



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Facultad de Ciencias

**“Estudio de la mitosis de raíces
de cebolla (*Allium cepa*)
con Microscopía de Fuerza Atómica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

Presenta:

Sarai de Jesús Cruz Gómez

Director de Tesis:

Dr. Luis Felipe Jiménez García



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado	
Formato	Datos
1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Cruz Gómez Sarai de Jesús 57 58 74 45 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 096251090
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dr Luis Felipe Jiménez García
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dra Guadalupe Trinida Zavala Padilla
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 M en C Ernestina Ubaldo Pérez
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 M en C Martha Ofelia Salcedo Álvarez
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Dra María de Lourdes Segura Valdez
7. Datos del trabajo escrito. Título Subtítulo Número de páginas Año	7. Datos del trabajo escrito. Estudio de la mitosis de raíces de cebolla (<i>Allium cepa</i>) con Microscopía de Fuerza Atómica 55p 2009

- ✦ *Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Nanobiología Celular, conjunto Tlahuizcalpan de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.*
- ✦ *Resultados de esta Tesis se han presentado en el VIII Congreso Nacional de Microscopía en la Ciudad de Acapulco, Octubre del 2006. X Congreso Ibero-Americano de Biología Celular en la Ciudad de México, Octubre del 2007. IX Congreso Nacional de Microscopía en la Ciudad de Guanajuato, Noviembre del 2008.*
- ✦ *Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo otorgado al proyecto IN215106 titulado: “Nanobiología del nucléolo”, del cual fui acreedora de una beca.*
- ✦ *Agradezco también al Programa Nacional de Becas para la Educación Superior del Gobierno Federal. SEP, Subsecretaría de Educación Superior por otorgarme una Beca de Educación Superior en su Modalidad de Titulación. Para el Ciclo escolar 2008-2009. Solicitud con el Folio No. 20080069156; Beca otorgada 5425. Y a la Dra. Nora Elizabeth Galindo Miranda de la Secretaría de Asuntos Estudiantiles, Becas y Servicio Social de la Facultad de Ciencia, UNAM por su apoyo administrativo.*

Dedicatoria

Dedico el resultado de este trabajo a mis dos grandes amores Hagen y Carlos quienes llenan mi vida de alegría; con ellos y por ellos no claudicaré hasta convertir mis derrotas en victorias.

A mi niño, mi mayor bendición, que ha esperado muchas noches a su mamá y escuchó muchas clases conmigo; hijo mío, espero que la vida me alcance para dejarte preparado en hacerle frente y que ésta sea fecunda en valores trascendentales como el amor, la justicia, la lealtad, el respeto y la gratitud. Te adoro cachito mío.

A mi Carlitos quien me ama incondicionalmente, me ha apoyado sin límite alguno, me ha tenido mucha paciencia, me hace reír, me da fuerza, me alienta para continuar y ha querido acompañarme para enfrentar juntos la realidad. Charly, gracias por ser el compañero ideal y el amor de mi vida. Te amo.

Además dedico con mucho cariño este trabajo a mis papás quienes me enseñaron a ser responsable en el uso de mi propia libertad, porque de ellos he obtenido la entereza y el carácter para salir adelante, ya que desde pequeña encontraban la manera de enseñarme y educarme, porque juntos me han dado las bases de la vida, y por causa de su lucha, amor y trabajo constantes han procurado mi bienestar y el de mis hermanos.

Y también dedico con mucho cariño este trabajo a mis hermanos Carmen, Lupita, Laura, Fabiola, Sofía y a Marco porque con ellos aprendí a compartir y han sido incondicionales a lo largo de mi vida.

A todos, muchas gracias.

Agradecimientos

- ✦ A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Ciencias; mi casa académica.
- ✦ Al Laboratorio de Nanobiología Celular y al de Microscopía Electrónica, conjunto Tlahuizcalpan, del Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Porque en sus instalaciones desarrollé mi trabajo durante la licenciatura.
- ✦ Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por ser tan rico humanamente, por dirigir esta tesis, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por prestarme un poco de su tiempo y porque a pesar de que invariablemente tiene saturada su agenda, siempre, me hacía un huequito en ella para ayudarme. Le agradezco su paciencia y los esfuerzos que tan amablemente ha dedicado a la formación de mi persona durante estos años. Porque es un excelente investigador, pero además, una inigualable persona; muchas gracias.
- ✦ A la Dra. Lourdes Segura porque con su temple, paciencia y sonrisa me alentaba día a día a ser mejor persona, espero alguna vez poder andar a la velocidad que anda ella, si eso es lo que se tiene que hacer para ser una excelente mujer, madre e investigadora.
- ✦ Gracias a la M en C. Reyna Lara Martínez no sólo por su apoyo técnico en el desarrollo de mi trabajo de tesis, sino también por haberme honrado con su amistad y afecto. Porque de ella aprendí entre otras cosas, que ser docente no es sinónimo de soberbia ni prepotencia. Francamente; gracias por todo Reyna, aún por el silencio.
- ✦ A la M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez por su sabiduría en las “malas artes” de la ultramicrotomía, por su dirección en el procesamiento con DGD. Pero en especial por los consejos sabios de alguien que ha dedicado la vida entera a la Microscopía dirigidos hacia mí, tan sólo un aprendiz.
- ✦ A la Dra. Martha Salcedo Álvarez, una persona caracterizada por tener un extraordinario carácter, de quien recibí constante apoyo personal y académico. Porque con sus comentarios enriqueció la presentación de la presente tesis.
- ✦ A la Dra. Guadalupe Zavala Padilla porque es un vivo ejemplo de una persona auténtica, por su exclusivo carácter y porque gracias a sus comentarios mi trabajo pudo mejorar y concretarse.
- ✦ Al M. en A. Aldi de Oyarzabal de quien tengo la fortuna de contar con su amistad y además tuvo la amabilidad de facilitarme la ilustración del Microscopio de Fuerza Atómica encontrada en el presente trabajo.
- ✦ A la Dra. Rosario Ortiz Hernández quien no sólo me ayudó, si no también me escuchó.

