



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ARQUITECTURA CELULAR DE
MICROORGANISMOS GIGANTES: ESTUDIO
DESCRIPTIVO DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LA
BACTERIA *EPULOPISCIVUM FISHELSONI* Y LA
AMIBA *CHAOS CHAOS*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

PARSIFAL FIDELIO ISLAS MORALES



DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2016



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.

A la memoria de mi abuelito, Rubén Islas Romero

Por la flor y el canto de la vida.

*Ombra mai fu
di vegetabile,
cara ed amabile,
soave più.*

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a los revisores este trabajo por su genuino interés y por la amistad con la que me han honrado, no solo en este proceso sino durante el curso de mi vida; aclaro también que las carencias y erratas que se presentaren son completa responsabilidad del autor.

Dra. Rosaura Ruiz Gutiérrez, Dr. Hebert Vázquez-Nin, Dr. Ruy Echavarría Rodríguez, Dr. Teófilo Herrera Suárez y muy especialmente a mi mentor y padre académico, el **Dr. Luis Felipe Jiménez García**.

Y a los colaboradores y patrocinadores de este trabajo por la pasión con la que compartimos el hacer ciencia y la amistad.

A La **Mtra. Silvia Juárez Chavero** por su apoyo técnico y enseñanzas.

Dr. Luis Felipe Jiménez, Mtra. Silvia Juárez Chavero, Dra. Olga Echavarría, Dr. Hebert Vázquez-Nin, Dr. Rodolfo Drizo, Dr. Mohammad Alnajjar, Dr. Ulrich Stingl y Alejandra Atzín.

A las casas de conocimiento donde me he formado

Universidad Nacional Autónoma de México

Universidad de Stanford

Universidad de Ciencia y Tecnología “Rey Abdullah” (KAUST)

Siendo esta tesis la culminación de mi formación profesional agradezco a las siguientes personas que me han horado con su compañía en este camino de la vida.

A mi madre, **Delia Morales Pavón**, por su infinito amor y apoyo incondicional.

A mi abuelo, **Rubén Islas Romero**, por su infinito amor, amistad y legado.

A mis abuelitas, **Brígida Pavón y María Cristina Ramos**, por su cariño y apoyo.

A mis tías, **Ángeles Morales y Laura Morales** por su infinito cariño y apoyo incondicional.

A mis primas-hermanas: **Ximena Usísima y Dainzú Morales**

A mis tíos **Patricio Martínez, Dionicio Morales y David Usísima.**

A mi padre, **Rubén Islas Ramos**, por su esfuerzo y apoyo material.

A mis maestros, todos, por haber cultivado la semilla del amor al saber.

Muy especialmente:

Al **Dr. Ruy Echavarría**, por su comprensión, amistad y consejo

Al **Dr. Jens Viehweg**, por su apoyo, amistad y sinceridad.

Al **Dr. Rubén López Martínez**, por su amistad.

A la **Dra. Magda Carvajal Moreno**, por su amistad, su apoyo y su presencia.

A mis amigos, por compartir conmigo la belleza de la vida,

A mi hermano de vida, **Enrique Cervantes Toiber**

A mis hermanos de carrera **Alejandro Fábregas, Ricardo Muñoz, Mario Morales**

Muy especialmente a **Alejandra Atzín y Sandra Malagón**

A mis amigos de la Universidad por tantas aventuras compartidas: **Jesús Villalobos, Jocelyn Huerta, Jesús Vega, Eugenio Contreras, Sergio Solís, Carolina Rocha, Eduardo Hernández, Andrea López, Diana Gallego, Mishelle Muñoz, Brenda Estrada, Essin Drumus, Adrián Villa, Antonio Zaldívar, Fátima, Nada Alljassim, Miguel Figueroa, María José Mosqueira, Lexter Savio.**

A mis familias de Stanford y de KAUST

ÍNDICE

Proemio	9
<i>Teoría celular y diversidad citológica</i>	9
Capítulo 1.....	11
Antecedentes históricos de la microanatomía celular.....	11
<i>El nuevo mundo microscópico</i>	11
<i>El vocablo "célula"</i>	14
<i>Anticipaciones de la teoría celular</i>	20
<i>La consolidación de la teoría celular</i>	23
<i>Hacia una biología celular</i>	24
<i>Biología celular evolutiva</i>	27
Capítulo 2.....	30
Elementos de una “arquitectura celular” en microorganismos gigantes	30
<i>¿Cómo se construye una célula?.....</i>	30
<i>Tamaño</i>	31
<i>La polaridad y la topología.....</i>	32
<i>Tenseguridad</i>	33
<i>La membrana plasmática</i>	37
<i>La arquitectura nuclear de los eucariontes.....</i>	37
<i>Diversidad y función de las ribonucleoproteínas.....</i>	40
<i>El nucléolo.....</i>	42
<i>La envoltura nuclear</i>	43
<i>La arquitectura del nucleoide bacteriano</i>	43
<i>Perspectivas de estudio de la arquitectura celular.....</i>	45
<i>La brecha entre arquitecturas celulares procariontes y eucariontes.....</i>	45
Capítulo 3.....	47
Arquitectura celular <i>Epulopisium fishelsoni</i>: compartimentalización en bacterias gigantes	47
<i>Introducción</i>	47

<i>Gigantismo celular bacteriano</i>	47
<i>Hiperpoliploidía</i>	48
<i>Arquitectura celular del gigantismo bacteriano</i>	49
<i>Epulopiscium fishelsoni un modelo del gigantismo bacteriano</i>	49
<i>Posición taxonómica y diversidad morfológica</i>	50
<i>Hábitat y distribución</i>	50
<i>Microanatomía ultraestructural</i>	51
<i>Reproducción</i>	52
<i>Metabolismo</i>	53
<i>Cuestionamientos</i>	53
<i>Objetivo</i>	53
<i>Hipótesis</i>	54
<i>Métodos</i>	54
<i>Hibridación fluorescente in situ (FISH)</i>	54
<i>Diseño de pruebas</i>	54
<i>Condiciones de fijación e hibridación</i>	55
<i>Hibridación fluorescente in situ de nitrato reductasa y piruvato óxido reductasa</i>	55
<i>Diseño de la prueba para piruvato oxidoreductasa</i>	56
<i>Diseño de la prueba para nitrato reductasa</i>	56
<i>Protocolo de hibridación in situ según Golding et al., 2013</i>	57
<i>Observación</i>	58
<i>Resultados</i>	58
<i>Discusión</i>	67
<i>Perspectivas</i>	68
Capítulo 4	69
Arquitectura celular de <i>Chaos chaos</i>: gigantismo celular en eucariontes	69
<i>Introducción</i>	69
<i>Chaos chaos: posición taxonómica y diversidad</i>	69
<i>Ultraestructura</i>	72
<i>Membrana mitocondrial</i>	72
<i>Membrana celular</i>	72

<i>Núcleo celular</i>	73
<i>Cuestionamientos</i>	73
<i>Objetivos</i>	73
<i>Hipótesis</i>	73
<i>Métodos</i>	74
<i>Procesamiento de células para microscopía electrónica de transmisión</i>	74
<i>Técnica de impregnación argéntica para organizador nucleolar AgNor</i>	74
<i>Corte y montaje de muestras para microscopía electrónica.</i>	75
<i>Contraste general</i>	75
<i>Reacción preferencial y regresiva con EDTA para ribonucleoproteínas según Bernhard.</i> .	76
<i>Contraste preferencias para DNA con amina de osmio</i>	76
<i>Observación al microscopio electrónico de transmisión</i>	76
Resultados	77
<i>Discusión</i>	87
Epílogo	89
Referencias	91

Proemio

Teoría celular y diversidad citológica

Epulopiscium fishelsoni y *Chaos chaos* son microorganismos gigantes. Sus células pueden llegar a dimensiones excesivas en comparación de otros organismos celulares. La bacteria *E. fishelsoni* llega a medir 500 micrómetros de largo; en tanto que la amiba *Chaos chaos* alcanza los 5mm de longitud. La mayoría de las bacterias no sobrepasan los 2 micrómetros, en tanto que los eucariontes unicelulares poseen un rango hasta 100 micrómetros. El fenómeno del gigantismo celular no es exclusivo de una especie o grupo, ocurre de forma polifilética. Su origen y funcionamiento a nivel celular y evolutivo están lejos de ser comprendidos. Un enfoque integrativo es necesario para encauzar las observaciones microanatómicas.

"Arquitectura" seguido del sufijo celular, es una metáfora de uso común en la biología contemporánea. Bajo ésta se asume la descripción de propiedades estructurales, funcionales, espaciales u organizativas de las células. En cada metáfora o analogía subyace una intención, consciente o inconsciente, de enriquecer el discurso o modelo explicativo en cuestión o simplemente de generar un vínculo de entendimiento entre la explicación científica y el lenguaje. En el caso de este trabajo la intención al utilizar el término de arquitectura es completamente consciente. Lleva por propuesta enriquecer el discurso explicativo hacia un modelo de arquitectura celular de *E. fishelsoni* y *C. chaos*.

La confrontación del científico con el avanzado estado del arte en microanatomía, biología estructural, fisiología celular y demás disciplinas que de forma transversal pretenden comprender la multiplicidad de biología celular demanda enfoques transdisciplinarios.

- ¿Qué da forma y estructura a las células?
- ¿Cuál es la topología de organelos y moléculas dentro de la célula?
- ¿Qué relación hay entre forma y función a nivel subcelular y molecular?

Para el autor, es digna de tomarse en consideración la popular metáfora de arquitectura celular como punto de partida para abordar la naturaleza morfofuncional de las células en el contexto de la diversidad citológica y sus constreñimientos evolutivos.

Esta tesis se enfoca en la presentación de las descripciones microanatómicas de la bacteria gigante *Epulopiscium fishelsoni* acompañadas de observaciones e indagaciones correspondientes. Entre estas versan aspectos relativos al tamaño, la forma, la diversidad morfofotópica de las poblaciones de este organismo, la distribución y organización de la cromatina y los RNA's; aspectos descriptivos de las membranas exteriores e interiores; y la compartimentalización aparente de ciertas expresiones génicas y su relación con el metabolismo. El propósito de esta sección es, en primer lugar, dar a conocer aspectos inéditos de la microanatomía de *E. fishelsoni* que se pudieran enmarcar en un modelo futuro del gigantismo celular bacteriano. Y en segundo lugar profundizar en las perspectivas de estudio hacia e entendimiento de la arquitectura celular única de estas bacterias.

Se presenta también la descripción microanatómica de las células y los núcleos de *Chaos chaos*. Éste organismo es el punto de comparación de un modelo eucariota de gigantismo celular con su análogo procariota, *E. fishelsoni*. Se abarcan aspectos descriptivos de la organización y la ultraestructura de las cromatinas, las ribonucleoproteínas y los cuerpos nucleares; el aspecto nanoscópico de diversos organelos.

Capítulo 1

Antecedentes históricos de la microanatomía celular.

El nuevo mundo microscópico

El año 1665 es relevante para la humanidad, Robert Hook, miembro de *Royal Society* de Londres y destacado filósofo natural publica *Micrographia* (Hooke, 1665). El suceso no podría ser de mayor relevancia, se trata de la primera antología de descripciones del mundo microscópico con una resolución de hasta cientos de micrómetros a través del microscopio tubular, consideración que le vale el título de la obra pionera de la microscopía. El título completo de la obra, *Micrographia or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observation and inquiries thereupon*, deja entrever una intención no solo descriptiva sino filosófica. Ya en la introducción de *Micrographia* Hook considera el descubrimiento del mundo microscópico como una "reformación en la filosofía":

*"In this kind I here present to the World my imperfect Indeavours; which though they shall prove no other way considerable, yet, I hope, they may be in some measure useful to the main Design of a reformation in Philosophy, if it be only by shewing, that there is not so much requir'd towards it, any strength of Imagination, or exactness of Method, or depth of Contemplation (...) as a sincere Hand, and a faithful Eye, to examine, and to record, the things them selves as they appear"*¹

¹ *"En esta forma presento al mundo mis imperfectas incursiones; que, aunque debieren demostrar ninguna otra ruta relevante, espero, no obstante, que sean en cierta medida útiles para el diseño primario de un reforma en la filosofía; si solo sea mostrando que no hay tanto requisito hacia este fin, cualesquiera fuerza imaginativa o precisión de método, o profundidad de contemplación (...), tanto como una mano sincera y un ojo fidedigno, para examinar y registrar las cosas por si mismas tal como se muestran"* tomado de Hooke, R. (1655). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. By R. Hooke, Fellow of the Royal Society. Jo. Martyn, and Ja. Allestry, printers to the Royal Society, and are to be sold at their shop at the Bell in S. Paul's church-yard. Society.

La consideración de Hook reside en la situación del mundo microscópico respecto a la concepción filosófica de la materia durante su tiempo. Asume que su obra es simplemente descriptiva e ilustrativa en sentido literal (Hooke, 1721). Se adiciona al proyecto de Bacon acerca del empirismo, sin embargo ante la carencia de una explicación armónica característica del hermetismo del siglo XVII sufre el embate de una sociedad ansiosa de explicaciones detalladas y ordenes *quasi* aritméticos (Denis, 1989). El microcosmos visto a través de las lentes suscitó críticas fundamentales. La de la infinidad de la materia desafiaba el atomismo filosófico y no establecía un límite para los sentidos ahora ayudados por las lentes. El entonces joven y futuro obispo George Berkeley equiparó la improcedencia del cálculo diferencial e infinitesimal con los límites de resolución del ojo y lentes (Robles, 2006), paradoja que sería refutada experimentalmente hasta el siglo XX con el desarrollo de la superresolución a partir de la derivación de la ecuación de Abbe (Moerner, 2012). Toulmin y Goodfield refieren: "*La cosa más difícil fue mantener los productos de la expedición microscópica en una proporción intelectual apropiada, y verlos en verdadera relación a nosotros y el mundo en que vivimos*"². Entonces, la microscopía demostró la existencia de un nuevo mundo desprovisto de una teoría o un paradigma previo que enriquecer o transformar, a diferencia de la revolución coperniquiana del siglo anterior que contó con las teorías ptopomeicas como objeto de refutación. Contrario al "*De revolutionibus orbium coelestium*"³ de Copernico, la *Micrographia* de Hook no generó una revolución científica sino reveló un nuevo cosmos con infinidad de dudas y confusiones (Espinasse, 1956; Toulmin y Goodfield, 1982).

Tradicionalmente el desarrollo temprano de la citología se enmarca dentro de la revolución científica del siglo XVII a la par de la invención del microscopio (Británica, 1959). Esto es una visión reduccionista de la historia ya que no es sino hasta mediados del siglo XIX que la disciplina se fundamentó y consolidó con el advenimiento de la teoría celular. Ésta confirió un criterio de unicidad a las observaciones microscópicas y comenzó a fungir como paradigma epistemológico, vigente en esencia hasta nuestros días (Mazzarello, 1999).

² "*The hardest thing of all was to keep the products of microscopic enquiry in a proper intellectual proportion...*" Citado y traducido de Toulmin, S., & Goodfield, J. (1982). *The architecture of matter*. University of Chicago Press p. 341.

³ "*Las revoluciones de los cuerpos celestes*" Original: Copernicus, N. (1995). 1543. *De Revolutionibus orbium coelestium*. *Trans. AM Duncan*.

El lento desarrollo de la citología y del concepto mismo de célula, conforman como refiere el filósofo de la biología, José González Recio, un proceso más asequible desde la dinámica de teorías de Lakatos. Es decir desde una crónica de predicción de hechos nuevos a través de múltiples anticipaciones confirmadas *a posteriori*, en lugar de un falsacionismo revolucionario como el que propone Thomas S. Kuhn en “*La Estructura de las Revoluciones Científicas*”⁴ (González Recio, 2012).

Como lo refiere Lakatos y lo ha expuesto Mayr esta dinámica histórica parece ser extensiva a una diversidad de disciplinas biológicas ya que en ellas destaca el componente histórico narrativo (Lakatos y Musgrave 1970; Mayr, 2006). Algunos ejemplos de esto se encuentran en el desarrollo de la microanatomía, la citología, la histología, la fisiología, la biología evolutiva, entre otras (Mayr, 2006). Un ejemplo ilustrativo, tanto por su estructura histórica como por su innovación discursiva es la constitución de la anatomía. Las descripciones anatómicas de Andrea Vesalio publicadas en su obra “*De Humanis Corporis Fabrica (Siglo XVI)*”⁵ fueron asimiladas progresivamente hasta la consolidación de anatomía y fisiología humana modernas en el siglo XIX (Pérez-Tamayo, 1996).

En la estructura Lakatosiana el lenguaje de la ciencia se conforma desde las anticipaciones interpretativas de los fenómenos (Lakatos, 1876), por lo que resulta natural emplear conceptos y términos de otras disciplinas para construir una nueva retórica (Nicolson, 1956). En el devenir histórico de los modelos de microanatomía celular no solo coincidieron las observaciones empíricas de microscopistas y fisiólogos (González Recio, 1990), sino también el desarrollo colectivo de un lenguaje de lo visual para entender la naturaleza de las células a partir de metáforas y signos.

Los casi doscientos años de desarrollo de la citología, a partir del descubrimiento del microcosmos, hasta consolidar en la teoría celular un conjunto de explicaciones lógicas acerca de la célula como unidad fundamental de la vida implicaron dos procesos importantes: 1) El descubrimiento del microcosmos y sus implicaciones filosóficas que contrastaron un empirismo incipiente en el siglo XVII (Toulmin y Goodfield, 1982) y con la *Naturphilosophie* en el siglo XIX (Hall, 1969); y 2) el

⁴ Para una edición hispana véase Kuhn, T. S. (2011). *La estructura de las revoluciones científicas*. Fondo de Cultura Económica.

⁵ Vesalio, A. 1543, *De humani corporis fabrica*, Basilea. Para una reedición facsimilar anotada véase Raval, Z., & Losordo, D. W. (2012). On the fabric of the human body. *Circulation*, Am. Hearst. As.

perfeccionamiento de los microscopios y su contingencia de otras disciplinas como la bioquímica (Albarracín Teulón, 1983).

Es notable mostrar a través del desarrollo histórico de la citología y la biología celular, cómo el lenguaje de la arquitectura y la plástica han acompañado históricamente a las observaciones microanatómicas: en primer lugar como una herencia de la *Naturphilosophie* y los postulados de Goethe⁶ acerca de la morfología (Torres, 2004), y en segundo lugar como una necesidad hermenéutica aún vigente y relativa al uso de la metáfora en la ciencia (Zenzen, 1999).

Resulta importante reconocer en la biología celular moderna la contingencia de diversas disciplinas teóricas y experimentales, algunas de estirpe lakatosiana. Estos procesos de integración e interdisciplina serán revisados a continuación con detalle, considerando tres periodos históricos: 1) de la publicación de *Micrographia* hasta la propuesta de Schwann y Schleiden; 2) de la idea original de la teoría celular hasta la constitución del axioma de Virchow; y 3) desde Virchow y Cajal hasta la constitución de biología integrativa como la *Evolutionary Cell Biology* o la Biología Celular del Genoma.

El vocablo "célula"

En 1664 John Evelyn publica *Sylva*⁷, donde Robert Hooke escribe sus consideraciones acerca de la apariencia microscópica de la madera petrificada (Espinasse, 1956). Un año más tarde en *Micrographia*, Hooke retoma la idea para referirse por primera vez al concepto de "célula":

*"an infinite company of exceedingly- small, very regular cells, so thick and so orderly set, and so close to one another, that they leave very little room or space between them to be fill'd with solid body, for the apparent intersticia, or separating sides of these pores seem some places, that the texture of a Honey-comb cannot be pore porous"*⁸

⁶ Goethe, J. W. V. (1817). *Morphologie. Hamburg edition, 13*. Para una revisión actual del texto original véase de Prado, C. S. (2010). Una aproximación a los escritos de carácter científico de Goethe. *Epos: Revista de filología*, (26), 431.

⁷ Evelyn, J. 1664. *Sylva, or a discourse of Forest-Trees, and the Propagation of Timber in His Majesties Dominions, &c. The Royal Society of London*. Una versión actual y anotada es Evelyn, J., & Nisbet, J. (2013). *Sylva, Or, a Discourse of Forest Trees: With an Essay on the Life and Works of the Author* Cambridge University Press.

⁸ **"...una infinidad de celdas extremadamente pequeñas, celdas muy regulares, tan densamente ya tan ordenadamente dispuestas, y tan cerca una de otra que dejan muy poco espacio entre sí para ser llenado con sustancia sólida; los aparentes intersticios, o poros avistados en algunos lugares parecen de tal textura que no pueden ser mas porosos que un panal."** Tomado de Hooke, R. (1966). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. By R.

El ojo sincero y la mano fiel de Hook, lo llevan a realizar una extensa descripción de los objetos magnificados por el microscopio. En los intersticios hallados, no solamente en la madera del corcho, sino también en sus hojas y en las conchas de la madre perla, llenas de aire o de fluidos, Hooke advierte un parecido con poros y celdas (Hooke, 1665).

A partir de la analogía entre la forma de las celdas de los monasterios ingleses se construye la primera metáfora arquitectónica de la microscopía: “*cell*”.

Pronto Hooke daría cuenta de la dificultad de elaborar un discurso lógico y una teoría acerca de sus observaciones. Una explicación de orden superior para el mundo microscópico fue imposible durante su tiempo. A diferencia de las incipientes ciencias físicas o las matemáticas que encontraban sustento lógico en definiciones formales, el microcosmos solo generó confusión (Toulmin y Goodfield, 1982).

Los microscopistas desarrollaron un lenguaje visual en lugar de un discurso literal del microcosmos. La ilustración detallada era la única herramienta de la microscopía para acercarse a la literalidad (Hooke, 1721; Alpers, 1983). ¿Cómo podrían las descripciones y las ilustraciones del microcosmos encajar en las filosofías imperantes? Por un lado la escuela de Descartes demandaba una lógica de la naturaleza regida por leyes explicables en un lenguaje matemático. Por otro lado el proyecto de Bacon necesitaba de pruebas empíricas que llevaran a la formulación de relaciones causales (Foucault, 1973). La microscopía carecía de las herramientas empíricas para establecer relaciones lógicas y causales acerca del microcosmos, y mucho menos leyes explícitas en definiciones matemáticas. Sin embargo las investigaciones de Hook fueron acogidas dentro del programa de investigaciones de la Royal Society diseñado e influenciado por Bacon (Dear, 1985).

Una base epistemológica para la microscopía del siglo XVII surgió gracias al diálogo entre el baconismo y el arte, particularmente la escuela de pintura holandesa (Alpers, 1983).

*"Concerning de aim of the Art Painting; what it is and what it procedures. The art of Painting is a science for representing all the ideas or notions which the whole of visible nature is able to produce and for deceiving the eye with drawing and color."*⁹

Hooke, Fellow of the Royal Society. Jo. Martyn, and Ja. Allestry, printers to the Royal Society, and are to be sold at their shop at the Bell in S. Paul's church-yard.

⁹ ***“En lo que concierne al fin del arte de la pintura; lo que es y en lo que procede. El arte de la pintura es una ciencia para represental todas las ideas o nociones que la naturaleza visible es capaz de producir, y encaminar al***

Estos preceptos son apreciables en la obra de Vandike, De Ghen y Vermer. Se trata de la exactitud y el detalle de la naturaleza en contraposición con el contexto histórico, la moda y la idealización. Los pintores holandeses privilegian la exactitud y la atemporalidad en sus obras para saciar la necesidad de una literalidad plástica como recurso explicativo del cosmos (Wheelock, 1977; Alpers, 1983).

Un personaje importante en la construcción del diálogo entre ciencia y arte fue Constatjin Hughens quien fungía como diplomático holandés en la Inglaterra de siglo XVII. El establece un discurso de relación entre las implicaciones filosóficas del microcosmos y la función del arte pictórico. Como producto de su fructífera amistad con Cornelis Debreel, microscopista de la corte inglesa, Hughens, se interesa en justificar la veracidad de las observaciones microscópicas frente a los preceptos del atomismo filosófico; y establecer que aunque el orden superior del "Nuevo Mundo (microscópico)" fuera aún desconocido, sería a través de la función descriptiva de la pintura que esté se vuelve asequible (Bachrach, 1962; Alpers, 1983).

*"In deed, material objects that till now classified among atoms, since they far eluded all human eye sight, presented themselves so clearly to the observer's eye ... For the fact this concerns a new theater of nature, another world... I have begun to push people (not against their will): namely, to portrair the most minute objects... to compile a book to be given the title of the New World, from which examples could be incised in metal."*¹⁰

C. Huygens

Hughens, desarrolla la labor de gestión junto con Hook y Bacon al interior de la Royal Society para generar una aceptación institucional de las investigaciones microscópicas acompañadas de sus ilustraciones correspondientes¹¹. Este suceso abriría las puertas para que Anton van Lewenhoek publicara sus trabajos en la Royal Society (Dobell, 1932; Lane, 2015).

ojo con representación y color. "Van Hoogstraten, S. (s/f). *Inleyding tot de hooge schoole der schilderkonst: anders de zichtbaere werelt*. Cita tomada de Alpers, S. (1983). *The art of describing: Dutch art in the seventeenth century* (Vol. 24, pp. 236-f). Chicago: University of Chicago Press.

¹⁰ **"En efecto, objetos materiales hasta ahora clasificados entre átomos, tal que han eludido toda visión del ojo humano, son ahora presentados al ojo del observador... Es un hecho que esto concierne a nuevo teatro de la naturaleza, otro mundo... Yo he comenzado a presionar gente (no contra su voluntad); sino para retratar los mas pequeños objetos...para compilar en un libro al que le sea dado el título de Nuevo Mundo, del que sus ejemplo puedan ser litografiados"** Huygens, C., & Worp, J. A. (1897). *Fragment eener autobiographie van Constantijn Huygens*. Nijhoff. Cita tomada de Alpers, S. (1983). *The art of describing: Dutch art in the seventeenth century* (Vol. 24, pp. 236-f). Chicago: University of Chicago Press.

¹¹ El recibimiento de los trabajos de Leewenhoek abriría las puertas a microscopistas holandeses. La influencia de Bacon sobre los científicos holandeses como Hermann Boerhave y Swammerdam fue artistas. Véase Swammerdam, J. (1758). *book of nature; or, The history of insects*, y la revision de Alpers, 1983)

Las aportaciones de Lewenhoek son importantes en el contexto del devenir histórico y filosófico de la microscopía. Lewenhoek al no ser propiamente un filósofo natural ni pertenecer al círculo académico de la época, no se adhiere formalmente al proyecto de Bacon sin embargo desarrolla un discurso empírico notable al demostrar sus observaciones.

En 1673, apenas una década después de la guerra anglo-holandesa y la publicación de *Micrographia*, Henry Oldenburg, usando el anagrama "Grubendoll" como seudónimo, accede a publicar por recomendación de Huygens, los trabajos de Leeuwenhoek.¹² Oldenburg entonces secretario de la Royal Society, accede ante la insistente y poderosa recomendación de Huygens y la de Regnerus de Graff, único holandés que en ese momento publicaba en la Royal Society (Lane, 2015).

El microscopio de Leeuwenhoek, fabricado de una sola lente *quasi* esférica permitía una resolución mayor al microscopio tubular de Hook. Este simple hecho implicó el re-descubrimiento del microcosmos, ya no en una escala de cientos de micras sino hasta la resolución de 2 micrómetros (Ford, 1991). Las primeras publicaciones de Leeuwenhoek contenían las observaciones de protistas y bacterias a los que él llamó "pequeños animáculos". Sin embargo trabajos posteriores fueron rechazadas debido al escepticismo de los miembros de la Royal Society, especialmente por parte de Hook, ya que no pudieron repetir las observaciones (Lane, 2015).

En la obra de Leeuwenhoek converge el uso de un lenguaje coloquial con exactitud metodológica. Como se muestra en el siguiente fragmento de la famosa "*Letter on Protozoa*" de 1676:

*"In 1675 I discovered living creatures in Rain water which had stood but few days in a new earthen pot, glazed blew within. This invited me to view this water with great attention, especially those little animals apperaing to me ten thousand times less than those represented by Mons Swamerdam and called by him Water fleas or Water lice. Which may be percieved in water with naked eye."*¹³

¹² Carta de Constantijn Huygens a Robert Hookm 8 de agosto de 1673 in Dobell, C., & van Leeuwenhoek, A. (1958). *Antony van Leeuwenhoek and his "little animals."*. Russell & Russell.

¹³ **"En 1675 descubrí criaturas vivientes en agua de lluvia que había estancado por algunos días en un recipiente hervido, vidriado por dentro. Esto me invitó a mirar esta agua con mayor atención, especialmente aquellos pequeños animales aparecidos ante mi diez mil veces más pequeños que los representados por el Sr. Swamerdam y llamados por él Pulgas de Agua o Piojos de Agua que pueden ser percibidos en el agua a simple vista"** Van Leeuwenhoek, A. 1677. Observations, communicated to the publisher by Mr. Antony van Leeuwenhoek, in a Dutch letter of the 9th of October. 1676. Here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well Sea-and snow-water; as also in water wherein pepper had lain infused. *Philios. Trans. R. Soc. Land. 11: 821—831*. Citas tomadas **"...Estos glóbulos, que en el seno de estas criaturas flotaron aleatoriamente aquí y allá eran del tamaño**

Irónicamente, y a pesar una extraordinaria habilidad para el diseño experimental, las observaciones de Leeuwenhoek fueron puestas en duda; tuvo un diseño experimental y honestidad notables pero mantuvo secretismo acerca del uso del microscopio simple (Dobell, 1958). La dificultad en el uso de los microscopios simples y el lento desarrollo del protocolo experimental en las observaciones microscópicas, atrasaron el advenimiento del anhelado fundamento teórico acerca del microcosmos: la teoría celular (Fournier, 1996).

Una paradoja surgida de la revisión reciente de los textos de Leeuwenhoek es que en su obra existen observaciones y conclusiones fisiológicas importantes sobre los microorganismos. Doscientos años antes de que se diera una fusión formal entre la microanatomía y la fisiología, Leeuwenhoek ya se preocupaba por la esterilización de los envases donde desarrolló el cultivo de microorganismos de agua estancada; por evadir la contaminación externa de sus cultivos (Meyer, 1937; Lane, 2015). Leeuwenhoek se oponía a la idea de generación espontánea, gracias a su conocimiento de la ideas de Francesco Reddi (Ruestow, 1984). Resulta extraordinaria su descripción de la procreación de algunas células vía copula, probablemente ciliados. En la carta de 1677 se describe a un organismo ahora identificado como *Colpidium colpoda* que contiene glóbulos internos cuya distribución cambia al momento que los organismos son expuestos a condiciones deshidratantes (Lane, 2015). El texto original refiere:

...these globules, which in bursting of these creatures did flow asunder here and there, were about the bigness of the first very samll creatures (bacteria)"¹².

La consideración de que elementos internos de microorganismos tuvieran la apariencia de bacterias, lleva a la idea de algunos biógrafos de Leeuwenhoek de que exista la posibilidad de que haya podido avistar mitocondrias de alrededor de 0.5- 1 micrómetros de diámetro (Lane, 2015).

