

# PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE ALGUNAS PROTEÍNAS CITOESQUELÉTICAS EN EL MEROPLASMODIO DE UN GRUPO NUEVO DE ALGAS AMEBOIDES MARINAS DEL OCÉANO ATLÁNTICO

por

Ana Sofía Fliegner<sup>1</sup>

## Resumen

**Fliegner, A. S.:** Presencia y distribución de algunas proteínas citoesqueléticas en el meroplasmodio de un grupo nuevo de algas ameboides marinas del Océano Atlántico. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **29** (111): 219-227. 2005. ISSN 0370-3908.

Se estudia la presencia y distribución de actina, tubulina, miosina y cadherina en el meroplasmodio de un grupo nuevo de algas ameboides marinas, así como el efecto de citochalasina y colchicina sobre el transporte bidireccional de partículas en sus reticulopodios. Actina tiene apariencia granulosa, tubulina está organizada en forma de microtúbulos que irradian a partir de centros de nucleación, miosina y cadherina están presentes en el meroplasmodio. Citochalasina no afecta el transporte reticulopodial de partículas, colchicina sí lo afecta.

**Palabras clave:** Algas ameboides, meroplasmodio, reticulopodios, transporte bidireccional, citoesqueleto, inmunofluorescencia, actina, tubulina, miosina, cadherina, microfilamentos, microtúbulos, inhibidores, citochalasina, colchicina.

## Abstract

The presence and distribution of actin, tubulin, myosin and cadherin in the meroplasmodia of a new marine ameboid algal group are studied, also the effect of cytochalasin and colchicine on the bidirectional particle transport along their reticulopodia. Actin has a granular appearance, tubulin is organized in form of microtubuli which radiate from nucleation centers, myosin and cadherin are also present in the meroplasmodia. Cytochalasin does not affect the reticulopodial movement of particles, colchicine does affect it.

**Key words:** Ameboid algae, meroplasmodium, reticulopodia, bidirectional transport, cytoskeleton, immunofluorescence, actin, tubulin, myosin, cadherin, microfilaments, microtubuli, inhibitors, cytochalasin, colchicine.

## Introducción

Filopodios, axopodios, lamelipodios y lobopodios son elevaciones o levantamientos de la superficie celular (Grell, 1994) implicados en el movimiento y locomoción de organismos eucariotas unicelulares (Westheide & Rieger, 1996). Los filopodios son largos y delgados, los axopodios son rígidos y con disposición radial, los lamelipodios son ensanchamientos en forma de hoja y los lobopodios en forma lobular (Westheide & Rieger, 1996). Los reticulopodios son apéndices de los protistas que se diferencian de los filopodios, axopodios, lamelipodios y lobopodios en que no son elevaciones aisladas, sino que forman uniones anastomosantes entre ellos y permanecen unidos formando una red tridimensional (Grell, 1994). La formación de células ameboides unidas entre sí por medio de una red tridimensional de reticulopodios es una característica que comparten varios géneros de algas y es denominada meroplasmodio (Grell, 1990a) (Figura 1). En el meroplasmodio los cuerpos celulares principales mantienen su independencia y se separan después de la división celular, a pesar de estar unidos por reticulopodios. Las algas ameboides son amebas con plastos fotosintéticamente activos, los cuales se cree fueron inicialmente algas unicelulares libres, que fueron fagocitadas e integradas en procesos endocitobióticos (Hibberd & Norris, 1984; McFadden *et al.*, 1994; Gilson & McFadden, 1996; Van de Peer *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1997; Schnetter, 2000; Fliegner, 2004). Existen géneros algales ameboides tanto de agua dulce (Bourrelly, 1968; Kristiansen & Preisig, 2001) como también marinos. Dentro de las algas ameboides marinas que forman un meroplasmodio en alguna de las fases de su ciclo de vida se encuentran las especies *Chlorarachnion reptans* Geitler (Geitler, 1930; Hibberd & Norris, 1984), *Lotharella amoebiformis* Ishida (Ishida *et al.*, 2000) y *Lotharella polymorpha* Dietz, Ehlers, Wilhelm, Gil-Rodríguez & Schnetter (Dietz *et al.*, 2003), todas ellas pertenecientes al phylum Chlorarachniophyta. Otras especies de algas ameboides marinas que forman un meroplasmodio son *Reticulosphaera socialis* Grell (Grell, 1989a; 1989b; Grell *et al.*, 1990) y *Reticulosphaera japonensis* Grell (Grell, 1990b), las dos únicas del género *Reticulosphaera* hasta ahora conocidas. El género *Reticulosphaera* ha sido atribuido a los phyla Heterokontophyta (Grell, 1989a) y Haptophyta (Cavalier-Smith *et al.*, 1996). El meroplasmodio desempeña un papel esencial en el transporte intercelular de partículas (Grell, 1989a; 1989b; 1990a; 1990b; 1994). En él quedan atrapadas células algales, bacterias y otros organismos, los cuales pueden ser digeridos en el mismo lugar de la captura (Grell, 1989a; 1989b; 1990a; 1990b; 1994; Dietz & Schnetter, 1996; Zamora & Schnetter, 2002) o transportados en el interior