- ✦ Al M. en C. Marco Antonio González Jiménez porque me transmitió un poco de su sapiencia durante las charlas amenas que teníamos por la tarde en el laboratorio.
- ✦ Al Dr. G. Hebert Vazquez Nin y la Dra. Olga M. Echeverría por coordinar a los talleristas.
- ✦ A la Dra. Concepción Sánchez, porque a ella debo el que haya despertado en mí el interés por la Biología Celular y la Microscopía.
- ✦ A todos los profesores que he tenido a lo largo de mi vida académica porque cada uno de ellos contribuyó para que hoy pueda ser una digna universitaria.
- ✦ A mis grandes amigos Abi chiquita, La China, Angy, Dianis cachubis, Kika, Hobbit, Hapus, Lai, Mel y Miry (Abigail Morales, Alejandra Rodríguez, Angela Nava, Diana Mota, Erika Antúnez, Iván Cervantes, José Reguera, Laila Yunes, Melisa Ramírez, Miryam Márquez, Susana Esparza) porque no importa como los llame si no lo importante que cada uno es en mi vida.
 - ✦ A mis cuates y compañeros de la carrera con quienes cursé las materias, a los de generaciones anteriores y posteriores a la mía, a quienes nos tocó formar equipo y además lanzarnos a la aventura en las salidas de campo.
 - ✦ A la Biol. Francisca Fernández V. del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía porque me compartió sus conocimientos de histoquímica y porque con ella aprendí que no siempre nos toca estar en el laboratorio produciendo resultados, sino también en la sala de espera de un consultorio.
 - ✦ A mis compañeros monitores, a los niños y a los coordinadores del Curso Infantil de Verano del Universum (Serafín Pérez Salgado, Arturo Vargas Canales, Salvador Mendoza Flores, a Jorge y a Víctor V.) porque contribuyeron a que mi vida cambiara, haciéndome valiente a partir de que me permitieron trabajar con ellos.
- ✦ A la Dra. Margarita R. Ponce Salazar y la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno por sus comentarios y apoyo académico en la elaboración de este escrito.
- ✦ A la carismática Olga Nelly Sánchez Cárdenas, mi profesora de inglés porque me dio las herramientas necesarias en el idioma para enfrentarme a él y poder, por fin aprobar el examen del CELE.
- ✦ Al Ing. Segovia, al Ing. Villaseñor y al Ing. Miguel Urbano de Micra Ingeniería S.A de C.V. por su confianza, por enseñarme cosas que eran impensables para mí, por el Software, por el Innova y por formar parte de mi desarrollo profesional.
- ✦ Al Dr. Ubaldo Sadot Pacheco y Alcalá del IMP por su apoyo y porque sin su cortador de portaobjetos no hubiera podido montar esa pequeña muestra.
- ✦ A Dios.

....cuando bebas agua, no olvides la fuente de la que bebiste....

Índice

✎ Resumen	I
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1 Un poco de historia	4
2.2 El ciclo celular	8
2.2.1 Interfase	9
2.3 Mitosis	13
2.3.1 Significado biológico de la mitosis	13
2.3.2 Eventos de la mitosis	13
2.3.3 Etapas de la Mitosis	14
2.4 Estructura del cromosoma	20
2.5 Biología de la cebolla, <i>Allium cepa</i> .L.	22
2.5.1 La raíz y su estructura	23
2.5.2 Duración del ciclo celular en <i>Allium cepa</i> L.	24
2.6 Diferentes tipos de microscopios	26
2.6.1 Microscopio óptico	26
2.6.2 Microscopio Electrónico de Transmisión	26
2.6.3 Microscopio de barrido por sonda	28
Microscopio de efecto túnel	29
Microscopio de Fuerza Atómica	29
Aplicaciones del microscopio de fuerza atómica	33
3. Objetivos	36
4. Hipótesis	37
5. Justificación	38
6. Metodología	39
6.1 Procesamiento para resina epóxica (Epon 812)	39
6.2 Procesamiento para resina acrílica (Lowicryl K4M)	40
6.2.1 Corte, tinción y contraste	40
6.2.2 Registro de imágenes	41
6.3 Procesamiento de material biológico incluido en DGD (Diesterato de dietilen glicol)	45
7. Resultados	47
7.1 Imágenes obtenidas con MO, inclusión en Epon	47
7.2 Imágenes obtenidas con AFM, inclusión en Epon	48
8. Discusión	54
9. Conclusión	55
✎ Referencias bibliográficas	V

Índice de figuras

Fig 1	Diagrama del Ciclo Celular	pag 8
Fig 2	Fotografía <i>Allium cepa</i>	Pag 22
Cuadro 1	Clasificación taxonómica	Pag 22
Fig 3	Micrografía y esquema raíz	Pag 23
Tabla 1	Duración del ciclo celular	Pag 25
Fig 4	Ilustración de M en C Aldi de Oyarzabal	Pag 31
Tabla 2	Comparación entre microscopios	Pag 35
Cuadro 2	Procesamiento del material	Pag 43
Diagrama de flujo 1	Procesamiento del material	Pag 44
Cuadro 3	Procesamiento con DGD	pag 46
Fig 7	Micrografías de luz, mitosis	Pag 48
Fig 8	Interfase 2D con AFM	Pag 49
Fig 9	Interfase 3D con AFM	pag 49
Fig 10	Profase 2D con AFM	Pag 50
Fig 11	Profase 3D con AFM	pag 50
Fig 12	Metafase 2D con AFM	Pag 51
Fig 13	Metafase 3D con AFM	Pag 51
Fig 14	Anafase 2D con AFM	Pag 52
Fig 16	Telofase 2D con AFM	Pag 53
Fig 17	Telofase 3D con AFM	Pag 54

Colaboración en publicaciones

2006	Observaciones sobre la estructura del núcleo de células del meristemo de raíz de cebolla (<i>Allium cepa</i> L.) con el microscopio de fuerza atómica	Anexo 1
2008	Visualización de la mitosis con el microscopio de fuerza atómica	Anexo 2

Resumen

En la presente tesis se muestran por primera vez, imágenes de diferentes fases de la mitosis *in situ* obtenidas con el Microscopio de Fuerza Atómica. Para la realización del estudio se utilizaron cortes semifinos de raíces de cebolla procesadas con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión y con otra resina llamada DGD (Diesterearato de Dietilen Glicol). Los cortes fueron analizados con un microscopio de fuerza atómica operando en modo de contacto y en modo intermitente (Tapping). Los resultados muestran diferentes figuras mitóticas a partir de cortes de epon, muy similares a lo observado previamente con los otros tipos de microscopios. Los criterios utilizados para definir las mitosis fueron la presencia de un límite nuclear, cúmulos de cromatina compacta y presencia o ausencia de nucleolos. Los resultados abren la posibilidad de analizar la mitosis con la resolución propia del microscopio de fuerza atómica.

I. Introducción

A lo largo de la historia de la humanidad una pregunta constante ha sido: ¿por qué los hijos se parecen a los padres? o ¿cómo fue que se dio lugar a la transmisión de caracteres de los padres a sus hijos?, aunque pareciera trivial preguntarse ello, gracias a la búsqueda de su respuesta las ciencias biológicas intentan conocer e interpretar la regulación de la expresión genética en función de las estructuras e interacciones que se presentan entre los constituyentes de la célula, particularmente a la Biología Celular le interesa conocer acerca del “sustrato biológico de la herencia” preguntándose ¿qué parte de la célula está relacionada con ella?

Estando ahora en la primera década del siglo XXI, se tiene conocimiento de los postulados acerca de la célula. Que es la unidad fundamental de continuidad y evolución de los organismos, que se autopropaga y es común a todos los seres vivos, que toda célula proviene de otra célula, que todas las células se forman por la división de células preexistentes, que en ella tienen lugar las reacciones metabólicas del organismo, que las células contienen material hereditario y que el organismo como unidad es el resultado de las actividades, funciones e interacción de las células ^[2].