Las importantes conclusiones emanadas de la habilidad experimental, el diseño de las condiciones de cultivo de los "animáculos" y las variaciones de sus condiciones, fueron olvidadas y algunas redescubiertas después del advenimiento de la teoría celular. Es sugerente que algunos elementos descriptivos que conforman la teoría celular, fueron reportados por Leeuwenhoek, como la

de la primeras y muy pequeñas criaturas (Bacterias)" Traducido parcialmente de Lane, N. (2015). The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(1666), 20140344.

reproducción de células a partir de otras células. Otras ideas más vanguardistas tampoco tuvieron eco en la comunidad científica del siglo XVII. La distinción morfológica de bacterias y protozoarios no impactó a la clasificación linneana de los microorganismos acotados a los grupos aristotélicos de Vermes y Chaos (sin forma) (Egerton, 2006; Lane, 2015).

Otros conceptos menos afortunados como el homúnculo, derivado de las observaciones microscópicas del semen, establecieron las bases para la teoría de la preformación que sería refutada siglos después en el seno de la teoría celular (Pinto-Correia, 1999).

En 1677, después de múltiples intentos, Hook logra replicar las observaciones de Leeuwenhoek, dando un criterio de repetitividad y veracidad a la existencia de los "animáculos". Hook describe con fascinación:

"It seems very wonderful that there should be such an infinite number of animals in so imperceptible quantity of matter. That these animals should be so perfectly shaped and indeed with such curious organs of motion as to be able to move nimbly, to turn, stay, accelerate and retard their progress at pleasure. And it was not less surprising to find that these gygantik monsters (protozoa) in comparison of less sort which almost filled the water (bacteria)"¹⁴

Posteriormente Hook publica sus observaciones con el microscopio simple y da detalle de sus métodos de observación, con los que las observaciones de Leeuwenhoek obtienen reconocimiento (Hooke, 1678).

El microscopio simple de Leeuwenhoek implicó el verdadero descubrimiento del microcosmos por la resolución que permitía (Ford, 1991). La confusión filosófica vislumbrada ya desde la obra de Hook fue mayor con respecto a los animáculos. Éstos carecían de explicación y poco satisfecha fue la necesidad de una lógica hermética detrás de la apabullante diversidad de las formas microscópicas.

¹⁴ ***"Parece muy bello que pueda existir un número infinito de animales en una cantidad imperceptible de materia. Que estos animales estén tan perfectamente moldeados y, en efecto, con tales curiosos órganos de movimiento como para moverse poco, girar, permanecer, acelerar y retardar su progresión a placer. Y no fue menos sorprendente encontrar que estos gigantes monstruos (protozoarios) en comparación con los menos diversos que casi llenan toda el agua (bacteria)"*** Carta de Hooke a Leeuwenhoek, 1 de diciembre de 1677 in Dobell, C., & van Leeuwenhoek, A. (1958). *Antony van Leeuwenhoek and his "little animals."* Russell & Russell. Cita tomada de Lane, N. (2015). The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(1666), 20140344.

La metáfora descriptiva de célula de Hook tendría que esperar la llegada del decimonónico para ser parte de un marco lógico general, que atribuyera propiedades y explicaciones sobre su naturaleza, funcional, estructural y ontogenética.

Pueden esbozarse dos factores importantes para explicar el lento desarrollo de la microanatomía entre el siglo XVII y el siglo XIX: el primero fue que aunque los microscopios sencillos poseían un poder de resolución mayor y esquivaban la aberración cromática su uso era complejo y la fabricación de lentes limitada (Zuylen, 1981; Singer, 1914). En segundo lugar, que la ilustración literal como medio para acceder a las observaciones microscópicas no fue complementada con experimentos enfocados a los cambios fisiológicos de los microorganismos hasta el siglo XIX (De Asúa y Klimovsky 1987; Gonzalez Recio, 1990). El devenir histórico de la teoría celular a partir de los postulados de Schwann y Schleiden se dio en un momento en que los microscopios compuestos fueron perfeccionados hasta el punto de contar con el objetivo apocromático¹⁵ de Zeiss y Abbe en 1887 (Abbe, 1887; Albarracín Teulón, 1983).

La obra detallada de Lewenhoeck solo sería redescubierta hasta 1932 por Christopher Dobell quien haría justicia sobre sus descripciones de Vorticella y Spirogyra y por Brian Ford en 1981 quien demostraría la resolución de sus microscopios (Dobell, 1932; Ford, 1981). De 1665 a 1838 la microscopía quedaría relegada a una curiosidad de gabinete.

Anticipaciones de la teoría celular

La publicación en 1838 de "*Beiträge zur Phytogenesis*"¹⁶ y en 1839 de "*Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*"¹⁷, marcan el comienzo de la teoría celular (Gonzalez Recio, 2012). Se trata de un proyecto del botánico Schleiden y el zoólogo Schwann que busca la unificación de la

¹⁵ El objetivo apocromático permitió la venta y distribución de lentes con aberración esférica y cromática corregida con los que en años posteriores adquirieran Ramón y Cajal, Virchow, Ouverton, etc. La mancuerna entre Zeiss y Abbe fue suceso histórico en la instrumentación científica del que surgieron las bases físicas para la microscopía moderna. Véase Abbe, E. (1886). *Über neue Mikroskope*. *Sitzungsber. der Jenaischen Ges. f. Medizin u. Naturwiss*, 1886, 107-128.

¹⁶ Schleiden, M. J. 1838. *Beiträge zur Phytogenesis*. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med*, 137.

¹⁷ Schwann, T. (1839). *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen*, Berlin.

microanatomía y la fisiología a la par de la postulación de un modelo teórico que explique la naturaleza de las células.

En los 200 años transcurridos desde Hook abundaron descripciones microanatómicas aisladas. La fisión de la diatomea *Synedra* fue descrita por Trembley en 1756¹⁸ y confundida como un animal (Baker, 1952). En 1781 Fontana describe el nucléolo como una estructura dentro del núcleo en el veneno de las víboras (Fontana, 1781; Smetana, 2011). Las células animales –globulos sanguíneos- fueron avistadas por Malpighi a finales del siglo XVIII¹⁹ (Pearce, 2007). El desarrollo folicular y la implantación del óvulo fueron descritos por de Graaf²⁰ y Swammerdam²¹ (Baker, 1951; Needham y Hughes, 2015).

La teoría de la fibra introducida por Nahemeiah Grew desde el siglo XIII, sostenía que la estructura mínima de los organismos eran fibras que en su conjunto daban soporte y apariencia de tejido. Durante el siglo XIII en la teoría fibrilar se volvió popular en el marco de la Naturphilosophie; valor metafórico y fundamento empírico a partir las observaciones de las fibras musculares de Haller y en las de células vegetales: "*La fibra es para el fisiólogo lo que la línea es para elgeometra, toda figura se forma de esta última, así todo tejido proviene de una fibra*"²² (Richerand, 1823). El vocablo tejido ha permanecido en el lenguaje de la histología pero ha perdido su significado original (Toulmin y Goodfield, 1982).

El lenguaje visual tuvo relevancia en la constitucion de la teoría celular. El baconismo del siglo XVII –imperante en tiempos de Hooke- se confrontó con la filosofía de Descartes. Por más de un siglo las preguntas complejas se debatieron entre la descripción fiel o la Mathesis. A finales del siglo XVIII surgió en Alemania la Naturphilosophie, que buscaría un compromiso entre la rigurosidad experimental, la teorización matemática y la poesía como instrumento para llegar a la

¹⁸ Trembley, A. (1756). An account of a work published in Italian by Vitaliano Donati, MD containing, an essay towards a natural history of the Adriatic Sea. *Royal Society of London Philosophical Transactions*, 49, 585-592.

¹⁹ Malpighi A. (1667). The capillary's of the Arteries, and Veins. *Royal Society of London Philosophical Transactions* (sin número)

²⁰ De Graaf, R (1668) De Virorum Organis Generationi Inservientibus, de Clysteribus et de Usu Siphonis in Anatomia

²¹ Swammerdam, J. (1758). Book of nature or the history of insects.

²² "*Fibra enim physiologia id est quod linea geometrae, ex qua nempe figurae omnes orientur*" Para Haller y los iatromecanicistas del siglo XVIII la fibra se convirtió no sólo en la base empírica de la organización de la "maquinaria viva" sino en la el concepto filosófico integrador de las observaciones anatómicas y microanatómicas. Haller, A. V. 1747. *Primae lineae physiologiae in usum praelectionum academicarum*.

verdad. La Naturphilosophie es un claro ejemplo de la búsqueda del conocimiento a través de las funciones literarias y la estética helenista (Cheirif Wolosky, 2014).

En el siglo XIX, la teoría celular usó metáforas visuales. La herencia de la Naturphilosophie persistió pero ya fuera de la dimensión explicativa de las observaciones microanatómicas. Los vocablos adquirieron significados literales o metafóricos en la biología; otros se convirtieron en uso frecuentes. Un ejemplo de estos últimos es el concepto de "tejido" y su apelativo de "conectivo" (Nordenskiöld, 1949).

La teoría de la fibra careció de sustento hacia 1800. Con ella cayó también el pensamiento preformista. Si en la naturaleza no hay generación sino solo propagación, ¿cómo podían los organismos volverse más complejos durante el desarrollo? La contraposición de la preformación y epigénesis, fue abordada por Lorenz Oken en 1805. Desde la Naturphilosophie propuso la teoría del Urshleim: los organismos son agregados de partículas infusorias, como los protozoos de Leeuwenhoek: propágulos y piezas básicas de organismos más complejos (Sanchez Garnica, 2005).

*Die Einfachsten lebenden Wesen von deren Dasein nicht das freie Auge, sondern nur das Mikroskop spricht, sind wohl die Infusorien, Wesen, in denen das Chaos der Schöpfung sich täglich erneuert, un verschwindet... Die Zeugung ist keine Analysis, sie ist Synthesis der Infusorien durch homogenen aber entgegengesetzten Pol der organischen Welt*²³

Oken

El preludeo hacia la búsqueda de unicidad en la teoría celular provino de una fusión entre la fisiología como elemento experimental y la microanatomía comparada como elemento descriptivo. La gran virtud de la teoría original de Schwann y Schleiden fue reconocer en la célula la unidad funcional elemental de la configuración anatómica de los seres vivos (Albarracín Teulón, 1983). La unicidad entre las células animales y vegetales había sido motivo de debate. El núcleo ya antes descrito por Leeuwenhoek²⁴ en eritrocitos de peces fue posteriormente descrito en plantas por Robert Brown (Brown, 1833; Harris, 2000). Este antecedente fue tal vez la primera característica que unificó a las células animales y vegetales.

²³ Oken deriva desde la Naturphilosophie un tratado acerca de la generación. Un compromiso filosófico y empírico entre el preformismo y la epigénesis a partir de los infusorios Oken, L. (1805). *Die Zeugung*. Goebhardt, pp 4 y 103.

²⁴ Los núcleos fueron reportados por Leeuwenhoek en 1682 en la sangre de anguilas. Las observaciones pueden consultarse en A. Leeuwenhoek, A. (1722). *Opera Omnia seu Arcana naturæ*

Cuando la teoría preformista fue abandonada la búsqueda de un mecanismo ontogenético común a células de plantas y de animales cobró relevancia. Sin embargo los postulados iniciales de la génesis de las células, resultaron erróneos; configuraron un elemento teórico refutable en el marco de una dinámica de teorías lakatosiana (González Recio, 2012).

La consolidación de la teoría celular

En un principio Schwann y Schleiden sostuvieron que las células se formaban: con la aparición del nucléolo, la generación del citoblastema a su alrededor y posteriormente la conformación del cuerpo de la célula (González Recio, 2012). La idea estuvo basada en los postulados globulares de Grew, donde las células de las plantas resultan de la multiplicación de vesículas (Grew, 1682). Sin embargo en 1841 Jacob Henle refutaría la explicación citogenética de Schwann y Schleiden al demostrar que los nucléolos eran posteriores al núcleo (Henle, 1841; Albarracín Teulón, 1980).

Schultze, de Bary y Leydig descartaron la idea de que la pared celular es un soporte estructural generalizado al reportar su ausencia en los protozoos²⁵. Con esto se refuta totalmente la teoría de la fibra.

Ulteriormente, Von Mohl comprueba que el citoblastema no es sólo una mezcla de azúcares y goma e introduce el concepto de protoplasma (Mohl, 1846). Este último íntimamente relacionado con la observación de la mitosis en células hemáticas (Remak, 1841; González Recio, 2012) y con el antecedente de división nuclear en Infusorios (Ehrenberg, 1838).

El postulado original acerca de la génesis de las células fue refutado muchas veces y sobre nuevas observaciones fue construida una heurística positiva (González Recio, 2012). La idea de Schwann acerca de que las moléculas se autorganizaban para formar células fue finalmente refutada por Rudolf Virchow. Virchow muestra en su obra "Cellpathologie"²⁶, como la causa de las leucemias

²⁵ Los estudios se refieren a la citología de foraminíferos con lo que Schultze concluye que la célula es "un grumito de protoplasma con núcleo (ein nacktes Protoplasmaklumpchen mit Kern) (Albarracín Teulón, 1980) véase en Schultze M., Arch. Für Naturges. 26: 287 (1860); la microanatomía de diversos infusorios en Leydig, F. (1857). *Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Thiere*. Meidinger.; y las observaciones microanatómicas de Mycetozoa en: de Bary, A. (1860). *Einige neue Saprolegnien*. Zeit. Wiss. Zool., 10: 88.

²⁶ *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* ese n rialidad un compendio de 20 conferencias que fueron dadas entre febrero y abril de 1858 en el Instituto Patológico de Berlín.

es producto de la multiplicación desmedida de las células de la médula ósea (Virchow, 1871). A partir de esto identifica que las células se forman a partir de otras células. Virchow ajusta la frase atribuida a William Harvey "*Omnes Vivum ex ovo*"²⁷ (Oken, 1805) y acuña el axioma celular "*Omnis cellula e Cellula*" (Virchow, 1852; Remak, 1852).

Otras anticipaciones teóricas alrededor de la naturaleza de las células serían confirmadas posteriormente. Eherenberg, Henle y Cajal anticiparon la división nuclear, celular, la mitosis y la independencia de la neurona respectivamente (Ehrenberg, 1838; Henle, 1841; Ramón y Cajal, 1888). En 1895 Overton describió las propiedades osmóticas (Overton, 1895) y reconceptualizó la membrana celular y abriendo paso a un proceso de reconsideración del metabolismo celular (Gonzalez Recio, 1980).

La célula, aquella metáfora visual de Hooke, se convirtió para 1900 el concepto axiomático: la unidad anatómica, funcional y ontogenética de los seres vivos, bajo cuya teoría se agrupan una caterva de explicaciones precisas y observaciones concretas. El nacimiento de una nueva disciplina, la citología, había conferido al vocablo célula, un nuevo significado.

Hacia una biología celular

La siguiente unificación epistemológica sucedió por parte de la bioquímica y la teoría evolutiva. Ya en vísperas de 1900, Ernst Haeckel había postulado en sus "*Árboles de la vida*" una hipótesis filogenética donde los organismos unicelulares son el origen de los seres vivos (Haeckel, 1866; Dayrat, 2003). La principal aportación de Haeckel fue destacar la diversidad microbiana y la introducción de los microorganismos al contexto de la sistemática, abandonando por completo el insuficiente género Chaos de Linneo. No obstante la conexión entre la fisiología y la diversidad microbiana no permitió la completa unificación de los postulados evolutivos de los protistas de Haeckel sino hasta la década de 1920. Haeckel, en el contexto del monismo filosófico y el

²⁷ *Omni Vivum ex ovo (todo sale de la vida)* es una frase y doctrina atribuida erróneamente a Harvey por Oken como lo refiere ya que Harvey no contempla mas allá de la doctrina aristotélica del desarrollo directo. Su uso comienza en una obra de Whalbon en 1746 para referirse a que todo proviene de un igual. Véase Meyer, A. W. (1936). *An analysis of the De generatione animalium of William Harvey*. Stanford University Press. Probablemente Francesco Reddi la utilizó en un sentido mucho más pragmático para referirse a la imposibilidad de la generación espontánea. Véase Gottdenker, P. (1979). Francesco Redi and the fly experiments. *Bulletin of the History of Medicine*, 53(4), 575.

positivismo, se decantó por las explicaciones metafísicas y hermenéuticas orgánicas acerca del alma y la esencia de las células; quizá pueda considerarse al monismo como el último reducto de la Naturphilosophie²⁸ (Jacobs 1989; Reynolds, 2008).

En 1922 Alber Kluver, expande el concepto de metabolismo con base en sus investigaciones sobre la fermentación. El intercambio de productos dentro la célula y el medio queda demostrado para las bacterias y con ello la unicidad del metabolismo como carácter de procariontes y eucariontes (Lane, 2015). Para la posteridad quedaría su frase "Del elefante a la bacteria de ácido butírico todo es lo mismo" (Kluver, 1947).

Otra unificación interdisciplinaria fue necesaria para establecer un criterio de continuidad informacional de la vida. Los postulados de Charles Darwin acerca de la variación no habían conseguido un discurso lógico ni una representación física. Las ideas de August Weissman acerca de la continuidad del germoplasma (Weissman, 1893), al igual que la teoría original de Schleiden y Schwann, prepararon un terreno de refutación parcial (Lee, 1969). A principios del siglo XX ocurre el redescubrimiento de la genética mendeliana y la revaloración de los trabajos citológicos de Miles Edwards y bioquímicos de Miescher acerca de los cromosomas, la cromatina y los ácidos nucleicos (Olins y Olins, 2003). Strasburger había el corolario: *omni nucelo e nucelo*, en 1875 (Strasburger, 1875); quizá como una premisa de la citogenética. La identificación física de los centrosomas en los cromosomas por Boveri permitió dar una base citológica al proceso de la herencia (Doxsey, 1998). Resulta interesante que T.H Morgan, originalmente escéptico del darwinismo, reconocería en la teoría cromosómica un sustento para el desarrollo de una citogenética claramente evolucionista²⁹ (Toulmin y Goodfield, 1982).

Ya para el año 1950 la citología tenía un fuerte componente interdisciplinario que combinaba genética, fisiología, histología, y citoquímica. La elucidación de la estructura del ADN en 1958 por James Watson y James Crick, y las implicaciones que lo autores vertieron en su artículo acerca de la potencialidad informacional del ADN marcaron el inicio de la biología molecular.

²⁸ Para una revisión más detallada del monismo en la concepción de la célula .También véase en particular para la visión monista de Haeckel: Haeckel, E. 1899. *Die Welträtsel*. Strauss, Bonn; y para la hermenéutica orgánica: Becerra, P. M. (2008). Nietzsche y la hermenéutica orgánica. *Veritas: revista de filosofía y teología*, (19), 331-342.

²⁹ Para un detalle de la aceptación de la teoría evolutiva por Morgan véanse sus trabajos previos a 1921 y compárnse con los posteriores: Morgan, T. H. (1916). *A Critique of the Theory of Evolution*. Princeton University Press; Morgan, T. H. (1935). *The scientific basis of evolution. The scientific basis of evolution. 2nd Ed.*

Típicamente se identifica el surgimiento de dos escuelas, la estructural y la escuela informacional (Stent, 1968).

La escuela estructural sería de vital importancia, ya que la “molecularización” de la biología se daría en el contexto de la célula. Se establecerían dos programas de investigación. 1) El de la biología molecular cada vez más alejada de la microanatomía, que se dedicaría a la indagación de los procesos celulares por técnicas moleculares (Abir Am, 1985). 2) El relativo a la exploración visual más fina de las estructuras de las células. Ambos programas constituyen la actual biología celular (Vázquez-Nin, 2014, Bechtel, 2006). Un problema intrínseco es el reduccionismo que supone el uso de pocos modelos celulares. Sin embargo el gran caudal de información acerca de la fisiología de la células permitió generar modelos biofísicos y funcionales de los organelos y sus propiedades (Nurse, 1998).

El microscopio electrónico, al igual que el microscopio de Leeuwenhoek abrió un nuevo cosmos, el nanocosmos. La ultraestructura generó un nuevo lenguaje de lo visual sobre la base de que la estructuras nanoscópicas eran partes de la estructuras celulares microscópicas. Con el nuevo lenguaje retórico del nanocosmos surgió la necesidad de nuevos métodos experimentales para formalizar el conocimiento. Hasta el advenimiento de la inmunocitoquímica, las conclusiones acerca de la funcionalidad de las estructuras nanoscópicas de las células fueron limitadas (Croft, 2006). El vínculo entre la biología estructural y la escuela ultraestructural daría pie a nuevas disciplinas como la biología molecular de la célula. Esta adoptaría el dogma central de la biología molecular, ya acuñado desde el reduccionismo del estructuralismo molecular.

La genómica esclarecería los flujos informacionales en la célula y refutaría el dogma central de la biología molecular (Shapiro, 2009). La biología celular tendría que buscar un proceso unificador en la microbiología evolutiva. El origen y evolución de la célula se convertiría en la pregunta central y con ella vendría el cuestionamiento acerca de los aspectos ontogenéticos y filogenéticos de una complejidad estructural y funcional descubierta a lo largo de todo un siglo (Lynch *et al.*, 2014). La consecuencia natural fue el surgimiento de nuevas disciplinas como la biología celular del genoma y un programa de investigación que pretende abarcar la relación lógica de la organización celular en sus distintas dimensiones espaciales y temporales, desde la escala orgánismica hasta la escala molecular en un contexto de diversidad celular apabullante (Hartwell *et al.*, 1999).

Biología celular evolutiva

*Da der Dichtung zauberische Hülle
Sich noch lieblich um die Wahrheit wand, –
Durch die Schöpfung floß da Lebensfülle,
Und was nie empfinden wird, empfand.
An der Liebe Busen sie zu drücken,
Gab man höhern Adel der Natur,
Alles wies den eingeweihten Blicken,
Alles eines Gottes Spur*

*F. Schiller*³⁰

En el siglo XVII Emmanuelle Tesauro se refirió a la metáfora como una modalidad del descubrimiento de relaciones inéditas entre los datos del conocimiento³¹ (Eco, 2009). Él se refería a la búsqueda de firmas ocultas detrás de los objetos, espíritu que marcó al hermetismo renacentista como se aprecia en la historia de Hooke³².

En vísperas del siglo XIX Goethe acuñó el concepto de morfología desde una perspectiva de la Naturphilosophie tratando de establecer una relación entre la poesía y los fenómenos naturales desde una hermética intelectual acorde al desarrollo de la ciencia moderna (Cheirif Wolosky, 2014).

Hoy que el hermetismo armónico y la Naturphilosophie son un reducto en la historia de la ciencia, el legado de Goethe puede ser retomado desde la filosofía y la historia de la ciencia. Se ha de reconocer al lenguaje científico no solo como medio sino como entidad semiológica. Como apunta

³⁰ Fragmento del poema de Schiller “Die Götter Griechenlandes” donde el poeta y filósofo natural hace referencia al conflicto de finales del siglo XVIII entre la poesía como instrumento de verdad y el análisis de la ciencia decimonónica. Lenguaje poético en contraste con leyes naturales; Mathesis. La complejidad que busca ser linearizada. El poema entero puede consultarse en: Schiller, F. (1991). *Poesía filosófica*. Hiperión.

³¹ El Catalejo Aristotélico de Emmanuelle Tesauro es una obra que pretendió un sistema de clasificación universal para a partir de la imaginación metafórica descubrir las relaciones de la que el mundo se compone. Durante el siglo XVII la hermenéutica tri-referencial; la búsqueda de signos secretos en las explicaciones hacia el conocimiento de la armonicidad del universo, conformó la doctrina del hermetismo moderno. La obra de Tesauro es un híbrido entre el hermetismo y la búsqueda de un sentido pragmático de la clasificación. Tesauro, E. (1665) *Cannocchiale aristotelico, ossia Idea dell'arguta et ingeniosa elocutione che serve a tutta l'Arte oratoria, lapidaria, et simbólica esaminata co' Principij del divino Aristotele*. Véanse para mayores referencias la obra de Umberto Eco, Michel Foucault y para el caso de los hermetas de América la obra de Elías Trabulse.

³² Los filósofos naturales del siglo XVII que en Inglaterra vivieron la institucionalización de las academias de ciencias, son un claro ejemplo del hibridismo entre el hermetismo moderno y el pragmatismo de a pre-ilustración. La obra Hooke, Newton, Huyghens; Boerhaave entre es ambivalente entre la mística y la observación pragmática; entre el hermetismo y los programas de Descartes y Bacon. Para mayor detalle, véase el texto de M. Foucault, Las palabras y las cosas.

Foucault en “*Las palabras y las cosas*” el principio de semejanza que crea las metáforas y las analogías ya no es el explicador central del mundo pero es el paso inicial de la curiosidad y la génesis del saber que pretende convertirse en conocimiento científico (Foucault, 1988). En la ciencia la creatividad de nuestras metáforas y nuestros lenguajes es la semilla de las nuevas disciplinas.

El desarrollo histórico de la biología celular ha sido contingente con el de la biología evolutiva. Ambas disciplinas han encontrado en la víspera del siglo XXI el reto de la causalidad de los sistemas complejos (Kitano, 2002). La biología celular en su búsqueda por explicaciones mecanicistas de las observaciones microanatómicas: la función otras de la forma. La biología evolutiva ante las emergentes disciplinas del evo-devo y la cuestión del origen de la forma. Las perspectivas reduccionistas de la genómica y de la fisiología celular, han sido insuficientes (Doolittle 1980; Hartwell *et al.*, 1999). "Todo cambio evolutivo requiere de modificaciones al nivel celular" (Marshall, 2011).

En 2014 Lynch y colaboradores advierten la necesidad de una biología celular evolutiva (Lynch *et al.*, 2014). Si los preceptos mecanicistas de la arquitectura celular pueden explicar aspectos importantes de la plasticidad fenotípica, entonces son dignos de ser tomados en cuenta por la biología evolutiva. Por otro lado el reduccionismo de los organismos modelo y la necesidad de explorar el origen de los sistemas celulares, demanda que la biología celular utilice las herramientas 'ómicas' y la estructura del pensamiento evolutivo para acertar explicaciones integrativas. La biología celular evolutiva es una nueva (trans) disciplina. No solo abreva de los conceptos de sus dos orígenes disciplinares sino que propone un nuevo diseño teórico y experimental.

Cuatro preguntas componente el manifiesto de la "*Evolutionary Cell Biology*":

- ¿Por qué las células son como son; porque no son perfectas?
- ¿Cómo surgen las innovaciones celulares?
- ¿Dónde se encuentran las innovaciones celulares en el árbol de la vida?
- ¿Cómo se puede asegurar una implementación efectiva del pensamiento evolutivo en la biología celular?

El programa de investigación que propone reconocer el valor de la diversidad citológica y morfofuncional, fuera de los organismos modelo canónicos y voltear a la tradición de la citología

comparada en un ejercicio que concilia el actualismo biológico morfoestructural con las filogenias basadas en la reconstrucción de estados ancestrales.

Capítulo 2

Elementos de una “arquitectura celular” en microorganismos gigantes

En el presente trabajo las descripciones microanatómicas tienen el objeto de contribuir con explicaciones al entendimiento de la arquitectura celular detrás del fenómeno de gigantismo celular. La comparación entre un organismo procarionte, *E. fishelsoni* y un organismo eucariote *Chaos chaos* pretende explorar cómo son los diversos elementos microanatómicos en células gigantes de distintos dominios. Bajo el entendido de que el gigantismo celular es una característica polifilética, la comparación no puede ser literal. Sin embargo los distintos sistemas celulares pueden tener concordancias a nivel de procesos moleculares. Las filogenias recientes acerca de la evolución temprana de la vida revelan muchos de estos sistemas que son compartidos por bacterias, arqueas y eucariotes. La relación de estos sistemas con la topología celular; es decir los organelos y estructuras donde se encuentran es una perspectiva que pretende acercarse a la evolución de la arquitectura celular. Las manifestaciones a nivel microanatómico de las estructuras y organelos en células gigantes resulta una aproximación inicial a este problema.

¿Cómo se construye una célula?

Al igual que en otros ámbitos de la biología las referencias más simples de arquitectura son aquellas que atañen al concepto de diseño e integridad física. Al hablar de diseño ha de considerarse como antes que no se propone un discurso teleológico sino que se habla acerca de los constreñimientos mecánicos y organizacionales que subyacen a la forma de las células. Es decir una abstracción del concepto de diseño -como es común en el arte contemporáneo- desde una visión no panglosiana.

Wallace Marshall ha hecho referencia en repetidas ocasiones al concepto de arquitectura celular. El tamaño, el número de organelos o elementos, la polaridad, la topología, la geometría y la

relación de estos elementos con la función y el flujo de información, son partes del análisis que se debe emprender para reconocer nuestro conocimiento hacia una arquitectura celular (Rafelski y Marshall, 2008).

Tamaño

En 1855 Adolf Fick deriva una ley biofísica fundamental para determinar el tamaño máximo de una célula. La relación entre superficie y volumen celular es una medida exponencial. El tamaño máximo de una célula bacteriana está determinado por la calidad de difusión de una partícula en el volumen contenido. Las células eucariontes evaden esta relación por la superficie que aportan sus compartimentados celulares (Tyrrell, 1964). No se cuenta con un estudio cuantitativo acerca de esta relación en ninguna célula eucarionte, pero se conoce que modificaciones por orden de magnitud afectan la curvatura de la membrana y su forma.

El tamaño de los organelos y de los elementos del citoesqueleto es una propiedad que las células controlan por medio de reglas moleculares. La longitud del flagelo de las bacterias, los filamentos de actina en los sarcomeros y los filamentos de secreción bacterianos tipo II es controlado por la longitud de los productos génicos (Rafelski y Marshall, 2008). Un mecanismo que primero fue descrito en la cola del fago lamda (Katsura, 1976).

La síntesis cuántica es otro mecanismo de control del tamaño. La síntesis de elementos que componen a una estructura está regulada por el progreso de la misma estructura (Stephens, 1989). La disposición de los monómeros en flagelos de *Chlamydomonas reinhardtii* se agota cuando el flagelo es concluido; siempre se conserva la misma longitud o proporción (Rosembaum *et al.*, 1969).

La autoorganización en la formación de las cisternas del retículo endoplásmico sigue un mecanismo de retroalimentación negativa (Bernales *et al.*, 2006). El balance dinámico en la polimerización es un mecanismo de los microtúbulos para establecer longitudes promedio. La tasa de ensamblaje disminuye a medida que la punta del túbulo es más lejana (Marshall y Rosenbaum, 2001).

El número de algunos organelos es controlado por mecanismos de realimentación (balance dinámico). La cantidad total de mitocondrias es la diferencia entre unidades nuevas y degradadas por mitofagia. También se puede establecer como la diferencia entre eventos de fisión y fusión mitocondrial (Youle y Van Der Bliek, 2012). Los peroxisomas, los plásmidos y los centriolos son ejemplos de elementos celulares que conservan un número fijo gracias a un sistema de balance dinámico (Rafelski y Marshall, 2008).