de los reticulopodios hasta los cuerpos celulares principales. Las cepas de algas ameboides aquí estudiadas forman un meroplasmodio y tienen un sorprendente parecido con los representantes del género *Reticulosphaera* en cuanto a su morfología, reproducción vegetativa y composición de pigmentos fotosintéticos (Grell *et al.*, 1990; Sieber, 1995; Kinkel, 1996; Fliegner, 2004). Todas las cepas aquí estudiadas presentan meroplasmodios formados por células ameboides sésiles rodeadas por una lorica, a través de la cual se extienden los reticulopodios; amebas migratorias que pueden mantener el contacto con el meroplasmodio por medio de sus filopodios o bien desplazarse libremente sobre el sustrato y estadios flotantes libres que parecen heliozoos (Fliegner, 2004). Estos tipos celulares también se presentan en el ciclo de vida de las especies del género *Reticulosphaera* (Grell, 1989a; 1989b; 1990b; Grell *et al.*, 1990). En ambos casos se trata de organismos mixótrofos, que llevan a cabo fotosíntesis y pueden alimentarse en forma heterótrofa de otras células algales y bacterias (Grell, 1989a; 1989b; 1990b; Grell *et al.*, 1990; Schnetter, 2000; Fliegner, 2004). Las principales diferencias consisten en que el grupo de algas ameboides estudiadas presenta cloroplastos con pirenoides prominentes orientados hacia el interior de la célula y sus células carecen de flagelos (Fliegner, 2004), mientras que los cloroplastos de las especies del género *Reticulosphaera* no tienen pirenoides y sus estadios celulares flotantes poseen dos flagelos heteromorfos, además de presentar tricomas tubulares en la superficie celular en cercanía de los mismos (Grell *et al.*, 1990). El grupo de algas ameboides aquí estudiadas constituye aparentemente un nuevo grupo taxonómico.

Estudios de inmunofluorescencia han demostrado la presencia de proteínas citoesqueléticas como actina, tubulina, miosina y cadherina en el meroplasmodio de algunas algas ameboides (Dietz, 1996, 1997; Fliegner, 2004).

En el presente estudio se investigan la presencia y distribución de actina, tubulina, miosina y cadherina en el meroplasmodio de un grupo aún no descrito de algas ameboides marinas del Océano Atlántico, así como el efecto de inhibidores de la polimerización de los microfilamentos (citochalasina D) y los microtúbulos citoplasmáticos (colchicina) sobre el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios de estos organismos.

## Materiales y métodos

### A. Recolección y aislamiento de los organismos

Muestras de sustrato del sublitoral superior con agua marina fueron tomadas en Rocky Cay, Isla San Andrés,

Colombia (13°00' N, 81°30' W) y en Nordeste, Isla São Miguel, Portugal (37°50' N, 25°30' W), como lo describen **Zamora & Schnetter** (2002). En estas muestras se detectaron y aislaron cuatro cepas de algas ameboides, como lo describe **Fliegner** (2004): Dos provenientes de Rocky Cay, las cuales se denominaron San Andrés F1 y San Andrés C1 y dos del Nordeste, las cuales fueron llamadas Nordeste Piscina y Nordeste.

La recolección de las muestras, la detección y el aislamiento de los organismos de este estudio fueron realizados por el profesor Dr. R. Schnetter, Instituto de Botánica, Universidad Justus Liebig, Giessen.

### B. Cultivos celulares

Las algas ameboides fueron cultivadas en cajas de petri plásticas y estériles y en cajas réplica (plásticas y estériles) en cuyo fondo se pusieron cubreobjetos de vidrio. Como medio de cultivo se utilizó agua marina (salinidad 32,8-33 ‰) proveniente de Asturias, España, la cual fue previamente filtrada, pasteurizada y enriquecida con una solución nutritiva (**Tabla 1**) como lo describe **Fliegner** (2004). Los cultivos celulares se mantuvieron bajo las condiciones de laboratorio descritas por **Beutlich & Schnetter** (1987). Las cepas de algas ameboides aquí estudiadas no fueron cultivadas de forma unialgal, otras células algales al igual que algunas bacterias estuvieron presentes en los cultivos.

### C. Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron organismos previamente cultivados sobre cubreobjetos de vidrio. La preparación se hizo aproximadamente a 20°C,

colocando los cubreobjetos (con el lado en donde crecieron los organismos hacia arriba) sobre portaobjetos de vidrio organizados en cámaras húmedas. Para la visualización de las proteínas actina, tubulina, miosina y cadherina se fijaron los organismos durante 20 minutos en una solución de formaldehído al 2% (w/v), glutaraldehído al 2,5% (v/v) y 3M NaCl en agua marina. Después de la fijación se adicionó Triton X-100 al 0,5% (v/v) en la solución tampón descrita por **La Claire** (1987) durante 5 minutos, para permeabilizar las células (**Dietz & Schnetter**, 1996). Posteriormente se agregó NaBH<sub>4</sub> (5,3 x 10<sup>-2</sup>M) en una solución tampón salina de fosfato ("phosphate buffered saline" o PBS) previamente preparada como lo describe **La Claire** (1987) durante otros 5 minutos, con el fin de reducir los aldehídos libres (**La Claire**, 1987). Finalmente se bañaron los cubreobjetos en una solución de suero de albúmina bovina (BSA) al 5% (w/v) en PBS, con el fin de evitar uniones no específicas del anticuerpo (**Worth et al.**, 2001). Las soluciones fueron adicionadas mediante pipetas de vidrio, asegurándose de que cubrieran por completo los cubreobjetos.

La incubación se llevó a cabo durante un mínimo de 4 horas con aproximadamente 50 ml por cubreobjeto de los siguientes anticuerpos primarios, previamente diluidos en PBS y adicionados con micropipetas:

Anti-actina monoclonal, Amersham, Braunschweig, RFA, código 350 en dilución 1: 1000; anti-a-tubulina monoclonal, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA, código T-5168 en dilución 1: 2000; anti-miosina (músculo esquelético y liso), Sigma, Saint Louis, Missouri, USA, código M-7648 en dilución 1: 10; anti-pan-cadherina, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA, código C-3678 en dilución 1: 100.

