliendo hacia el nucleoplasma, gránulos pericromatinianos (→) y RNPs formando pequeños cúmulos (↘). 120,000X. **Recuadro.** Cúmulos RNPs con un diámetro aproximado de 50 nm. Barra de escala, 100 nm. 100,000X.

(C) Nucleolo adosado a la envoltura nuclear (*), se distinguen sus componentes fibrilar denso (CFD) y granular (CG), se observan cromosomas desteñidos en su periferia. **Recuadro.** Se observan fibras y gránulos pericromatinianos (→) en los cromosomas (Cr) que se encuentran en contacto con el nucleolo (*). 120,000X.

Con esta misma técnica se contrastaron estructuras ubicadas cerca de la periferia nuclear parecidas morfológicamente a los cuerpos de Cajal (Figura 21), pero si se les compara en tamaño con los que se encuentran en los núcleos celulares de mamíferos, estos llegan a ser hasta 5 veces menores, midiendo aproximadamente 100 nm de diámetro.

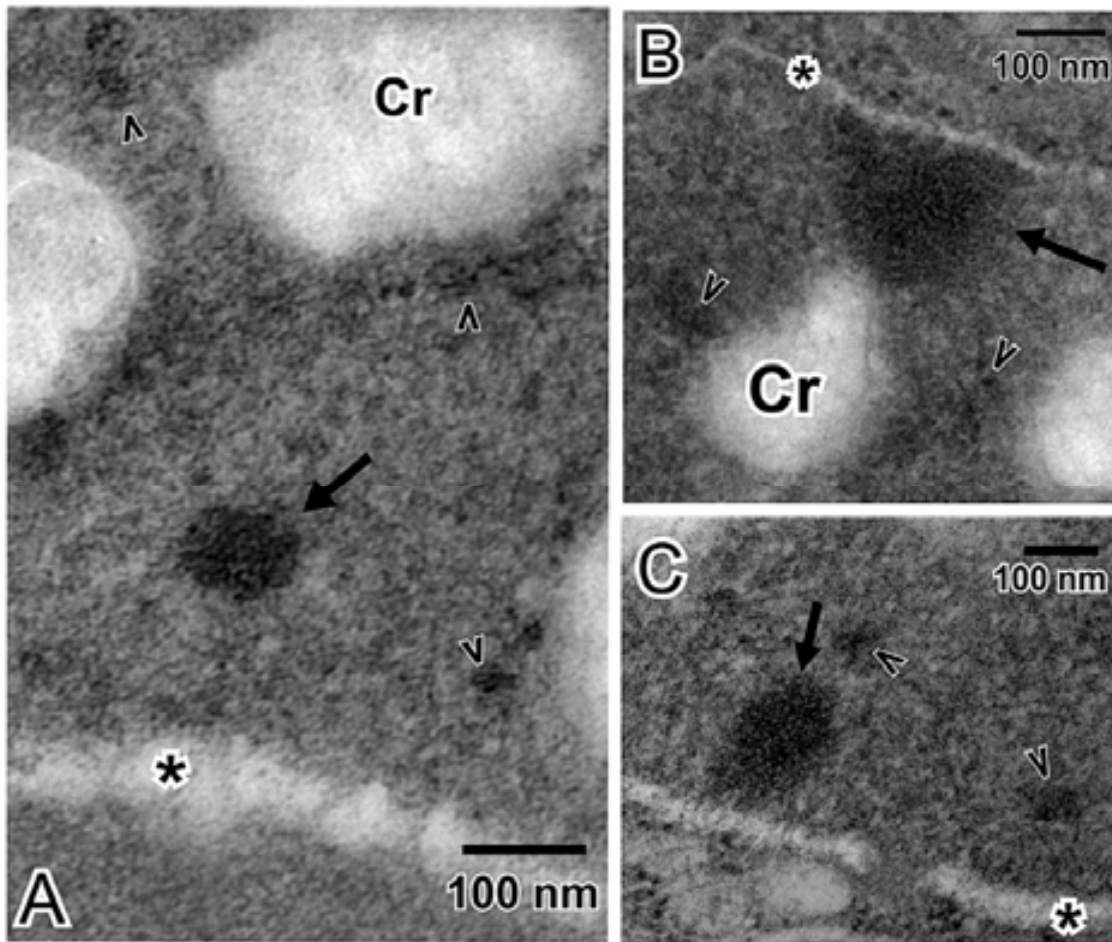


Figura 21: Contraste preferencial para RNPs con Acetato de Urnilo– EDTA– Citrato de Plomo. **(A, B y C)** Estructuras de forma similar a los cuerpos de Cajal (→) miden aproximadamente 100 nm de diámetro y se ubican cercanas a la periferia nuclear (*) o en contacto directo con ésta. En el nucleoplasma y en la periferia de los cromosomas (Cr) se observan RNPs (>). 150,000X, 120,000X y 150,000X respectivamente.

El anticuerpo monoclonal Anti-Y12 que localiza proteínas relacionadas con la maduración del RNA pre-mensajero en mensajero maduro ("splicing"), se localizó en dos sitios específicos, alrededor de los cuerpos condensados del cromosoma y en la región extracromosomal (Figura 22).