La polaridad y la topología

La polaridad de la célula tiene que ver con el rompimiento de la simetría radial. Tanto en las células como en la ontogenia la adquisición de la simetría se debe a procesos independientes o parcialmente dependientes de la expresión génica. En el desarrollo embrionario el eje anteroposterior se determina por herencia materna durante los primeros estadios (Wodarz, 2002). En protozoarios y células móviles se han estudiado los mecanismos de la polaridad celular. Esta se establece en primer lugar por la distribución aleatoria de proteínas y organelos (centriolos) que dan una pista para el autoensamblaje de estructuras que definen los ejes de simetría. En los protistas el axostilo es una estructura que define una simetría bilateral. La mayoría de las células individuales con simetría se valen de complejos de microtúbulos que distribuyen los organelos en sitios específicos (Thery *et al.*, 2006; Marshall, 2011). Los microtúbulos son sistemas versátiles que comprimen las fuerzas mecánicas del exterior y las tensiones internas (Ingber, 1993). Otros organismo como los radiolarios y los foraminíferos adquieren simetrías radiales que les permiten por proceso de compresión y distribución de fuerzas en sus testas, soportar condiciones hiperbárica (Hottinger, 1982). El centriolo y el cuerpo basal son estructuras altamente conservadas que resultan en modificaciones específicas del centro organizador de microtúbulos. La topología de los organelos en las arquitecturas celulares de los protistas depende en gran medida del citoesqueleto microtubular. Un ejemplo es el cinetoplasto; una estructura que integra cilio, cuerpo basal y núcleo; y define la simetría de la célula. Los mecanismos por los que los organelos se posicionan continúan ignorados así como el detalle de las interacciones físicas en la diversidad de arquitecturas celulares (Grain, 1986).

Los mecanismos termodinámicos son útiles también en la determinación de la forma. La tubulación del retículo endoplásmico liso se debe probablemente a la presencia de reticulones: proteínas con dos dominios hidrofóbicos, que constriñen físicamente la forma de las cisternas (Hu *et al.*, 2008). Las mitocondrias además de los mecanismos de balance determinan sus formas por procesos bioenergéticos. La curvatura de las crestas mitocondriales es una estructura exotrópica que solo es posible por el arreglo particular y la concentración de las ATP sintasas. La inactividad lleva por lo general la disrupción de las crestas y a la fisión mitocondrial (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005).

La propagación de estructuras iterativas es otra perspectiva. Patrones arquitectónicos pueden propagarse en un mismo organismo a través de procesos de polimerización, autoensamblaje, o pasar de generación en generación como herencia celular (Rafelski y Marshall, 2008). Los experimentos en *Paramecium aurelia* confirman la herencia del arreglo de las cinétidas (Beisson y Sonneborn, 1965). Las perturbaciones geométricas afectan las propiedades de muchas estructuras. Estas observaciones apuntan a la importancia de los constreñimientos físicos, las bases estructurales de la morfología, la naturaleza dinámica de los procesos celulares y la “evolucionabilidad”³³ de las arquitecturas celulares (Marshall, 2011). Muchos de estos problemas han sido abordados desde marcos conceptuales que también ocupan un vocabulario arquitectónico.

Tensegridad

En las últimas décadas la biofísica del citoesqueleto ha derivado de analogías arquitectónicas más complejas que han permitido la traslación de modelos de la ingeniería estructural a la biología. Tal es el caso de la tensegridad (Ingber; 1993; Ingber and Jamieson, 1982; Joshi *et al.*, 1985; Fulton e Isaacs, 1986).

La tensegridad es una propiedad de series de elementos rígidos conectados por series de elementos ténsiles que forman un patrón geométrico. Tensegridad quiere decir integridad tensional (Fuller, 1961; 1965). Es un concepto acuñado en la arquitectura por Buckminster Fuller y utilizado en la plástica por el escultor Kenneth Snelson (Edmonson, 2007). En la segunda década del siglo XX las

³³ Del vocablo inglés *evolvability* que se refiere a la capacidad de un carácter o de una especie de ser sujeto de procesos evolutivos y es medida de su potencial de cambio en el tiempo.

estructuras tensegriles permitieron el desarrollo de superficies elongadas extensas sin necesidad de elementos de soporte. La tensión mediante arreglos geométricos en carpas geodésicas y tridillosos reparte la tensión y las fuerzas sobre toda la estructura. Un ejemplo icónico es el pabellón geodésico de Buckminster Fuller en la exposición universal de 1970. La estructura es una esfera geodésica soportada sobre sí misma. El pabellón es una analogía orgánica de la organización de las formas naturales, y una analogía ecológica debido a la homeostasis que mantiene la esfera respecto del exterior (Massey, 2006). La analogía orgánica de Fuller y Fulton derivó en la década de 1990 en el desarrollo de un modelo de organización del citoesqueleto: la tensegridad celular.

El biólogo celular Donald Ingber trasladó el concepto de tensegridad a la biología celular bajo la premisa de que los mayores componentes del citoesqueleto: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, cuentan con las propiedades físicas ténsiles y rígidas para emular un modelo de tensegridad estructural (Ingber, 1985). La macroestructura del citoesqueleto es un campo de estudio abierto, ya que aunque se reconocen las propiedades físicas de sus elementos no se cuenta con una panorámica de su dinámica estructural.

Las premisas iniciales para la traslación de la tensegridad a la biología celular son:

- 1) Reconocer que la matriz extracelular y las uniones celulares son una extensión estructural del citoesqueleto (Ingber, 1986; 1991).
- 2) Considerar que la forma de la célula es dinámica y que el citoesqueleto no es una estructura pasiva sino que es un sistema estructural que interactúa con el estrés mecánico y ecofisiológico (Ingber, 1986)).

En modelos previos de la mecánica del continuo, como los que llevaron al modelo de mosaico fluido de membrana, el balance de fuerzas ocurre por la compresión en la superficies de las membrana o paredes celulares, al tiempo que el cito esqueleto es un estructura rígida que comprime hacia el exterior (Evans *et al.*, 1980).

En un modelo de tensegridad el balance de fuerzas ocurre a través de tensiones continuas y compresiones locales; es decir que las fuerzas se distribuyen isométricamente en lugar de comprimir todas hacia un mismo punto (Ingber, 1993). La tensión isométrica es la manifestación física del trabajo del citoesqueleto en el contexto celular y tisular. Ejemplo de ello, son los sistemas

de actina-miosina en músculos y el movimiento de fibroblastos en cultivos de gel (Kolodney y Wysolmerski, 1992).

Los microfilamentos, compuestos principalmente por actina, son elementos de un sistema dinámico en la mayoría de las células. El cambio en la concentración de F-actina y el número de microfilamentos correlaciona con cambios drásticos en la forma de las células (Lazarides, 1976). Los filamentos de actina están estructuralmente relacionados con las uniones celulares. En uniones focales conforman un complejo proteico transmembrana que incluye integrinas, vinculadas y vimeinas, complejos similares se encuentran en uniones adherentes, uniones estrechas y algunas uniones comunicantes (Burrige *et al.*, 1988; Fey *et al.*, 1984). Sobre estas uniones operan múltiples rutas de señalización que regulan la formación y degradación de uniones y alteraciones en la polimerización de microfilamentos. En consecuencia la arquitectura del sistema de microfilamentos, matriz extracelular y uniones celulares, es la interface para procesos de mecano transducción celular; algunos relacionados con la regulación genética y otros relacionados con la plasticidad fenotípica (Breither-Hahn, 1987; Ingber, 1997) .

Los microfilamentos son altamente tensionales no solo debido a las propiedades elásticas de la actina sino al uso de ATP para ejercer trabajo mecánico. En modelos de uniones adherentes, los filamentos de actino-miosina adquieren un arreglo geométrico ordenado en los momentos de mayor tensión isotrópica (por ejemplo el *rigor mortis*) (Sims, *et al.*, 1992). Los arreglos geométricos corresponden con estructuras geodésicas que tienen la propiedad de ser iterativas; desde un tetraedro hasta un poliedro. Estudios de microscopía electrónica revelan que los microfilamentos corresponden a estructuras isotrópicas, es decir que tienden a la simetría. La mayoría establece ángulos de 90' y 120 grados (Heuser y Kirschner, 1980). Observaciones de inmunofluorescencia sugieren que los patrones hexagonales de actina en la superficie de células son evidencia de un arreglo geodésico subyacente (Osborn *et al.*, 1978).

Los microtúbulos son otros elementos que puede integrarse a un modelo de tensegridad celular. Las propiedades físicas de la tubulina hacen de los microtúbulos sistemas más complejionales que tensionales. A medida que la fuerza tensional aumenta, por ejemplo en células o en arquitecturas tisulares especializadas (muchas uniones), la concentración de microtúbulos disminuye y con ella la compresión interna (Ingber, 1997). En células individuales que sufren procesos de elongación,

los microtúbulos ejercen compresión sobre centros de apoyo. Esto se observa en la mitosis o en la formación de *spitzenkörper* en hongos (Steinberg, 2007).

Modelos termodinámicos de la tensegridad celular han sido propuestos por Heideman y Buxbaum (Heideman y Buxbaum, 1990). El reto de un modelo de tensegridad sería explicar el movimiento aparentemente amorfo de un fibroblasto, un plasmodio o un ameboideo (Travis y Bower, 1986). Se ha propuesto que en un inicio los microfilamentos proveen una estabilidad tensegril ante la presión de la adhesión celular al sustrato. Posteriormente la formación de matriz extracelular resulta en el reclutamiento de integrinas y la liberación de fosfatidilinositol que promueve la liberación de monómeros de actina. Los sitios libres de miosina (vértices y geodomas) proveen sitios de nucleación para la polimerización de la actina que resultan en la formación de filópodos. Los filópodos son tensionados por la estructura de microfilamentos. La tensión se balancea con la formación de patrones geodésicos en lamelipodios yseudópodos. Una vez que el andamiaje de microfilamentos está presente en las nuevas proyecciones celulares, nueva matriz extracelular se forma; la adhesión al sustrato ocurre nuevamente y el ciclo comienza (Ingber, 1997).

Los filamentos intermedios son probablemente integradores mecánicos en un modelo de tensegridad celular. (Lazarides, 1980) En el contexto estructural de la célula los organelos y los compartimentos son elementos comprometidos por los cambios en la forma. Los filamentos intermedios proveen un andamio para el núcleo ante las tensiones rotacionales del citoplasma (Pienta y Coffey, 1992; Ingber, 1997). La forma del núcleo también podría corresponder a un modelo de tensegridad. Las actinas nucleares no generan tensión interna pero reciben trabajo por parte del citoesqueleto. Los núcleos en muchas células se contraen cuando las uniones celulares ceden (Sims, 1992). Probablemente las proteínas de la lámina nuclear y los distintos estados de compactación de la cromatina (elementos rígidos y téniles) establezcan interacciones relevantes en el contexto de la forma y la mecanotransducción (Ingber, 1997). Estos procesos son entendidos ahora bajo la metáfora de arquitectura nuclear.

Hasta que los estudios de microscopía electrónica y microscopía de súper resolución en vivo confirmen estas observaciones la tensegridad será un modelo explicativo potencial. Una metáfora que ha traspasado la barrera del lenguaje abstracto para convertirse en un discurso epistémico; ahora provee un elemento semántico que se suma a la metáfora de arquitectura celular.

La membrana plasmática

La dinámica de membranas es proceso celular bien conocido en los eucariontes. Los procesos de fagocitosis, endocitosis, pinocitosis han sido descritos a detalle desde perspectivas moleculares y microanatómicas (Field *et al.*, 2007). En bacterias la dinámica de membranas es un campo virgen. Muchos sistemas bacterianos poseen una dinámica de membranas compleja. Tal es el caso de los planctomicetes y las actinobacterias (Gitai, 2005). Los compartimentos de membranosos de *Gemmata obscuriglobis* han sido poco estudiados a la fecha así como la participación de las proteínas involucradas (Pearson *et al.*, 2003). Las bacterias gigantes cuentan con la formación de vesículas o sistema de endomembranas análogos. Su estudio podría brindar perspectivas interesantes de cómo se comportan estas estructuras en modelos bacterianos.

La arquitectura nuclear de los eucariontes

La arquitectura nuclear es una expresión metafórica que se refiere al entendimiento orgánico del espacio y los elementos del núcleo de las células; su relación con funciones específicas y sus cambios a lo largo de la ontogenia y la filogenia. La microanatomía del núcleo ha sido objeto de estudio desde el siglo XIX, pero solo a partir de la incursión de las técnicas inmuntocitoquímicas fue posible establecer relaciones funcionales de las proteínas nucleares y su espacialidad. Actualmente la arquitectura nuclear a nivel nanométrico es fundamental para explorar aspectos experimentales de la expresión genética (Busch, 2012). La arquitectura nuclear es contingente a la arquitectura genómica. Sus objetos son estudiados con técnicas de microscopía de súper resolución y genómica funcional de última generación: FLIRT, smFISH, multiFISH (Rouquette *et al.*, 2010). El entendimiento de que existen explicaciones causales detrás de las observaciones nanoscópicas ha llevado a la generación de conceptos formales alrededor de la metáfora de la arquitectura nuclear y genómica (Misteli, 2005).

El primer concepto es la resignificación de compartimentos nucleares. Desde el surgimiento de la microscopía electrónica se ha identificado una gran diversidad de cuerpos nucleares ribonucleoprotéicos con variadas formas, funciones y morfologías. (Tabla 1) Aunque la composición, función e interacción de las proteínas en muchos cuerpos nucleares es conocida, la

relación particular que guardan con la arquitectura nuclear permanece ignorada. ¿Qué son los cuerpos nucleares y de qué forma se relacionan con un orden y una dinámica de proteínas y ácidos nucleicos dentro del núcleo? ¿Existen andamiajes estructurales como en los modelos de tensegridad o más bien patrones de organización complejos derivados de las interacciones DNA-RNP; agregaciones proteicas o procesos de autoorganización? En primera instancia los argumentos formales entorno al concepto de compartimento nuclear indican que éste puede ser proteinaceo: cuerpos nucleares y estructuras de la envoltura nuclear (Mistelli, 2005).

Los cuerpos cromatínicos que se refieren a la organización espacial y funcional de la cromatina. La dicotomía histórica de heterocromatina y eucromatina ha sido rebasada por las definiciones ultraestructurales, bioquímicas y moleculares (genómicas). El corolario actual de que los genomas se organizan en patrones discretos dentro del núcleo es abarcado bajo la metáfora de territorio cromosómico (Cremer *et al.*, 2006). Diversos experimentos han demostrado que en ciertos estados metabólicos regiones ricas en genes se distribuyen en la periferia del núcleo en contraste con regiones no codificantes al centro. Estos patrones no corresponden con la distribución de la eucromatina y la heterocromatina, pero sí con la presencia de complejos remodelados de cromatina y procesos de condensación (Gilbert *et al.*, 2004).

La relación de la expresión genética con el arreglo espacial de los territorios cromosómicos ha llevado a la conclusión de que el genoma no se organiza azarosamente. Desde finales del siglo pasado experimentos de mutación dirigida revelaron que los cromosomas son entidades discretas en la laxidad de la cromatina nuclear (Cremer *et al.*, 1982). Posteriormente se ha descubierto que los arreglos de territorios cromosómicos son tejido-específicos y se relacionan con la heterocromatización de los genes necesarios para las funciones del tejido (Parada y Mistelli, 2002). Persiste el anhelo de poder obtener una visión panorámica de la organización espacial cromosómica en vivo; entender a la biología del núcleo a través de un mapa de los territorios cromosómicos.

Se han propuesto modelos de interacción para explicar la dinámica de los cuerpos nucleares y los territorios cromosómicos. Algunos cuerpos nucleares son dependientes de la expresión de ciertos genes. El nucléolo es la manifestación física de la expresión de los genes ribosómicos; alteraciones en este proceso modifican el número tamaño y posición de partículas Núcleolares (Seer y Hock,

1999). Otros cuerpos como los PML o los cuerpos de Cajal son dependientes de interacciones con RNA's (Mistelli, 2001).

El concepto de organización no azarosa del núcleo incluye fenómenos tangibles de relación radial y relativa entre partículas; reclutamiento y aislamiento de regiones funcionales; y potenciación de procesos por afinidad (Phair y Mistelli, 2000)). Se ha propuesto que las interacciones DNA-proteína operan en un modelo selectivo en donde las proteínas no permanecen solas por momentos mayores a los 20 nanosegundos. Las interacciones inespecíficas son constantes y el tiempo de interacción se prolonga cuando la afinidad es alta; cuando las interacciones son específicas (Phair *et al.*, 2004).

El concepto de dinámica nuclear es actualmente extrapolable a complejos proteicos y cuerpos nucleares. El cuerpo de Cajal muestra un comportamiento saltatorio mientras el cuerpo PML ocurre en movimientos rectilíneos a lo largo de la Nucleolina (Wiesmeijer *et al.*, 2002). En el contexto de la expresión génica, mecanismos como splicing y transcripción se coordinan por el intercambio de proteínas en distintos cuerpos nucleares (Jímenez-García y Spector, 1993).

En contraste el concepto de andamio nuclear o carioesqueleto es otra idea para entender la arquitectura nuclear. Actinas nucleares y proteínas fibrosas han sido reportadas en el núcleo celular (Capco *et al.*, 1982). La mayoría pertenece a la envoltura. Proteínas de la familia EAST y ESCT III se encuentran conservadas en todos los núcleos eucariontes y poseen homólogos de dominios de interacción DNA-proteína en procariontes (Wilson y Dawson, 2001). Las interacciones con DNA entre laminas y proteínas STAB1 parecen ser mecanismos relacionados con la expresión de genes y el posicionamiento de territorios y *loci* cromosómicos (Cai *et al.*, 2003). Algunas láminas en el interior del núcleo cumplen funciones de transcripción y replicación (Goldman *et al.*, 2002).

El concepto de patología nuclear ha cobrado relevancia ya que la morfología del núcleo es un diagnóstico recurrente al que subyacen fallas en la expresión génica y en las interacciones DNA-proteína. Un ejemplo es la reticulación del núcleo durante la progeria (Gordon *et al.*, 2014).

Una visión orgánica de la arquitectura nuclear pretende una visión programática de los conceptos de autoorganización, carioesqueleto y dinámica nuclear. Las observaciones sugieren que la relación entre forma y función yace en la manifestación *in vivo* de la expresión génica. Los constreñimientos físicos y proceso de autoorganización podrían ser parte de la plasticidad fenotípica; o estar relacionadas con rutas de señalización (mecanotransducción) como en los

modelos de tensegridad. Los aspectos físicos a escala nanométrica son relevantes en la contingencia de las diversas disciplinas y técnicas que conforman a la biología celular contemporánea. El entendimiento de procesos auto organizativos y biofísicos ayudará a la comprensión de la plasticidad fenotípica del núcleo; un panorama no panglosiano para abordar su origen y evolución.

Diversidad y función de las ribonucleoproteínas

Las ribonucleoproteínas son estructuras electrodensas compuestas de proteínas y RNA presentes en el núcleo celular y en el citoplasma. El término es ampliamente aplicable a la caterva de cuerpos nucleares: nucléolo, cuerpo de Cajal, cuerpos Policomb, gránulos pericromatinianos, intercromatinianos, etc. Actualmente se conocen de han caracterizado más de 10 diferentes tipos de cuerpos nucleares ribonucleoprotéicos (Ver Tabla 1) que llevan a cabo una diversidad de funciones reguladoras, transductoras y de maduración del RNA (Spector *et al.* 2011).

Tabla 1: Relación de cuerpos ribonucleoprotéicos más importantes³⁴

Nombre	Número promedio por célula	Tamaño promedio (µm)	Componentes determinantes	Funciones putativas
Cuerpo de Cajal	0-10	0.1-2.0	Coilina, SMN	Ensamblaje, modificación y tráfico de snoRNA y snRNA.
Clastosoma	0-3	0.2-1.2	19S, 20S proteosoma	Inducción de actividad proteosomal para ensamblaje de las unidades 19S y 20S del proteosoma y tráfico de los conjugados de ubiquitinación para el marcaje proteosomal.
Cuerpo de locus de histonas	2-4	0.2-1.2	NPAT, FLASH	Transcripción y procesamiento de los pre-mRNA's de histonas

³⁴ Tomado y complementado a partir de: Spector *et al.* 2011, *Biogenesis and function of nuclear bodies*, Trends on Genetics, Vol. 27, No. 8.

Speckle	25-50	0.8-1.8	SRFS2, SRFS1, Malat1	Procesamiento y almacenaje de pre-mRNA y factores de splicing
Paraspeckle	10-20	0.5	PSP1, p54nrb,	Retención de mRNA's hipereditados (A-I)
Compartimento perinuclear	1-4	0.2-1.0	PTP, CUGBP	Presuntamente involucrado con capacidad metastásica
PML	10-20	0.3-1.0	PML	Señalización de vías de estrés y defensa viral.
Cuerpos Polycomb	12-16	0.3-1.0	BMi1, Pc2	Apareamiento y silenciamiento de genes de proteínas Polycomb en <i>Drosophila sp.</i>
Nucléolo	1-4	0.5-8.0	Núcleolina, Fibrilarina, UBF, maquinaria de RNAPol I	Biogénesis de ribosomas, regulación de la transcripción de genes ribosómicos y señalización de vías de estrés y homeostasis general
Cuerpos de estrés	2-10	0.3-3.0	HSF1, HAP	Respuesta a estrés y almacenaje de III ncRNA's.
Clusters de gránulos pericromatinianos		0.3-1.8	mRNA	Almacenaje de mRNA maduro listo para su exportación al citoplasma
Clusters de gránulos intercromatinianos		0.3-1.8	mRNA, factores de splicing	Pre-RNA en proceso de maduración.
Gránulos de Lacandonia		0.03		Se desconoce (Jiménez-García <i>et al.</i> 1992)

Existe un fino mecanismo de regulación entre el arreglo espacial, la estructura de los cuerpos ribonucleoprotéicos y el estado general de la célula. Esta relación se establece a través de centros de actividad transcripcional y vías de señalización de estrés asociadas a las estructuras mencionadas (Mistelli, 2005).

El nucléolo por ejemplo, se forma alrededor de los “clusters” de genes ribosómicos a partir de organizadores Núcleolares (NOR's) y conforma una morfología tripartita característica (Jiménez-García, *et al.*, 1994). Los gránulos pericromatinianos se establecen en periferia de regiones

transcripcionalmente activas como depósitos de mRNA. El cuerpo de Cajal se sitúa en el Núcleoplasma y establece una relación con el nucléolo para la maduración de snoRNA y factores de *splicing* (Spector *et al.* 2011).

La transcripción del rDNA depende completamente del ensamblaje y presencia del nucléolo que regula esta actividad dependiendo del anclaje de proteínas ligadas vías de señalización de estrés, homeostasis y metabolismo como: SIRT, mTOR y CDK (Mayer y Grummt, 2005).

El resto de las ribonucleoproteínas funcional de manera similar regulando el anclaje de proteínas de señalización correspondientes a tareas específicas, con base a las señales citoplasmas de estrés, metabolismo y homeostasis. Esto se refleja en la especificidad funcional de cada uno de los cuerpos nucleares y las relaciones que entre ellos establecen (Véase tabla 1).

El nucléolo

El nucléolo es un dominio nuclear riboNúcleoprotéico compuesto por más de ochocientos tipos diferentes de proteínas (Lammond *et al.*, 2004). Es el sitio de la transcripción y maduración de los pre-rRNA's, que representan más del 50% de la expresión genética. Típicamente, las subunidades del ribosoma son transcritas de los tándems de secuencias 5.8; 18s y 28s, dispuestos sobre los *loci* ribosómicos. El ensamblaje nucléolar inicia en el anafase tardío sobre algunos de estos *loci* en un dominio cromosómico llamado organizador Núcleolar (NOR) (Ochs *et al.*, 1895). En las plantas y los animales, el NOR recluta factores pre-transcripcionales. Ya iniciada la transcripción de rRNA, más proteínas son reclutadas hasta formar el nucléolo interfásico (Giménez-Martin, 2001). Muchas proteínas Núcleolares participan en procesos como: el ciclo celular, la proliferación celular, la muerte celular, y la regulación metabólica, alterando la magnitud de la síntesis ribosómica. Un paradigma actual es que el nucléolo es plurifuncional. Morfológicamente, el nucléolo interfásico posee tres dominios ultraestructurales: el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) (Pederson, 1985). Sin embargo a la fecha no existe un consenso acerca de la distribución nanométrica de los componentes y las funciones de estos dominios ni de su relación espacial con el NOR. Las interacciones moleculares de los diferentes cuerpos ribonucleoprotéicos han sido ampliamente estudiados en modelos tradicionales

e incluso como sistemas complejos para entender la dinámica espacial de la expresión genética de los eucariontes (Spector *et al.*, 2011).

La envoltura nuclear

La envoltura nuclear no muestra componentes de las membranas celulares convencionales y es completamente diferente en estructura y función; así lo es también la organización de la cromatina dentro del núcleo y la arquitectura del genoma. Las partículas nucleares, ribonucleoproteicas son poco conocidas en el mundo procariota (Van Iterson, 1966). Su implicación en la expresión génica solo ha sido estudiada en eucariontes.

Desde la perspectiva de la bioquímica comparada se ha mostrado la posibilidad de que el complejo del poro nuclear (NPC) y el sistema endocítico hayan co-evolucionado. La estructura de protoautómero se encuentra presente en todos los núcleos eucariontes sugiriendo que es un carácter altamente conservado (DeGrasse *et al.*, 2009). Las proteínas que interactúan con ácidos nucleicos en esta estructura y también en las laminas nucleares, son homólogas de proteínas encargadas de proceso de la segregación del DNA en bacterias. Un punto de vista interesante es el estudio de sistemas bacterianos que poseen una dinámica membranas (Dawson & Wilson, 2015). Tal es el caso de los planctomicetes y las actinobacterias. Los compartimentos de membranosos de *Gemmata obscuriglobis* han sido poco estudiados a la fecha así como la participación de las proteínas involucradas (Lonhienne *et al.*, 2010). Las bacterias gigantes cuentan con la formación de vesículas o sistema endomembranosos análogos. Su estudio podría brindar perspectivas interesantes de cómo se comportan estas estructuras en modelos bacterianos (Schulz y Jørgensen, 2001).

La arquitectura del nucleóide bacteriano

El Nucleóide de las bacterias es considerado como un compartimento no membranoso; una conglomeración del material desoxiribonucleoprotéico (Robinow y Kellenberger, 1992). Sin embargo a la fecha no existe una explicación concreta acerca de la particularidad de la arquitectura del Nucleóide bacteriano. Los conceptos de la arquitectura nuclear revisados en el capítulo

anterior, (cromatina, cuerpos nucleares, etc.) no han sido estudiados ni aplicados a los procariontes. EL concepto actual de nucleoide proviene de los estudios cariológicos de principios de siglo XX. El reconocimiento de que el material nuclear en las bacterias podía ser identificado con la técnica tinción de Giemsa y la precipitación alcalina con tetra óxido de osmio, llevó a la imagen de una zona discreta que el DNA ocupa en las bacterias. Los estudios de microcopia electrónica acerca del Nucleoide, han resultado infructuosos. Las técnicas de procesamiento han resultado muy agresivas y generan artefactos en las micrografías. (Fig.) Los procesos de fijación, deshidratación y contraste han arrojado descripciones contrastantes (Robinow y Kellenberger, 1992). Actualmente no existe una técnica básica de procesamiento de las bacterias para microscopía electrónica, como en el caso de las células eucariontes.

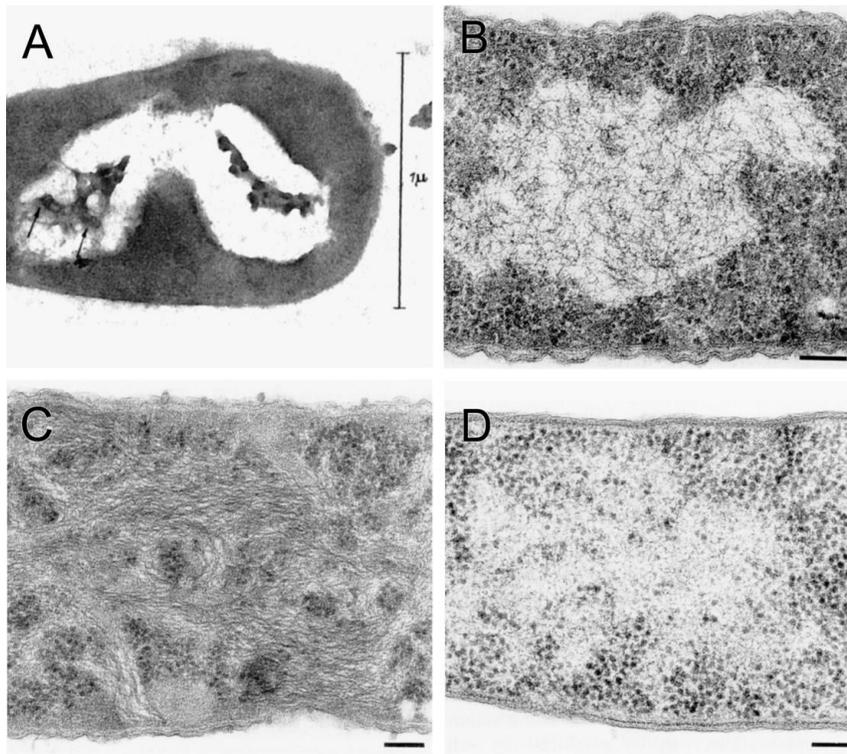


Fig. 13 Artefactos generados por diversas técnicas de fijación. A. Fijación ósmica; B Técnica de Ritter-Kellenberger y contraste ósmico; C Fijación con Glutaraldehído y post fijación con acetato de uranilo; D Criomicroscopía CFS

En cuanto a los aspectos de la organización molecular del DNA en bacterias, se reconocen aspectos importantes. El genoma bacteriano consta de un cromosoma único que se intuiría dentro del dominio descrito como Nucleoide. Se piensa que la compactación del DNA depende de la

interacción de los ácidos nucleicos con diversas proteínas. Se ha reconocido a la fecha proteínas tipo histonas (H-NS). Estas proteínas son exclusivas de bacterias Gram negativas. Las H-NS poseen dos dominios de interacción con DNA, lo que les permite formar duplas (puentes). Estas interacciones han sido observadas a nivel de microscopía de fuerza atómica. Los complejos de mantenimiento estructural (SMC) de los cromosomas son proteína homodiméricas presentes en todas las bacterias. Al igual que las proteínas tipo histonas, estos complejos forman duplas con el DNA; tienen la capacidad de hidrolizarse bajo la acción de ATP permitiendo la liberación de las interacciones. Su participación ha sido reportada durante la replicación y segregación del DNA bacteriano. La proteína tipo histona de *E. coli* (HU) es responsable del enroscamiento del DNA en las bacterias. Sus dominios de interacción no son coplanares como en la H-NS lo que resulta en la formación de surcos (Luijsterburg et al., 2006).

La perspectiva molecular de la arquitectura del DNA bacteriano no ha sido empatada con las observaciones ultraestructurales.

Perspectivas de estudio de la arquitectura celular

La metáfora de arquitectura celular tiene potencial de aplicación en diversos campos de la “Evolutionary Cell Biology”:

- El origen y evolución temprana de la célula eucarionte.
- El concepto de genoma mínimo y el origen de la vida.
- El origen de la multicelularidad y la evolución de la diversificación tisular.
- La biofísica de las células y los fenómenos de gigantismo celular.

La brecha entre arquitecturas celulares procariontes y eucariontes

Existen objetivos inmediatos para estudiar la “arquitectura celular” en el contexto del origen de la célula eucarionte. Entre estos versan: encontrar los homólogos de las vías moleculares en las filogenias y colocarlos en el contexto de los compartimentos celulares teóricamente como experimentalmente. Un artículo reciente de Gabaldón y Pittis es un ejemplo notable que calcula

“los largos de rama” para las familias de proteínas eucariotas a lo largo de la rama FECA-LECA, da evidencia llamativa de la secuencialidad potencial en las que los organelos surgieron (Gabaldon y Pitiis, 2016). La brecha entre filogenética y biología celular se hace más difusa a medida que la interdisciplina entre campos aumenta.