De la misma manera se sabe que los procesos llevados a cabo por todos los organismos para transmitir su información hereditaria están finamente regulados. A la programación de la vida de una célula desde que se forma hasta que ella origina sus dos descendientes, con todas las características morfológicas y fisiológicas de la misma se llama ciclo celular. La mayor parte de las divisiones celulares en los eucariontes conlleva un proceso llamado mitosis, el cual es un proceso fundamental en la vida de las células, puesto que asegura que cada célula hija reciba una copia de cada cromosoma y por lo tanto una copia de cada gen de la célula progenitora ^[3]. La mitosis forma parte del ciclo celular proliferativo el cual se encuentra bioregulado con una exactitud necesaria para la supervivencia de las células hijas, los individuos y las especies ^[5].

Para la comprensión del sustrato celular de la herencia, es preciso analizar los mecanismos reguladores de eventos bioquímicos secuenciales y continuos en la célula teniendo en cuenta que todos los seres vivos utilizan el mismo código genético ^[4]. De igual forma para conocer lo que sucede en la célula durante la mitosis es preciso delimitar la trayectoria de los eventos que se llevan a cabo dentro de ella y comprender que la división celular también es resultado de factores externos a la célula.

En la elaboración de este trabajo principalmente se usó el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), un instrumento que en las ciencias biológicas tiene tan sólo algunos años en haberse empezado a usar, su mecanismo permite obtener imágenes reales y en tercera dimensión de la muestra en estudio además de ofrecer una resolución mayor al Microscopio Electrónico de Transmisión. En el AFM una aguja “barre” el relieve de la muestra y por medio de un programa de cómputo lo transforma en una imagen que puede ser interpretada como una imagen en tercera dimensión. La muestra referida es un corte muy delgado de la punta de una raíz de cebolla que fue procesada con la técnica convencional de microscopía electrónica.

Siendo así, el contenido de este trabajo comprende una visión diferente a las anteriores de un proceso fundamental sucedido en todos los organismos eucariontes para generar nuevas células y nuevos organismos; el de la mitosis.

Aunque el proceso de división celular ha sido caracterizado desde hace muchos años atrás en diversos tipos celulares, con diferentes técnicas y con diferentes instrumentos, es para mí muy satisfactorio mostrar en los resultados de este trabajo imágenes obtenidas con el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) de células de raíz de cebolla en división celular.

2. Antecedentes

2.1 Un poco de historia

Los primeros seres vivos que aparecieron en la Tierra hace unos 3.7 mil millones de años eran organismos unicelulares llamados procariontes, alcanzaron su pleno éxito en su desarrollo y reproducción hace unos 3.5 mil millones de años y en un momento de la historia evolutiva hace unos 1.5 mil millones de años surgieron células especializadas llamadas eucariontes ^[7]. Este tipo de células se diferencian de las procariontes por la presencia de un núcleo, lo cual confiere a la célula la capacidad de compartimentalizar el genoma (ADN) por una envoltura nuclear, realizan procesos específicos como mitosis y meiosis, son capaces de diferenciarse y forman organizaciones multicelulares. El proceso evolutivo ha producido una inmensa diversidad de formas de vida altamente organizadas que sin embargo, al ser estudiadas a nivel celular y molecular presentan en conjunto, cierta unidad que las relaciona ^[8].

El estudio de la célula como unidad estructural y funcional de todos los organismos vivos ha echado mano de diversos métodos y técnicas. De estas investigaciones se ha obtenido el conocimiento de la composición íntima de la materia viva y de los fenómenos básicos de la herencia. Todos los seres vivientes están constituidos por células, en algunos casos una sola célula conforma un organismo completo, en otros más complejos muchas células se han organizado para constituir un organismo. Lo anterior ha llevado a la especialización celular para la realización de variadas funciones, producto de lo cual, es posible observar una muy amplia diversidad celular ^[9].

El hombre a lo largo de su historia ha necesitado observar objetos cercanos y lejanos a él; motivo por el cual desarrolló lentes que aumentarían las cosas de tamaño a los ojos del observador. El telescopio de Galileo usado en el siglo XVII es el primer instrumento para

ver a lo lejos, del que se tiene un registro, probablemente el microscopio óptico se desarrolló a partir de él; sin embargo nadie sabe con seguridad quién inventó el microscopio. El primer registro escrito del empleo de uno de éstos instrumentos se halla entre 1590 y 1608 en Middelburg, Holanda, donde Zacarías Jansen, Hans Cansen y Hans Lippershey ^[10] construyeron un instrumento que producía un aumento de casi 10 veces del tamaño real. Algunas décadas más tarde, en 1663 Robert Hooke vio por primera vez células vivas en unas muestras de musgo y en 1665 publica su grandiosa obra *Micrographia*. Poco después, hizo su más famosa observación microscópica con delgadas secciones de corcho. Hooke nombró a esas delicadas cámaras "células" ^[6], nombre aún empleado en esas estructuras.

Anthony van Leeuwenhoek, un comerciante holandés nacido en la ciudad de Delft realizó en agosto de 1674 la primera descripción precisa de los glóbulos rojos con ayuda de un microscopio formado por una lente convexa y un soporte ajustable para el espécimen; marcando así el nacimiento de la biología moderna ^[2].

Louis Pasteur utilizó un microscopio para demostrar que los gérmenes transmitían enfermedades de unos seres vivos a otros. Robert Brown, un cirujano escocés estudió el tejido de las plantas y a él se le atribuye el descubrimiento del núcleo en 1832, aunque sólo nombró la estructura. El botánico sueco Carlos Linneo utilizó un instrumento que tenía un vidrio de reloj sobre una plataforma circular y la lente se colocaba en foco con un brazo transversal ^[11], con este instrumento hizo muchas de las descripciones aún vigentes en la taxonomía.

Al paso de los años, los lentes se perfeccionaron y transformaron en microscopios ópticos. La tentativa de interpretar las estructuras celulares con respecto a su función es la característica del siglo XIX. En 1838-1839, Mathias Jacob Scheiden y Theodor Schwann formularon la teoría celular, que considera a la célula como una unidad estructural común de todos los seres vivientes, y que una célula madre es capaz de dividirse en dos células hijas. Esto último fue un aporte hecho por Rudolph Virchow en 1858 ^[12]. Poco después se dispuso de tinción y fijación de los tejidos que permitieron una enorme recopilación de detalles celulares como la división celular y la fecundación. Los fenómenos de evolución y herencia empezaron a tener gran importancia.

En la 3ª década del siglo XX, la invención del microscopio electrónico hizo posible alcanzar el millón de aumentos. En este periodo se acentúa el conocimiento de la función de los componentes celulares a nivel molecular. En un esfuerzo continuo para obtener mejor resolución, se encontró que el poder de resolución del microscopio estaba limitado no solo por el número y calidad de lente sino, también, por la longitud de onda de la luz utilizada para la iluminación. El uso de longitud de onda corta, (azul o ultravioleta) proporcionó una ligera mejora; sumergir el espécimen en la parte anterior de la lente objetiva en un medio elevado índice de refracción (aceite) proporcionó otra ligera mejora, pero estas medidas juntas, sólo llevaron el poder de resolución del microscopio justo por debajo de 100nm ^[13].