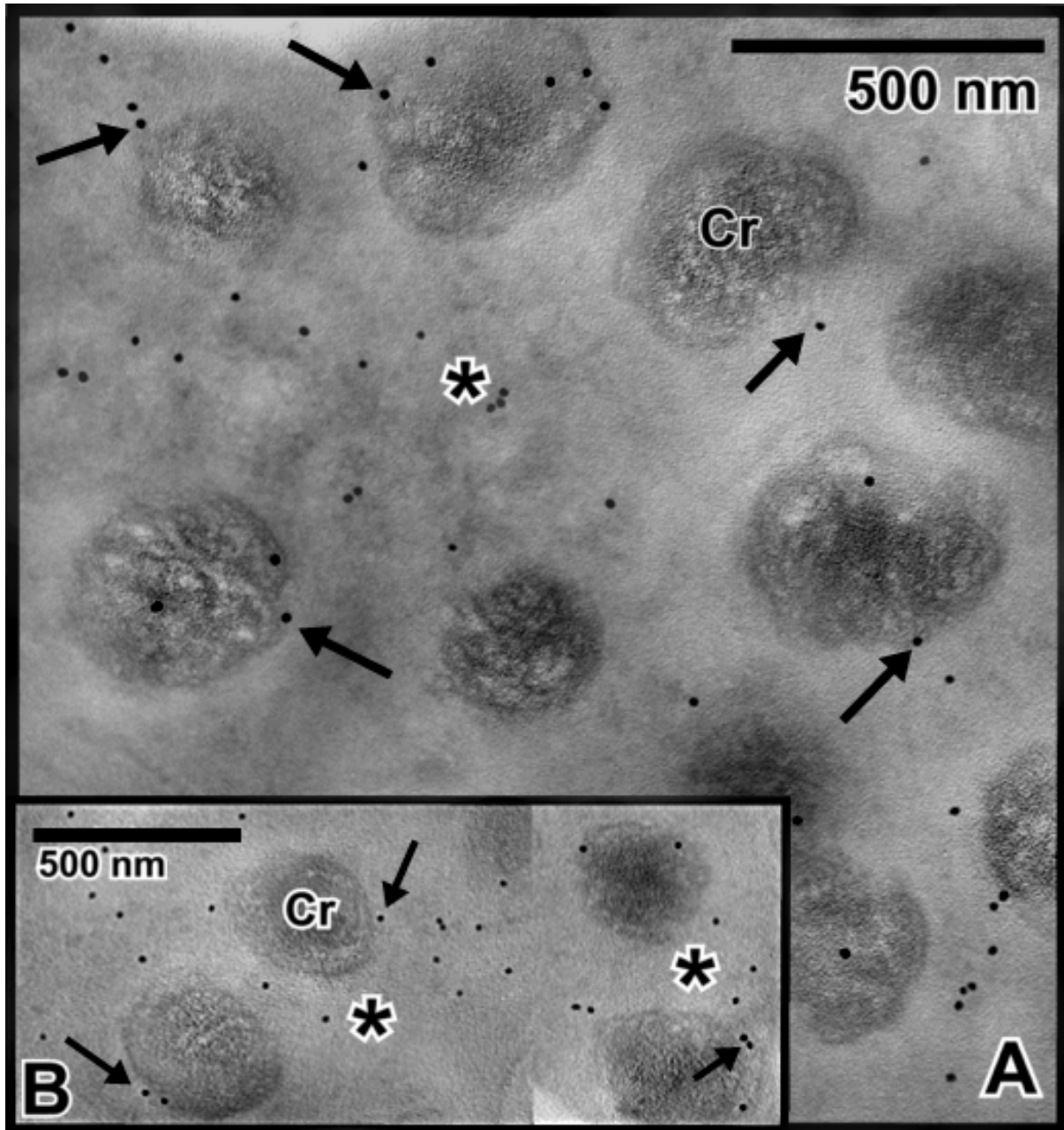


Figura 22: Immunolocalización de proteínas Sm. Los sitios en los que aparece distribuida la marca es principalmente en la periferia cromosomal (→) y en la región extracromosomal (*). **(A)** 60 000X. **(B)** 40 000X.

5. 3. 4 Nucleolo

La impregnación argéntica contrasta fuertemente el nucleolo de los dinoflagelados (Figura 23), los dos componentes nucleolares, tanto el fibrilar denso como el granular son argirófilos y se puede diferenciar fácilmente uno del otro (Figura 24A, 24B y 24C), de acuerdo a la literatura (Jordan, 1984; Spector, 2001; Alberts et al., 2002) las partes contrastadas intensamente corresponden a el componente fibrilar denso formado por fibrillas de 8 a 10 nm de diámetro y se encuentran rodeadas por el componente granular, una zona menos densa al haz de electrones que alberga gránulos de 15 a 25 nm de diámetro aproximadamente.