Estos programas investigación interdisciplinarios que bajo la metáfora de “arquitecturas celulares” pretenden una visión orgánica de los procesos biológicos dan vigencia al valor heurístico del concepto que aquí se ha analizado.

Mientras el estudio de la arquitectura celular eucarionte ha sido un tema de estudio constante, las células procariontes han recibido poca atención. Las preguntas de la “Evolutionary Cell Biology” y las perspectivas en evolución celular obligan a prestar atención a la diversidad de arquitecturas celulares de los procariontes, y en especial a aquella que por sus diferencias sustanciales puedan proveer explicaciones a la evolución de la forma en los procariontes.

El primer paso es revalorar la descripción microanatómicas de los microorganismos.

La siguiente parte de este trabajo se enfoca en dos estudios microanatómicas. Se trata de células que por sus dimensiones pertenecen a la categoría de células gigantes o gigantismo celular. Bajo la metáfora de arquitectura celular las observaciones microanatómicas que a continuación se presentan, pretenden contribuir a la constitución de una imagen cada vez más integral de la biología celular de estos microorganismos.

Capítulo 3

Arquitectura celular *Epulopisium fishelsoni*: compartimentalización en bacterias gigantes

Introducción

Gigantismo celular bacteriano

La idea de que la arquitectura celular de las bacterias es simple ha sido superado gracias a una serie de importantes descubrimientos en materia de diversidad microbiana en la últimas dos décadas (Gitai, 2005). El descubrimiento bacterias mayores a 250 micrómetros como *Thiomargarita namibiensis*, *Beggiattoa sp.* y *Epulopiscium fishelsoni* ha significado la aceptación de nuevas formas de organización subcelular en bacterias, nuevos mecanismos reproductivos; nuevos procesos metabólicos, nuevos procesos de adaptación; en conjunto un amplio programa de investigación acerca de la biología del gigantismo celular en las bacterias (Angert, 2006).

Se reconoce como bacteria gigante a aquellas especies cuyos individuos superan los 250 micrómetros lineales. El gigantismo bacteriano presupone ciertos desafíos explicativos. El tamaño de las células individuales esta dado en términos biofísicos por la ley de Fick, que establece el comportamiento exponencial de la relación entre superficie y volumen (Schulz y Jørgensen, 2001). En consecuencia el tiempo de difusión de partículas en el espacio celular está limitado a volúmenes pequeños. Las células eucariontes superan este problema gracias a la compartimentalización del citoplasma que proveen sus organelos (El-Hajj y Newman, 2015). En las bacterias son conocidos los casos de células gigantes desde hace más de un siglo. Las cianobacterias y las espiroquetas pueden medir hasta 100 micrómetros de largo. Su descripción data desde los trabajo de Leeuwenhoek con *Synedra* (Lane, 2015) y Eherenberg con *Spiriochaeta plicatus* (Blakemore y Canale-Parola, 1973). *Thiomargarita namibiensis* es una bacteria sulfurosa y esférica cuyo diámetro puede alcanzar un milímetro (Schulz, 2006). *Beggiattoa sp.* es una bacteria sulfurosa filamentosa que alcanza hasta los 120 μm de largo (Jannasch *et al.*, 1989). *Epulopiscium fishelsoni*

es una bacteria Gram positiva (bacilar) que llega a medir hasta 500 micrómetros (Schulz y Jørgensen, 2001). Estos conocidos ejemplos de gigantismo celular no contradicen los constreñimientos biofísicos de la ley de Fick, ya que en todos los casos el volumen citoplásmico es reducido por la presencia de vacuolas internas o la forma filamentososa; ambas permitiendo que la relación entre volumen y superficie se tenga (Viswanathan, 2012).

El gran tamaño de estas bacterias supone consecuencias en todos los niveles de organización de la célula. La pregunta vigente es: si se trata de una simple escala de los procesos y estructuras celulares o si existen diferencias esenciales en la biología de estos organismos respecto de los modelos bacterianos convencionales (Lane, 2011).

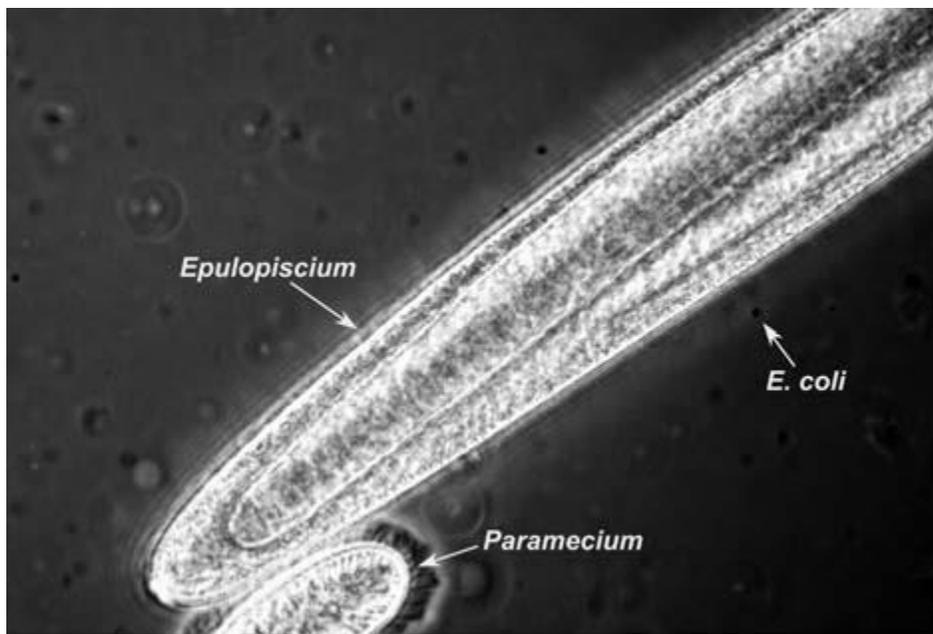


Fig. 14. Gigantismo celular bacteriano. *Epulopiscium fishelsoni* en comparación de *E. coli* y *Paramecium sp.*

Hiperpoliploidía

La hiperpoliploidía ha sido descrita como una constante del gigantismo bacteriano. Las células de *Thiomargarita*, y *E. fishelsoni* llegan a contar con cientos o miles de copias genómicas (Mendell *et al.*, 2008). Los aspectos de estabilidad genómica, regulación de la expresión génica, continúa ignorados respecto de esta condición. Los postulados acerca de la hiperpoliploidía como una adaptación a las condiciones de vida, amortiguamiento al daño genético y dinámicas poblacionales

son hasta el momento una especulación concomitante. Sin embargo los estudiosos de estos organismos concuerdan en que la hiperpoliploidía y el gigantismo pueden ser una adaptación a las condiciones de vida de estas especies (Soppa, 2015). Los habitats que habitan cuentan con condiciones extremadamente particulares. *Thiomargarita namibiensis* ocurre en sitios endémicos del desierto de Namibia donde las concentraciones de azufre son muy altas (Schultz, 2006). *Epulopiscium fishelsoni* es un simbiote estricto del intestino de los peces de la familia Acanthuridae (Bressler y Fishelson, 2003). El metabolismo de estas bacterias es desconocido a detalle pero se prevé que está ligado a la ecología donde habitan.

Arquitectura celular del gigantismo bacteriano

Alrededor del fenómeno del gigantismo celular en bacterias se ensamblan tres campos de estudios que tratan de responder las causas y orígenes del gigantismo. 1) La microanatomía de las bacterias gigantes y sus diferencias con las formas canónicas 2) la fisiología y el metabolismo y 3) la eco fisiología. Actualmente estos aspectos son abarcados desde una metodología “ómica”; es decir a través de técnicas que permitan ofrecer una imagen integral de los componentes funcionales a nivel molecular: genomas; proteomas, metabolomas e interactomas. De estas aproximaciones se pretende abarcar una imagen integral de la biología de estos organismos, pero también de su origen y relación con la diversidad bacteriana (De Keersmaecker *et al.*, 2006). Un cuarto enfoque integrado es el aspecto evolutivo; el origen y evolución del gigantismo celular, que se presenta como un carácter polifilético. Por sí mismo el gigantismo celular es una propiedad compleja que demanda la explicación de múltiples procesos en el contexto celular y ecológico. Es un objeto de estudio de la biología celular evolutiva y la ecología microbiana. El gigantismo celular es una arquitectura celular que ofrece un amplio campo de investigación.

Epulopiscium fishelsoni un modelo del gigantismo bacteriano

Epulopiscium fishelsoni es un ejemplo de gigantismo celular bacteriano. Esta especie tiene la particularidad de que a diferencia de ejemplos previos, carece de vacuolas aparentes que le

permitan contrarrestar la diferencia entre volumen y superficie. Las células de *E. fishelsoni* llegan a medir hasta 500 micrómetros y carecen de compartimentos aparentes (Angert, 2006).

Posición taxonómica y diversidad morfológica

Las propiedades cito químicas de estos organismo fueron abordadas por Angert y por Montgomery y Polak. La tinción de Gram resulta en un falso positivo ya que se trata de bacteria Gram positivas con bajo contenido de guanina y citosina, tal que la estrigencia de la tintura no penetra en toda la célula (Angert, 2006). Esta característica es propia del orden de los Firmicutes. En 1993 Angert realiza la hibridación in situ de sondas específicas y el alineamiento de las mismas, estableciendo que se trata de una bacteria. Dadas las características citológicas y su posición filogenética, se agrupa dentro del; phylum Firmicutes; clase Clostridia; orden Clostridiales; género *Epulopiscium* (Angert *et al.*, 1993). También es reconocida dentro del constructo taxonómico de las Gram positivas y las enterobacterias. Tras las confirmación de su identidad bacteriana se han identificado 10 diferentes morfotipos de *E. fishelsoni*, que corresponden que varía en tamaño, forma y ocurrencia en ciertas especies de peces. El morfotipo A agrupa a o individuos de mayor tamaño (70-600µm), forma elongada (tipo habano). El trabajo original de Angert describió dos clados A1 y A2 de estos morfotipos con un 91% de identidad. El morfotipo B posee una forma elongada (habano) y un tamaño de entre 200 y 300 µm. Los ejemplares del morfotipo E son bacterias de menores de 50 µm. EL morfotipo C comprende individuos de forma elipsoide cuyo largo va de los 40 a los 130 µm. El morfotipo E consta de bacterias extremadamente elongadas que asemejan filamentos hasta de 100 µm pero con un diámetro no mayor a 2 µm (Fishelson, 1999). Trabajos recientes de genómica apuntan a que los 10 morfotipos se agrupan filogenéticamente en cuatro construcciones genómicas; y que probablemente corresponda a unidades taxonómicas funcionales (OTU) (Miyake *et al.*, 2016).

Hábitat y distribución

E. fishelsoni habita solamente en el intestino de los peces cirujano. Es un simbiote estricto de diversos miembros de la familia Acanthuridae, que ocurren en los sistemas arrecifales alrededor

del mundo (Clements y Bullivant, 1991). Los peces cirujano son detritívoros de las algas que crecen sobre los esqueletos calcáreos de los corales. La distribución de la familia Acanthuridae es cosmopolita. Se han reportado y estudiado la coexistencia de peces y *E. fishelsoni* en la Gran Barrera de Arrecife; Hawái; el mar rojo; y el golfo de California. Algunas especies son endémicas. *A. sohal* es exclusiva del mar rojo y contiene la mayor ocurrencia de Morfotipo A. Se ha reportado la presencia de *E. fishelsoni* en *Acanthaurus sohal*, *Acanthaurus nigrofuscus* y *Naso elegans*. Los diversos morfotipos se distribuyen específicamente entre los peces cirujanos. El morfotipo A ocurre en *A. nigrofuscus*, *A. sohal*; mientras que el morfotipo B presenta poblaciones homogéneas en *Naso tongarus*. Los morfotipos C; D; E; ocurren con mayor frecuencia en todas las especies. Estudios recientes muestran que no existen relaciones filogeográficas discretas ya que los grupos filogenéticos comparten una divergencia menor al 10% entre poblaciones de la Gran barrera de arrecife y el mar rojo (Miyake *et al.*, 2016). Los estudios existentes no han tomado en cuenta un tratamiento especial de la hiperpoliploidía en el procesamiento de datos filogenómicos. No existe a la fecha un marco metodológico particular para la genética de poblaciones de *E. fishelsoni*.

Microanatomía ultraestructural

Las primeras observaciones ultraestructurales sugirieron que el organismo en cuestión era un protista. Se advirtió la presencia de estructuras celulares inéditas. Un largo citoplasma con estructuras fibrogranulares que difícilmente fueron identificadas como un Nucleoide (Angert, 2006). Los estudios de Angert demostraron que la cantidad de DNA por célula es mayor a la de cualquier bacteria. *E. fishelsoni* es hiperpoliploidía y contiene más de 1000 copias de su genoma por individuo (Angert, 2012). Montgomery y Polak realizaron un estudio donde usando la tinción de Giemsa describieron la distribución de DNA y RNA en las células, sus resultados sugieren que los ácidos nucleicos se distribuyen heterogéneamente (Bresler *et al.*, 1998). No existen antecedentes de un estudio similar a nivel ultraestructural.

E. fishelsoni posee invaginaciones y pequeños cuerpos semejantes a vacuolas que se distribuyen en la periferia interna de la membrana. Estas estructuras fueron descritas como besucas cubiertas por Robinow o como retículo endoplásmico por Clemens (Robinow y Angert, 1998). Consisten en una intrincada red de cisternas túbulos cuya probable función es la de la compartimentalización del

citoplasma como ocurre en los planctomicetes (Lindsay *et al.*, 2001). Hasta la fecha se desconoce su función exacta y si esta estructura se relaciona con propiedades metabólicas; de transporte interno, estructurales o de síntesis de membrana. *E. fishelsoni* posee una gran cantidad de flagelos que cubren la totalidad de la superficie externa de la pared celular. El movimiento de las células en su medio natural es rectilíneo sugiriendo que los flagelos se comportan de la misma forma que en otras bacterias (Angert, 2006).

Reproducción

E. fishelsoni, posee un forma particular de reproducción, A diferencia de la mayoría de las bacterias ha sustituido la fisión binaria por una forma de viviparidad. Las células desarrolla progenie en los extremos apicales de sus membranas (Angert, 2005). Las células hijas crecen a lo largo de 12 horas hasta que su tamaño provoca la lisis de la célula madre. Un 90% del contenido genético de la célula madre es liberado al medio, mientras que el 10% restante fue transmitido a la progenie (Angert y Clemens, 2004). Esther Angert ha estudiado a detalle los mecanismos no canónicos de reproducción de las bacterias. Los morfotipos A; B y C de *E. fishelsoni* presentan viviparidad mientras que los demás pueden ocurrir en fisión binaria (Ward *et al.*, 2009). La capacidad de esos mecanismos se relaciona con la presencia de mecanismos, variantes del de formación de anillo Z de división. En *E. fishelsoni*, proteínas homólogas de *spoII* interactúan con FtsZ en los términos apicales de la célula madre a fin de formar una invaginación membranal que da origen a un compartimento celular que se convierte en la célula hija (Miller *et al.*, 2011). Este mecanismo es homólogo de la formación de endosporas en bacterias del Phylum Firmicutes como *Metabacterium poliyspora*. Se ha propuesto que el mecanismo de reproducción de *E. fishelsoni* evolucionó dentro de los Firmicutes como una adaptación a la simbiosis estricta.

El ciclo de vida está íntimamente relacionado con la reproducción de *E. fishelsoni*. Se ha observado una métrica circadiana en las poblaciones del Mar Rojo. Las bacterias comienzan su crecimiento durante el día después de que el pez se ha alimentado de las algas que crecen en el coral. La progenie comienza su crecimiento después del mediodía hasta finalizar con la explosión de la célula madre poco antes del comienzo del día siguiente (Flint *et al.*, 2005).

Metabolismo

El metabolismo de *E. fishelsoni* es poco conocido pero forma parte de un gran programa de investigación para comprender la ecofisiología del microbioma. *E. fishelsoni* habita en condiciones de anaerobiosis en el intestino medio del pez cirujano. Se ha documentado la producción excesiva de hidrogeno molecular en esta zona del intestino, fenómeno que se atribuye a la presencia de *E. fishelsoni* (Bresler y Fishelson, 2006). Se ha especulado acerca de la relación de las vacuolas del retículo citoplásmico y rutas metabólicas hipotéticas que llevan a la producción de hidrógeno. Entre ellas la posibilidad de acetogénesis como vía fermentativa. Se ha propuesto concomitantemente que una vía de reducción de nitrato o nitrito pudiera sostener producción concomitante de hidrogeno a través de enzimas asimiladoras como la nitrato reductasa periférica. La capacidad de difusión del hidrógeno molecular es mucho mayor que la de ATP; lo que lo hace un candidato para explicar la sostenibilidad energética de una bacteria gigante como *E. fishelsoni* (Alnajjar M., com. Pers.). El interés actual en *E. fishelsoni* concurre en la explicación de su metabolismo en el contexto de su microanatomía; en la comprensión de los efectos de su arquitectura celular. Múltiples aplicaciones prácticas han llamado la atención a partir de la producción de hidrógeno, pero su realización es limitada debido a la imposibilidad de cultivar estos organismos. Esto no sería posible hasta no comprender a detalle su metabolismo y la relación eco fisiológico que desempeñan en el microbioma del pez cirujano.

Cuestionamientos

- ¿Se encuentra la expresión genética confinada a compartimentos en *E. fishelsoni*?
- ¿Existen compartimentos metabólicos en *E. fishelsoni*?

Objetivo

Observar la distribución de los transcritos de nitrato reductasa y piruvato oxidoreductasa en células de *E. fishelsoni*

Hipótesis

Los transcritos de nitrato reductasa y de piruvato oxidoreductasa están confinados a compartimentos celulares en E. fishelsoni

Métodos

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

FISH es una herramienta poderosa para demostrar la expresión de genes específicos a través de la localización de secuencias de DNA y RNA mensajero in situ. Las pruebas de DNA son complementaria a las secuencias diana. Ligadas a fluoróforos, las pruebas pueden localizar genes en estado de heterocromatina; secuencias de RNA como mRNA; snoRNA, microRNA y RNA ribosomal. FISH tiene múltiples aplicaciones. En la microbiología ambiental la hibridación con pruebas específicas de rRNA determina grupos taxonómicos en muestras ambientales. En biología celular, la expresión de los genes puede ser constatada. La posición y el movimiento de RNA's en el núcleo también es estudiada a través de técnicas de FISH (Bartlett, 2004). Las técnicas de hibridación se han adaptado a los avances de la microscopía. Pueden ser realizadas en microscopía de fluorescencia y confocal, así como en microscopía electrónica sustituyendo los fluoróforos por nano partículas de oro coloidal (Velázquez y Jiménez- García, 1997). Recientemente Golding y colaboradores desarrollaron un protocolo de FISH que permite la localización de moléculas individuales. Su aplicación a la microscopía de superresolución representa la frontera de estas técnicas (Skinner *et al.*, 2013).

Diseño de pruebas

Las pruebas de FISH tienen distintas propiedades dependiendo de su aplicación. Varían en longitud y contenido de G+C para cubrir requerimientos de especificidad, afinidad y permeabilidad.

Las pruebas mayores a 100 nucleótidos son muy específicas pero poco permeables, resultando en señales débiles. Las pruebas menores a 20 nucleótidos son poco específicas pueden resultar en falsos positivos por la afinidad inespecífica. La afinidad de las pruebas depende del contenido G+C ya que estas regiones poseen mayor capacidad de interacción (Bartlett, 2004).

En FISH de RNA ribosomal utiliza una estrategia distinta basada en la afinidad de estructuras secundarias del RNA (cuellos y asas) (Pernhalter *et al*, 2001).

Condiciones de fijación e hibridación

El procesamiento de las muestras varía dependiendo de la naturaleza de las mismas. Las células animales son fijadas normalmente en paraformaldehído al 2.5% o etanol. La preservación de la estructura celular es crítica en este aspecto. El paraformaldehído permite la preservación por “Crosslinking” pero reduce las posibilidades de interacción de los ácidos nucleicos con las pruebas; a su vez permite la permeabilización de la membrana (Palade, 1952).

En bacterias Gram negativas la fijación con paraformaldehído es necesaria debido a la poca permeabilidad de la pared. En bacterias Gram positivas la fijación en etanol es una alternativa confiable.

Hibridación fluorescente in situ de nitrato reductasa y piruvato óxido reductasa

Con el fin de conocer el lugar que ocupan las posibles rutas metabólicas de *E. fishelsoni*, se eligieron dos enzimas: nitrato reductasa (NAP) y piruvato-oxidoreductasa (POR). Estas enzimas fueron halladas en el proteoma de *E. fishelsoni* realizado por el Dr. Mohammed Alnajjar (sin publicar). A partir de las secuencias de estas enzimas se diseñaron conjuntos de oligonucleótidos de 20 nucleótidos de largo. Los conjuntos conformaron las pruebas correspondientes para ambas enzimas y fueron marcados con fluoróforos. Se utilizaron sobre células de *E. fishelsoni* provenientes de A. sohal de la costa sur del Mar Rojo, usando un protocolo para hibridación in situ de alta resolución. La especificidad de las pruebas se comprobó realizando controles negativos en celular de *Bacillus subtilis*.

Diseño de la prueba para piruvato oxidoreductasa

1. La secuencia de aminoácidos obtenida del proteoma fue analizada con “*Smart Genome*” para probar su concordancia con dominios proteicos y funciones putativas. La secuencia fue encontrada positiva para piruvato oxido-reductasa.
2. La secuencia de aminoácidos fue contrastada con el genoma de *E. fishelsoni* morfotipo B en Gen Bank usando el algoritmo blastp. Se obtuvo una secuencia nucleotídica correspondiente a la enzima.
3. La secuencia fue utilizada para diseñar pruebas de 20 bases de largo a través del programa “*Stellaris mRNA FISH probe designer*” con énfasis en el contenido de G y C.
4. 27 secuencias fueron elegidas de entre las que obtuvieron 40-45% de G + C.
5. El conjunto de 27 oligonucleótidos fue sintetizado y marcado con el fluorocromo ATTP 594. La compañía *Sigma Aldrich* fue la encargada de sintetizar esta prueba en concentración 100µM de cada oligonucleótido.

Diseño de la prueba para nitrato reductasa

La secuencia de aminoácidos del proteoma correspondiente a la nitrato reductasa fue analizada con el programa *Smart Genome*. Los dominios encontrados sugirieron que se podía tratar tanto de nitrato reductasa asimiladora como de la nitrato reductasa deasimiladora. La secuencia resulto muy pequeña para ser analizada con *blastp* y *blastx*. Se procedió a la siguiente estrategia.

1. Se buscó la especie más cercanamente emparentada a *E. fishelsoni* que cuenta con nitrato reductasa.
2. La secuencia del gen de nitrato reductasa (*napA*) de *Clostridium perfringens* (CPE_RS09240 *Clostridium perfringens* str 13., fue contrastada contra el genoma *E. fishelsoni* morfotipo B con el algoritmo *blastn*.
3. La secuencia *Epulopiscium* sp. 'N.t. morphotype B'] NCBI Reference Sequence: WP_010167362.1 fue hallada homóloga con un cociente de similitud de 90%.
4. Los dominios proteico de nitrato reductasa fueron confirmados con “*Smart Genome*”

5. La secuencia fue utilizada para diseñar pruebas de 20 bases de largo a través del programa “*Stellaris mRNA FISH probe designer*” con énfasis en el contenido de G y C.
6. 27 secuencias fueron elegidas de entre las que obtuvieron 40-45% de G + C.
7. El conjunto de 27 oligonucleótidos fue sintetizado y marcado con el fluorocromo ATTO 550. La compañía *Sigma Adrich* fue la encargada de sintetizar esta prueba, purificada por cromatografía líquida de alta resolución HPLC en concentración 100 μ M de cada oligonucleótido.

Protocolo de hibridación in situ según Golding et al., 2013

1. Los oligonucleótidos fueron resuspendidos a una concentración 100 μ M con agua destilada.
2. La solución madre de cada prueba se conformó de 10 μ L de cada oligonucleótido, resultado en una concentración 100 μ M del conjunto de pruebas. La solución madre se conservó a -4°C.
3. Se disecó el intestino del ejemplar de *A. sohal*. Se extrajo del intestino medio un volumen de 1mL de contenido intestinal de aspecto hialino.
4. Las muestras se centrifugaron a 600g por 3min. Se retiró el sobrenadante y se observó la fase hialina bajo el estereoscopio para confirmar la presencia de células.
5. El botón fue resuspendido en 300 μ L de agua destilada con 700 μ L de etanol al 100%. Se homogenizó en un oscilador durante una hora.
6. Se preparó solución de lavado consistente en formamida al 40% en buffer de citrato (m/vol). La solución de lavado se almacena a 4 °C y se mantiene en hielo durante el protocolo.
7. La muestra se centrifugó a 600 g por 7min. A temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante.
8. El botón fue resuspendido en 1mL de solución de lavado al 40%. Se agitó gentilmente durante 5min usando un oscilador.
9. Se prepararon alícuotas de solución hibridizante de formamida al 40% (m/V; formamida/2xSSC). Esta solución se mantiene en el hielo durante el protocolo.
10. En un tubo Eppendorf de 1.5mL se agregaron para cada muestra 50 μ L de solución hibridizante. A esta solución se agregó 0.5 μ L de la prueba fluorescente en cuestión.

11. 50 μ L de la mezcla de solución hibridizante y prueba fueron agregadas al botón de la muestra. Se resuspendió pipeteando cuidadosamente y evitando la formación de burbujas.
12. Las muestras fueron incubadas por 14h a 30°C. Esta mezcla puede almacenarse posteriormente a 4°C y resumirse el protocolo desde este punto.
13. Se transfirieron 10 μ L de muestra hibridada a un nuevo tubo. Se adicionaron 200 μ L de solución de lavado al 40%
14. Se centrifugó a 600g por 3.5min. a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante.
15. Se agregaron 200 μ L de solución de lavado y se incubó a 30°C por 30 min.
16. Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 600g por 3.5 min. El sobrenadante se desechó.
17. Se volvió a centrifugar a 600f por 3.5min. Se desechó el sobrenadante
18. Se resuspendieron las celular en 10 μ L de 2x SCC.
19. El mismo procedimiento se realizó para todas las muestras.
20. Se toaron 2 μ L de cada muestra para la observación al microscopio por preparación.

Observación

Se realizó la observación en un microscopio confocal ZEISS LSM 800 del Laboratorio de Nanobiología de la *King Abdullah University of Science and Technology*, Reino de Arabia Saudita. Se realizaron observaciones contrastando la estructura en contraste de fases y microscopia confocal de fluorescencia

Resultados

Todos los morfotipos de *E. fishelsoni* fueron encontrados en la muestras obtenidas de *A. sohal* del Mar Rojo. Las células midieron hasta 400 micrometros. El morfotipo B fue el más abuntante.

La hibridación para piruvato oxidoreductasa fue positiva. Los transcritos de POR se distribuyen en todo el citoplasma. A observación en distintos planos muestra que la señal es muy débil sobre la membrana plasmática; en cambio se obtiene una señal fuerte el el plano medio-longitudinal. En algunos casos se logran observas puntos de señal mas intensa en el citoplasma Durante la observación se advirtió que la pared celular también mostraba una señal positiva debido al contraste. La señal fue observada en todos los morfotipos.

La hibridación de *napA* fue positiva. Se observó la señal fluorescente en la periferia de las células de diferentes morfotipos de *E. fishelsoni*. Los transcritos de nitrato reductasa se distribuyen discretamente en la periferia interna de la membrana celular y cerca de la membrana de la progenie en algunas células. La comparación entre el plano transversal de la célula y el plano tangencial muestra la diferencia en la señal fluorescente; los transcritos se distribuyen claramente en la periferia. Se observó una señal más intensa que en el caso de la piruvato oxidoreductasa, sugiriendo que la concentración de los transcritos es mayor debido a su distribución periférica. La interpretación de una señal positiva fue confirmada con base en el control negativo que descartó la posibilidad de auto fluorescencia; por otro lado la posibilidad de afinidad inespecífica fue descartada mediante la observación de señal negativa en células de *Bacillus subtilis*.

La hibridación simultánea de ambas enzimas también fue positiva (Fig.22). Se observa en un morfotipo B la distribución diferencial de ambas señales al mismo tiempo. La señal de piruvato oxidoreductasa se distribuye uniformemente mientras que la de nitrato reductasa se conserva solo en la periferia.

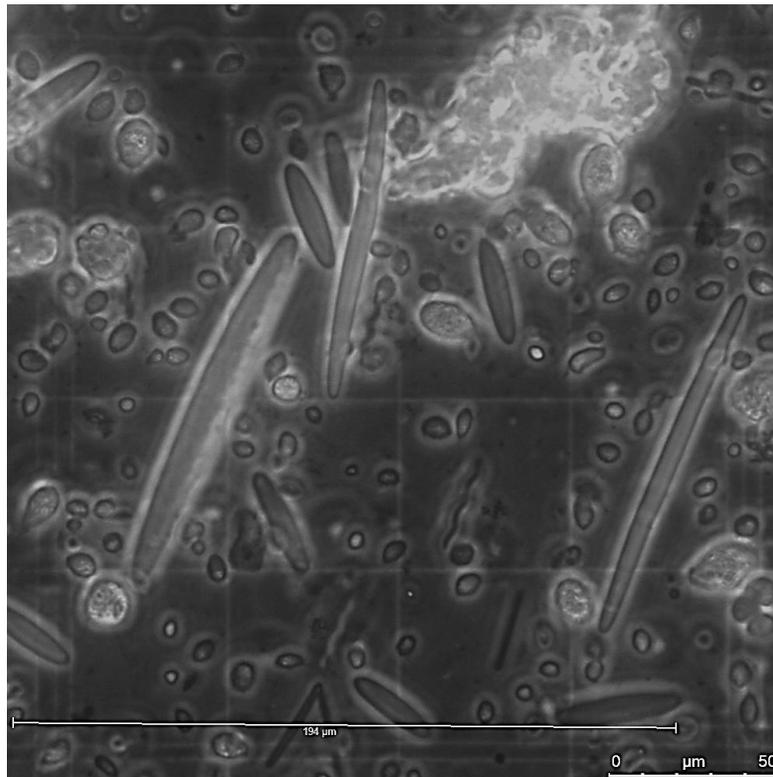


Fig. 15. Microscopía de la microbiota de *A sohal* con *E. fishelsoni*. Se observan los morfotipos A; B C y E.