En los años veinte se descubrió que los electrones acelerados se comportan en el vacío como luz, que viajan en línea recta y tienen una longitud de onda que es unas 100,000 veces más pequeña que la de la luz. Además se encontró que los campos eléctricos y magnéticos tienen el mismo efecto sobre los electrones que el que tienen las lentes y los espejos de vidrio sobre la luz visible. El Dr. Ernst Ruska, en la universidad de Berlín, usó dichas características, las combinó y construyó en 1931 el primer microscopio electrónico de transmisión (MET). El primer microscopio electrónico usaba dos lentes magnéticas y tres años más tarde se añadió una tercera lente. Se logró una *resolución* de 100 nm, doblemente mejor que la del microscopio óptico en esa época. ^[14] Actualmente hay MET que usan hasta cinco lentes electromagnéticas en el sistema de visualización, y se puede conseguir un poder de resolución de 0.1 nm con *aumentos* de más de un millón de veces.

El desarrollo de la microscopía electrónica se da por el continuo intento de explorar estructuras celulares y relacionar la organización de éstas con un significado funcional.

En el caso de la mitosis que es un proceso continuo en el que están involucrados moléculas y mecanismos celulares, los cuales se han estudiado por métodos genéticos, bioquímicos, por análisis moleculares o por la reconstrucción del proceso *in vitro* ^[15]; también está involucrado el uso del microscopio.

Resolución y Aumento

Con luz suficiente, el ojo humano puede distinguir dos puntos separados entre sí, 0,2 mm. Si los puntos están más próximos, sólo se verá un punto. Esta distancia se llama poder de resolución o resolución del ojo. Para ampliar esta distancia se puede usar una lente, o un conjunto de lentes (un microscopio) para hacer posible que el ojo vea puntos, incluso más juntos que 0,2 mm. El poder de resolución de un microscopio determina su aumento máximo. Sólo se necesita ampliar el poder de resolución a 0,2 mm, el poder de resolución del ojo humano, para que se revelen todos los detalles finos de un objeto. Un aumento superior no revelará más información y es innecesario.

El poder de resolución de un microscopio es uno de sus parámetros más importantes. La razón por la que se citan los aumentos es que dan una idea de cuánto se puede ampliar una imagen.

Dependiendo de diferentes técnicas que se usan para abordar una cuestión en particular, se puede obtener como resultado un gel bidimensional, una gráfica, una tabla o una solución dentro de un tubo de ensaye; si la técnica usada es la microscopía, como resultado se obtiene una micrografía y dependiendo del tipo de pregunta por resolver se echa o no mano de una o varias técnicas adicionales a ésta.

Desde finales del siglo XIX y con ayuda de la microscopía, se sabía lo que ocurre en la célula cuando se divide y lo que pasa en las fases contiguas durante el espacio en que un núcleo se divide en dos ^[16], pero aún era incierto lo que sucede en los núcleos formados en el final de una mitosis hasta el comienzo de su nueva división. Al núcleo en esta etapa Flemming lo llamó, núcleo en reposo, actualmente llamado núcleo interfásico. Howard y Pelc, empleando P32 demostraron que su incorporación al núcleo celular no se realizaba durante todo el periodo postmitótico en los que el núcleo no captaba el isótopo. Ellos denominaron al periodo de incorporación del isótopo al núcleo celular con la sigla S, de síntesis, y a los otros dos con G postmitótico y G2 al premitótico. Después para alguien este hallazgo en el que la interfase divide en G1, S y G2 mas la división nuclear (mitosis), marca el nacimiento de los estudios sobre el ciclo celular proliferativo.

Posteriormente para conocer más acerca de como se dividía el citoplasma a través del proceso de citocinesis; en 1963 Waley y Mollenhauer expusieron como sucedía el proceso citocinético en células vegetales y en 1966 el grupo de trabajo del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, encabezado por el Dr. Giménez-Martín, detallaron las distintas fases del mismo ^[17], dicho grupo se dedicó al estudio del ciclo celular, las distintas fases de la mitosis, y la nucleogénesis usando principalmente como modelo biológico *Allium cepa* (una variedad europea a la que llaman cebolla francesa) y estandarizaron la técnica del cultivo de la cebolla para estudios celulares.

Después de la primera aplicación de la microscopía electrónica en el estudio de especies biológicas a principios de 1940's, tomó cerca de 20 años desarrollar las técnicas de preparación que usamos hoy en día, además; el desarrollo y disponibilidad de microscopios y microtomos comerciales, resinas de inclusión, fijadores, contrastantes y las técnicas para que el corte resultara suficientemente delgado, fueron prácticas determinantes para permitirnos visualizar las estructura fina de las células.

2.2 El ciclo celular

El ordenado programa de eventos en la vida de una célula es conocido como ciclo celular y consiste en la programación de la vida de una célula desde que se forma por mitosis hasta que ella origina a sus dos descendientes con todas las características morfológicas de la misma; sirve también para sustituir a las fallecidas y perdurar la capacidad orgánica de cada ser. Aunque los detalles de cada ciclo celular eucarionte varían entre los organismos así mismo varían en los diferentes linajes celulares. En las células somáticas, las células producidas son genética, estructural y funcionalmente idénticas tanto a la célula materna como entre sí, a menos que hayan sufrido mutaciones. Las células nuevas heredan un duplicado exacto de la información genética de la célula madre. Para que esto se lleve a cabo es necesario que la célula coordine un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares.

El proceso de dividir exactamente el material genético es muy complejo en las células eucariotas debido a la serie de pasos que deben ocurrir para lograr este objetivo. La

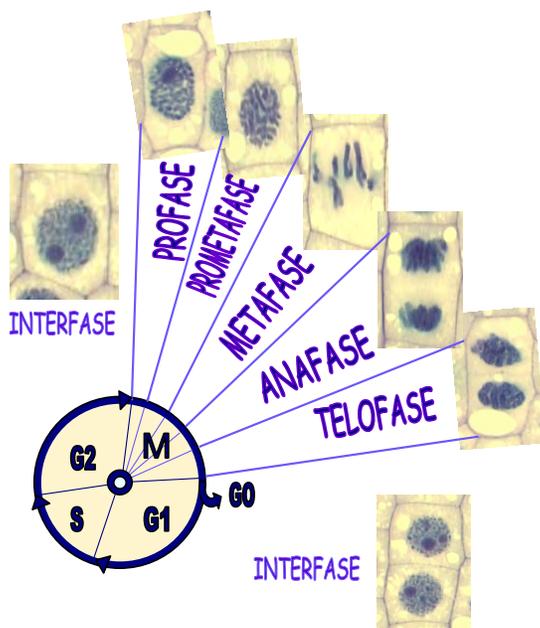


Fig. 1 Diagrama que muestra las fases del ciclo celular; interfase y mitosis. Las fotografías muestran células de cebolla en las etapas de la mitosis.

solución está dada por un conjunto de pasos llamado ciclo celular, su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. Un ciclo celular típico se da en dos fases, la interfase y la mitosis. La interfase se divide en tres etapas G1, S, G2 y la mitosis se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.

Antes de que una célula comience la mitosis debe duplicar su ADN cromosómico, sintetizar mayor cantidad de histonas y otras proteínas asociadas al ADN de los cromosomas, producir una reserva adecuada de organelos para las dos

células hijas y ensamblar las estructuras necesarias para que se lleven a cabo la mitosis y la citocinesis. Estos procesos preparatorios ocurren durante la interfase.