**Tabla 1.** Solución nutritiva según Von Stosch, modificada (ver **Schnetter et al.**, 1984)

Sustancia	Solución inicial (mg /100 ml agua destilada)	ml de solución inicial / 1 l agua marina	Concentración final (Mol / l)
NaNO <sub>3</sub>	4250,00	1,00	500
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	1075,00	1,00	30
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,80	1,00	1
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	37,20	10,00	10
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9,30	0,10	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	24,20	0,10	0,1
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,70	0,10	0,1
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,96	1,00	0,1
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	26,30	1,00	1
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	33,00	0,02	0,02
TeO <sub>2</sub>	17,00	0,02	0,002
KJ	16,30	1,00	1

La incubación con los respectivos anticuerpos secundarios se llevó a cabo en la oscuridad, durante un mínimo de 15 horas con aproximadamente 50 ml por cubreobjeto de los siguientes anticuerpos secundarios, diluïdos en PBS:

Anti-Mouse IgG conjugado con FITC (isotiocianato de fluoreseina) (Amersham, código N-1031) en dilución 1:50; anti-Rabbit IgG conjugado con FITC (Sigma, código F-4151) en dilución 1:160.

Después de un baño final en PBS (3 x 10 minutos) los cubreobjetos fueron montados sobre DABCO (trietilendiamina) disuelto en PBS y sellados con esmalte transparente para uñas.

Para los ensayos control se realizó el mismo procedimiento y en vez del anticuerpo primario se utilizó únicamente PBS.

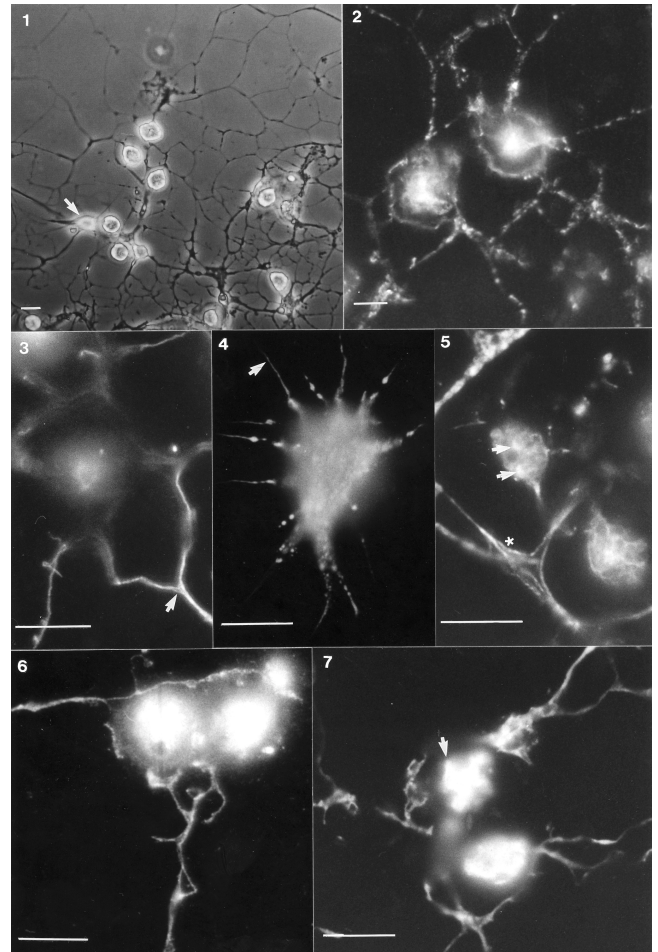
#### D. Inhibidores

Citochalasina D (Sigma, código C-8273) fue adicionada a cultivos en concentraciones finales de 5 y 10 µg/ml de agua marina, a partir de una solución inicial de concentración 1000 µg citochalasina D/ml de etanol al 98%. Colchicina (Sigma, código C-9754) en concentraciones 1, 3 y 8 mM en agua marina fue adicionada a cultivos en cajas de petri. Para los ensayos con inhibidores se cultivaron los organismos en cajas de petri a las cuales se les había realizado previamente una perforación circular en el centro a las dos tapas y el plástico en este lugar había sido reemplazado por un cubreobjeto de vidrio adherido con silicona. De esta forma se logró que el paso de la luz a través de las cajas de Petri estuviera adaptado a las características ópticas del objetivo para contraste de fase Zeiss Neofluar 40/0,75 Ph 2.

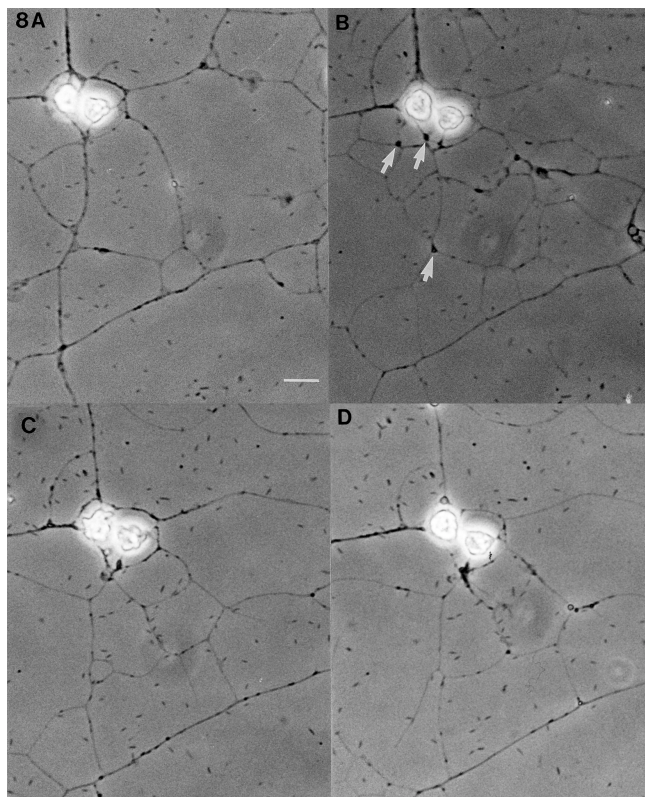
#### E. Equipos ópticos y documentación

Las muestras de los ensayos de inmunofluorescencia fueron examinadas con un microscopio Leitz Diaplan para fluorescencia, equipado con una lámpara de xenón Osram XBO 75 W/2, objetivos para uso con aceite de inmersión Leitz NPL Fluotar 40/1,30 (Fluoreszenz), Leitz NPL Fluotar 100/1,32, Leitz PL Fluotar 100/1,32 Phaco 3 y un filtro Leitz L3 (excitación 450 – 490 nm, dicróico 510 nm, emisión 505 – 545 nm). Las microfotografías fueron tomadas con un fotoautomático Wild MPS 46/52 y películas fotográficas Kodak T-Max 400.