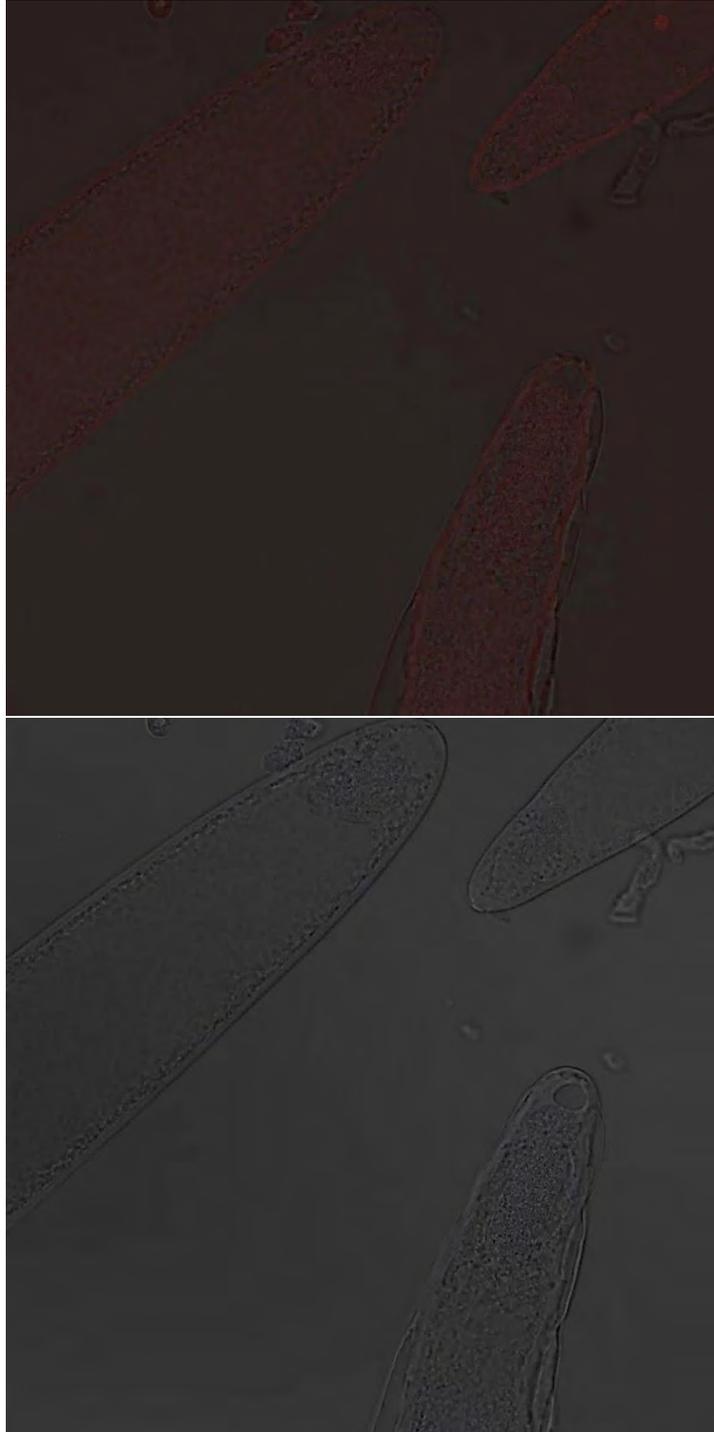


Fig. 16. Hibridación *in situ* de piruvato oxidoreductasa en *E. fishelsoni*: controles. La imagen superior muestra que la señal fluorescente se distribuye en el citoplasma; imagen en contraste de fasas y fluorescencia. Imagen inferior. Células no hibridizadas.

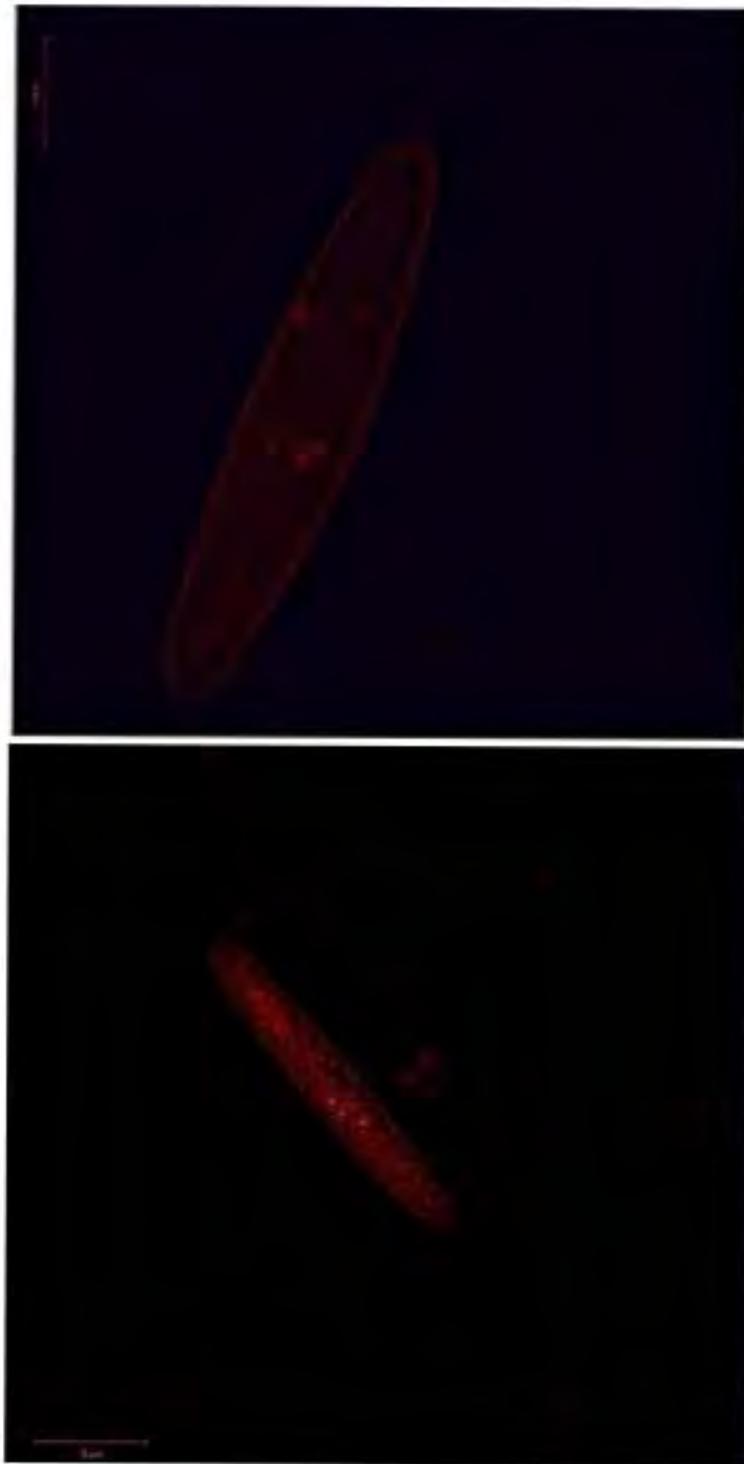


Fig. 17. Hibridación *in situ* de piruvato oxidoreductasa en *E. fishelsoni*. Comparación de planos confocales. En la imagen superior se observa el plano tangencial, la señal es débil sobre la membrada plasmática. En la imagen inferior de onserva el plano longitudinal; la señal de distribuye en el citoplasma.

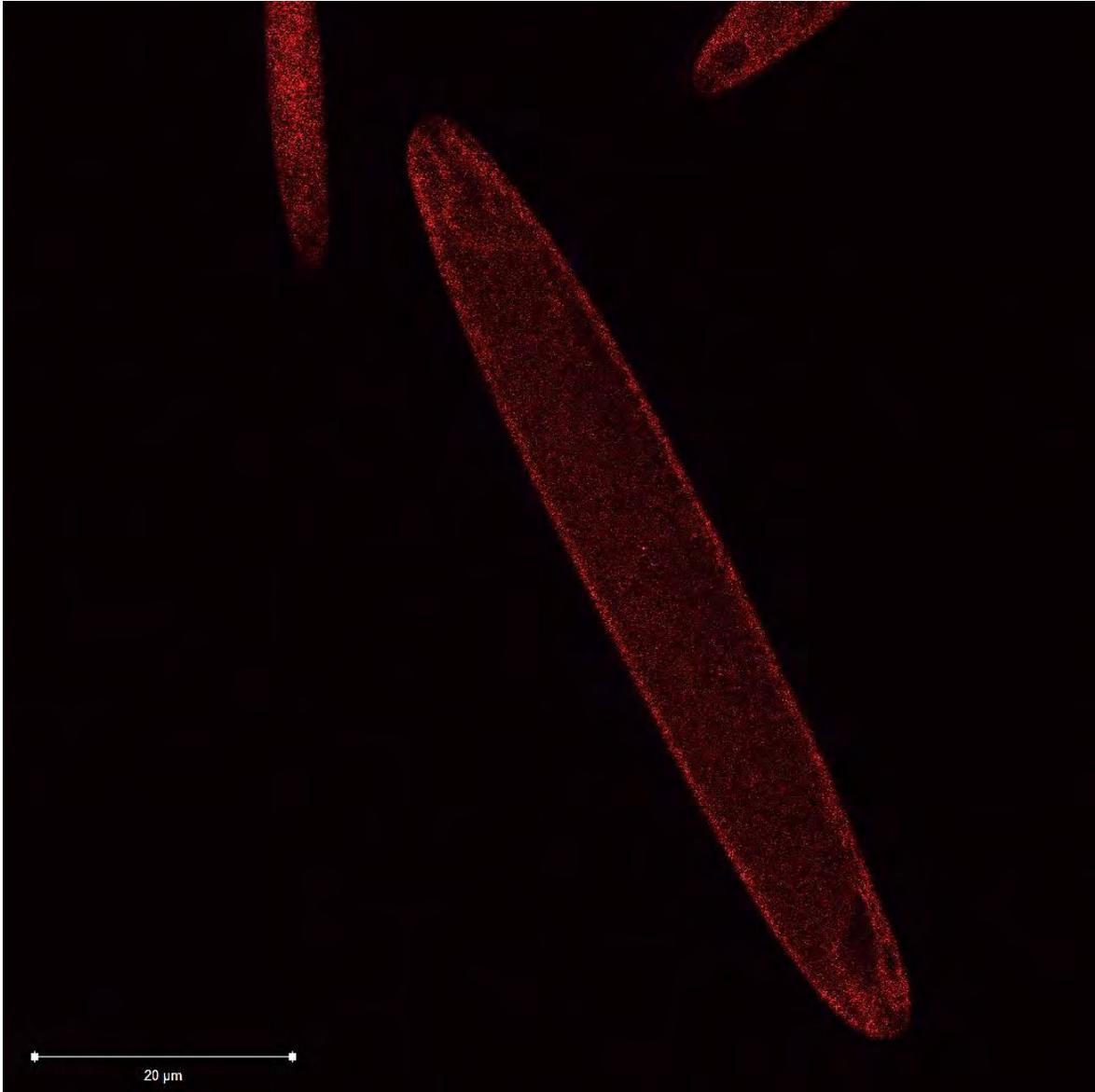


Fig. 18. Hibridación *in situ* de piruvato oxidoreductasa en *E. fishelsoni*, morfotipo A y B (marco superior). Los transcritos de la enzima se distribuyen en el citoplasma; algunas señales más fuertes al centro sugieren la presencia de centros de transcripción.

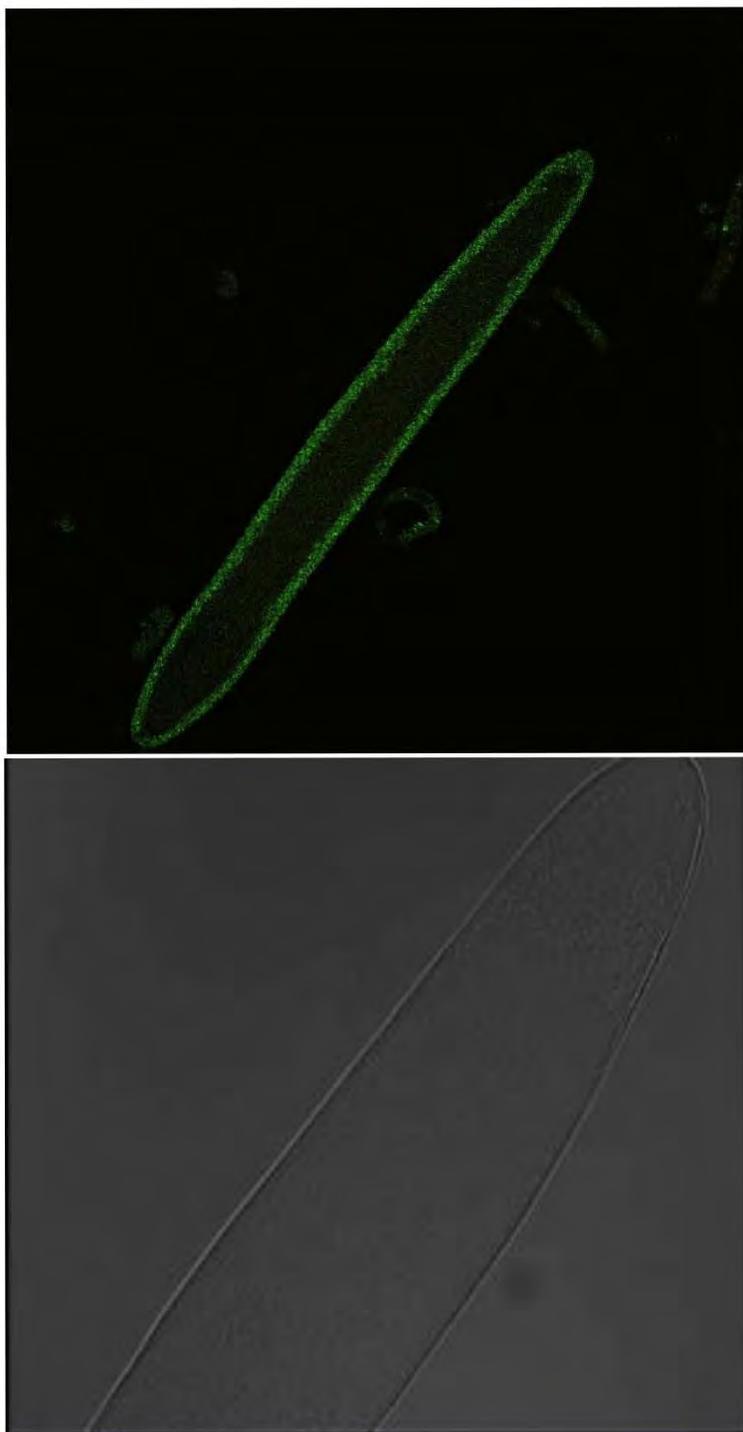


Fig. 19. Hibridación *in situ* de *napA* en *E. fishelsoni*: control del experimento. La imagen superior muestra una célula hibridizada. La señal en verde muestra la posición de las las secuencias de mRNA en la célula. En la imagen inferior se aprecia una célula de *E. fishelsoni* no hibridizada en conraste de fases; no se detectó autofluorescencia.

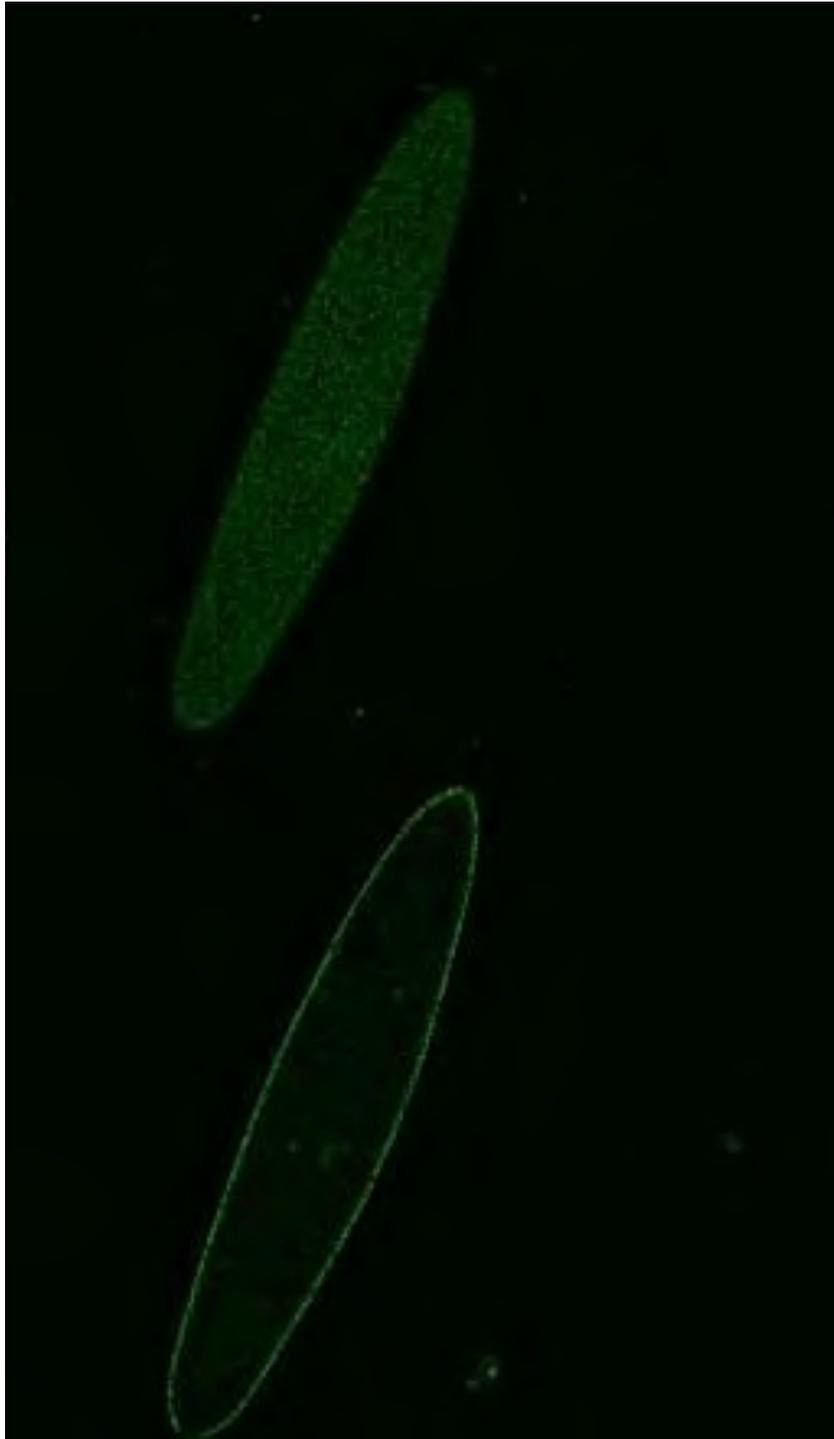


Fig. 20. Hibridación *in situ* de *napA* en *E. fishelsoni*: comparación de planos confocales. La imagen superior muestra el plano tangencial: la señal se distribuye sobre la membrana plasmática. La imagen inferior muestra el plano de longitudinal: la señal se distribuye en al periferia de la célula.

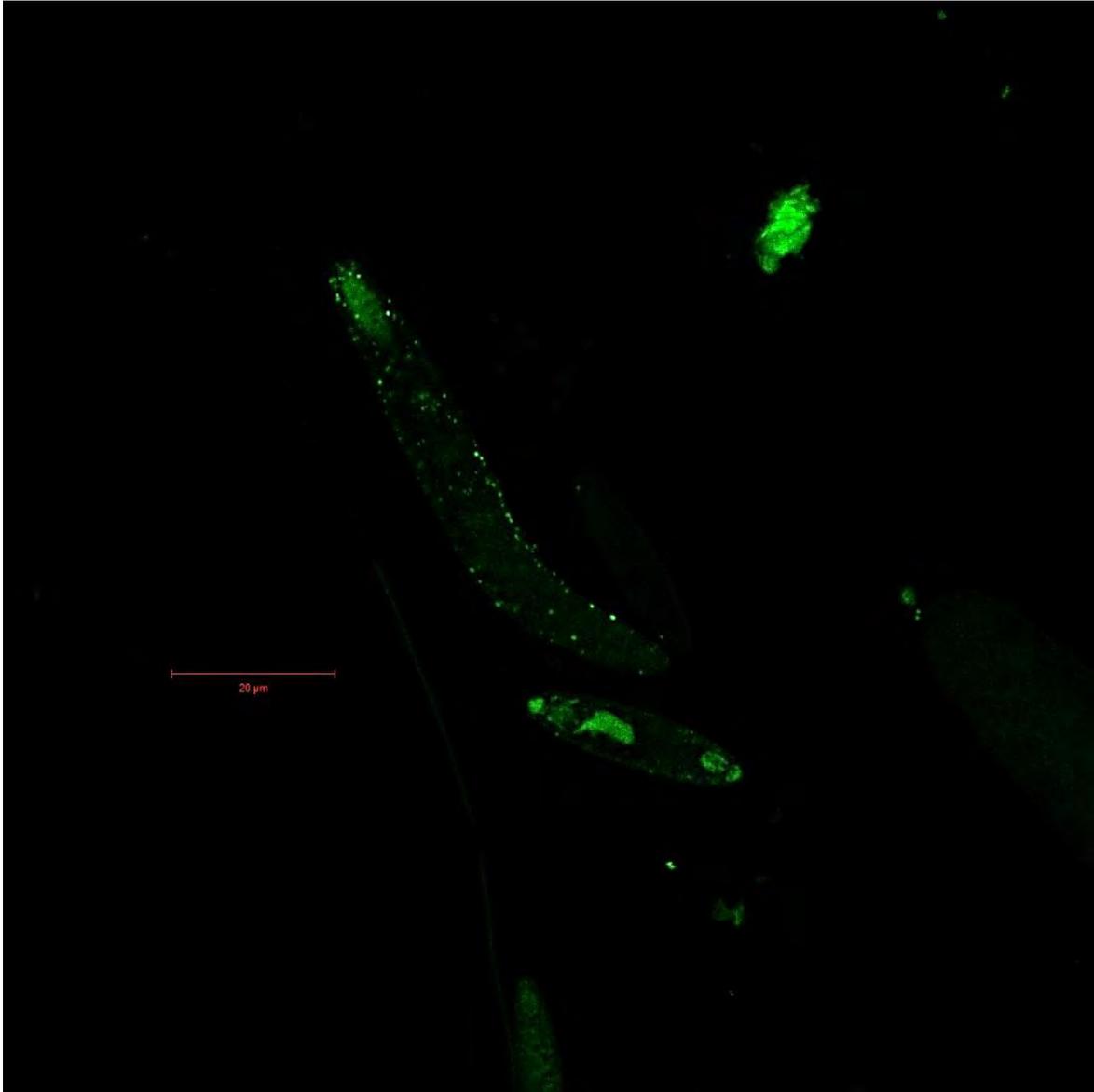


Fig. 21. Hibridación *in situ* de *napA* en *E. fishelsoni*. Se observan tres células: Morfotipo A (parte superior); morfotipo C (Parte inferior 2 células). En el morfotipo A se observan los sitios de mayor transcripción.

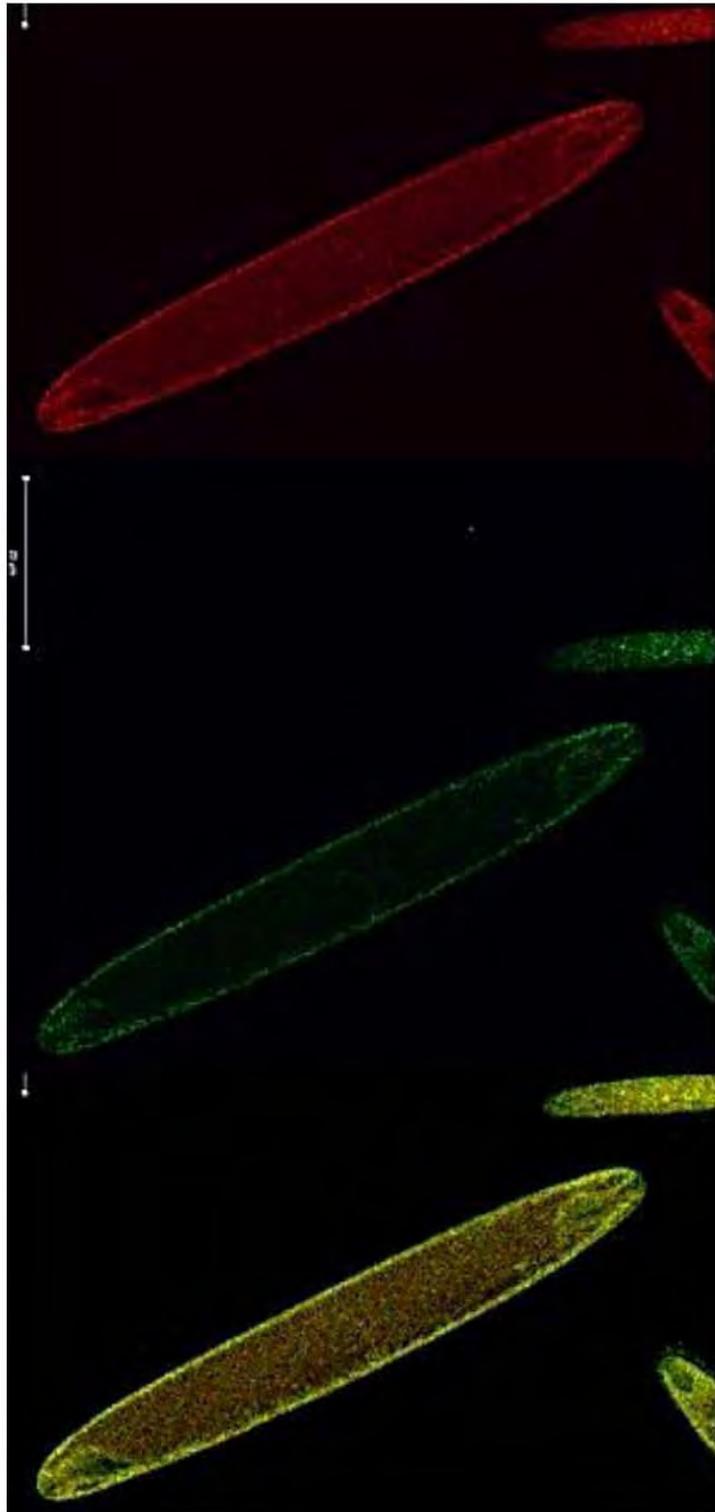


Fig. 22. Colocalización de napA y POR. Imagen superior corresponde a POR; imagen media corresponde a napA; imagen inferior corresponde a la colocalización de ambas.

Discusión

La interpretación de una señal positiva fue confirmada con base en el control negativo que descartó la posibilidad de auto fluorescencia; por otro lado la posibilidad de afinidad inespecífica fue descartada por mediante la señal negativa en células de *Bacillus subtilis*. La señal positiva fue observada como mayor intensidad en los morfotipos A, B y C. La presencia de piruvato oxidoreductasa en el citoplasma sugiere que la respiración celular acontece en todo el citoplasma. Debe de considerarse que la señal corresponde a los transcritos. En procariontes la transcripción y la traducción son evento consecuentes; a diferencia de los eucariontes donde la maduración del RNA mensajero y su almacenamiento en el núcleo permite una pausa temporal en el proceso de expresión genética. En las bacterias este proceso es simultáneo, por lo que los genes son transcritos muy cerca del sitio donde sus productos serán activos. Con base en esto es probable pensar que la actividad de la piruvato oxidoreductasa es común así como su transcripción es común en todo el citoplasma de *E. fishelsoni*.

La comparación de ambas señales confirma la hipótesis. La nitrato reductasa está presente en las células de *E. fishelsoni* y tienen una distribución compartimentalizada. Ha de considerarse que *napA* es un enzima periplásmica que posee un dominio de unión a proteínas de membrana. La relación con el resultado es notable y sugiere que la transcripción de *napA* sucede en la formación del retículo citoplásmico ya que es probable que la enzima se encuentre activa mientras esta unida a otra proteína de membrana. La conclusión es sugerente en el sentido de las funciones putativas del retículo endoplásmico. Si la nitrato reductasa se encuentra activa con la distribución que se observa de sus transcritos, entonces el retículo endoplásmico de *E. fishelsoni* podría ser una superficie metabólica.

La actividad de la piruvato oxidoreductasa es citoplásmica, pero sugiere que la totalidad de las células se encuentra activa es decir que en todo el citoplasma se encuentran transcritos de POR. Ha de notarse que a diferencia de la nitrato reductasa donde algunas imágenes permiten ver centros de actividad transcripcional con una señal más potente, la distribución de piruvato oxidoreductasa POR es homogénea. Una sugerencia es que POR mantiene un nivel constitutivo de expresión mientras que la expresión de NAP puede responder a un mecanismo de regulación más fino que

permite que se exprese diferencialmente en ciertas zonas de la membrana. Una observación interesante es que existe una señal evidente de NAP en las células hijas. La actividad metabólica en estos primordios, probablemente es mayor ya que se encuentran en un proceso de crecimiento constante.

Perspectivas

La arquitectura celular de *E. fishelsoni* sigue siendo un enigma pero la pregunta acerca de una compartimentalización de la expresión génica en esta bacteria se ha decantado por mostrar, algunos procesos genéticos y metabólicos si esta confinados. La probable relación entre las estructuras y las funciones abre el camino a nuevos estudios.

La observación a nivel ultraestructural con técnicas de contraste preferencial permitirá discernir la distribución de DNA y ribonucleoproteínas al interior; comprender mejor la naturaleza del nucleoide o los nucleoides. Técnicas específicas de inmunolocalización de enzimas selectas podría advertir rasgos importantes acerca del retículo citoplásmico como superficie bioenergéticas. La localización de ATP sintasas sobre la superficie del retículo podría sugerir la existencia de un mecanismo termodinámico similar al de las crestas mitocondriales que permita mantener la forma del retículo. La arquitectura de *E fishelsoni* sigue siendo una metáfora de entendimiento orgánico del gigantismo celular, a la cual se van sumando poco a poco más explicaciones.

Capítulo 4

Arquitectura celular de *Chaos chaos*: gigantismo celular en eucariontes

Introducción

Chaos chaos: posición taxonómica y diversidad

Chaos del latín sin forma fue para Linneo un género donde se agruparon a la mayoría de los organismos microscópicos y en especial a las amibas mayores a un milímetro (Osorio, 2007). Durante el siglo XIX trabajos de Ehrenberg previeron una visión más amplia de la diversidad de organismos infusorios, sus características diagnósticas y su comportamiento. Entre ellos destacaron las llamadas amibas gigantes; organismos unicelulares que pueden alcanzar 5 milímetros de largo y que habían sido descritas desde el siglo XVIII (Chruchill, 1989). Chaos se convirtió en una polémica taxonómica así como las especies que fueron connotadas bajo su nombre. Las amibas gigantes heterótrofas del hemisferio Norte, como la que en este trabajo se presenta, pertenecen a este contrato taxonómico. Una breve reseña histórica de la definición del género Chaos y la especie *Chaos chaos* es provista por Rice (1945).