El estudio del ciclo celular se ha desarrollado principalmente por dos vías; una de ellas consiste en estudiarlo con relación al núcleo y la otra con relación al citoplasma a través del proceso de citocinesis.

2.2.1 Interfase

El periodo continuo que transcurre entre el final de una Mitosis y el comienzo de la siguiente se denomina Interfase, aquí las células no están dividiéndose y pareciera que no suceden grandes cambios en el núcleo celular; no obstante, es justamente cuando el núcleo alcanza el máximo de actividad metabólica. Toda célula realiza las funciones propias de los seres vivos: se nutre, respira, crece y se reproduce. Uno de los organelos más importantes en el proceso mitótico es el núcleo. El núcleo celular es el organelo más grande (se puede observar fácilmente al microscopio óptico a bajos aumentos), pero también es el menos entendido puesto que su morfología varía dependiendo de la etapa del ciclo celular en la que se encuentre la célula; sin embargo sus componentes son los mismos en cualquier etapa del ciclo celular.

En los eucariontes, el núcleo celular está organizado en dinámicos dominios macromoleculares envueltos en el metabolismo del ADN y ARN, contiene el material necesario para la transcripción de la información, procesamiento de ARN y duplicación del ADN. El núcleo interfásico es el núcleo celular característico, se encuentra envuelto por una doble membrana lipídica llamada envoltura nuclear, el material cromosómico denominado cromatina, el nucleolo y un espacio que no es ocupado por el nucleolo ni por los grumos de cromatina; llamado zona intercromatiniana. Se ha determinado que este espacio está ocupado por partículas ribonucleoproteicas más pequeñas que el nucleolo que contienen diferentes tipos de ARN (fibras pericromatinianas, los gránulos intercromatinianos, gránulos pericromatinianos, cuerpos espiralados). Los cuerpos nucleares, la matriz nuclear, la lamina y el complejo del poro también son componentes del núcleo celular. Esos dominios se pueden analizar por varias pruebas citoquímicas y

además se pueden observar por medio de la microscopía electrónica (Jiménez-García, 2000). No obstante, dichos componentes no tienen el mismo aspecto en todas las etapas del ciclo celular (Cormarck, 1988). Una característica del núcleo es que se desensambla y se reorganiza cada vez que la célula se divide, otro cambio fundamental en la estructura del núcleo durante la mitosis es la condensación de los cromosomas.

La cromatina es la expresión interfásica de los cromosomas, por lo que actualmente tiende a utilizarse el término cromosomas interfásicos para denominarla. Aunque los cromosomas siguen individualizados funcionalmente en el núcleo interfásico, morfológicamente no pueden ser observados durante este estadio. En este periodo de activa transcripción y duplicación del ADN, se pueden visualizar cúmulos de cromatina de diferente tamaño y posición, dependiendo del nivel de compactación. A la cromatina compacta también se le conoce como heterocromatina y a la más laxa, como eucromatina. La eucromatina no se ve con el microscopio óptico, pues los delgados filamentos que la forman, están por debajo de la resolución de éste. (Vásquez Nin, en Biología celular y molecular de LFJG).

En las plantas se han caracterizado dos tipos de núcleos el reticulado y el cromocéntrico, dependiendo del arreglo de la cromatina compacta. En el patrón reticulado se observan numerosas bandas de cromatina densa entremezcladas con regiones de cromatina laxa, fibrillas y gránulos, y el patrón cromocéntrico que presenta grumos periféricos de cromatina densa llamados cromocentros. Las plantas que presentan núcleos reticulados tienen en general cromosomas muy largos y más ADN por cromosoma y por célula en comparación con los núcleos cromocéntricos. [Jiménez-García, L.F. 1989]

La duración de la síntesis del ADN divide el ciclo de las células eucariotas en cuatro fases diferenciadas. La **fase M** del ciclo corresponde a la Mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. A esta fase le sigue la **fase G1** (gap I, del inglés *gap*: hendidura) que corresponde al intervalo (gap) entre la mitosis y el comienzo de la replicación del ADN. Durante G1, la célula es metabólicamente activa y está creciendo, pero no se replica su ADN. Seguidamente tiene lugar la **fase S** (síntesis), durante la que se produce la

replicación del ADN. Tras finalizar la síntesis del ADN, se produce la **fase G2**, durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis.

La *fase G1* se caracteriza por ser un período de actividad bioquímica intensa. La célula incrementa el material enzimático, se replican los organelos, moléculas y estructuras citoplasmáticas. La célula aumenta en tamaño. Se lleva a cabo en el citoesqueleto la síntesis de microtúbulos, microfilamentos de actina y ribosomas, además el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas se derivan del retículo endoplásmico. Se lleva a cabo la replicación de mitocondrias y cloroplastos previamente existentes.

Si las condiciones ambientales no son favorables para entrar en el ciclo, las células en G1 pueden detener su progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial, llamado G0 (G cero), donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar y en ocasiones nunca más dividirse, como por ejemplo las fibras musculares esqueléticas que no se dividen, pero sí renuevan sus organelos citoplasmáticos. (11, 12) Además, desde este estadio de G0 la célula es sensible a estados de diferenciación (organismos pluricelulares), o de inicio de procesos sexuales (organismos unicelulares). Si las condiciones ambientales se tornan nuevamente favorables, la célula vuelve a iniciar los ciclos de división.

Poco antes de finalizar la fase G1, existe un momento en que la célula se divide. Recibe el nombre de punto de arranque o de control G1. La división depende de la presencia de sustancias inductoras provenientes de otras células.

Durante la *fase S*: Síntesis, comienza la replicación semiconservativa del ADN, se generan dos juegos o complementos de ADN idénticos para ser repartidos entre las dos células hijas. Las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras de las proteínas asociadas al ADN son sintetizadas (ADN, polimerasas, ligasas, topoisomerasas, entre otras).

La preparación para la mitosis transcurre durante la *fase G2*. La cromatina recién duplicada, ya está dispersa en el núcleo en forma de cordones filamentosos, se enrosca lentamente y se compacta para formar los cromosomas. Se lleva a cabo el ensamble de

estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto completo y equitativo de cromosomas a cada célula hija lo cual se desarrollará durante la mitosis.

La entrada al ciclo celular, la síntesis de DNA y la regulación son procesos claves que están regulados por dos tipos de moléculas (proteínas quinasas dependientes de ciclina y ciclinas). Las quinasas dependientes de ciclinas, que al interactuar con las ciclinas fosforilan y activan a las moléculas responsables de la división celular. Las ciclinas, cuyo nombre se debe a que en el curso de cada ciclo celular alternan un periodo de síntesis creciente seguido por uno de rápida degradación. Existen varias clases de ciclinas, cuyas concentraciones se elevan y descienden en diferentes concentraciones se elevan y descienden en diferentes momentos del ciclo celular.