Las cajas de petri de los ensayos con inhibidores fueron examinadas con un microscopio invertido Olympus, equipado para este fin con un objetivo para contraste de fase Zeiss Neofluar 40/0,75 Ph 2 y una placa corredera



**Figuras 1.** Meroplasmodio de la cepa Nordeste Piscina. Los cuerpos celulares principales de las amebas sésiles están unidos entre sí por medio de la red reticulopodial. Ameba migratoria (→). Escala = 10 µm. **2.** Marcación con los anticuerpos anti-actina y anti-mouse IgG conjugado con FITC, excitación con luz azul. Distribución granulosa de la actina en el meroplasmodio de la cepa San Andrés C1. Escala = 10 µm. **3.** Marcación con los anticuerpos anti-actina y anti-mouse IgG conjugado con FITC, excitación con luz azul. Microfilamentos (→) en los puntos de ramificación de los reticulopodios de la cepa San Andrés F1. Escala = 10 µm. **4.** Marcación con los anticuerpos anti-actina y anti-mouse IgG conjugado con FITC, excitación con luz azul. Distribución de la actina llega hasta las puntas de los filopodios (→) de las amebas migratorias de la cepa San Andrés C1. Escala = 10 µm. **5.** Marcación con los anticuerpos anti-a-tubulina y anti-mouse IgG conjugado con FITC, excitación con luz azul. Distribución longitudinal de los microtúbulos a lo largo de los reticulopodios de la cepa San Andrés F1. Haces de microtúbulos (\*) en los puntos de ramificación de los reticulopodios y centros de nucleación o MTOCs (→) cercanos al núcleo, en el interior de los cuerpos celulares principales. Escala = 10 µm. **6.** Marcación con los anticuerpos anti-miosina y anti-mouse IgG conjugado con FITC, excitación con luz azul. Miosina se encuentra presente en los cuerpos celulares principales y reticulopodios del meroplasmodio de la cepa Nordeste Piscina. Escala = 10 µm. **7.** Marcación con los anticuerpos anti-pan-cadherina y anti-rabbit IgG conjugado con FITC, excitación con luz azul. Cadherina se encuentra presente en los reticulopodios y cuerpos celulares principales de la cepa Nordeste Piscina, en donde forma agrupaciones lobulares (→). Escala = 10 µm.



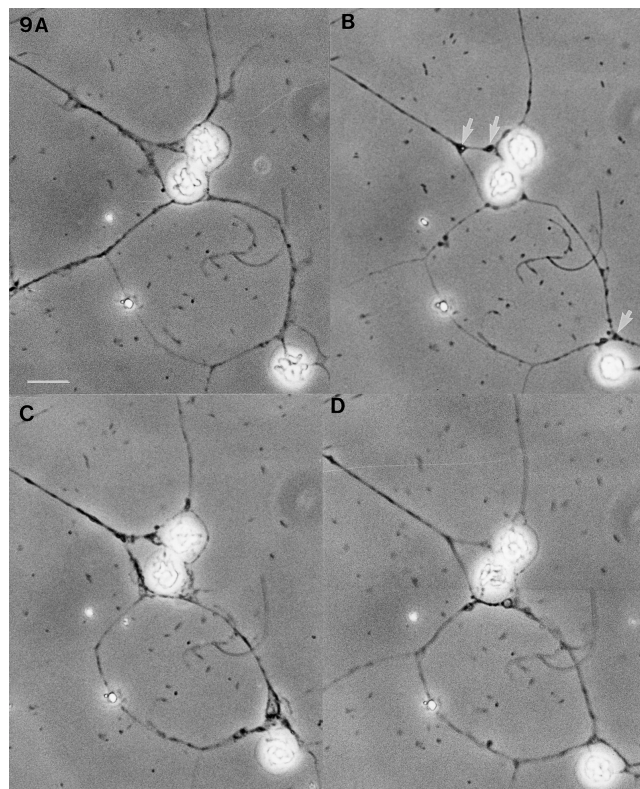
**Figura 8.** Efecto de citochalasina D (5 mg/ml agua marina) sobre el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios de la cepa Nordeste Piscina. **A.** Tiempo 0: 00 h; justo antes de la adición del inhibidor. **B.** Tiempo 1: 00 h; formación de algunos engrosamientos o acumulaciones de partículas (→) en los puntos de ramificación de los reticulopodios. **C.** Tiempo 3: 30 h; justo antes del reemplazo del inhibidor por agua marina. **D.** Tiempo 4: 30 h; acumulaciones de partículas a lo largo de los reticulopodios tienden a deshacerse, transporte reticulopodial transcurre normalmente. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

con un anillo de luz ajustado para contraste de fase. Las microfotografías fueron tomadas con una cámara Olympus OM-2 y películas fotográficas AGFA Agfapan APX 100.

## Resultados

Los ensayos control (sin el anticuerpo primario) no mostraron fluorescencia, por lo tanto se consideraron específicas las uniones de los anticuerpos. Las proteínas actina,  $\alpha$ -tubulina, miosina y cadherina estuvieron presentes en el meroplasmodio de las cuatro cepas de algas ameboides estudiadas.