En 1755 Roesel von Rosenhof nombró a las amiba gigantes como “der kleine Proteus”. Dos años más tarde Linneo les confirió el apelativo de *Volvox chaos* para diferenciarlos del género Chaos donde son encontraba agrupados microorganismos *Incerta sedis*. En 1767 Linneo cambia su nombre a *Chaos chaos* para diferenciarlo del género de algas. La discrepancia alrededor de los nombres muestra el primitivo desarrollo de la protozoología comparada en la clasificación de Linneo (Lane, 2015). En 1979 Joseph Leidy propone la reestructuración del género Chaos para que solo incluya a las grandes amibas de vida libre; menciona como carácter diagnóstico de la especie *Chaos chaos*, la presencia de un solo núcleo. Hacia 1900 Wilson, basado en los trabajos de Ehrenberg describe a la amiba gigante del Norte de Carolina como *Pelomyxa caroliniensis*. Wilson destaca los caracteres citológicos tales como cristales, múltiples núcleos, la presencia de un uroide apical con cilios aberrantes. La especie de Wilson concuerda con observaciones realizadas en todo el

hemisferio norte (Pennard 1902; Edwards, 1917; Schaeffer, 1937). En 1937 Schaeffer argumenta que las amibas que alcanzan hasta 5mm corresponden con las observaciones de Rosenhof y que por lo tanto el criterio de autoridad del género Chaos de Linneo corresponde a estos organismos hallados en todo el Septentrión; los nombra bajo la especie *Chaos chaos* (Linneo) (Rice, 1945).

La controversia se genera alrededor de los caracteres citológicos. La mayoría de las amibas solo alcanzan los 3mm de largo. El color del citoplasma, la presencia de cristales y el movimiento se vuelven caracteres diagnósticos. Stiles y Leidy argumentaron que la mayoría de las observaciones corresponden a *Amoeba proteus* cuyo tamaño es menor (Leidy, 1878). Johnson en 1931 propone que las amibas gigantes pertenecen al grupo de los mixomicetos. Hacia la segunda mitad del siglo XX las características ultraestructurales previeron más caracteres (Rice, 1945). Daniels propone la especie *Pelomyxa palustris*, un amiba de vida libre que corresponde a las observaciones citológicas de Leidy; a nivel ultraestructural denota que los organismos carecen de mitocondrias y retículo endoplásmico; poseen en su lugar bacterias endosimbiontes (Daniels *et al.*, 1966). La separación entre los géneros Chaos, *Pelomyxa* y *Amoeba* ocasionó controversia. Las clasificaciones protozoológicas de Kudo y Grell consideran a todo estos organismos dentro del phylum Rhizopoda (Kudo, 1931). Page propone en 1981 que las amibas desnudas se clasifican en dos clases Lobosea y Heterolobosea que se diferencia en la cantidad y morfología de sus pseudópodos y lobópodos. Page en 1985 confirma con un estudio de secuencias ribosómicas y datos morfológicos que el constructo de amibas desnudas es polifilético (Page y Balnton, 1985). Cavalier Smith argumenta que el género *Pelomyxa* pertenece a la clase Archeamoeba y se encuentra en la base de la filogenia, mientras que los géneros restantes diversificaron posteriormente (Cavalier Smith, 1991). Posteriormente se describió que la ausencia de mitocondrias en *Pelomyxa palustris* es producto de una pérdida secundaria, asumiendo que las especies mencionadas se encuentran en un clado no resuelto llamado Gymnoamoeba (Edgcomb *et al.*, 2002). Estudios recientes de filogenia molecular y caracteres moleculares ha descrito la existencia de cuatro especies probables de *Pelomyxa* (Ptáčková *et al.*, 2013). En congruencia con la clasificación propuesta en 2013 por Adl, *Chaos chaos*, y *A. proteus* se encuentran dentro de la clase Tubulinea en el phylum Amebozoa. La clase Archeamoeba es parte del phylum Amebozoa y hermana de Tubulinea. Algunas especies del antiguo Gymnoamoeba como *Naegleria sp.* fueron posicionadas en la clase Rhizaria del Superphylum SAR (Adl *et al.*, 2012). La posición de *Chaos chaos* como especie hermana del

género *Amoeba* fue confirmada (Bolivar *et al.*, 2001). Los estudios filogenéticos han llegado a la conclusión de que el gigantismo celular en amibas es un carácter polifilético dentro del clado.

Aunque a lo largo del siglo XX numerosos estudios fisiológicos se han llevado a cabo con *Chaos chaos* y *Chaos caroliniensis*, existe una ambigüedad en saber si estos estudios evaluaron a organismos del género *Amoeba*, *Pelomyxa* o *Chaos* (Fritz, 1966; Andersen 1955). Desde 1970 se cuenta con cultivos monogénicos de *Chaos chaos*, lo que ha permitido emprender estudios específicos, sin embargo a partir de la segunda mitad del siglo XX el uso de *Chaos chaos* como modelo de estudio ha mermado.

Chaos chaos son amibas politácticas multinucleadas de aspecto hialino que pueden alcanzar hasta 5 mm de largo. Forman pseudópodos múltiples y su desplazamiento es errático. Su principal distinción de *A. proteus* es el tamaño (Godokov, 1999). Rice provee una imagen ilustrativa en su trabajo de 1945. En la imagen se muestra la comparación de *A. proteus* con *Chaos caroliniensis*, ahora *Chaos chaos* (Fig. 23).

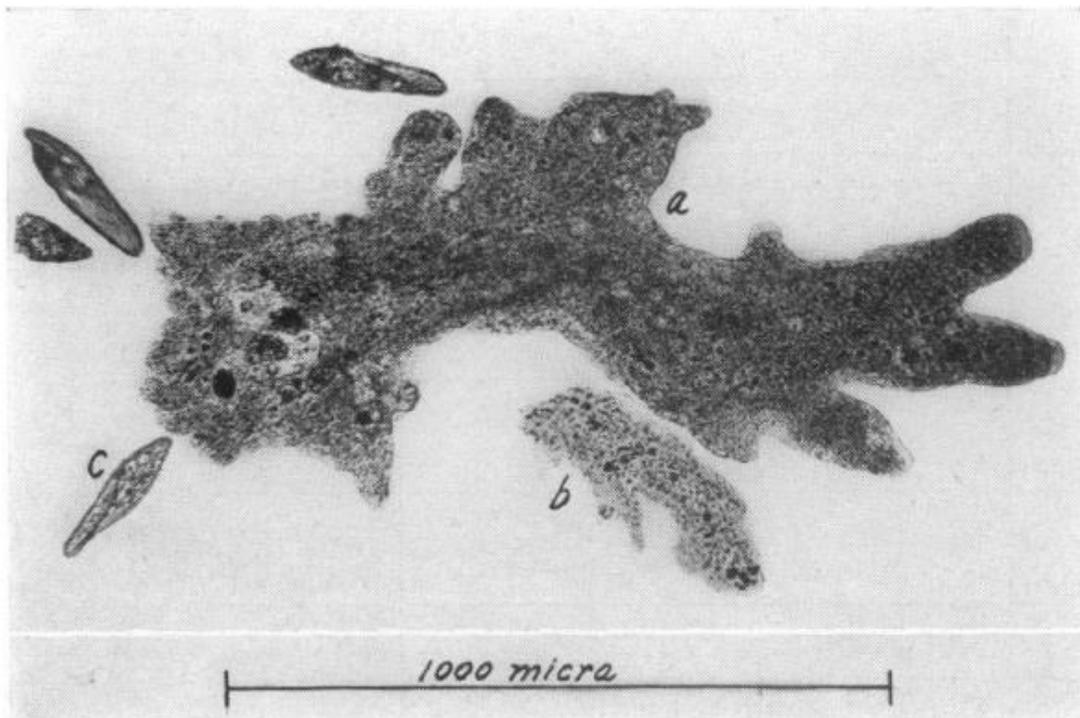


Fig. 23. Escalas de tamaño: Se observa a) *Chaos chaos*; b) *Amoeba proteus*; y c) *Paramecium* sp.

Ultraestructura

A nivel ultraestructural se ha reportado la presencia de cristales cúbicos, múltiples núcleos, lisosomas, retículo endoplásmico y mitocondrias (Chapman-Andresen, 1971).

Membrana mitocondrial

La ultraestructura de la membrana mitocondrial ha sido estudiada a detalle por Deng y brinda un antecedente importante en el contexto de la arquitectura celular de estos organismos.

La membrana mitocondrial en *Chaos chaos* presenta un arreglo geométrico como el que ha sido reportado en otras membranas de organelos. En este caso se trata de un arreglo cúbico presente en las superficie interna de las crestas mitocondriales. Los autores propusieron la posible relación de este orden con la actividad de las ATP sintasas (Deng *et al.*, 1999). Aunque los estudios en *Chaos chaos* no fueron continuados. En 2012 se reportó que la forma de las membrana corresponden al efecto entrópico de la distribución de ATP sintasas mitocondriales de humano, (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). La relación entre los arreglos cúbicos y estas observaciones no ha sido estudiada a la fecha.

Membrana celular

La membrana celular ha sido descrita brevemente. Godokov y colaboradores describen que *Chaos ilinoiliensis* (syn. *Pelomyxa palustris*) posee dictiosomas discretos y una membrana celular rica en matriz extracelular (Godokov, 1999). Los estudio relativos a *Chaos chaos* por Christiansen y Marshall, revelan que durante la fagocitosis la membrana celular forma estructuras parecidas a copas, cuya función es desconocida pero que no ha sido reportadas en otras amibas. Los procesos de endocitosis han sido abordados por varios autores concluyendo que ésta ocurre de la misma forma que en organismos modelos convencionales. (Christiansen y Marshall, 1965) La estructura fina de la membrana celular de *Chaos chaos* ha sido poco estudiada así como las características de la matriz extracelular.

Núcleo celular

Los ejemplares de *Chaos chaos* son multinucleados. Presentan según Rice hasta 400 núcleos (1000 según Schaeffer aunque la descripción podría corresponder a *P. palustris*). El estudio de la ultraestructura nuclear ha sido somero. Se conoce que los núcleos de *Chaos chaos* tienen forma irregular y poseen micro nucléolos putativos (Godokov, 1999). Sin embargo se desconoce la naturaleza de la distribución de DNA y RNA, así como la confirmación de que las estructuras observadas sean nucléolos u otros cuerpos ribonucleoprotéicos. El presente trabajo es pionero en el estudio de la arquitectura nuclear de *Chaos chaos* con técnicas preferenciales y específicas.

Cuestionamientos

- ¿Cómo es la arquitectura celular de *Chaos chaos*?
- ¿Cómo es la arquitectura nuclear de *Chaos chaos*?
- ¿Qué estructuras nucleares corresponden a nucléolos en *Chaos chaos*?

Objetivos

- Observar la ultraestructura de *Chaos chaos*
- Implementar técnicas de contraste preferencial para ácidos nucleicos en *Chaos chaos*
- Implementar técnicas específicas para la identificación del nucléolo en *Chaos chaos*

Hipótesis

Las células de Chaos chaos cuentan con compartimentos celulares tanto membranosos como no membranosos que les confieren una arquitectura celular única.

Métodos

Procesamiento de células para microscopía electrónica de transmisión

Durante el verano de 2014 fueron obtenidos cultivos poligénicos de *Chaos chaos* y *Paramecium* (ATCC). Se prepararon bloques en resina epóxica y en resina hidrofílica para morfometría ultraestructural e inmunocitoquímica, respectivamente. Las amibas, visibles bajo el microscopio estereoscópico, fueron colectadas manualmente con una pipeta Pasteur y depositadas en tubos Eppendorf con Glutaraldehído al 4% y paraformaldehído al 2.5%.

Para los bloques en resina epóxica los ejemplares fueron fijados por dos horas. Se efectuaron lavados en PBS en intervalos de una hora durante la fijación y tres lavados finales en intervalos de 10 minutos. Algunas muestras fueron post-fijadas en teraóxido de osmio e inmediatamente se procedió a la deshidratación con series de etanol en el siguiente orden y en intervalos de 10 minutos: 30%; 50%; 70%; 80%; 90%; 95%; 3x 100%. En algunas se omitió la post-fijación ósmica ya que fueron usadas para la reacción preferencial de RNP's con EDTA. La deshidratación concluyó con tres lavados de óxido de propileno al 100% en intervalos de 5 minutos. La preinclusión para resina epóxica se llevó a cabo en una mezcla de óxido de propileno y Epon 611 (1:1 v/v) durante 16 horas. Finalmente se incluyó en resina pura y se polimerizó a 60 C.

Para los bloques en resina hidrofílica (Lowycril) la fijación y la deshidratación transcurrieron de forma homóloga, omitiendo la postfijación ósmica. La preinclusión se llevó a cabo en dos mezclas de Lowycril y etanol (1:1 y 2:1 v/v) respectivamente en intervalos de una hora. La inclusión final en Lowycril puro transcurrió durante toda la noche y al día siguiente se polimerizó el bloque en una cámara de luz ultravioleta.

Técnica de impregnación argéntica para organizador nucleolar AgNor

Las células fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% por una hora. Posteriormente se volvieron a fijar en solución de Carnoy, compuesta de ácido acético glacial y etanol al 75% (1:3 v/v). Se rehidrataron en una serie de etanol al 70%, etanol al 50% y agua bidestilada en intervalos de 10 minutos. En baño maría se agregaron gotas de la solución de nitrato de plata, compuesta de un

gramo de nitrato de plata disuelto en 2 mL de agua bidestilada. Posteriormente se lavó 5 veces con agua helada. La reacción se lleva a cabo cuando al agregar 4 gotas de la solución $\text{NH}_4\text{-As}$, compuesta de 4g AgNO_3 ; 5mL de agua bidestilada; 5mL de NH_4OH concentrado. El pH debe marcar entre 12 y 13. Al mismo tiempo se agregan 4 gotas de catalizador. El catalizador es una solución de formaldehído al 3% que ha sido neutralizado a un pH neutro con cristales de acetato de sodio. Después de que la reacción alcanzó una coloración amarillenta, se lavó 5 veces en agua helada. Posteriormente se procedió a una deshidratación e inclusión igual a la de los bloques en resina epóxica.

Corte y montaje de muestras para microscopía electrónica.

Los bloques fueron retallados y cortados en un ultramicrotomo *Leica*. Se obtuvieron cortes de 50-70 nm de todos los bloques. Los cortes para análisis ultraestructural y para AgNor se dispusieron en rejillas de cobre sin entramado. Los bloques para inmunocitoquímica se dispusieron en rejillas de aluminio de con entramado cerrado. Los cortes para la prueba de Amina de Osmio para DNP's se dispusieron en rejillas de oro de entramado cerrado sin membrana de fomvar.

Contraste general

Los cortes en resina epóxica con post-fi en tetraóxido de osmio son especialmente propicios para la observación de la morfología ultraestructural de la célula mediante el contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. El procedimiento se efectuó en una cámara húmeda reposando la rejilla con los cortes en acetato de uranilo durante 20 minutos, que finalizó con un lavado en agua destilada y posteriormente 10 minutos de contraste en citrato de plomo. En cortes de resina acrílica, los tiempos de contraste se redujeron a la mitad con resultados virtualmente iguales.

Reacción preferencial y regresiva con EDTA para ribonucleoproteínas según Bernhard.

Para contrastar preferencialmente los cuerpos ribonucleoprotéicos se efectuó la técnica propuesta por Bernhard que cuenta con una amplia aceptación aún en la era de la inmunocitoquímica. Las rejillas con cortes en resina epóxica sin post-fijación en OsO₄ fueron contrastados por 10 minutos en acetato de uranilo, posteriormente fueron tratados con EDTA (pH=7.5) durante 40 minutos y finalmente contrastados con citrato de plomo por 10 minutos. Cuidadosamente se realizaron los lavados correspondientes con agua destilada entre cada contraste. Los tiempos de contraste fueron estandarizados de forma empírica siendo los susodichos los mejores para este tipo de células.

Contraste preferencias para DNA con amina de osmio

Esta técnica preferencial es complementaria a la de EDTA. Los cortes de resina “Lowycryl” montados en rejillas de oro -sin membrana de fomvar- fueron hidrolizados durante 25 minutos en ácido clorhídrico con concentración 5N y al término fueron lavados con agua destilada. En una cámara húmeda se dejó flotar las rejillas en solución de sulfito de amina a 37 C por una hora. Las rejillas se traspasaron a un tubo Eppendorf que ya contenía la solución de amina de osmio. Y se dejaron contrastar durante toda la noche. Al día siguiente las rejillas fueron lavadas con agua destilada y ácido sulfúrico 0.5N respectivamente.

Observación al microscopio electrónico de transmisión

Las rejillas de contraste general, EDTA, amina de osmio y AgNOR fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión de la Facultad de Ciencias de la UNAM bajo la asesoría del Dr. Gerardo Vázquez-Nin y el Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Resultados

Las células de *Chaos chaos* son de alrededor de 2mm de longitud; presentan diversas morfologías de acuerdo a las descripciones previas. Bajo el estereoscopio a un aumento de 10x se observan organismos politácticos que reptan en el fondo del recipiente donde se les cultiva. Se observó que la mayoría se desplaza de forma rectilínea formando una gran cantidad de pseudópodos, en contraste con las descripciones de *Pelomyxa palustris*. Algunos ejemplares alcanzaron hasta 4 mm de longitud.

La observación en microscopía electrónica reveló que las células de *Chaos chaos* poseen una gran cantidad de formas no reconocidas. Se observaron estructuras internas delimitadas por una membrana cuya forma es perfectamente esférica y que probablemente correspondan a vacuolas digestivas.

La membrana plasmática de *Chaos chaos* posee muchas estructuras fibrilares adyacentes a la luz interna. Se observó una gruesa capa de estas estructuras en las preparaciones. El exterior de la membrana, correspondiente a la matriz, extracelular, presenta muchas fibras que se prologan por algunas centenas de nanómetros hacia el exterior. Su apariencia no corresponde a la de cilios sino a la de glicoproteínas como se ha reportado en otros organismos.

Se observó una gran cantidad de mitocondrias en la periferia de los núcleos pero sin un arreglo particular como el que se reporta en otras amibas. Las mitocondrias presentan cisternas tubulares. En algunos casos se detectó la conexión entre mitocondrias y otras estructuras membranosas; putativamente retículos endoplásmicos.

Las células de *Chaos chaos* son multinucleadas; los núcleos tienen formas irregulares y miden entre dos y cuatro micrómetros de diámetro. Se observa una gran cantidad de estructuras fibrilares y granulares dentro de la Núcleolina, con diferentes electrodensidades. En el contraste general con acetato de uranillo y citrato de plomo se observan conglomerados electrodensos; correspondientes a los nucléolos putativos de estudios anteriores.

La luz interna de la membrana nuclear presenta una gran cantidad de fibras dispuestas paralelamente a la membrana. Estas estructuras corresponden a una lámina nuclear

extremadamente gruesa. El conglomerado de estructuras laminares dobla el grosor de la membrana nuclear en algunas regiones.

Se observan también una gran cantidad de poros nucleares que destacan por diferencias de electrodensidad en cortes transversales del núcleo. Los poros nucleares se encuentran dispuestos ordenadamente.

El contraste preferencial con EDTA funcionó. En las imágenes se observa la ausencia de estructuras fibrilares que corresponden al DNA. Tras el procesamiento solo han permanecido las ribonucleoproteínas que se observan en cuerpos granulares de diversas morfologías. Se observan cadena de gránulos de alrededor de 2nm de diámetro, así como gránulo de menor tamaño agrupados en “clusters”. También se observan conglomerados de estructuras fibrogranulares. Estas observaciones corresponden putativamente a gránulos intercromatinianos, pericromatinianos y nucléolos respectivamente. En estas imágenes también se observa con más detalle la gran cantidad de láminas nucleares debajo de la membrana nuclear.

El contraste preferencial con amina de osmio destaca la zona de cromatina compacta. Se aprecia el blanqueo del compartimento pericromatiniano. En comparación con el contraste de EDTA se observa el contraste de las estructuras fibrilares sobre los gránulos.

Los núcleos de *Chaos chaos* contienen múltiples nucléolos, identificados a partir de la técnica de AgNOR. Se observa la precipitación de plata amoniacal como pequeños puntos extremadamente electrodensos entre las estructuras fibrogranulares. Múltiples precipitaciones se observan en el centro de los conglomerados vistos anteriormente con el contraste de EDTA.

El nucléolo de *Chaos chaos* posee dos compartimentos aparentes: una *pars fibrosa* y una *pars amorfa*, revelados a partir de la técnica de EDTA. El componente granular rodea al componente fibrilar y da la apariencia de un nucléolo compacto. Los nucléolos son en su mayoría periféricos

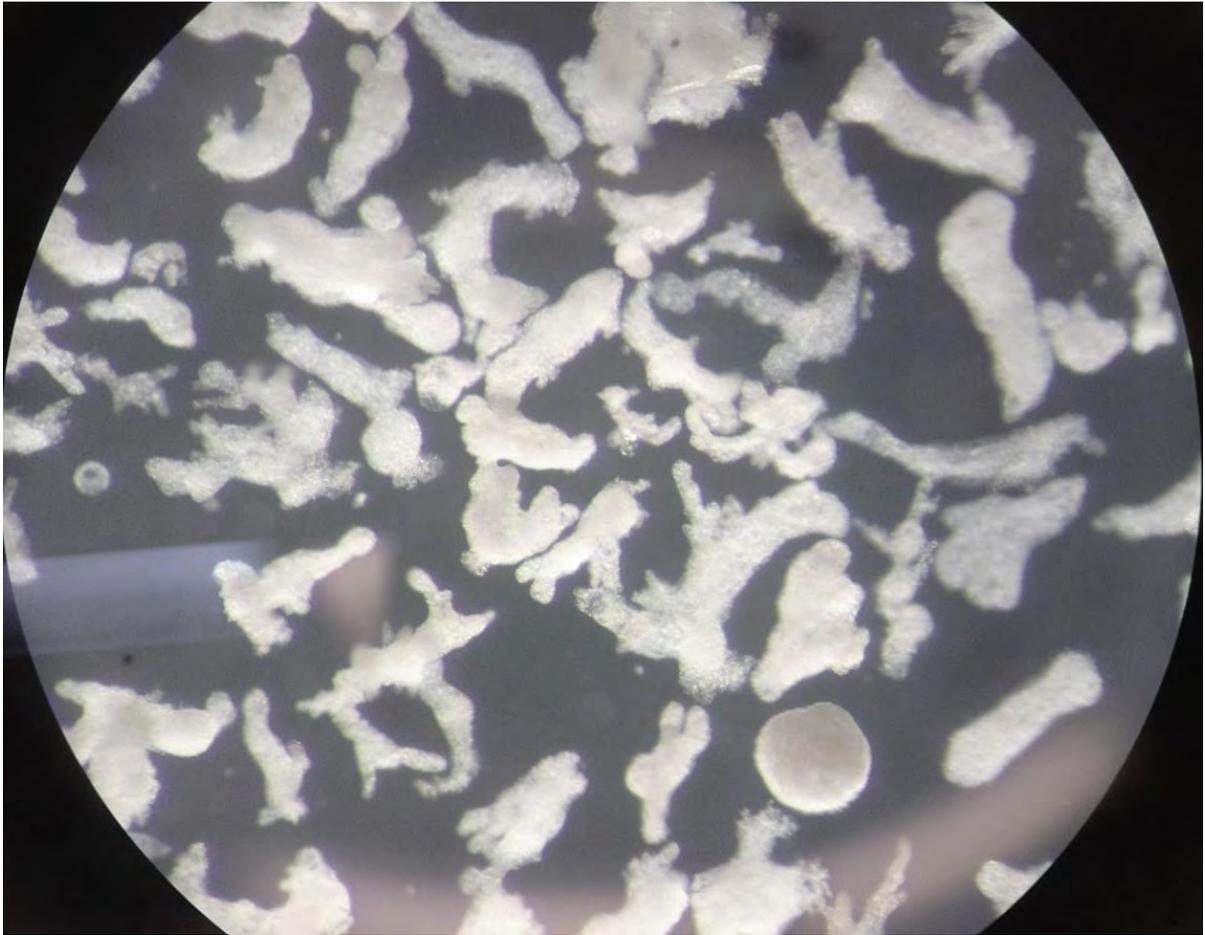


Fig. 24. Células de *Chaos chaos* vistas al microscopio estereoscópico

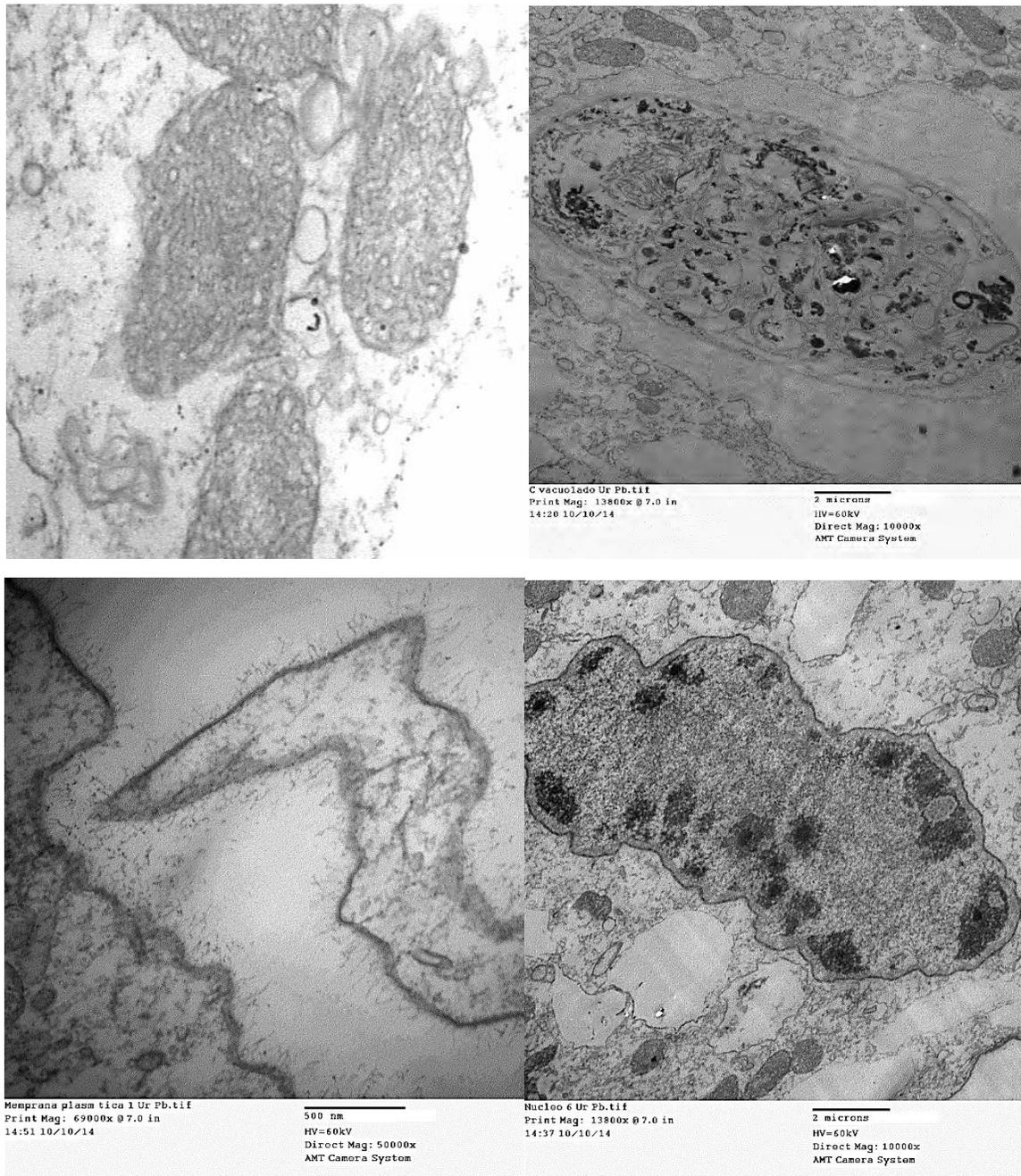
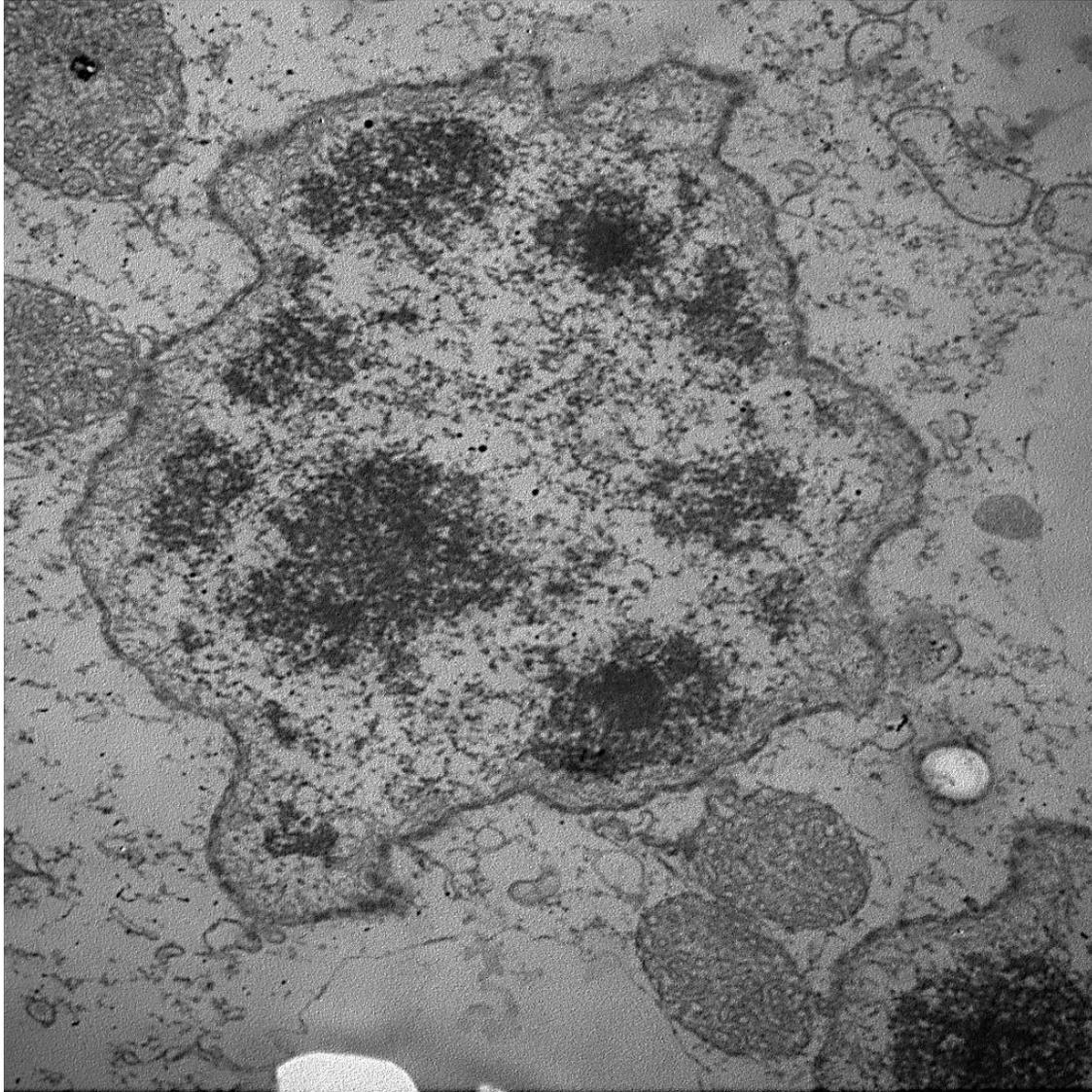


Fig. 25. Ultraestructura de *Chaos chaos* en contraste general con UrPb. Superior izquierdo: mitocondrias tubulares. Superior derecho: Cuerpo vacuolado, posiblemente un fagosoma rodeado de una invaginacion de la membrana y algunas mitocondrias. Inferior izquierdo: Detalle de la membrana plasmatica y las prolongaciones fibrosas de la matriz extracelular. Inferior derecho: núcleo celular interfásico y mitocondrias.