La *fase S* se produce cuando la ciclina G1 activa a la Cdk2. Tomada la decisión de dividirse, la célula deja atrás la fase G1 e ingresa a la fase S, donde comienza a duplicar su ADN. Ello acontece cuando una ciclina G1 activa a la quinasa Cdk2, la cual inicia una cadena de fosforilaciones en sucesivas proteínas intermediarias. La cadena culmina con la activación de moléculas responsables de la replicación del ADN. En la fase G2 actúan mecanismos de seguridad; la pausa impuesta por la fase G2 le provee a la célula un lapso durante el cual actúan mecanismos de seguridad para controlar (antes que la célula se divida) si las moléculas de ADN han culminado su replicación y, cuando corresponda, si fueron reparadas. Aunado a éstos eventos, en la fase G2 se completa la duplicación de los componentes citoplasmáticos.

2.3 Mitosis

2.3.1 Significado biológico de la mitosis

Todos los organismos vivos en la Tierra están hechos de una o más células, las cuales son la unidad fundamental de la vida capaz de reproducirse y vivir de manera independiente.

La mitosis es el proceso por el cual las células eucariontes aseguran la repartición de su material genético a cada uno de los núcleos hijos. Cada nueva célula es sólo producida por células existentes, de esta manera dicho proceso celular es esencial para la continuación de la vida.

La regularidad del proceso de la división celular garantiza que cada célula hija recibirá exactamente el mismo número y tipo de cromosoma que tenía la célula progenitora. Por tanto, la mitosis es un mecanismo que permite a la célula distribuir en las mismas cantidades los materiales duplicados durante la interfase.

Como consecuencia de la mitosis los organismos multicelulares crecen en tamaño y complejidad por producir más células y las células viejas y/o dañadas son continuamente reemplazadas por la división de otras células.

2.3.2 Eventos de la mitosis

Para el acontecimiento de la división celular son importantes dos sucesos; primero la célula “madre” debe asegurar que cada nueva célula “hija” reciba una copia completa de su información hereditaria. La información es transmitida en forma de moléculas complejas llamadas DNA, y dirige varias actividades de la célula a lo largo de su vida. El Segundo requerimiento es la partición del citoplasma entre las dos células hijas.

Al principio de la mitosis, los cromosomas se condensan, el nucleolo desaparece y la envoltura nuclear se disgrega, lo que da lugar a la liberación del contenido nuclear al citoplasma. Al final de la mitosis tiene lugar al proceso inverso: los cromosomas se descondensan y la envoltura nuclear se organiza alrededor de cada juego de cromosomas hijos. El proceso es controlado principalmente mediante fosforilaciones y

desfosforilaciones reversibles de las proteínas nucleares, debido a la acción de la proteína Cdc2, que es un regulador fundamental de las mitosis en las células eucariotas.

Un sistema excelente para el estudio cuantitativo del ciclo mitótico es el que permite que las células se encuentren en perfecta sincronía. Por ese motivo se empleaban en un principio como modelo, las primeras divisiones celulares de los embriones aunque sólo permanezcan sincronizadas unos cuantos ciclos. Después, la carencia de material sincrónico natural ha obligado a los científicos a procurarla mediante tratamientos experimentales, sometiendo a los modelos biológicos a diferentes periodos de iluminación y oscuridad, cambios de temperatura, a la acción puntual de algunas drogas sobre algún punto específico de la mitosis (hidroxiurea, 5-aminouracilo, colchicina), incorporación de nucleósidos marcados (timidita tritiada), hasta llegar al bloqueo de uno de los puntos del ciclo. Por ejemplo el bloqueo de la citocinesis usando cafeína, para producir células binucleadas, pero sin alterar la duración del ciclo celular.

La duplicación de los cromosomas, su separación, la citocinesis y formación de dos nuevos núcleos son procesos llevados a cabo por elementos del citoesqueleto y existen diferencias importantes entre células animales y de plantas.

El citoesqueleto de las células eucariotas lo constituyen los microtúbulos que pueden encontrarse dispersos por el citoplasma, o formando estructuras estables como cilios, flagelos o centriolos. Son estructuras muy dinámicas, según la actividad celular se pueden formar y distinguir. Están constituidos por moléculas de tubulina (dímeros compuestos por α y β tubulina), sirven para dar rigidez y conservar la forma celular, regular el movimiento intracelular de organelos y vesículas, contribuyen a formar los compartimentos intracelulares constituyendo el huso mitótico (responsable de organizar el movimiento de los cromosomas durante la división celular), distribuyen el retículo endoplásmico y aparato de Golgi en los lugares apropiados, son los elementos estructurales y generadores del movimiento de cilios y flagelos. Se estabilizan en el centro organizador de los microtúbulos (COMT), donde uno de los extremos queda embebido en él.

La pared celular le confiere rigidez a las células de plantas, las cuales no sufren cambios dramáticos en su morfología durante los procesos de mitosis y citocinesis. En la interfase existen arreglos de los microtúbulos y los microfilamentos que participan en la orientación

y expansión celular que se encuentran rodeando a la célula en la región adyacente a la membrana plasmática. También existen arreglos de MT que irradian del núcleo hacia el citoplasma y que participan junto con los MF en distintos fenómenos de movilidad celular intracitoplásmica. El huso mitótico de plantas y animales se organiza de diferente manera. Las plantas no tienen centrosomas y tampoco centriolos. En los vegetales la estructura del huso mitótico consiste de cientos de microtúbulos y de proteínas que se asocian a éstos. Justo antes de que la célula se divida, los cromosomas son atraídos hacia cada uno de los dos polos de huso mitótico, mediante microtúbulos unidos a los centrómeros; los centrómeros marcan el camino y los brazos distales de los cromosomas (terminados en los telómeros) lo siguen después.

El organelo citocinético en las plantas es el fragmoplasto. Este organelo está formado de vesículas de la interzona originarias del aparato de Golgi que viajan a través de los MT y que serán las membranas plasmáticas de las células hijas. Las vesículas contienen polisacáridos, precursores de celulosa y pectina, que se encuentran orientadas perpendicularmente para formar la pared celular. Por otra parte también se acumula MF, miosina, MT y algún tipo de kinesina, como la TKRPI25, que fue la primera proteína motor tipo kinesina aislada de fragmoplasto de tabaco. Posteriormente los MT corticales y los MF corticales regresan a su posición submembranal.

La división de los componentes citoplásmicos se llama citocinesis, este proceso en la mayoría de los casos se lleva de manera continúa a la mitosis, comienza generalmente en la anafase (rara ocasión en la telofase) y se prolonga hasta el final de la telofase. En las células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo de filamentos de actina y miosina constriñe la membrana plasmática en el ecuador. Eventualmente, la célula parental es dividida en dos células.

En las células vegetales, varias pequeñas vesículas se funden en el eje metafásico para formar el eje celular. Tiempo después la placa celular se extiende alrededor de la célula y la une con la membrana plasmática. El proceso de mitosis y citocinesis crea dos células separadas, cada una con un paquete idéntico de cromosomas. Después de la citocinesis, la célula hija entrará en interfase.

2.3.3 Etapas de la Mitosis

El comienzo de la mitosis es llamado *profase* comienza con la condensación de filamentos de cromatina, lo que da lugar a los cromosomas, los cuales aparecen como una masa acumulada dentro del núcleo. Al principio los cromosomas estirados al máximo, dejan ver bien los cromómeros, con distinción de tamaño y forma pudiendo, en condiciones favorables, identificarse cada uno de ellos. Cuando los cromosomas se contraen subsecuentemente los cromómeros se superponen y ya no es posible diferenciarlos entre sí. Cada mitad del cromosoma doble se llama cromátida; las dos cromátidas quedan unidas al centrómero que permanece único hasta la metafase.