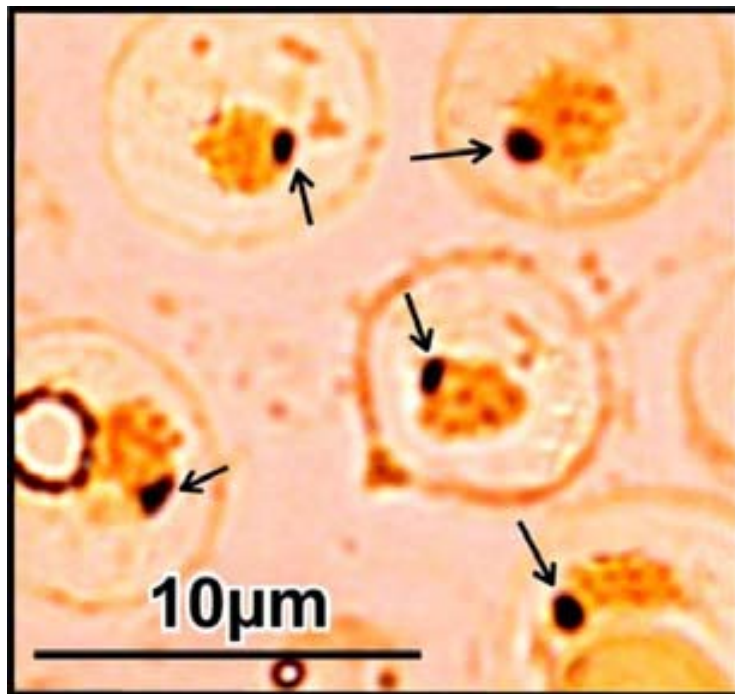


Figura 23: Impregnación argéntica (AgNOR). Micrografía óptica que muestra la especificidad de la técnica contrastando fuertemente el nucleolo (→) de *Symbiodinium sp.* 100X.

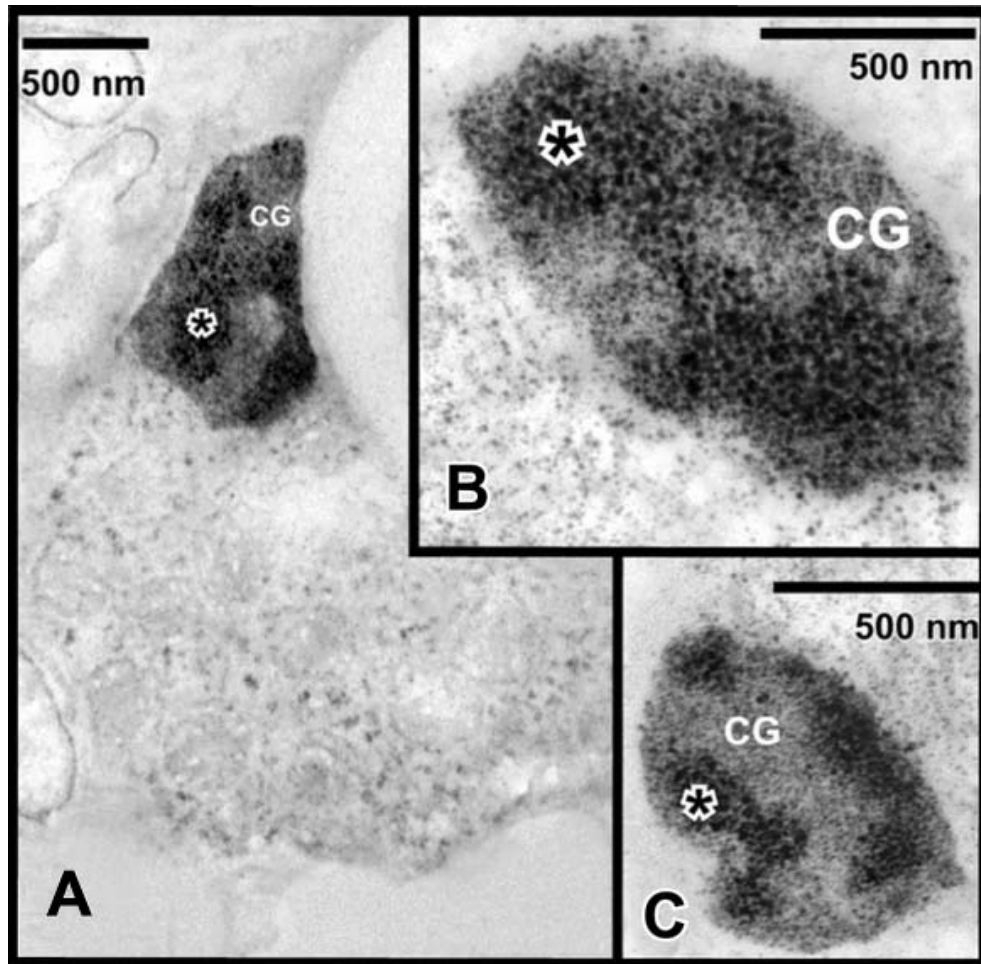


Figura 24: Impregnación argéntica (AgNOR). **(A, B y C)** Micrografías electrónicas en donde se observa la ultraestructura nucleolar, el componente fibrilar denso (*) lo conforman las zonas más densas que se encuentran rodeadas por el componente granular (CG) de menor densidad. **(B)** 30,000X, **(C y D)** 50,000X.

VI. DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron al estudiar la simbiosis entre una anémona y *Symbiodinium sp.*, muestran que ésta se ubica en las células gastrodermales de la capa endodérmica del hospedero, un sitio análogo al sistema digestivo de los bivalvos donde también ocurren asociaciones simbióticas (Farmer et al., 2001).

La mayor población de *Symbiodinium sp.* se encontró en los tentáculos de la anémona ocupando casi la totalidad de la cavidad gastrovascular. Se sabe que las células gastrodermales que se encuentran en la columna que forma el cuerpo de las anémonas albergan pocos simbiosis (de 1 a 3), en comparación con las células gastrodermales de los tentáculos que contienen entre 10 y 40 simbiosis ya sea todos de la misma especie o especies diferentes del género *Symbiodinium* (Fitt, 2000; LaJeunesse & Trench, 2000; Toller et al., 2001; Belda – Baillie et al., 2002; Ishikura et al., 2004; Apprill & Gates, 2007). Las diferentes especies del género *Symbiodinium* que se encuentra dentro del hospedero se agrupan por especie en sitios específicos formando “nichos” en el tejido del hospedero (Sampayo et al., 2007).