Nucleo 4 Ur Pb.tif
Print Mag: 27600x @ 7.0 in
14:31 10/10/14

500 nm
HV=60kV
Direct Mag: 20000x
AMT Camera System

Fig. 26. Núcleo interfásico de *Chaos chaos*. Nótese la disposición periférica de la cromatina compacta y la ausencia de cromatina perinuclear, en su lugar destacan sendas aglomeraciones de estructuras laminares, posiblemente laminas nucleares. Se aprecian nucléolos putativos con estructuras granulares y fibrilares. Adicionalmente se observa claramente el detalle de los poros nucleares, visibles en el corte de la envoltura nuclear.

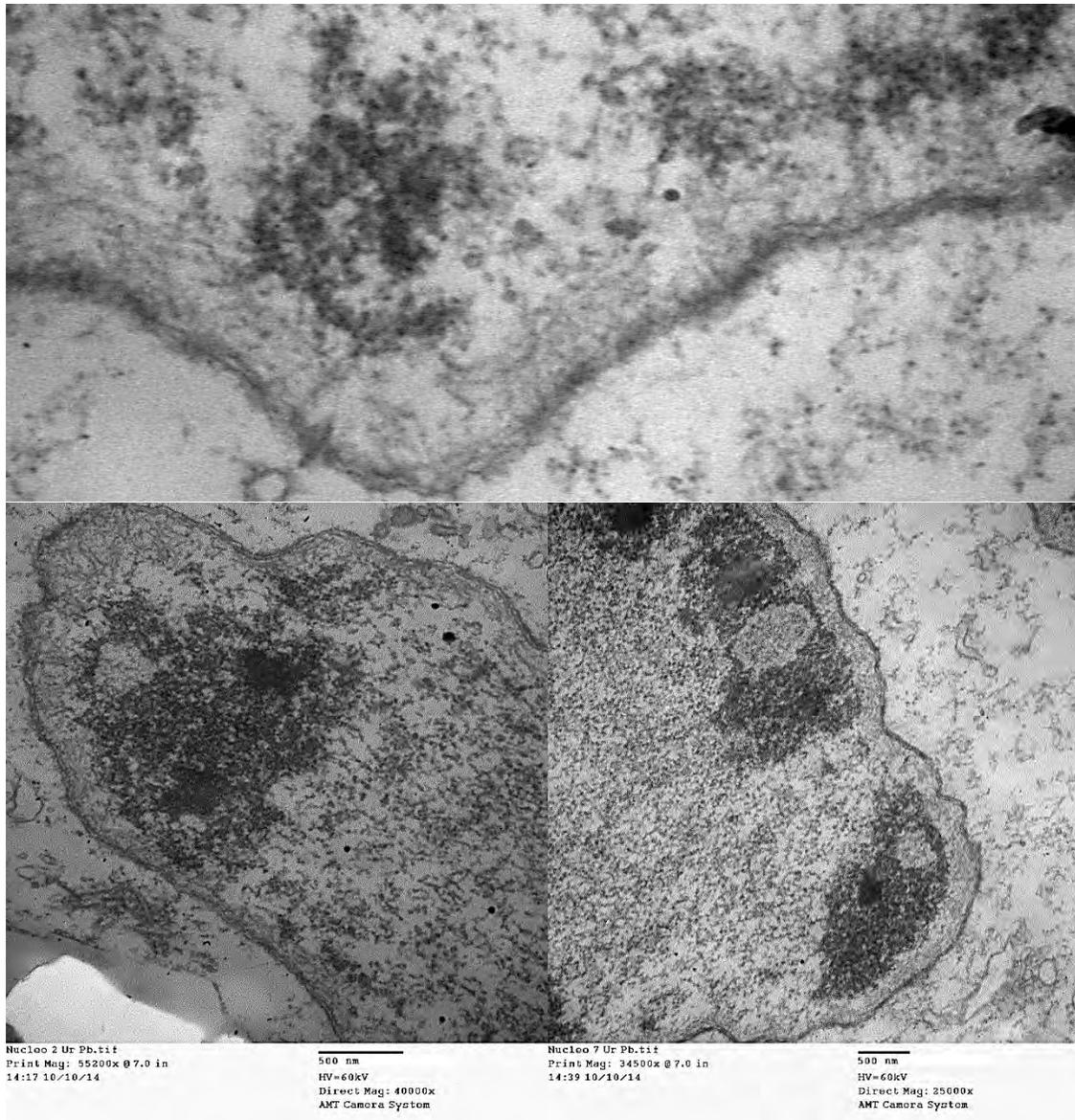


Fig. 27. Ultraestructura del núcleo interfásico de *Chaos chaos* en contraste con UrPb. Panel superior: Estructuras laminares adyacentes a la membrana nuclear, asociadas con cuerpos nucleares. La cariolinfa se observa poco contrastada sugiriendo la presencia de cromatina muy laxa. Inferior izquierdo: Cromatina compacta y laxa, la cariolinfa exhibe cromatina laxa de aspecto coralino en contraposición posibles nucléolos rodeados de cromatina perinuclear densa. Inferior derecho: Detalle de posible nucléolo, nótese el marcado límite entre la cariolinfa y el conjunto de láminas nucleares.

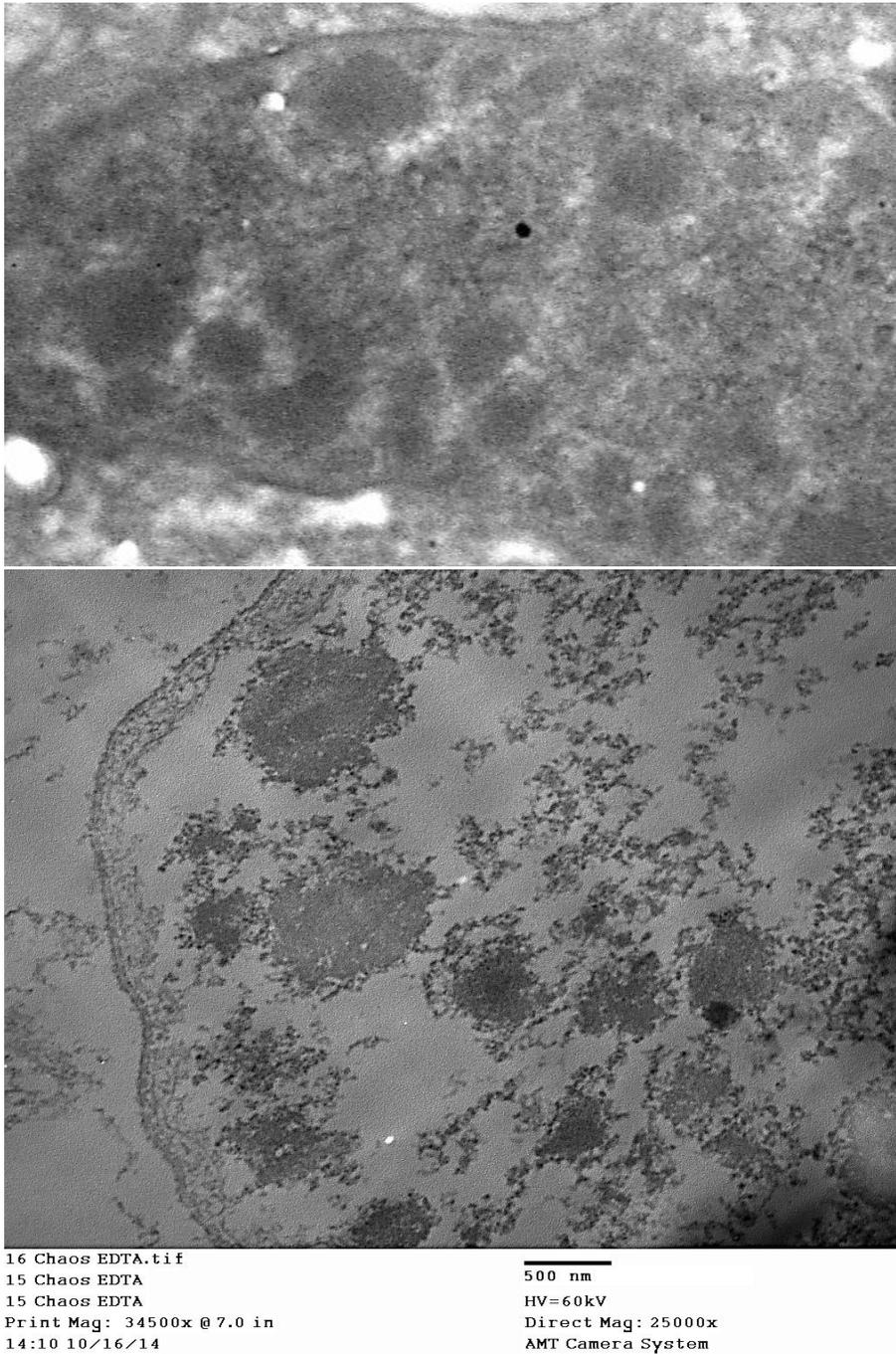
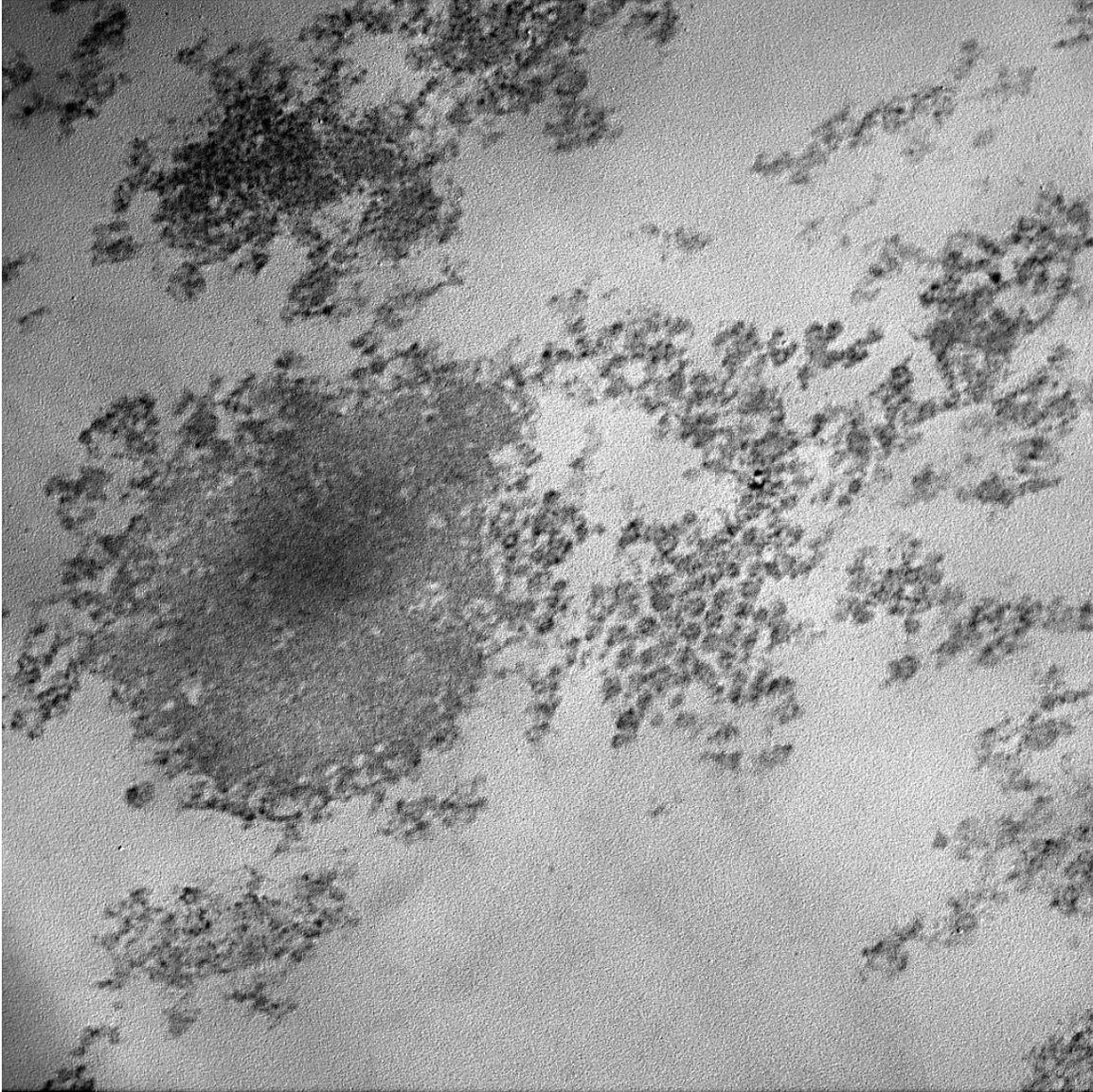


Fig. 28. Distribución de DNA y RNA en el núcleo interfásico de *Chaos chaos*. Panel superior: Contraste preferencial para DNA con la técnica de amina de osmio. Nótese el blanqueo de zonas alrededor de la cromatina compacta. En el futuro un mejor contraste permitirá el total blanqueo de ribonucleoproteínas. Panel inferior: Reacción preferencial regresiva de EDTA para RNP's. Nótese el blanqueo total de la cromatina laxa. Se observan gran diversidad de estructuras granulares y fibrilares en cúmulos o libres en la nucléolina.



02 Chaos EDTA.tif

02 Chaos EDTA

02 Chaos EDTA

Print Mag: 69000x @ 7.0 in

13:30 10/16/14

500 nm

HV=60kV

Direct Mag: 50000x

AMT Camera System

Fig. 29. Contraste preferencial de RNP's con EDTA. nucléolina con gránulos intercromatinianos cercanos a una estructura fibrilar densa con componentes granulares adyacentes, posiblemente un pequeño nucléolo.

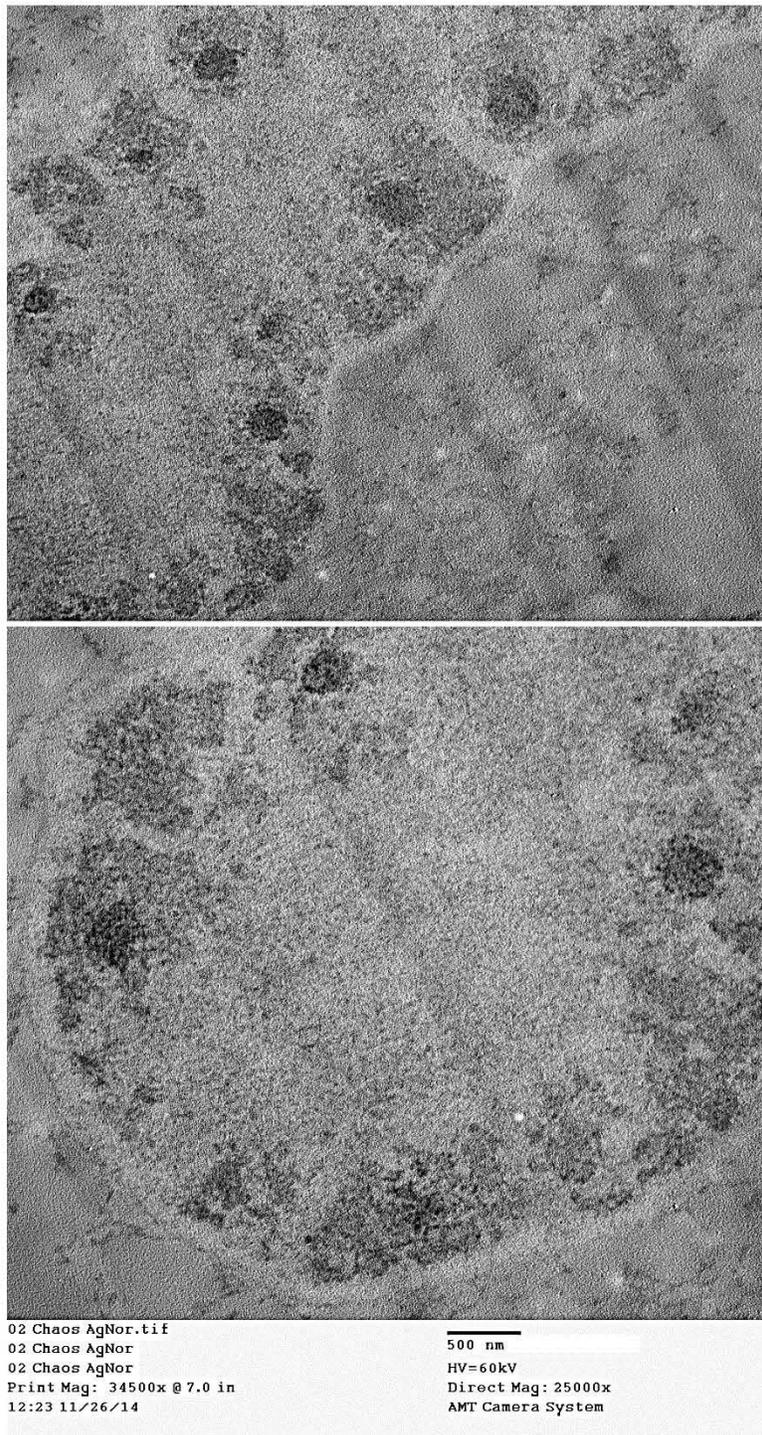


Fig. 30. Localización in situ de organizadores nucléolares con el contraste argéntico de AgNOR. Ambos paneles: Nótese la precipitación de la plata en las zonas fibrilares de ciertos cumulo periféricos del núcleo de *Chaos chaos*. Cada organizador nucléolar representa la unidad funcional de un nucléolo, sugiriendo que los núcleos de *Chaos chaos* son representativamente polinucleolados.

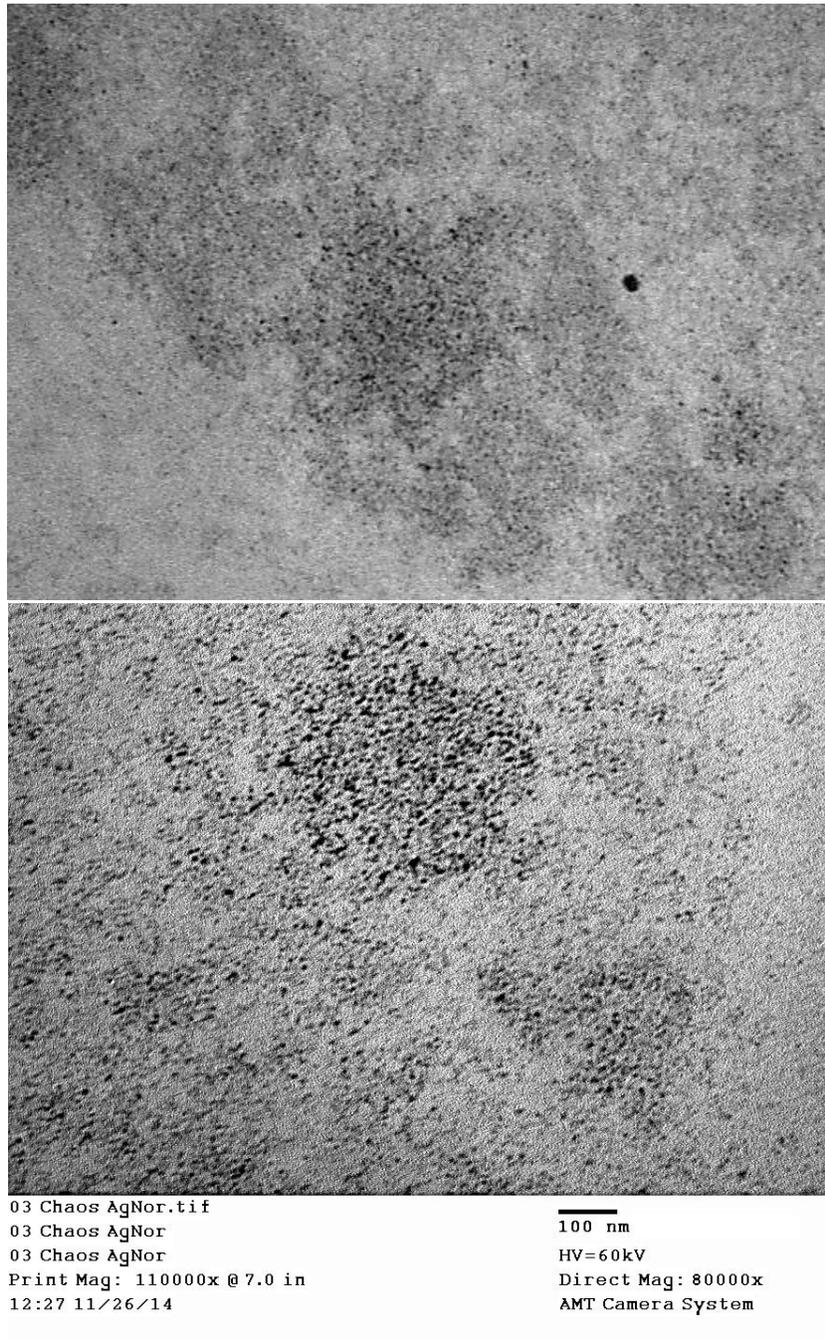


Fig. 31. Detalle de la impregnación argéntica de AgNOR. Panel superior: Nucléolo con precipitados de plata en el componente fibrilar. Se aprecien invaginaciones en el nucléolo a manera de nucléolonema. Panel inferior: Detalle de la precipitación argéntica en *Chaos chaos*, mucho menos fuerte que en células de mamíferos, sugiere que la composición y densidad protéica del nucléolo de la amiba es distinta.

Discusión

Los resultados presentados confirmaron las observaciones anteriores. Las células de *Chaos chaos* son enormes repositorios de organelos y cristales. Llama la atención ahondar sobre los aspectos nuevos de arquitectura nuclear. Los conceptos esbozados por Mistelli son aplicables a futuros estudios en *Chaos chaos* (Mistelli, 2005). La presencia de nucléolos confirmado por la técnica de impregnación argéntica (AgNOR) confirman varios aspectos. 1) Muchos nucléolos coexisten en un mismo núcleo, lo que sugiere que la actividad transcripcional es alta. 2) Los nucléolos son periféricos y la cromatina compacta se encuentra preferentemente al centro del núcleo. Esto sugiere que las regiones de expresión genética y de procesamiento ribosómico se encuentran hacia el exterior del núcleo. 3) Los nucléolos son bipartitos, lo que sugiere que el procesamiento de los RNA ribosomales ocurre de forma similar que en otros protistas, al menos desde el punto de vista de la morfología Núcleolar. Este aspecto es por demás interesante desde el punto de vista evolutivo. Desde la perspectiva citológica el nucléolo es un carácter muy conspicuo entre los eucariontes. Se conoce su anatomía ultraestructural en: aves (Deray, 1979), reptiles (Faure *et al.*, 1987), anfibios (Mais y Sheer, 2001), peces (Thiry *et al.*, 2005), artrópodos (Favard-Soreno, 1968) (Richard-Mercier, 1979), moluscos (Romanova, 1985), equinodermos (Chudinova *et al.*, 2001), anélidos (Bertout, 1984), nematodos (Lee *et al.*, 2012), levaduras (Trummtel *et al.*, 2000), plantas (Thiry *et al.*, 2011), eumicetozoos (Ploton *et al.*, 1979), alveolados (Soyer-Gobillard *et al.*, 1991), excavados y diplomónidos (Jiménez-García *et al.*, 2005) (Jiménez-García *et al.*, 2008). Mientras los animales y las plantas poseen nucléolos constitutivos con dos o tres dominios, los de los hongos y los protistas varían en forma, tamaño y estructura (Olive, 1965). Con excepción de metazoarios y plantas el nucléolo es una estructura reincidentemente polimórfica.

Las diferencias en el número de nucléolos y la morfología Núcleolar abren una pauta a la investigación del gigantismo celular en *Chaos chaos*. En organismos pluricelulares el número de nucléolos es limitado. Alteraciones en este aspecto se han relacionado con la pluripotencialidad de la célula en modelo de células cancerosas. El hecho de que los núcleos de las amibas gigantes sean multinucleolados sugiere que la actividad transcripcional es extremadamente alta en cada núcleo.

Surge la pregunta de si en una amiba gigante la expresión genética es descontrolada espacialmente o si existe una expresión genética diferencial y compartimentalizada como en *E. fishelsoni*. La perspectiva a futuro apunta a trasladar experimentos como los realizados en *E. fishelsoni* a *Chaos chaos* como medio de estudio de estos fenómenos en protistas gigantes.

Finalmente cabe señalar que otro fenómeno de gigantismo ha sido asociado a las amibas gigantes. El gigantismo y la hiperpoliploidía en virus ocurren mayormente en los patógenos de amibas gigantes. Esta perspectiva puede ser trasladada a *E. fishelsoni*, donde el papel de los virus es ignorado aún.

Epílogo

Los resultados muestran que las células de *Chaos chaos* y *E. fishelsoni* se comportan como grandes repositorios de núcleos en el primer caso y de genomas en el segundo. En el caso de la amiba la gran cantidad de nucléolos sugiere que la actividad transcripcional es constante, así mismo la gran cantidad de poros nucleares es una característica que se aprecia en muchas amibas, y probablemente se relaciona con una intensa actividad transcripcional. En el caso de la bacteria la distribución diferencial de los transcritos sugiere que además de que existe una compartimentalización de la expresión génica, son muchos los genomas que al mismo tiempo transcriben un mismo gen. En *E. fishelsoni* el hecho de que la expresión de dos genes sea diferencial espacialmente, da pauta para considerar que existen actividad diferencial de algunas copias genómicas sobre otras. En el caso de *Chaos chaos* el cumplimiento de tareas (perfiles transcripcionales) distintas por diversos núcleos es mera especulación, pero es una percepción sumamente interesante a revisar en un organismo cuyo naturalza se acerca más al plasmodio y al sincicio que a la célula individual.

El funcionamiento orgánico de una célula gigante probablemente depende de la acción colectiva de genomas en las bacterias y de núcleos en el caso de los eucariontes. En ambos organismos se ha reportado la hiperpoliploidía; en amibas no se ha sabido discernir si los núcleos son hiperpoliploides o en su conjunto hacen hiperpoliploide al organismo.

Para la pregunta fundamental: ¿Qué le permite a las células gigantes exceder los tamaños convencionales?, existen muchas perspectivas futuras. El presente trabajo aporta información valiosa. Las bacterias gigantes tienen una compartimentalización no aparente del metabolismo y de la expresión génica. A pesar de la gran cantidad de copias genómicas, existe evidencia para pensar que cada copia cumple con actividades particulares, de forma análoga a un organismo pluricelular. Este principio puede ser trasladado como hipótesis a las amibas gigantes. Verificar la expresión diferencial de genes en sus núcleos es una perspectiva interesante.

La arquitectura celular de los microorganismos gigantes es una imagen del deseo de comprender el funcionamiento orgánico de un sistema vivo tan complejo como una célula que sobrepasa las

medidas habituales. Los aspectos biofísicos continúan siendo un enigma en cuanto al estudio de estos dos organismos. Huelga verificar si existen patrones estructurales en sus membranas. Si en el caso de *E. fishelsoni* el retículo citoplásmico contrarresta la proporción superficie/volumen y si las invaginaciones se mantienen por mecanismos análogos a los de las cresta mitocondriales. Un estudio futuro será observar la distribución de ATP sintasas en *E fishelsoni* En el caso de *Chaos chaos* vale la pena estudiar el citoesqueleto y las estructura de la matriz extracelular. Las amibas proveen un modelo prometedor para verificar las hipótesis de tensegridad que ha sido vistas en fibroblastos.

La conjunción de estudios biofísicos con perspectivas microanatómicas como la que se presentó, ayudaran a completar la imagen de una arquitectura celular hacia un modelo del gigantismo celular desde la biología celular evolutiva. Hasta el momento, la arquitectura celular sigue siendo una metáfora creativa que abre el camino hacia investigaciones futuras

Referencias

Capítulo 1

- Abbe, E. (1886). Uber neue Mikroskope. *Sitzungsber. der Jenaischen Ges. f. Medizin u. Naturwiss, 1886*, 107-128.
- Abir-Am, P. (1985). Themes, genres and orders of legitimation in the consolidation of new scientific disciplines: Deconstructing the historiography of molecular biology. *History of science*, 23(1), 73-117.
- Albarracín Teulón, A. (1983). La teoría celular. *Madrid: Alianza Universidad*.
- Alpers, S. (1983). *The art of describing: Dutch art in the seventeenth century* (Vol. 24, pp. 236-f). Chicago: University of Chicago Press.
- Bachrach, A. G. H. (1962). *Sir Constantine Huygens and Britain, 1596-1687: a pattern of cultural exchange* (Vol. 1). Published for the Sir Thomas Browne Institute at the University press; [distributed outside the Netherlands by] Oxford University Press, London.
- Baker, J. R. (1951). Remarks on the discovery of cell-division. *Isis*, 42(4), 285-287.
- Baker, J. R. (1952). *Abraham Trembley of Geneva: Scientist and Philosopher, 1710-1784*. E. Arnold & Company.
- Bechtel, W. (2006). *Discovering cell mechanisms: The creation of modern cell biology*. Cambridge University Press.
- Britannica, E. (1959). Inc. Enciclopedia Britannica.
- Brown, R. (1833). XXXV. On the Organs and Mode of Fecundation in Orchideæ and Asclepiadeæ. *Transactions of the Linnean Society of London*, 16(3), 685-738.
- Cheirif Wolosky, Alejandro. 2014. Alexander von Humboldt entre la historia natural francesa y la filosofía natural alemana. *Ciencias* núm, 113-114, abril-septiembre. pp. 68-76.
- Croft, W. J. (2006). *Under the microscope: a brief history of microscopy* (Vol. 5). World Scientific.
- Dayrat, B. (2003). The roots of phylogeny: how did Haeckel build his trees? *Systematic Biology*, 52(4), 515-527.
- De Asúa, M. J., & Klimovsky, G. (1987). Ensayo de axiomatización de la teoría celular. *Theoria: An International Journal for Theory, History and Foundations of Science*, 389-399.
- Dear, P. (1985). Totius in verba: Rhetoric and authority in the early Royal Society. *Isis*, 145-161.
- Dennis, M. A. (1989). Graphic understanding: Instruments and interpretation in Robert Hooke's Micrographia. *Science in context*, 3(02), 309-364.
- Dobell, C., & van Leeuwenhoek, A. (1958). *Antony van Leeuwenhoek and his "little animals."* Russell & Russell.
- Doxsey, S. (1998). The centrosome—a tiny organelle with big potential. *Nature genetics*, 20(2), 104-106.
- Eco, U., & Irazazábal, M. P. (2009). *El vértigo de las listas*. Lumen Editorial.
- Egerton, F. N. (2006). A history of the ecological sciences, part 19: Leeuwenhoek's microscopic natural history. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 87(1), 47-58.
- Ehrenberg, C. G. (1838). *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen: ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur*. Leipzig. Voss.