En las células animales, al comienzo de la profase, el centríolo se divide en dos centríolos hijos, cada uno de los cuales emigra a los extremos opuestos de la célula. Desde cada centríolo se proyectan unos filamentos dispuestos de manera radial, llamados áster; entre estos filamentos y los centríolos se forma un huso. En el tiempo en que se separan los centríolos y se forma el huso, se contraen los cromosomas del núcleo, de modo que quedan más cortos y gruesos.

En células vegetales la profase los cromosomas se condensan, los “husos mitóticos de la profase” se organizan y pasan alrededor del núcleo, los microtúbulos y los microfilamentos se juntan hasta formar “la banda de la preprofase”. Esta banda marca el sitio donde ocurrirá la próxima división celular. En la profase tardía, la envoltura nuclear se disgrega y algunos microtúbulos se asocian al par de cromátidas. Durante la metafase las cromátidas se mantienen alineadas entre los polos de la célula.

En la mayoría de las células, la disgregación de la envoltura nuclear marca el final de la profase de la mitosis. Sin embargo, el desensamblaje del núcleo no es una característica universal de la mitosis y no ocurre en todas las células. Algunos otros organismos eucariotas unicelulares, llevan a cabo la denominada mitosis cerrada, sin embargo las células de los organismos eucariotas superiores sufren la mitosis abierta, que se caracteriza por el desarmado de la envoltura nuclear. Los cromosomas hijos entonces migran a los polos opuestos del huso mitótico y los nuevos núcleos se reorganizan a su alrededor.

La disgregación de la envoltura nuclear, que ocurre al mismo tiempo que la fragmentación del retículo endoplásmico, implica cambios en sus tres componentes: las membranas nucleares se fragmentan en vesículas, los complejos del poro nuclear se disocian y la lámina nuclear se despolimeriza.

En la prometáfase desaparece la banda de la preprofase, la envoltura nuclear se rompe, maduran los cinetocoros de los cromosomas, los husos mitóticos capturan los cromosomas que se van hacia el huso del ecuador por orientación, una copia de cada cromosoma hacia el eje central de la célula para formar el “eje metafásico”. Se empiezan a organizar husos mitóticos polares, que difieren en la organización de los husos mitóticos de los centrosomas en animales.

Condensados los cromosomas, no sólo resultan más cortos sino más teñidos y con aspecto de bastón. Desaparece la envoltura nuclear y entonces los cromosomas se disponen alineados en el plano ecuatorial del huso que se formó a su alrededor. Esto señala el fin de la profase; el corto periodo en que los cromosomas están en el plano ecuatorial constituye la metafase.

La metafase se lleva a cabo en el momento que se divide el centrómero y las dos cromátidas se separan por completo en dos cromátidas hijas. La división de los centrómeros ocurre simultáneamente en todos los cromosomas. Los centrómeros hijos comienzan a separarse, lo que señala el principio de la anafase. Bajo observación microscópica se comprueba que en las células humanas la profase dura de 30 a 60 minutos. Sin embargo, estos tiempos varían mucho según los tejidos y las especies en estudio.

Los microtúbulos se reorganizan al principio de la mitosis para formar el huso mitótico, que desempeña un papel central en la división celular al distribuir los cromosomas duplicados a los núcleos hijos. Esta distribución crítica del material genético tiene lugar durante la anafase de la mitosis, cuando las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso. El movimiento de los cromosomas se realiza por dos mecanismos distintos, denominados anafase A y anafase B, en los que intervienen diferentes tipos de microtúbulos del huso y proteínas motoras asociadas. La anafase A consiste en el movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso a lo largo de los microtúbulos cinetocóricos, que se acortan a medida que se mueven los cromosomas.

Este tipo de movimiento cromosómico está dirigido por proteínas motoras asociadas al cinetocoro que trasladan los microtúbulos a lo largo de los microtúbulos del huso en dirección al extremo “menos”, hacia los centrosomas. La dineína citoplásmica está asociada a los cinetocoros y puede que intervenga en el movimiento cromosómico hacia los polos, al igual que los miembros de la familia de la quinesina dirigidos al extremo negativo. La acción de estas proteínas motoras cinecóricas se acopla al desensamblaje y acortamiento de los microtúbulos cinecóricos, lo que puede deberse a que algunos miembros de la familia de la quinesina actúen como enzimas desestabilizadoras de microtúbulos.

La anafase B se refiere a la separación de los polos del huso entre sí. A la separación de los polos del huso se acompaña un alargamiento de los microtúbulos polares, y es similar a la separación inicial de los centrosomas duplicados para formar los polos del huso al comienzo de la mitosis. Durante la anafase B los microtúbulos polares solapados se deslizan unos sobre otros, empujando los polos y separándolos. Se ha encontrado que este tipo de movimiento se debe a la acción de varios miembros de la familia de la quinesina dirigidos hacia el extremo “más” del microtúbulo solapado –alejándolos del polo opuesto del huso. Además, los polos del huso pueden ser separados por los microtúbulos astrales. El mecanismo responsable de este tipo de movimiento no ha sido totalmente establecido, pero podría resultar por la acción de la dineína citoplásmica unida al córtex celular o a otra estructura citoplasmática. El desplazamiento de este motor de dineína a lo largo de los microtúbulos astrales hacia el extremo “menos” podría tener efecto para separar los polos de la periferia a la célula. De esta manera alternativa, una proteína motora asociada con los tipos de huso podría desplazarse por los microtúbulos astrales hacia el extremo “más”, lo cual también podría tirar de los polos del huso hacia la periferia celular.

En la última fase de la mitosis (telofase), se forman dos nuevos núcleos alrededor de cada juego separado de cromosomas hijos. La descondensación de los cromosomas y la reorganización de la envoltura nuclear parece que se ocurre por la inactivación de Cdc2, que es responsable de la entrada de la mitosis mediante la fosforilación de las proteínas diana, que incluyen las láminas, la histona H3 y las condensinas. La progresión de metafase

a anafase implica la activación de un sistema de proteólisis mediada por ubiquitina que inactiva la Cdc2, degradando su subunidad reguladora, la ciclina B.

Esto termina la división nuclear también llamada cariocinesis, a la que sigue la división del cuerpo de la célula, la citocinesis.

En las células del reino animal, la división se acompaña de un surco que rodea la superficie de la célula en el plano ecuatorial. El surco se hace gradualmente más profundo hasta que el citoplasma se separa en dos mitades, lo que forma dos células hijas, cada una con su núcleo. En los vegetales se forman una placa celular en la región ecuatorial del huso, la cual se prolonga hasta la pared de la célula. La placa celular es secretada por retículo endoplásmico. Cada célula hija forma entonces una membrana celular en el centro de la placa, formándose finalmente las paredes celulares de celulosa sobre cada lado de la placa celular.