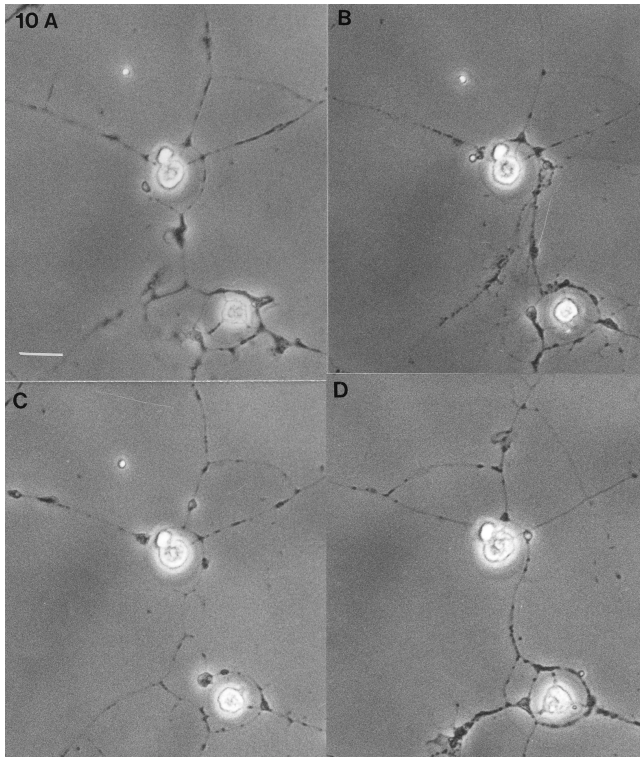
La apariencia de la actina fue granulosa (**Figura 2**), en algunos casos se observaron microfilamentos en los puntos de ramificación de los reticulopodios (**Figura 3**). La



**Figura 9.** Efecto de citochalasina D (10 mg/ml agua marina) sobre el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios de la cepa Nordeste Piscina. **A.** Tiempo 0: 00 h; justo antes de la adición del inhibidor. **B.** Tiempo 0: 30 h; transporte reticulopodial de partículas no es afectado por el inhibidor, formación de algunos engrosamientos o acumulaciones de partículas (→) en los puntos de ramificación de los reticulopodios. **C.** Tiempo 3: 00 h; justo antes del reemplazo del inhibidor por agua marina. **D.** Tiempo 4: 30 h; acumulaciones de partículas a lo largo de los reticulopodios tienden a deshacerse. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

distribución de actina llegó inclusive hasta las puntas de los filopodios de las células ameboides migratorias (**Figura 4**). Tubulina estuvo organizada en forma de microtúbulos, los cuales se orientaron longitudinalmente a lo largo de los reticulopodios (**Figura 5**). En los puntos de ramificación de los reticulopodios fueron visibles haces de microtúbulos (**Figura 5**). Los microtúbulos irradiaron a partir de centros de nucleación (**Figura 5**), localizados en el interior de los cuerpos celulares principales, cerca del núcleo. La miosina estuvo presente a lo largo de los reticulopodios y en interior de los cuerpos celulares principales (**Figura 6**).

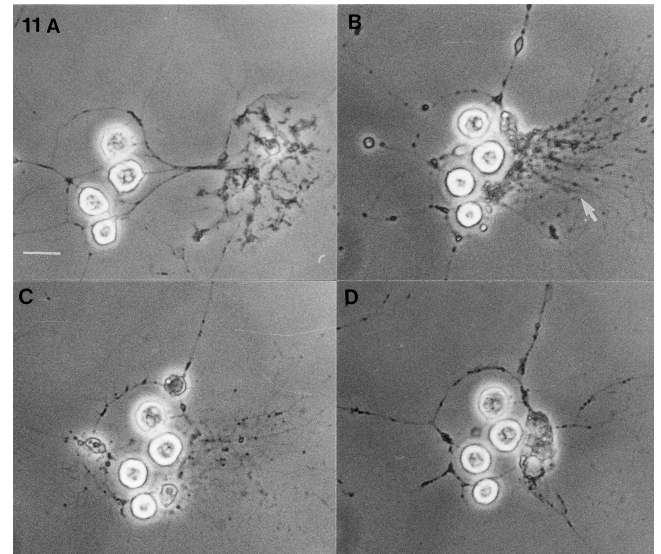
La cadherina presentó una fluorescencia intensa en el interior de los cuerpos celulares principales, donde fueron visibles agrupaciones de forma lobular (**Figura 7**).



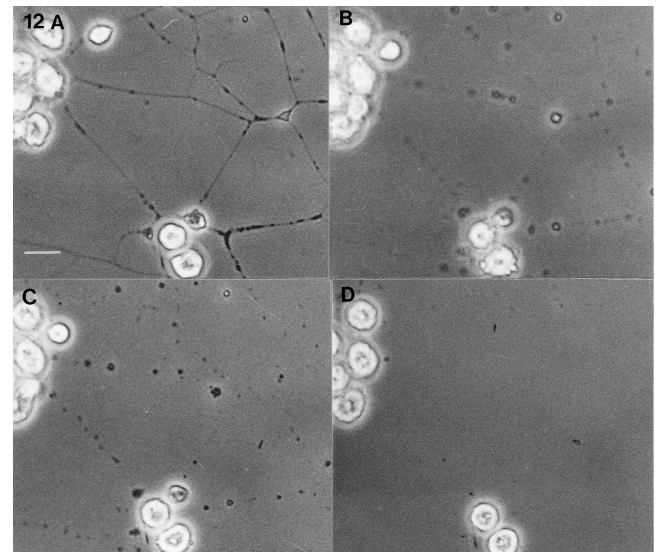
**Figura 10.** Efecto de colchicina (1 mM en agua marina) sobre el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios de la cepa Nordeste Piscina. **A.** Tiempo 0: 00 h; justo antes de la adición del inhibidor. **B.** Tiempo 0: 05 h; transporte reticulopodial de partículas se hace más lento en comparación con **A.** **C.** Tiempo 0: 30 h; transporte reticulopodial de partículas se ha detenido; permanece así hasta antes del reemplazo del inhibidor por agua marina. **D.** Tiempo 3: 40 h; transporte reticulopodial de partículas se ha reanudado. Escala = 10 µm.