El tamaño poblacional del simbiote y su ubicación dentro del tejido de la anémona son características de gran importancia para los integrantes de esta simbiosis, las anémonas pueden regular la población de simbiosis en su interior dependiendo de las condiciones ambientales y metabólicas. Los hospederos pueden expandir o contraer sus tejidos limitando la cantidad de nitrógeno que le proporcionan a *Symbiodinium* y fragmentando la gastrodermis (Sandeman, 2006).

La gran cantidad de *Symbiodinium sp.*, encontrada en los tentáculos resulta lógico debido a que tienen mayor superficie de contacto con el ambiente y pueden recibir una gran cantidad de fotones para realizar la fotosíntesis y producir los azúcares necesarios utilizados por las anémonas para realizar diferentes funciones metabólicas y además, el simbiote protege al hospedero de los daños provocados por la constante exposición a la radiación ultravioleta ya que *Symbiodinium* posee aminoácidos tipo micosporina que

absorben eficientemente los rayos UV y los disipan como calor para evitar la formación de radicales libres potencialmente tóxicos para el hospedero (Furla et al. 2005).

Los individuos de la especie *Symbiodinium sp.*, son pequeños y esféricos al igual que todas las especies del género *Symbiodinium* que han sido estudiadas previamente, en cambio, los dinoflagelados de vida libre poseen formas más variadas que asemejan cuernos, alas, collares, etc. (Hackett et al., 2004).

En cuanto a la ultraestructura de *Symbiodinium sp.* los resultados muestran que comparten características en común con otras especies de dinoflagelados. La morfología de *Symbiodinium sp.* y la posición de sus cloroplastos se asemeja a la observada en dinoflagelados de vida libre como *Aureodinium pigmentosum* (Dodge, 1968) o *Amphidinium carterae* (Moreno et al., 2005) y en dinoflagelados simbiotes como *Symbiodinium corculorum* (Farmer et al., 2001) o *Symbiodinium bermudense* (Wakefield et al., 2000), estas especies al igual que *Symbiodinium sp.*, poseen pirenoides con una morfología que ya ha sido descrita anteriormente como un organelo en etapa madura (Dodge, 1968). La elevada autofluorescencia de los pirenoides puede deberse a que posiblemente almacenen moléculas diferentes a la clorofila, como por ejemplo flavinas o luciferinas, además se sabe que en los dinoflagelados la autofluorescencia aumenta con el proceso de fijación del material biológico (Tang & Dobbs, 2007).

Con respecto al estudio morfométrico, el tamaño celular de *Symbiodinium sp.* oscila entre los 7.6 y 10.4 μm , un valor muy común entre los dinoflagelados simbiotes ya que poseen los tamaños más pequeños de todos los géneros de dinoflagelados estudiados hasta el momento. Por ejemplo, *Symbiodinium microadriaticum* mide entre 6 y 7 μm , *Symbiodinium californium* entre 7.5 y 10 μm y *Symbiodinium goreau* entre 6 y 8 μm . Los dinoflagelados de vida libre poseen los tamaños más grandes como *Alexandrium tamarense* que mide 25 μm , *Karenia mikimotoi* 29 μm y *Prorocentrum micans* que mide 30 μm (LaJeunesse et al., 2005).

El tamaño nuclear de *Symbiodinium sp.*, ocupa valores entre los 2.4 y 3.6 μm , se sabe que el rango en el que oscila el tamaño nuclear de los dinoflagelados es muy amplio, va desde los 5 μm como en *Cryptothecodinium cohnii* hasta los 40 μm como en *Gymnodinium nelson* (Spector, 1984).

El núcleo de *Symbiodinium sp.* se observó con diferentes técnicas de contraste como el DAPI o la tinción con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo, mostró su forma arriñonada parecida a la de especies de vida libre como *Alexandrium tamarense* o *Glenodinium oculatum* (LaJeunesse et al., 2005), y a la de especies simbioses como *Symbiodinium bermudense* (Wakefield et al., 2000; Wakefield & Kempf, 2001). Dicho núcleo se encuentra limitado por una doble membrana y contiene tres componentes: el primer componente son los cromosomas que contienen el DNA y proteínas cromosomales, el segundo componente, el nucleolo que sintetiza el RNA ribosomal y el tercer componente, el nucleoplasma, contiene una gran variedad de partículas.

Con respecto a los cromosomas, en el contraste fluorescente con DAPI se observó el núcleo de *Symbiodinium sp.* con varios cromosomas en su interior, como en el caso de las especies *Amphidinium carterae*, *Akashiwo sanguinea*, *Alexandrium lusitanicum*, *Alexandrium fundyense* y *Prorocentrum micans* (Alverca et al., 2006). Los núcleos observados en MET y contrastados con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo mostraron detalladamente la morfología de los cromosomas, éstos son típicamente ovalados, compactos, bandeados y con fibras en su periferia, parecidos a los que se observan en la especie *Cryptothecodinium cohnii* (Spector, 1984).

En los contrastes realizados con PTA y Amina de Osmio en *Symbiodinium sp.*, se confirmó la naturaleza de los filamentos que salen de los cromosomas hacia el nucleoplasma estos son cromatina laxa, aunque existen filamentos resistentes a la RNasa (Echeverría et al., 1993) y negativos a la Amina de Osmio por lo que se supone que podrían ser proteínas del nucleoesqueleto. La especificidad del contraste con Amina de Osmio mostró que los cromosomas de *Symbiodinium sp.*, poseen un alto contenido de DNA y poco líquido cristalino negativo a la tinción.