- Espinasse, M. (1956). Robert Hooke (pp. 69-70). London.
- Fontana, Felice. (1781). *Traité sur le venin de la vipère, avec des observations sur la structure primitive du corps animale. Florence, Italy.*
- Ford, B. J. (1981). The van Leeuwenhoek specimens. *Notes and records of the Royal Society of London*, 36(1), 37-59.
- Ford, B. J. (1991). *The Leeuwenhoek Legacy*. Biopress.
- Foucault, M. (1988). *Las palabras y las cosas: una arqueología de las ciencias humanas*. Siglo xxi.
- Fournier, M. (1996). *The fabric of life: microscopy in the seventeenth century*. Johns Hopkins Univ Pr.
- Gallagher, R., Appenzeller, T., & Normile, D. (1999). Beyond reductionism. *Science*, 284(5411), 79.
- Grew, N. (1965). 1682. *The anatomy of plants*. New York, London: Johnson Reprint Corp.
- Haeckel, E. H. (1866). *Generelle Morphologie der Organismen allgemeine Grundzuge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie von Ernst Haeckel: Allgemeine Entwicklungsgeschichte der Organismen kritische Grundzuge der mechanischen Wissenschaft von den entstehenden Formen der Organismen, begründet durch die Descendenz-Theorie*. Verlag von Georg Reimer.
- Hall, T. S. (1969). *Ideas of Life and Matter*, 2 vols. Chicago, University of Chicago.
- Harris, H. (2000). *The birth of the cell*. Yale University Press.
- Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402, C47-C52.
- Henle, J. (1841). *Allgemeine anatomie*. Leipzig: Voss.
- Hollaender, A., & Emmons, C. W. (1941, January). Wavelength dependence of mutation production in the ultraViolet with special emphasis on fungi. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 9, pp. 179-186). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hooke R. (1721). “An instrument of Use to take the Draught, or Picture of a Thing” in *Philosophical Experiments and Observations*.
- Hooke, R. (1655). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. By R. Hooke, Fellow of the Royal Society. Jo. Martyn, and Ja. Allestry, printers to the Royal Society, and are to be sold at their shop at the Bell in S. Paul's church-yard.
- Hooke, R. (1678) *Lectures and collections; Microscopium*. Royal Society, London, I.
- Jacobs, N. X. (1989). From unit to unity: Protozoology, cell theory, and the new concept of life. *Journal of the History of Biology*, 22(2), 215-242.
- Kluyver, A. J. (1947). Three decades progress in microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 13(1), 1-20.
- Lakatos, I. (1976). *Falsification and the methodology of scientific research programmes* (pp. 205-259). Springer Netherlands.
- Lakatos, I., & Musgrave, A. (1970) *Criticism and the growth of knowledge*, Cambridge, Cambridge Univesity Press).
- Lane, N. (2015). The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) ‘Concerning little animals’. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(1666), 20140344.
- Lee, K. K. (1969). Popper's falsifiability and Darwin's natural selection. *Philosophy*, 44(170), 291-302.

- Lynch, M., Field, M. C., Goodson, H. V., Malik, H. S., Pereira-Leal, J. B., Roos, D. S., ... & Sazer, S. (2014). Evolutionary cell biology: two origins, one objective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48), 16990-16994.
- Mayr, E. (2006). *Por qué es única la biología: consideraciones sobre la autonomía de una disciplina científica*. Katz Editores.
- Mazzarello, P. (1999). A unifying concept: the history of cell theory. *Nature Cell Biology*, 1(1), E13-E15.
- Meyer, A. W. (1937). Leeuwenhoek as experimental biologist. *Osiris*, 3, 103-122.
- Moerner, W. E. (2012). Microscopy beyond the diffraction limit using actively controlled single molecules. *Journal of microscopy*, 246(3), 213-220.
- Mohl, H. V. (1846). Über die Saftbewegung im Innern der Zellen. *Bot. Ztg*, 4, 73-78.
- Needham, J., & Hughes, A. (2015). *A history of embryology*. Cambridge University Press.
- Nicolson, M. H. (1956). *Science and imagination* (No. 654). Great Seal Books.
- Nordenskiöld, A. E. (1949). *Evolución histórica de las ciencias biológicas*. Espasa-Calpe Argentina.
- Nurse, P. (1998). Reductionism and explanation in cell biology. In *Novartis Found Symp* (Vol. 213, pp. 93-105).
- Oken, L. (1805). *Die Zeugung*. Goebhardt, pp 4 y 103.
- Olins, D. E., & Olins, A. L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(10), 809-814.
- Overton, C. E. (1895). *Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen-und Tierzelle*. Ges. Zürich, 40: 159
- Pearce, J. M. S. (2007). Malpighi and the discovery of capillaries. *European neurology*, 58(4), 253-255.
- Pérez-Tamayo, R. (1996). *La profesión de Burke y Hare y otras historias*. Fondo de Cultura Económica.
- Pinto-Correia, C. (1999). Strange Tales of Small Men: Homunculi in Reproduction. *Perspectives in biology and medicine*, 42(2), 225-244.
- Ramón y Cajal, S. (1888). Estructura del cerebelo de las aves. *Rev. Trim. Histol*, (2).
- Recio, J. L. G. (1990). Elementos dinámicos de la teoría celular. *Revista de filosofía*, (4), 83-110.
- Recio, J. L. G. (2012). La constitución de la citología Y Los modelos de la microanatomía celular. *Ludus Vitalis*, 20(37), 25-32.
- Remak, R. (1841). Über Theilung rother Blutzellen beim Embryo. *Med. Ver. Zeit*.
- Remak, R. (1852). Ueber extracellulare Entstehung thierischer Zellen und über Vermehrung derselben durch Theilung. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin*, 47-57.
- Reynolds, A. (2008). Ernst Haeckel and the Theory of the Cell State: Remarks on the History of a Bio-political Metaphor. *History of Science*, 46(2), 123-152.
- Richerand, A. Elements of Physiology, trans. *GJM De Lys, 5th London ed. (Philadelphia: James E. Moore, 1823)*.
- Robles J. A., G. (2006). *Los escritos matemáticos de George Berkeley y la polémica sobre El analista*. (Ed.). UNAM.
- Ruestow, E. G. (1984). Leeuwenhoek and the campaign against spontaneous generation. *Journal of the History of Biology*, 17(2), 225-248.

- Sanchez Garnica, D. E. (2005). La biología romántica de los Naturphilosophen. *El Taller de las Ideas: diez lecciones de Historia de la Ciencia*. Ed. Plaza y Valdez, 151-181.
- Shapiro, J. A. (2009). Revisiting the central dogma in the 21st century. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1178(1), 6-28.
- Singer, C. (1914). Notes on the early history of microscopy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 7(Sect Hist Med), 247.
- Smetana, K. (2011). The Nucleolus through the years. *Journal of Applied Biomedicine*, 9(3), 119-127.
- Stent, G. S. (1968). That was the molecular biology that was. *Science*, 160(3826), 390-395.
- Strasburger, E. (1875). Zelltheilung. *Hermann Dabis, Jena*.
- Teulón, A. A. (1980). La "Allgemeine Anatomie" de Henle: una nueva aproximación a su estudio. In *Medicina e historia* (pp. 251-264). Universidad Complutense.
- Torres, S. M. (2004). Goethe y Kant: Arte, Naturaleza y Ciencia. *Endoxa*, 1(18), 355-382.
- Toulmin, S., & Goodfield, J. (1982). *The architecture of matter*. University of Chicago Press.
- Van Leeuwenhoek, A., & Dobell, C. (1932). *Antony Van Leeuwenhoek and His "Little Animals": A Collection of Writings by the Father of Protozoology and Bacteriology*. Dover.
- Vazquez-Nin, G. H. (2014). Mesa redonda: ¿Qué nos dice nuestro pasado sobre nuestro futuro próximo?, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Virchow R., (1852) Ernährungseinheiten und Krankheitsheerde, *Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.*, 4: 375.
- Virchow, R. L. K. (1871). *Die Cellularpathologie: in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* (Vol. 1). Verlag von August Hirschwald, Unter den Linden No. 68.
- Von Uexküll, J. (1920). *Theoretische biologie*. Paetel.
- Weismann, A. (1893). *The germ-plasm: a theory of heredity*. Scribner's.
- Wheelock, A. K. (1977). *Perspective, optics, and Delft artists around 1650*. New York, NY: Garland.
- Zenzen, M. J. (1999). Science, Hermeneutics, and Metaphorical Thought. In *Hermeneutics and Science* (pp. 281-291). Springer Netherlands.
- Zuylen, J. V. (1981). The microscopes of Antoni van Leeuwenhoek. *Journal of microscopy*, 121(3), 309-328.

Capítulo 2

- Allen, T. D., & Potten, C. S. (1976). Significance of cell shape in tissue architecture.
- Beisson, J., & Sonneborn, T. M. (1965). Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 53(2), 275-282.
- Bender, W., Spierer, P., Hogness, D. S., & Chambon, P. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Journal of molecular biology*, 168(1), 17-33.

- Bereiter-Hahn, J. (1987). Mechanical principles of architecture of eukaryotic cells. In *Cytomechanics* (pp. 3-30). Springer Berlin Heidelberg.
- Bernales, S., McDonald, K. L., & Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 4(12), e423.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., & Turner, C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual review of cell biology*, 4(1), 487-525.
- Busch, H. (Ed.). (2012). *The cell nucleus* (Vol. 3). Elsevier.
- Buxbaum, R. E., & Heidemann, S. R. (1988). A thermodynamic model for force integration and microtubule assembly during axonal elongation. *Journal of theoretical biology*, 134(3), 379-390.
- Cai, S., Han, H. J., & Kohwi-Shigematsu, T. (2003). Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nature genetics*, 34(1), 42-51.
- Capco, D. G., Wan, K. M., & Penman, S. (1982). The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell*, 29(3), 847-858.
- Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews genetics*, 2(4), 292-301.
- Cremer, T., Cremer, C., Schneider, T., Baumann, H., Hens, L., & Kirsch-Volders, M. (1982). Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Human genetics*, 62(3), 201-209.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I., & Fakan, S. (2006). Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Current opinion in cell biology*, 18(3), 307-316.
- Doolittle, W. F. (1980). Revolutionary concepts in evolutionary cell biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 5(6), 146-149.
- Evans, E. A., Skalak, R., & Weinbaum, S. (1980). Mechanics and thermodynamics of biomembranes.
- Fey, E. G., Wan, K. M., & Penman, S. (1984). Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *The Journal of Cell Biology*, 98(6), 1973-1984.
- Fuller, B. R. (1961). Tensegrity. Portfolio and Art News Annual.
- Fuller, R. B. (1965). *Conceptuality of fundamental structures*. In Kepes, G., Kepes, G., Foster, N., Prouvé, J., Norman Foster, J. P., Habraken, N. J., ... & Mott, R. L. R. L. (1965). *Structure in Art and in Science* (No. 624.04). G. Braziller,.
- Fulton, A. B., & Isaacs, W. B. (1986, November). Possible tensegrity models for the cytoskeleton. In *JOURNAL OF CELL BIOLOGY* (Vol. 103, No. 5)
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P., & Bickmore, W. A. (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*, 118(5), 555-566.
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., & Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & development*, 16(5), 533-547.
- Gordon, L. B., Rothman, F. G., López-Otín, C., & Misteli, T. (2014). Progeria: a paradigm for translational medicine. *Cell*, 156(3), 400-407.
- Grain, J. (1986). The cytoskeleton in protists: nature, structure, and functions. *International review of cytology*, 104, 153-249.

- Grassé, P. P. (2013). *Evolution of Living Organisms: Evidence for a New Theory of Transformation*. Academic Press.
- Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, *402*, C47-C52
- Heuser, J. E., & Kirschner, M. (1980). Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *The Journal of Cell Biology*, *86*(1), 212-234.
- Hottinger, L. (1982). Larger foraminifera, giant cells with a historical background. *Naturwissenschaften*, *69*(8), 361-371.
- Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M. ... & Prinz, W. A. (2008). Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science*, *319*(5867), 1247-1250.
- Ingber, D. (1991). Integrins as mechanochemical transducers. *Current opinion in cell biology*, *3*(5), 841-848.
- Ingber, D. E. (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal of cell science*, *104*, 613-613.
- Ingber, D. E. (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal of cell science*, *104*, 613-613.
- Ingber, D. E. (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual review of physiology*, *59*(1), 575-599.
- Ingber, D. E., & Jamieson, J. D. (1985). Cells as tensegrity structures: Architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membranes. *Gene Expression during Normal and Malignant Differentiation*.
- Ingber, D. E., & Jamieson, J. D. (1985). Cells as tensegrity structures: Architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membranes. *Gene Expression during Normal and Malignant Differentiation*.
- Jiménez-García, L. F., & Spector, D. L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell*, *73*(1), 47-59.
- Joshi, H. C., Chu, D., Buxbaum, R. E., & Heidemann, S. R. (1985). Tension and compression in the cytoskeleton of PC 12 neurites. *The Journal of cell biology*, *101*(3), 697-705.
- Katsura, I. (1986). Determination of bacteriophage lambda tail length by a protein ruler. *Nature*, *327*(6117), 73-75.
- Kitano, H. (2002). Systems biology: a brief overview. *Science*, *295*(5560), 1662-1664.
- Kolodney, M. S., & Wysolmerski, R. B. (1992). Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *The Journal of Cell Biology*, *117*(1), 73-82.
- Lazarides, E. (1976). Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *The Journal of cell biology*, *68*(2), 202-219.
- Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, *283*(5744), 249-256.
- Lynch, M., Field, M. C., Goodson, H. V., Malik, H. S., Pereira-Leal, J. B., Roos, D. S., ... & Sazer, S. (2014). Evolutionary cell biology: two origins, one objective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(48), 16990-16994.
- Marshall, W. F. (2011). Origins of cellular geometry. *BMC biology*, *9*(1), 57.
- Marshall, W. F., & Rosenbaum, J. L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules implications for flagellar length control. *The Journal of cell biology*, *155*(3), 405-414.

- Massey, J. (2006). Buckminster Fuller's cybernetic pastoral: the United States Pavilion at Expo 67. *The Journal of Architecture*, 11(4), 463-483.
- Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., & García, J. J. (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12356-12358.
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, 291(5505), 843-847.
- Misteli, T. (2005). Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*, 27(5), 477-487.
- Osborn, M., Born, T., Koitsch, H. J., & Weber, K. (1978). Stereo immunofluorescence microscopy: I. Threedimensional arrangement of microfilaments, microtubules and tonofilaments. *Cell*, 14(3), 477-488.
- Parada, L. A., & Misteli, T. (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends in cell biology*, 12(9), 425-432.
- Phair, R. D., & Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404(6778), 604-609.
- Phair, R. D., Scaffidi, P., Elbi, C., Vecerová, J., Dey, A., Ozato, K. ... & Misteli, T. (2004). Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 24(14), 6393-6402.
- Pienta, K. J., & Coffey, D. S. (1992). Nuclear-Cytoskeletal interactions: Evidence for physical connections between the nucleus and cell periphery and their alteration by transformation. *Journal of cellular biochemistry*, 49(4), 357-365.
- Pittis, A. A., & Gabaldón, T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*, 531(7592), 101-104.
- Rafelski, S. M., & Marshall, W. F. (2008). Building the cell: design principles of cellular architecture. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 593-602.
- Rosenbaum, J. L., Moulder, J. E., & Ringo, D. L. (1969). Flagellar elongation and shortening in chlamydomonas The Use of Cycloheximide and Colchicine to Study the Synthesis and Assembly of Flagellar Proteins. *The Journal of Cell Biology*, 41(2), 600-619.
- Rouquette, J., Cremer, C., Cremer, T., & Fakan, S. (2010). Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *International review of cell and molecular biology*, 282, 1-90.
- Scheer, U., & Hock, R. (1999). Structure and function of the Nucleolus. *Current opinion in cell biology*, 11(3), 385-390.
- Sims, J. R., Karp, S. E. T. H., & Ingber, D. E. (1992). Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *Journal of Cell Science*, 103(4), 1215-1222.
- Smith, C. L., & Kaji-O'Grady, S. (2014). Exaptive translations between biology and architecture. *Architectural Research Quarterly*, 18(02), 155-166.
- Steadman, P. (2008). *The Evolution of Designs: Biological analogy in architecture and the applied arts*. Routledge.
- Steinberg, G. (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic Cell*, 6(3), 351-360.
- Stephens, R. E. (1989). Quantal tektin synthesis and ciliary length in sea-urchin embryos. *Journal of cell science*, 92(3), 403-413.

- Théry, M., Racine, V., Piel, M., Pépin, A., Dimitrov, A., Chen, Y. ... & Bornens, M. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19771-19776.
- Toulmin, S., & Goodfield, J. (1982). *The architecture of matter*. University of Chicago Press.
- Travis, J. L., & Bowser, S. S. (1986). A new model of reticulopodial motility and shape: Evidence for a microtubule-based motor and an actin skeleton. *Cell motility and the cytoskeleton*, 6(1), 2-14.
- Tyrrrell, H. J. V. (1964). The origin and present status of Fick's diffusion law. *J. Chem. Educ.*, 41(7), 397.
- Wiesmeijer, K., Molenaar, C., Bekeer, I. M., Tanke, H. J., & Dirks, R. W. (2002). Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not. *Journal of structural biology*, 140(1), 180-188.
- Wilson, K. L., & Dawson, S. C. (2011). Functional evolution of nuclear structure. *The Journal of cell biology*, 195(2), 171-181.
- Wodarz, A. (2002). Establishing cell polarity in development. *Nature cell biology*, 4(2), E39-E44.
- Youle, R. J., & Van Der Blik, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065.
- Zenzen, M. J. (1999). Science, Hermeneutics, and Metaphorical Thought. In *Hermeneutics and Science* (pp. 281-291). Springer Netherlands.
- DeGrasse, J. A., DuBois, K. N., Devos, D., Siegel, T. N., Sali, A., Field, M. C. ... & Chait, B. T. (2009). Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(9), 2119-2130.
- Field, M. C., Gabernet-Castello, C., & Dacks, J. B. (2007). Reconstructing the evolution of the endocytic system: insights from genomics and molecular cell biology. In *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton* (pp. 84-96). Springer New York.
- Giménez-Martin G., (2001) Reiniciación de la transcripción en el ciclo celular: Nucléologénesis, Anal. Real Acad. Farm., 67:
- Jiménez-García, L. F., Segura-Valdez, M. D. L., Ochs, R. L., Rothblum, L. I., Hannan, R., & Spector, D. L. (1994). Nucléologénesis: U3 snRNA-containing preNucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 5(9), 955-966.
- Lam, Y.W., Fox, A.H., Leung, A.K., Andersen, J., Mann, M. and Lamond, A.I. (2004) Proteomics of the Nucleus; in *The Nucleolus* Olsen, Mark O.J. (Ed) Kluwer Academic/Plenum 16 pp. 302-314.
- Lonhienne, T. G., Sagulenko, E., Webb, R. I., Lee, K. C., Franke, J., Devos, D. P., ... & Fuerst, J. A. (2010). Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), 12883-12888.
- Luijsterburg, M. S., Noom, M. C., Wuite, G. J., & Dame, R. T. (2006). The architectural role of Nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *Journal of structural biology*, 156(2), 262-272.
- Mao, Y. S., Zhang, B., & Spector, D. L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Gen.*, 27(8), 295-306.
- Mayer, C., & Grummt, I. (2005). Cellular stress and Nucleolar function. *Cell Cycle*, 4(8), 1036-1038.
- Misteli, T. (2005). Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*, 27(5), 477-487.
- Pearson, A., Budin, M., & Brocks, J. J. (2003). Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15352-15357.

- Pederson, T. (1998). The plurifunctional Nucleolus. *Nucleic Ac. Res.*, 26(17), 3871-3876.
- Robert L. Ochs, Michael A. Lischwe, Eve Shen, Robert E. Carroll, Harris Busch, (1985) Nucléologenesi: Composition and fate of preNucleolar bodies, *Chromosoma*, September, Volume 92, Issue 5, pp 330-336
- Robinow, C., & Kellenberger, E. (1994). The bacterial Nucleoid revisited. *Microbiological reviews*, 58(2), 211-232.
- Van Iterson, W. (1966). The fine structure of the riboNucleoprotein in bacterial cytoplasm. *The Journal of cell biology*, 28(3), 563-570.
- Wilson, K. L., & Dawson, S. C. (2011). Functional evolution of nuclear structure. *The Journal of cell biology*, 195(2), 171-181.

Capítulo 3

- Angert, E. (2006). Beyond binary fission: Some bacteria reproduce by alternative means. *Microbe, american society for microbiology*, 1(3), 127.
- Angert, E. R. (2005). Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 214-224.
- Angert, E. R. (2012). DNA replication and genomic architecture of very large bacteria. *Annual review of microbiology*, 66, 197-212.
- Angert, E. R., & Clements, K. D. (2004). Initiation of intracellular offspring in *Epulopiscium*. *Molecular microbiology*, 51(3), 827-835.
- Angert, E. R., Clements, K. D., & Pace, N. R. (1993). The largest bacterium. *Nature*, 362, 239-241.
- Bartlett, J. M. (2004). Fluorescence in situ hybridization. *Molecular Diagnosis of Cancer: Methods and Protocols*, 77-87.
- Bresler, V., & Fishelson, L. (2003). Polyploidy and polyteny in the gigantic eubacterium *Epulopiscium fishelsoni*. *Marine biology*, 143(1), 17-21.
- Bresler, V., & Fishelson, L. (2006). Export pumps in *Epulopiscium fishelsoni*, the symbiotic giant gut bacterium in *Acanthurus nigrofuscus*. *Naturwissenschaften*, 93(4), 181-184.
- Bresler, V., Montgomery, W. L., Fishelson, L., & Pollak, P. E. (1998). Gigantism in a bacterium, *Epulopiscium fishelsoni*, correlates with complex patterns in arrangement, quantity, and segregation of DNA. *Journal of bacteriology*, 180(21), 5601-5611.
- Clements, K. D., & Bullivant, S. (1991). An unusual symbiont from the gut of surgeonfishes may be the largest known prokaryote. *Journal of bacteriology*, 173(17), 5359-5362.
- El-Hajj, Z. W., & Newman, E. B. (2015). How much territory can a single *E. coli* cell control?. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Fishelson, L. (1999). Polymorphism in gigantobacterial symbionts in the guts of surgeonfish (Acanthuridae: Teleostei). *Marine Biology*, 133(2), 345-351.
- Flint, J. F., Drzymalski, D., Montgomery, W. L., Southam, G., & Angert, E. R. (2005). Nocturnal production of endospores in natural populations of *Epulopiscium*-like surgeonfish symbionts. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7460-7470.
- Jannasch, H. W., Nelson, D. C., & Wirsen, C. O. (1989). Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* sp.) at a hydrothermal deep-sea vent site. *Nature*, 342(6251), 834-836.

- Lindsay, M. R., Webb, R. I., Strous, M., Jetten, M. S., Butler, M. K., Forde, R. J., & Fuerst, J. A. (2001). Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology*, 175(6), 413-429.
- Mendell, J. E., Clements, K. D., Choat, J. H., & Angert, E. R. (2008). Extreme polyploidy in a large bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6730-6734.
- Miller, D. A., Choat, J. H., Clements, K. D., & Angert, E. R. (2011). The spoIIE homolog of *Epulopiscium* sp. Type B is expressed early in intracellular offspring development. *Journal of bacteriology*, 193(10), 2642-2646.
- Miyake, S., Ngugi, D. K., & Stingl, U. (2015). Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. *Molecular ecology*, 24(3), 656-672.
- Miyake, S., Ngugi, D. K., & Stingl, U. (2016). Phylogenetic Diversity, Distribution, and Cophylogeny of Giant Bacteria (*Epulopiscium*) with their Surgeonfish Hosts in the Red Sea. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Robinow, C., & Angert, E. R. (1998). Nucleoids and coated vesicles of “*Epulopiscium*” spp. *Archives of microbiology*, 170(4), 227-235.
- Schulz, H. N. (2006). The genus *Thiomargarita*. In *The prokaryotes* (pp. 1156-1163). Springer New York.
- Schulz, H. N., & Jørgensen, B. B. (2001). Big bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 105-137.
- Skinner, S. O., Sepúlveda, L. A., Xu, H., & Golding, I. (2013). Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent in situ hybridization. *Nature protocols*, 8(6), 1100-1113.
- Soppa, J. (2015). Polyploidy in archaea and bacteria: About desiccation resistance, giant cell size, long-term survival, enforcement by a eukaryotic host and additional aspects. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 24(5-6), 409-419.
- Velázquez, G. L., & García, L. F. J. (1997). *Hibridacion in situ ultraestructural*. Plaza y Valdes.
- Viswanathan, V. K. (2012). Sizing up microbes. *Gut microbes*, 3(6), 483-484.
- Ward, R. J., Clements, K. D., Choat, J. H., & Angert, E. R. (2009). Cytology of terminally differentiated *Epulopiscium* mother cells. *DNA and cell biology*, 28(2), 57-64.

Capítulo 4

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S.,... & Heiss, A. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429-514.
- Andresen, N. (1955). Cytological investigations on the giant amoeba *Chaos chaos* L. *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie chimique*, 29(26), 435-555.
- Bertout, M. (1984). Ultrastructural cytochemistry of NOR in oocytes of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). *Biol. Cell*, 52(1), 35-42.
- Bolivar, I., Fahrni, J. F., Smirnov, A., & Pawlowski, J. (2001). SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Molecular Biology and Evolution*, 18(12), 2306-2314.
- Cavalier-Smith, T. (1991). Archamoebae: the ancestral eukaryotes?. *Biosystems*, 25(1), 25-38.
- Chapman-Andresen, C. I. C. I. L. Y. (1971). Biology of the large amoebae. *Annual Reviews in Microbiology*, 25(1), 27-48.
- Christiansen, R. G., & Marshall, J. M. (1965). A study of phagocytosis in the ameba *Chaos chaos*. *The Journal of cell biology*, 25(3), 443-457.

- Chudinova, E. M., Kireev, I. L., Fais, D., Gianguzza, F., Giudice, G., Morici, G. ... & Poliakov, V. Y. U. (2001). Noncanonical structural-functional organization of Núcleoli in maturing oocytes of sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Submicrosc Cytol Pathol.*, 33(3), 301-311.
- Churchill, F. B. (1989). The guts of the matter. Infusoria from Ehrenberg to Bütschli: 1838–1876. *Journal of the History of Biology*, 22(2), 189-213.
- Daniels, E. W., Breyer, E. P., & Kudo, R. R. (1966). *Pelomyxa palustris* Greeff. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 73(3), 367-383.
- Deng, Y., Marko, M., Buttle, K. F., Leith, A., Mieczkowski, M., & Mannella, C. A. (1999). Cubic membrane structure in amoeba (*Chaos carolinensis*) mitochondria determined by electron microscopic tomography. *Journal of structural biology*, 127(3), 231-239.
- Deray, A. (1979). Small ovarian follicle granulosa cells of ducks: Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*), wild ducks (*Cairina maschata*) and hybrids-Pekin male X wild female. I. Structural comparison between periods of weak ovarian activity (Winter) and strong ovarian activity (Spring). *J. Ultrastruct. Res.*, 68(2), 118.
- Edgcomb, V. P., Simpson, A. G., Zettler, L. A., Nerad, T. A., Patterson, D. J., Holder, M. E., & Sogin, M. L. (2002). Pelobionts are degenerate protists: insights from molecules and morphology. *Molecular biology and evolution*, 19(6), 978-982.
- Favard-Sereno, C. (1968). Evolution des structures nucléolaires au cours de la phase d'accroissement cytoplasmique chez le grillon (Insecte, Orthoptère). *J. Microsc.*, 7, 205-230.
- Friz, C. T. (1966). Studies of the nucleic acids of the amoeba, *Chaos chaos*. *Comptes-rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 35(11), 287.
- Géraud, M. L., Herzog, M., & Soyer-Gobillard, M. O. (1991). Núcleolar localization of rRNA coding sequences in *Prorocentrum micans* Ehr. (Dinomastigote, kingdom Protoctista) by in situ hybridization. *BioSystems*, 26(2), 6
- Goodkov, A. V., Smirnov, A. V., & Skovorodkin, I. N. (1999). Study of a rediscovered large freshwater multinucleate amoeba *Chaos illinoisense* Kudo, 1950). *Protistology*, 1(2).
- Jiménez-García, L. F., Zavala, G., Chávez-Munguía, B., del Pilar Ramos-Godínez, M., López-Velázquez, G., de Lourdes Segura-Valdez, M.,... & Ortega-Pierres, G. (2008). Identification of Núcleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.*, 38(11), 1297-1304.
- Kudo, R. R. (1931). Handbook of Protozoology. *Handbook of Protozoology*.
- Lee, L. W., Lee, C. C., Huang, C. R., & Lo, S. J. (2012). The Núcleolus of *Caenorhabditis elegans*. *BioMed Res. Int.*, 2012.
- Leidy, J. (1878). *Amoeba proteus*. *The American Naturalist*, 12(4), 235-238.
- López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M. D. L., & Jiménez-García, L. F. (2005). Electron microscopy analysis of the Núcleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.*, 11(04), 293-299.
- López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M. D. L., & Jiménez-García, L. F. (2005). Electron microscopy analysis of the Núcleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.*, 11(04), 293-299. 1-74.
- Mais, C., & Scheer, U. (2001). Molecular architecture of the amplified Núcleoli of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.*, 114(4), 709-718.
- Olive Lindsey, 1953, Structure and Behavior of fungus nuclei, *The Botanical Review*, 19:8.9 pp.439-586
- Osorio, C. G. (2007). Sobre agentes infecciosos, zoofitos, animálculos e infusorios. *Revista chilena de infectología*, 24(2), 171-174.

- Page, F. C., & BLANTON, R. L. (1985). The Heterolobosea (Sarcodina: Rhizopoda), a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistologica*, 21(1), 121-132.
- Ploton, D., & Gontcharoff, M. (1979). Ultrastructural study of the Núcleolar cycle in *Physarum polycephalum* using EDTA preferential stain for RNP (author's transl). *Exp. Cell Res.*, 118(2), 418.
- Ptáčková, E., Kostygov, A. Y., Chistyakova, L. V., Falteisek, L., Frolov, A. O., Patterson, D. J., ... & Cepicka, I. (2013). Evolution of Archamoebae: morphological and molecular evidence for pelobionts including *Rhizomastix*, *Entamoeba*, *Iodamoeba*, and *Endolimax*. *Protist*, 164(3), 380-410.
- Rice, N. E. (1945). *Pelomyxa carolinensis* (Wilson) or *Chaos chaos* (Linnaeus). *Biological Bulletin*, 88(2), 139-143.
- Richard-Mercier, N. (1979). Evolution des cellules germinales et mesodermiques des testicules larvaires du doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Int. J. Ins. Morphol. Embryol.* 8(5), 335-358.
- Romanova, I. (1985). Ultrastructure of the oocyte nucleus and cytoplasm of the mollusk *Littorina saxatilis*. 3. The structure of the Núcleolus. *Tsitologiya*, 27(4), 383.
- S. Trumtel et al., Assembly and functional organization of the Núcleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants, *Mol. Biol. Cell*, 11 (2000), pp. 2175–2189
- Thiry M1, Lamaye F, Lafontaine DL. The Núcleolus: when 2 became 3. *Nucleus*. 2011 Jul-Aug; 2(4):289-93.
- Thiry, M., & Poncin, P. (2005). Morphological changes of the Núcleolus during oogenesis in oviparous teleost fish, *Barbus barbus* (L.). *Journal of structural biology*, 152(1), 1-13.