La citochalacina D no tuvo influencia sobre el transporte bidireccional de partículas a lo largo de los reticulopodios en concentraciones de 5 µg/ml de agua marina durante 4½ horas (**Figura 8A, B, C, D, E, F**) y 10 mg/ml de agua marina durante 6½ horas (**Figura 9A, B, C, D, E, F**). La formación de engrosamientos a lo largo de los reticulopodios durante el tiempo de incubación con el inhibidor en ambas concentraciones fue totalmente reversible al sustituir el inhibidor por agua marina.

La colchicina si tuvo influencia sobre el transporte bidireccional de partículas a lo largo de los reticulopodios. En concentración 1 mM causó inicialmente una disminución en la velocidad del transporte, hasta detenerlo totalmente después de ½ hora de incubación. El transporte bidireccional de partículas a lo largo de los reticulopodios fue reanudado al sustituir el inhibidor por agua marina (**Figura 10A, B, C, D, E, F**). En concentra-



**Figura 11.** Efecto de colchicina (3 mM en agua marina) sobre el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios de la cepa Nordeste Piscina. **A.** Tiempo 0: 00 h; justo antes de la adición del inhibidor. **B.** Tiempo 0: 05 h; transporte reticulopodial de partículas se ha detenido, han desaparecido las extensiones citoplasmáticas (→)comparar con **A**) en las puntas de los reticulopodios. **C.** Tiempo 1: 00 h; red reticulopodial ha desaparecido casi por completo, justo antes del reemplazo del inhibidor por agua marina. **D.** Tiempo 2: 00 h; transporte reticulopodial de partículas se ha normalizado y se han formado nuevas conexiones reticulopodiales. Escala = 10 µm.



**Figura 12.** Efecto de colchicina (8 mM en agua marina) sobre el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios de la cepa Nordeste Piscina. **A.** Tiempo 0: 00 h; justo antes de la adición del inhibidor. **B.** Tiempo 0: 05 h; destrucción de la red reticulopodial. **C.** Tiempo 0: 30 h; justo antes del reemplazo del inhibidor por agua marina. **D.** Tiempo 1: 30 h; red reticulopodial no logra reestablecerse. Escala = 10 µm.

ción 3 mM causó un cese del transporte inmediatamente después de la aplicación del inhibidor y una destrucción de reticulopodios. Estos efectos fueron reversibles, al sustituir el inhibidor por agua marina (**Figura 11A, B, C, D**). En concentración 8 mM causó un cese inmediato del transporte después de la aplicación del inhibidor, así como la destrucción de la red reticulopodial. Estos efectos no fueron reversibles al sustituir el inhibidor por agua marina (**Figura 12A, B, C, D**).

## Discusión

En el meroplasmodio del grupo de algas ameboides estudiadas se encuentran presentes las proteínas citoesqueléticas actina,  $\alpha$ -tubulina, miosina y cadherina, características de los organismos eucarióticos. Hoy en día se sabe que los movimientos protoplasmáticos de las células ameboides tienen su origen en un sistema de contracción cuya base molecular son la actina y la miosina (**Grell, 1994; Stossel, 1994; Westheide & Rieger, 1996**). Este sistema permite movimientos de contracción en organismos como las amebas, los hongos mucilaginosos y células de los animales vertebrados (**Grell, 1994**). Son pocos los conocimientos existentes acerca del citoesqueleto de las algas ameboides. **Hibberd & Norris (1984)** observaron elementos microtubulares a nivel ultraestructural en *Chlorarachnion reptans*, **Dietz & Schnetter (1996)** establecieron algunas características estructurales del citoesqueleto en los filopodios de *Cryptochlora perforans* Calderón-Saenz & Schnetter, especie del phylum Chlorarachniophyta que no forma meroplasmodio (**Calderón-Sáenz & Schnetter, 1987; 1989**), en el cual la distribución de actina y los microtúbulos no es paralela. La actina presenta una distribución granulosa y se observan escasos microfilamentos, mientras que los microtúbulos están organizados longitudinalmente a lo largo de los filopodios. Estos resultados son similares a la distribución de la actina y los microtubulos observada en los reticulopodios de *Reticulosphaera socialis* (**Grell et al., 1990**) y en los del grupo de algas ameboides estudiadas. Una clara diferencia consiste en que los microtúbulos de este grupo de algas y los de *Reticulosphaera socialis* (**Grell et al., 1990**) irradian a partir de centros de nucleación en el interior de los cuerpos celulares principales, mientras que en *Cryptochlora perforans* no se observan estos centros de nucleación (**Dietz & Schnetter, 1996**). Estos centros son también conocidos como MTOCs o “microtubule organizing centers” (**Kleinig & Sitte, 1992**) y son responsables del número, localización y orientación de los microtúbulos citoplasmáticos (**Alberts et al., 1998**). Se encuentran presentes en la mayoría de células animales (**Wolf & Boehm, 1997; Mogensen et al.,**