La inmunolocalización realizada con Anti DNA en *Symbiodinium sp.*, además de marcar específicamente los cuerpos cromosomales, marcó los lugares en donde se habían visto fibras de DNA pericromosomales, y la inmunolocalización con Anti Z-DNA fue positiva en la región pericromosomal demostrando que la transcripción del DNA se localiza en esta zona, al igual que en las especies de dinoflagelados de vida libre como *Prorocentrum micans* (Soyer-Gobillard et al., 1990) y *Akashiwo sanguinea* (Alverca et al., 2006).

El segundo componente del núcleo de *Symbiodinium sp.*, el nucleolo, no había sido estudiado en trabajos anteriores realizados en este género, tiene una morfología semejante a la de eucariontes superiores. En el contraste con AgNOR, el nucleolo mostró una fuerte afinidad por el componente fibrilar denso lo que indica la presencia de proteínas argirofílicas, una característica que también se observa en dinoflagelados de vida libre como *Akashiwo sanguinea* y *Cryptothecodinium cohnii*. En el componente fibrilar denso se lleva a cabo la transcripción y el procesamiento del RNA ribosomal (Spector, 2001). Se sabe que el número de NORs y la organización funcional del nucleolo es característico de cada especie, y su composición consiste en RNAs ribosomales y proteínas como la fibrilarina y la nucleolina demostrando que el nucleolo de los dinoflagelados es muy similar al nucleolo de plantas, pero a diferencia del nucleolo de muchos eucariontes, este se mantiene organizado a través de todo su ciclo celular incluyendo la mitosis (Spector, 1984; Moreno et al., 2005).

Y por último, el tercer componente del núcleo de *Symbiodinium sp.*, el nucleoplasma, se encuentra constituido por una gran variedad de partículas, algunas de ellas ya han sido descritas como: a) partículas ribonucleoprotéicas heterogéneas nucleares (hnRNPs) que forman un complejo de proteínas y RNA mensajero, y b) partículas ribonucleoprotéicas pequeñas nucleares (snRNPs) involucradas en el procesamiento y transporte de las hnRNPs (Spector, 1984).

El contraste con acetato de uranilo- EDTA- citrato de plomo, permitió la observación de dos regiones dentro del nucleoplasma: a) la región pericromosomal, constituida por una lamina, fibras y gránulos pericromatianos, y b) la región extracromosomal constituida por RNPs de diferente forma y tamaño.

En la región pericromosomal de *Symbiodinium sp.*, la lamina EDTA- positiva que se observa podría ser una estructura involucrada en mantener el arreglo cromosomal, en tratamientos realizados con DNasa después de una hidrólisis con proteasa se observó que los cromosomas no son totalmente digeridos, sino que dejan espacios rodeados por un borde laminar (Echeverría et al., 1993), este borde podría ser el mismo que se observa con la técnica para RNPs de Bernhard realizada en este trabajo. Las fibras y los gránulos pericromatianos que se observaron en *Symbiodinium sp.*, son parecidos en forma y tamaño con los estudiados anteriormente en especies del mismo género y difieren con especies de vida libre solo en el tamaño. Por ejemplo, en especies simbiotes los gránulos pericromatianos miden de 10 a 47 nm de diámetro (Echeverría et al., 1993), y en dinoflagelados de vida libre miden de 30 a 50 nm. (Alverca et al., 2006). Las asas de DNA pericromosomales observadas con Amina de Osmio y detectadas con AntiDNA, co-localizan con las fibras y gránulos pericromatianos.

La región extracromosomal de *Symbiodinium sp.* la conforman RNPs de menor tamaño que los gránulos pericromatianos, son parecidas a las descritas por González en 1988 en donde las partículas más pequeñas miden 5 nm de diámetro y las más grandes son cúmulos que miden aproximadamente 12 nm de diámetro. También en núcleos de dinoflagelados simbiotes se han realizado tratamientos con DNasa y RNasa con los cuales se ha observado una red de fibras resistentes a ambos tratamientos en esta misma región, lo cual sugiere que podrían tratarse de fibras del nucleoesqueleto, debido a que los resultados obtenidos en este trabajo con la tinción de Amina de Osmio no muestran fibras contrastadas en esta zona.

Las estructuras ribonucleoprotéicas parecidas a los cuerpos de Cajal observadas en *Symbiodinium sp.* son de menor tamaño (100 nm) a las observadas en dinoflagelados de vida libre, por ejemplo, en *Akashiwo sanguinea* y *Alexandrium lusitanicum* los cuerpos de Cajal llegan a medir hasta 500 nm de diámetro, se sabe que la cantidad de estas partículas por núcleo suele variar dependiendo de la especie, debido a esto se puede encontrar solo uno como en *Amphidinium carterae* o hasta 23 como en *Alexandrium fundyense* (Alberca et al. 2006).