2000), en donde son llamados centrosomas y se componen de un par de centriolos y material pericentriolar (**Mogensen et al., 2000**). En células vegetales se encuentran centrosomas sólo en algunas gimnospermas y algas verdes (**Sitte et al., 1998**). En células neuronales se ha identificado que los haces longitudinales de microtúbulos a lo largo de los axones sirven como “carril” para las proteínas motoras, las cuales transportan distintas moléculas entre los cuerpos celulares y las porciones distales de las neuronas (**Keating & Borisy, 1999**). Un mecanismo similar podría funcionar en el transporte bidireccional de partículas en los reticulopodios del grupo de algas ameboides aquí estudiadas. La miosina, también presente en el meroplasmodio, podría desempeñar un papel no sólo en la movilización de distintas moléculas a lo largo de los reticulopodios, sino también en el elongamiento de los mismos. En células neuronales se ha logrado demostrar que microfilamentos y distintos tipos de miosina son responsables del crecimiento de las puntas de los axones (**Mitchison & Kirschner, 1988**). Las cadherinas pertenecen a un grupo de proteínas transmembranales que están implicadas en procesos morfogenéticos y en la adhesión intercelular en tejidos (**Boggon et al., 2002**). Se encuentran presentes en zonas especiales de contacto intercelular o entre la membrana plasmática y la matriz extracelular (**Geiger et al., 1985; Takeichi, 1988**). Una de sus características es que forman uniones estables con microfilamentos (**Geiger et al., 1987**). La presencia de cadherina en el meroplasmodio del grupo de algas ameboides estudiadas se puede relacionar con la formación de uniones anastomoseantes entre los reticulopodios y también con la adhesión del meroplasmodio al sustrato. El hecho de que la citochalasinina no afecte el transporte reticulopodial de partículas en el grupo de algas ameboides estudiadas es similar a los resultados obtenidos por **Dietz & Schnetter (1996)** en los filopodios de *Cryptochlora perforans* con el mismo inhibidor. Observaciones semejantes fueron hechas para el foraminífero *Allogromia laticollaris* por **Travis & Bowser (1986a)**. Ellos observaron que los reticulopodios de *Allogromia* perdían su adhesión al sustrato con la adición de citochalasinina 0,01M, sin embargo el transporte de partículas a través de los mismos no se veía afectado y los efectos del inhibidor eran reversibles al sustituirlo por medio de cultivo. La detención del transporte reticulopodial por la adición de colchicina ha sido observado no sólo para el grupo de algas ameboides estudiadas, sino también para *Allogromia laticollaris* (**Travis & Bowser, 1986a**), *Astrammia rara* (**Bowser et al., 1992**) y los filopodios de *Cryptochlora perforans* (**Dietz & Schnetter, 1996**). El hecho de que el transporte reticulopodial de partículas sea afectado por colchicina, más no por citochalasinina, en el grupo de algas

ameboides estudiadas, sugiere que éste podría ser dependiente del citoesqueleto microtubular, como ocurre en *Allogromia laticollaris* (Travis & Bowser, 1986a; 1986b) y *Astrammia rara* (Bowser *et al.*, 1992).

### Agradecimientos

Agradezco especialmente al profesor Dr. Reinhard Schnetter, Universidad Justus Liebig, Giessen, por sus comentarios e interés en este trabajo. Las muestras de sustrato provenientes de San Andrés, Colombia, fueron exportadas al Instituto de Botánica de la Universidad Justus Liebig, Giessen, con el permiso número 0069 del Ministerio del Medio Ambiente de Colombia (Bogotá, 29 de Agosto de 2001).

Los resultados de esta investigación hacen parte de la tesis doctoral de Ana Sofía Fliegner (2004).

### Bibliografía

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & P. Walter. 1998. Essential cell biology. An introduction to the molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc., New York.
- Beutlich, A. & R. Schnetter. 1993. The life cycle of *Cryptochlora perforans* (Chlorarachniophyta). *Botanica Acta* **106**: 441-447.
- Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M. & L. Shapiro. 2002. C-Cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**: 1308-1313.
- Bourrelly, P. 1968. Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome II: Les Algues jaunes et brunes, Chrysophycées, Phéophycées, Xantophycées et Diatomées. Éditions N. Boubée & Cie, Paris.
- Bowser, S. S., Alexander, S. P., Stockton, W. L. & T. E. DeLaca. 1992. Extracellular matrix arguments mechanical properties in the carnivorous foraminiferan *Astrammia rara*: Role in prey capture. *Journal of Protozoology* **39**: 724-732.
- Calderón-Sáenz, E. & R. Schnetter. 1987. *Cryptochlora perforans*, a new genus and species of algae (Chlorarachniophyta), capable of penetrating dead algal filaments. *Plant Systematics and Evolution* **158**: 69-71.
- Calderón-Sáenz, E. & R. Schnetter. 1989. Morphology, biology, and systematics of *Cryptochlora perforans* (Chlorarachniophyta), a phagotrophic marine alga. *Plant Systematics and Evolution* **163**: 165-176.
- Cavalier-Smith, T., Allsopp, M. T. E. P., Haeuber, M. M., Rensing, S. A., Gothe, G., Chao, E. E., Couch, J. A. & U-G. Maier. 1996. Chrombionte phylogeny: The enigmatic alga *Reticulosphaera japonensis* is an aberrant haptophyte, not a heterokont. *European Journal of Phycology* **31**: 255-263.
- Dietz, C. 1997. Vergleichende Immunfluoreszenzuntersuchungen ueber das Cytoskelett von *Cryptochlora perforans* (Chlorarachniophyta), anderer amoeboider Algen und *Labyrinthula spec.* (Myxomycota). Inaugural-Dissertation, Fachbereich Biologie, Justus Liebig-Universitaet, Giessen.
- Dietz, C. & R. Schnetter. 1996. Arrangement of F-actin and microtubules in the pseudopodia of *Cryptochlora perforans* (Chlorarachniophyta). *Protoplasma* **193**: 82-90.
- Dietz, C., Ehlers, K., Wilhelm, C., Gil-Rodríguez, M. C. & R. Schnetter. 2003. *Lotharella polymorpha* sp. nov. (Chlorarachniophyta) from the coast of Portugal. *Phycologia* **42**: 582-593.
- Fliegner, A. S. 2004. Morphologie, Ultrastruktur und Cytoskelettproteine einiger mariner amoeboider Algen aus dem Atlantik. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Biologie, Justus Liebig-Universitaet, Giessen.
- Geiger, B., Volk, T. & T. Volberg. 1985. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *Journal of Cell Biology* **101**: 1523-1531.
- Geiger, B., Volk, T., Volberg, T. & R. Bendori. 1997. Molecular interactions in adherens-type contacts. *Journal of Cell Science (Supplement)* **8**: 251-272.
- Geitler, L. 1930. Ein gruenes Filarplasmodium und andere neue Protisten. *Archiv fuer Protistenkunde* **69**: 615-637.
- Gilson, P. R. & G. I. McFadden. 1996. The miniaturized nuclear genome of a eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliceosomal introns. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**: 7737-7742.
- Grell, K. G. 1989a. *Reticulosphaera socialis* n. gen., n. sp., ein plasmodialer und phagotropher Vertreter der heterokonten Algen. *Zeitschrift fuer Naturforschung* **44c**: 330-332.
- Grell, K. G. 1989b. The life cycle of the marine protist *Reticulosphaera socialis* Grell. *Archiv fuer Protistenkunde* **137**: 177-197.
- Grell, K. G. 1990a. Anzeichen sexueller Fortpflanzung bei dem plasmodialen Protisten *Chlorarachnion reptans* Geitler. *Zeitschrift fuer Naturforschung* **45c**: 112-114.
- Grell, K. G. 1990b. *Reticulosphaera japonensis* n. sp. (Heterokontophyta) from tide pools of the Japanese coast. *Archiv fuer Protistenkunde* **138**: 257-269.
- Grell, K. G. 1994. Reticulopodien. *Biologie in unserer Zeit* **24** (5): 267-272.
- Grell, K. G., Heini, A. & S. Schüller. 1990. The ultrastructure of *Reticulosphaera socialis* Grell (Heterokontophyta). *European Journal of Protistology* **26**: 37-54.
- Hibberd, D. J. & R. E. Norris. 1984. Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *Journal of Phycology* **20**: 310-330.
- Ishida, K., Cao, Y., Hasegawa, M., Okada, N. & Y. Hara. 1997. The origin of chlorarachniophyte plastids, as inferred from phylogenetic comparisons of amino acid sequences of EF-Tu. *Journal of Molecular Evolution* **45**: 682-687.
- Ishida, K., Ishida, N. & Y. Hara. 2000. *Lotharella amoebiformis* sp. nov.: A new species of chlorarachniophytes from Japan. *Phycological Research* **48**: 221-229.



- Keating, T. J. & G. G. Borisy.** 1999. Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biology of the Cell* **91**: 321-329.
- Kinkel, H.** 1996. Kultivierung und Charakterisierung einer neuen Mikroalge mit amoeboiden Stadien von der karibischen Kueste Kolumbiens. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Justus-Liebig-Universitaet, Giessen.
- Kleinig, H. & P. Sitte.** 1992. Zellbiologie: Ein Lehrbuch. 3., neubearbeitete Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Kristiansen, J & H. R. Preisig (Eds.).** 2001. Encyclopedia of Chrysophyte Genera. J. Cramer Verlag, Berlin.
- La Claire, J. W.** 1987. Microtubule cytoskeleton in intact and wounded coenocytic green algae. *Planta* **171**: 30-42.
- McFadden, G. I., Gilson, P. R., Hofmann, C. J. B., Adcock, G. J. & U-G. Maier.** 1994. Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**: 3690-3694.
- Mitchison, T. & M. Kirschner.** 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**: 761-772.
- Mogensen, M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V. & M. Bornens.** 2000. Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non centrosomal sites: The role of ninein. *Journal of Cell Science* **113**: 3013-3023.
- Schnetter, R., Ruckelshausen, U. & G. Seibold.** 1984. Mikrospektrophotometrische Untersuchungen ueber den Entwicklungszyklus von *Ernodesmis verticillata* (Kuetzing) Boergesen (Siphonocladales, Chlorophyceae). *Cryptogamie, Algologie* **5**: 73-78.
- Schnetter, R.** 2000. Los animales se convirtieron en plantas: El ejemplo de las algas ameboides. En: *Memorias 1er Congreso Colombiano de Botánica*, Abril 26-30, 1999, Santafé de Bogotá, Colombia (Ed. por J. Aguirre C.). Instituto de Ciencias Naturales, Santafé de Bogotá. (CD-ROM) (ISBN: 958-8051-84-3).
- Sieber, T. K.** 1995. Charakterisierung einer Filarplasmodien bildenden marinen Alge von Teneriffa. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Justus-Liebig-Universitaet, Giessen.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. & A. Bresinsky.** 1998. Strassburger, Lehrbuch der Botanik. 34. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Stossel, T. P.** 1994. Der Kriechmechanismus von Zellen. *Spektrum der Wissenschaft* **11**: 42-49.
- Takeichi, M.** 1988. The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**: 639-655.
- Travis, J. L. & S. S. Bowser.** 1986a. A new model of reticulopodial motility and shape: Evidence for a microtubule-based motor and an actin skeleton. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **6**: 2-14.
- Travis, J. L. & S. S. Bowser.** 1986b. Microtubule-dependent reticulopodial motility: Is there a role for actin? *Cell Motility and the Cytoskeleton* **6**: 146-152.
- Van de Peer, Y., Rensing, S. A., Maier, U-G. & R. de Wachter.** 1996. Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniphyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**: 7732-7736.
- Westheide, W. & R. Rieger (Eds.).** 1996. Spezielle Zoologie, erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Wolf, K.W. & K. J. Boehm.** 1997. Organization von Mikrotubuli in der Zelle. *Biologie in unserer Zeit* **27**: 87-95.
- Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, F. & G. R. Campbell.** 2001. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **49**: 130-145.
- Zamora, A. S. & R. Schnetter.** 2002. *Chlorarachnion reptans*: Primer registro para la Costa Atlántica colombiana. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **26** (101): 477-480.

Recibido el 26 de marzo de 2004

Aceptado para su publicación el 23 de febrero de 2005