En la inmunolocalización de proteínas Sm se observó la ubicación de factores de “splicing” (snRNAs), los cuales se distribuyen en ambas regiones, tanto en la pericromosomal como en la extracromosomal, comprobando que en dinoflagelados simbiotes la conservación de las proteínas Sm involucradas en la biosíntesis del RNA es esencial, al igual que en dinoflagelados de vida libre y eucariontes superiores (Alverca et al., 2006). Se han realizado análisis con la secuencia completa del U5 snRNA de *Cryptothecodinium cohnii* comparándola con las secuencias U5 snRNA de humanos, ratas y pollos mostrando un 70% de homología (Spector, 1984), esto sugiere que los snRNAs surgieron tempranamente en la evolución de los eucariontes.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se confirmó la existencia de compartimentos nucleares para la transcripción y el “splicing” en *Symbiodinium sp.*, mostrando que la transcripción ocurre en las asas de DNA que salen de los cromosomas. En esta región pericromosomal se han encontrado proteínas tipo histonas, factores de transcripción, cromatina con conformación Z-DNA, y actina nuclear (involucrada en la remodelación cromosomal, en la transcripción y el “splicing” del RNA), también aquí se da la incorporación de uridina tritiada y la detección de proteínas Sm (Alverca et al., 2006), todas estas evidencias confirman que los dinoflagelados llevan a cabo un “splicing” co-transcripcional con características funcionales similares a las de otros eucariontes a pesar de la pérdida de histonas que implica una forma de remodelación cromatiniana aún desconocida.

VII. CONCLUSIÓN

La simbiosis entre *Symbiodinium sp.* y su hospedero se distribuye de manera abundante en los tentáculos de la anémona como generalmente sucede en los cnidarios.

El estudio morfométrico de *Symbiodinium sp.* mostró que su tamaño celular es de 9 μm y el nuclear de 3 μm , estos valores son más pequeños que los de dinoflagelados de vida libre.

En las micrografías electrónicas contrastadas con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo se observó que la morfología y ubicación de los cloroplastos, pirenoides y vacuolas digestivas de *Symbiodinium sp.* son muy semejantes a las descritas en otras especies de dinoflagelados de vida libre y simbioses.

El núcleo de *Symbiodinium sp.* contrastado con DAPI y con azul de toluidina es de forma arriñonada y posee varios cromosomas en su interior, este organelo se caracterizó a nivel de MET con las técnicas de contraste general, preferencial y específico realizadas con Acetato de Uranilo - Citrato de Plomo, PTA y Amina de Osmio, así como con técnicas inmunocitoquímicas hechas con antiDNA y antiZ-DNA, se observó que el DNA se encuentra en forma de cromosomas ovalados, compactados y bandeados con asas de DNA en su periferia transcripcionalmente activas.

Las RNPs del núcleo de *Symbiodinium sp.* contrastadas con Acetato de Uranilo- EDTA- Citrato de Plomo se distribuyen en dos regiones: pericromosomal y extracromosomal, estas zonas también son marcadas positivamente con el anticuerpo Y12, en la región pericromosomal se encuentran gránulos y fibras de forma y tamaño semejantes a los estudiados anteriormente en especies del mismo género, en esta zona se lleva a cabo la transcripción y el procesamiento del RNAm. La región extracromosomal posee RNPs más pequeñas que los gránulos pericromatínicos y los cuerpos de Cajal son parecidos a los de especies de vida libre pero se encuentran en menor número y tamaño.

El nucleolo se ubica en la periferia nuclear es compacto y posee los componentes fibrilar denso y granular, contrastado con la técnica de AgNOR se observó que posee proteínas argirofílicas y un componente fibrilar denso muy contrastado en comparación con el componente granular que es menos denso, esta morfología también se observa en dinoflagelados de vida libre.

Como conclusión general, la caracterización del núcleo de *Symbiodinium sp.* confirma que el phylum Pyrrophyta presenta diferencias relevantes con eucariontes superiores como la presencia de cromosomas permanentemente condensados, a pesar de esta característica la organización estructural y funcional de las RNPs es parecida a la de eucariontes superiores.

Aún quedan cosas por saber sobre la biología de los dinoflagelados, por ejemplo, como se da la regulación de la expresión genética y la compactación de los cromosomas, que pueden contribuir a un gran avance no sólo en el campo de la biología celular y molecular de los dinoflagelados, sino también, en el entendimiento de la evolución de eucariontes superiores.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., A. Johnson, M. Lewis, M. Raff & W. Roberts. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed., Garland Science. USA. 1463.
2. Alverca E., S. Franca & S. Moreno. 2006. *Topology of Splicing and snRNP biogenesis in dinoflagellate nuclei*. Biol. Cell., (98). 709-720.
3. Apprill A. M. & D. Gates. 2007. *Recognizing diversity in coral symbiotic dinoflagellate communities*. Molecular Ecology., (16). 1127–1134.
4. Belda – Baillie C. A., K. Baillie & T. Maruyama. 2002 *Specificity of a Model Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis*. The Biological Bulletin., (202). 74-85.
5. Bernhard W. 1969. *A new staining procedure for electron microscopical cytology*. Journal Ultrastructure Research., (27). 250-256.
6. Bhaud Y., D. Guillebault, J-F. Lennon, H. Defacque, M-O. Soyer - Gobillard & H. Moreau. 2000. *Morphology and behaviour of chromosomes during the cell cycle and mitosis*. Journal of Cell Science., (113). 1231- 1239.
7. Bouligand Y. & V. Norris. 2001. *Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states*. Biochimie., (83). 187-192.
8. Chan Y- H. & J. T. Y. Wong. 2007. *Concentration-dependent organization of DNA by the dinoflagellate histone-like protein HCc3*. Nucleic Acids Research., (35) 8. 2573–2583
9. Davy S. K. & J. R. Turner. 2003. *Early development and acquisition of Zooxanthellae in the temperate symbiotic sea anemone Anthopleura ballii (Cocks)*. The Biological Bulletin., (205). 66- 72.
10. Dodge J. D. 1987. *General Ultrastructure*. En: The Biology of Dinoflagellates. Ed. Taylor F. J. R., Botanical Monographs. (21). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.785.
11. Dodge J. D. 1968. *The fine structure of chloroplasts and pyrenoids in some marine dinoflagellates*. Journal of Cell Science., (3). 41- 48.
12. Echeverría O. M., L. F. Jiménez, G. González, M. Elizunda & G. H. Vazquez - Nin. 1993. *Cytochemical and autoradiographic study of the nucleus of a symbiotic dinoflagellate*. Caryologia., (46) 4. 261-274.

13. Farmer M. A., W. K. Fitt & R. K. Trench. 2001. *Morphology of the symbiosis between Corculum cardissa (Mollusca: Bivalvia) and Symbiodinium corculorum (Dinophyceae)*. Biol. Bull., (200). 336- 343.
14. Filfilan S. A. & D. C. Sigeo. 1977. *Continuous DNA replication in the nucleus of the dinoflagellate Prorocentrum micans (Ehrenberg)*. Journal of Cell Science., (27). 81-90.
15. Fitt W. K. 2000. *Cellular Growth of Host and Symbiont in a Cnidarian - Zooxanthellar Symbiosis*. Biol. Bull., (198). 110-120.
16. Furla P., D. Allemand, J. M. Shick, C. Ferrier-Page, S. Richier, A. Plantivaux, P-L Merle & S. Tambutte. 2005. *The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal*. Integr. Comp. Biol., (45). 595-604.
17. González C. G. 1988. *Estudio ultraestructural, citoquímico y autorradiográfico del núcleo celular de Dinoflagelados*. Tesis licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. pp. 53.
18. Graham L. E. & L. W. Wilcox. 2000. Algae. Prentice Hall. USA.
19. Hackett J. D., D. M. Anderson, D. L. Erdner & D. Bhattacharya. 2004. *Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment*. American Journal of Botany., (10) 91. 1523-1534.
20. Hackett J. D., T. E. Scheetz, H. S. Yoon, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant & D. Bhattacharya. 2005. *Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis*. BMC Genomics., (6) 80.
21. Ishikura M., K. Hagiwara, K. Takishita, M. Haga, K. Iwai & T. Maruyama. 2004. *Isolation of New Symbiodinium Strains from Tridacnid Giant Clam (Tridacna crocea) and Sea Slug (Pteraeolidia ianthina) Using Culture Medium Containing Giant Clam Tissue Homogenate*. Mar. Biotechnol., (6). 378–385.
22. Jiménez G. L. F., J. M. Elizunda, Z. B. López, A. Maciel, G. Zavala, O. M. Echeverría & G. H. Vázquez - Nin. 1989. *Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists*. BioSystems., (22). 103-116.
23. Jordan E. G. 1984. *Nucleolar Nomenclature*. Journal of Cell Science., (67). 217-220.

24. Kubai D. F. & H. Ris. 1969. *Division in the dinoflagellate Gyrodinium cohnii (Schiller). A New Type of Nuclear Reproduction.* The Journal Cell Biology., (40). 508-528.
25. LaJeunesse T. C. & R. K. Trench. 2000. *Biogeography of two species of Symbiodinium (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone Anthopleura elegantissima (Brandt).* The Biological Bulletin., (199). 126-134.
26. LaJeunesse T. C., G. Lambert, R. A. Andersen, M. A. Coffroth & D. W. Galbraith. 2005. *Symbiodinium (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates.* Journal Phycology., (41). 880- 886.
27. Leforestier A. & F. Livolant. 1993. *Supramolecular Ordering of DNA in the Cholesteric Liquid Crystalline Phase: An Ultrastructural Study.* Biophysical Journal., (65). 56-72.
28. Lindner L. E. 1993. *Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR).* The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. (41) 3. 439-445.
29. Mak C. K. M., V. K. L. Hung & J. T. Y. Wong. 2005. *Type II topoisomerase activities in both the G1 and G2/M phases of the dinoflagellate cell cycle.* Chromosoma., (114). 420–431.
30. Mínguez A., S. Franca & S. Moreno. 1994. *Dinoflagellates have a eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase II.* Journal of Cell Science., (107). 2861-2873.
31. Monneron A. & W. Bernhard. 1969. *Fine Structural Organization of the Interphase Nucleus in Some Mammalian Cells.* Journal Ultrastructure Research., (27). 266-288.
32. Morden C. W. & A. R. Sherwood. 2002. *Continued evolutionary surprises among dinoflagellates.* PNAS., (99) 18. 11558-11560.
33. Moreno S., E. Alverca, A. Cuadrado & S. Franca. 2005. *Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates.* European Journal of Cell Biology., (84). 137-149.

34. Oakley B. R. & J. D. Dodge. 1974. *Kinetochores associated with the nuclear envelope in the mitosis of Dinoflagellate*. The Journal of Cell Biology., (63). 322-325.
35. Pochon X., J. I. Montoya - Burgos, B. Stadelmann & J. Pawlowski. 2006. *Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus Symbiodinium*. Molecular Phylogenetics and Evolution., (38). 20-30.
36. Puvion E. & F. Puvion - Dutilleul. 1996. *Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules*. Experimental Cell Research., (229). 217-225.
37. Recillas T. F. & O. M. E. Zurita. 2003. *Control de la Expresión Genética en Eucariontes*. En: Biología Celular y Molecular. Eds. Jiménez G L F, Merchant H. Prentice Hall. México. pp. 82-83.
38. Rich A. & S. Zhang. 2003. *Z-DNA: the long road to biological function*. Nature Reviews Genetics., (4). 566- 572.
39. Rizzo P. J. 2002. *Those amazing dinoflagellate chromosomes*. Cell Research., (4) 13. 215-217.
40. Rizzo Peter J. 1987. *Biochemistry of the Dinoflagellate Nucleus*. En: The Biology of Dinoflagellates. Ed. Taylor F. J. R., Botanical Monographs. (21). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.785.
41. Rodriguez M. L. 2003. *Evolving lineages of Symbiodinium-like dinoflagellates based on ITS1 rDNA*. Molecular Phylogenetics and Evolution., (28). 152–168.
42. Rowan R. & D. A. Powers. 1992. *Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae)*. Proc. Natl. Acad. Sci., (89). 3639-3643.
43. Saldarriaga J. F., F. J. R Taylor, T. Cavalier-Smith, S. Menden-Deuer & P. J. Keeling. 2004. *Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates*. European Journal of Protistology., (40). 85-111.
44. Sampayo E. M., L. Franceschinis, O. Hoegh-Guldberg & S. Dove. 2007. *Niche partitioning of closely related symbiotic dinoflagellates*. Molecular Ecology., (16). 3721–3733.

45. Sandeman I. M. 2006. *Fragmentation of the gastrodermis and detachment of zooxanthellae in symbiotic cnidarians: a role for hydrogen peroxide and Ca²⁺ in coral bleaching and algal density control*. Rev. Biol. Trop., (54). 79-96.
46. Santos S. R. & M. A. Coffroth. 2003. *Molecular genetic evidence that dinoflagellates belonging to the genus Symbiodinium Freudenthal are haploid*. The Biological Bulletin., (204). 10-20.
47. Seo K. S. & L. Fritz. 2006. *Karyology of a marine non-motile dinoflagellate, Pyrocystis lunula*. Hydrobiologia., (563). 289–296.
48. Sluiman Hans J. 1993. *Nucleus, Nuclear Division and Cell Division*. En: Ultrastructure of Microalgae. Eds. Tamar Berner & Ph. D. CRC Press, Inc. USA. pp. 228-230.
49. Soyer - Gobillard M – O., M-L Géraud, D. Coulaud, M. Barray, B. Théveny, B. Révet & E. Delain. 1990. *Location of B- and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote dinoflagellate*. The Journal of Cell Biology., (111). 293-308.
50. Spector D. L. 1984. Dinoflagellates. Academic Press, Inc. London. pp. 1-13, 107-147.
51. Spector D. L. 2001. *Nuclear domains*. Journal of Cell Science., (114). 2891-2893.
52. Tang Y. Z. & F. C. Dobbs. 2007. *Green Autofluorescence in Dinoflagellates, Diatoms, and Other Microalgae and Its Implications for Vital Staining and Morphological Studies*. Applied and Environmental Microbiology., (73) 7. 2306–2313.
53. Toller W. W., R. Rowan & N. Knowlton. 2001. *Zooxanthellae of the Montastraea annularis Species Complex: Patterns of Distribution of Four Taxa of Symbiodinium on Different Reefs and Across Depths*. The Biological Bulletin., (201). 348-359.
54. Van Den Hoek C., D. G. Mann & H. M. Jahns. 1995. Algae. An introduction to phycology. Cambridge University Press. USA. pp. 244-276.
55. Vázquez - Nin G. H., M. Biggiogera & O. M. Echeverría. 1995. *Activation of osmium ammine by SO₂-generating Chemicals for EM Fuelgen- type staining of DNA*. Eur. J. Histochem., (39). 101-106.

56. Vázquez - Nin G. H., B. Chávez & M. C. Tomas. 1973. *A preferential staining method for chromatin in electron microscopy*. Journal de Microscopie., (16). 243-246.
57. Vázquez - Nin G. H., O. M. Echeverría & L. F. Jiménez. 2003. *El núcleo interfásico, morfología y función*. En: Biología Celular y Molecular. Eds. Jiménez G. L. F., Merchant H. Prentice Hall. México. pp. 341-394.
58. Vázquez-Nin G. H. & O. M. Echeverría. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 81-85, 153.
59. Wakefield T. S. & S. C. Kempf. 2001. *Development of host- and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian- dinoflagellate symbiosis*. The Biological Bulletin., (200). 127-143.
60. Wakefield T. S., M. A. Farmer & S. C. Kempf. 2000. *Revised description of the fine structure of in situ "Zooxanthellae" Genus Symbiodinium*. The Biological Bulletin., (199). 76- 84.
61. Whitehead L. F. & A. E. Douglas. 2003. *Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host*. The Journal of Experimental Biology., (206). 3149-3157.
62. Wong J. T. Y. & A. C. M. Kwok. 2005. *Proliferation of dinoflagellates: blooming or bleaching*. BioEssays., (27). 730-740.
63. Yeung P. K. K., D. C. New, A. Leveson, C. H. Yam, R. Y. C. Poon & J. T. Y. Wong. 2000. *The Spindle Checkpoint in the Dinoflagellate Cryptecodinium cohnii*. Experimental Cell Research., (254). 120–129.
64. Yoon H. S., J. D. Hackett, F. M. Van Dolah, T. Nosenko, K. L. L. Lidie & D. Bhattacharya. 2005. *Tertiary Endosymbiosis Driven Genome Evolution in Dinoflagellate Algae*. Mol. Biol. Evol. (5) 22. 1299–1308.