2.4 Estructura del cromosoma

Durante la mitosis, la formación de cromosomas metafísicos requiere la compactación del DNA en niveles superiores de empaquetamiento. El genoma de los organismos eucariotas se encuentra organizado y empaquetado en forma de cromatina, que es una estructura teñida diferencialmente en el núcleo. En el interior del cromosoma metafísico se encuentra reducida la longitud del DNA en un factor de 10^4 . La cromatina es un nivel de organización que permite regular muchos genes a lo largo del ciclo de vida de los organismos eucariotes. La unidad primaria de empaquetamiento es el nucleosoma, está formado por un octámero de histonas, dos de cada una de las proteínas histónicas: H2A, H2B, H3 y H4 y una molécula de la histona H1 que queda en el exterior de la estructura. Un fragmento de 146 pares de bases de DNA se arregla alrededor de cada octámero. (recillas targa). La sucesión de nucleosomas, conectados por el DNA espaciador, origina el denominado nucleofilamento, cuya estructura recuerda a las cuentas de un collar. El plegamiento posterior del nucleofilamento conduce a estructuras de orden superior de la cromatina.

Cada cromosoma contiene aproximadamente la misma proporción de DNA, histonas y no histonas. Debido a las interacciones entre éstas proteínas y el DNA, este último se compacta sobre su longitud aproximadamente 40 veces para formar la fibra de cromatina. El mecanismo por el cual esta fibra de cromatina se empaqueta las siguientes 250 veces hasta llegar al nivel máximo de compactación durante la formación del cromosoma metafísico, ha sido objeto de muchos estudios. Se sabe que la condensación es necesaria para que los cromosomas se muevan a lo largo del huso mitótico sin enredarse o romperse durante su segregación a las células hijas. El ADN en este estado altamente condensado ya no puede ser transcrito, por lo que durante la mitosis cesa toda la síntesis del ARN. A medida que los cromosomas se condensan y la transcripción termina, los nucleolos desaparecen.

Cuando la célula entra en mitosis, la condensación de la cromatina conduce a la formación de los cromosomas en la metafase que consiste en dos cromátidas idénticas. Estas cromátidas hermanas se mantienen unidas por el centrómero, el cual se considera como una región cromosómica compacta o como la región especializada del cromosoma cuyo papel es asegurar la correcta distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas durante la mitosis. Una vez iniciada la mitosis, los microtúbulos del huso mitótico se adhieren al centrómero, y las dos cromátidas hermanas se separan y se dirigen a los polos opuestos del huso. Al final de la mitosis, la envoltura nuclear se restablecen y los cromosomas se descondensan, resultando la formación de los núcleos de las células hermanas que contienen una copia de cada cromosoma parental.

Los centrómeros, por lo tanto, sirven como sitios de asociación de las cromátidas hermanas y como sitios de unión para los microtúbulos del huso mitótico. Son secuencias específicas de ADN a las que numerosas proteínas de unión asociadas a los centrómeros, formando una estructura llamada cinetocoro. La unión de los microtúbulos a las proteínas del cinetocoro dirige la unión de los cromosomas al huso mitótico. Las proteínas asociadas al cinetocoro actúan como “motores moleculares” que conducen el movimiento de los cromosomas a lo largo de las fibras del huso, segregando los cromosomas a los núcleos de las células hijas.

2.5 Biología de la cebolla, *Allium cepa*.L.



Fig. 2 Fotografía de cebolla, *Allium cepa*.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Subclase Liliidae
Superorden: Lilianae
Orden: Aspargales
Familia: Alliaceae
Género: <i>Allium</i>
Especie: <i>Allium cepa</i>
Nombre binomial: <i>Allium cepa</i>. L.

Cuadro 1 Clasificación Taxonómica según Dahlgren,

Es una angiosperma monocotiledónea, terrestre. Es originaria del occidente asiático, una de las especies más cultivadas en regiones templadas y subtropicales, puede encontrarse en forma silvestre. Se obtienen con facilidad a partir de semillas o, más comúnmente, plantándola con pequeñas matas provistas de un bulbillito. El zumo de cebolla es antiséptico y el bulbo se utiliza como diurético e hipoglucemiante. Contiene vitaminas B, C y D, calcio, magnesio, fósforo y potasio.

Su filotaxia es alternada con hojas cilíndricas, largas, huecas y engrosadas, tienen venación paralela en la base y éstas constituyen la mayor parte del bulbo. El bulbo está formado por numerosos catáfilos, capas gruesas y carnosas al interior que realizan las funciones de reserva de sustancias nutritivas necesarias para la alimentación de los brotes y están recubiertas de membranas secas, delgadas y transparentes, que son base de las hojas.

Las flores son monoicas, blancas o rosadas y dispuestas en umbelas de 6-10 cm de diámetro soportadas por brácteas y sobre un robusto tallo que se ensancha en la mitad inferior. Tienen ovario súpero, trilocular, con dos o más óvulos por lóculo y placentación axilar. Están conformadas por seis sépalos, seis pétalos, seis estambres dispuestos en dos verticilos de tres y un solo pistilo, tienen anteras tetrasporangiadas y bitecas. El fruto es una cápsula con tres caras, de ángulos redondeados, que contienen las semillas, las cuales son de color negro, angulosas, aplastadas, de superficie rugosa, con una gruesa testa negra y un embrión más o menos curvado. El sistema radicular es fasciculado, corto y poco ramificado; siendo las raíces blancas, espesas y simples.

El cariotipo de *A. cepa* fue descrito por Mensinkai en 1939 (W.F.Grant). Su complemento consiste en ocho pares de cromosomas ($2n=16$) los cuales son metacéntricos y submetacéntricos (545), miden entre 8 y 16 μm y sólo el par de cromosomas satélite es subteloecéntrico. Posee uno de los genomas más grandes de todas las plantas estudiadas (546).

2.5.1 La raíz y su estructura

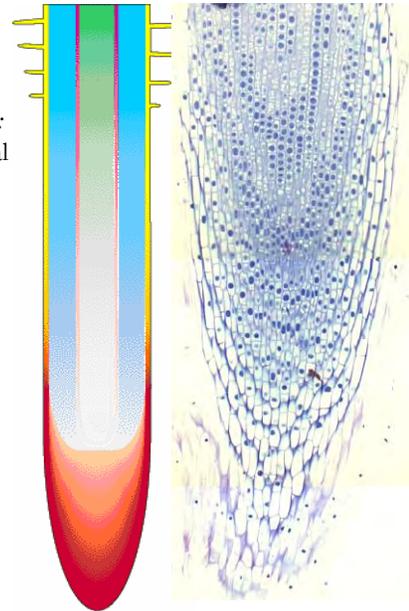
Cuando un bulbo de cebolla (*Allium sp*) se rehidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta.

La estructura de la raíz es particular desde los aspectos macroscópicos hasta la ultraestructura de su crecimiento, desarrollo y función. La constituye la parte subterránea del eje de la planta especializado en la absorción de sustancias, conducción, reserva y sostén de la misma.

La región más dinámica de la raíz es una zona pequeña de crecimiento, usualmente de unos pocos milímetros de largo; el *meristemo fundamental*. En esta zona hay constante división celular, el patrón de división es específico en cada especie y está dado por una combinación de divisiones longitudinales y alargamiento de su tamaño. En el ápice de cada raíz en crecimiento hay una cobertura cónica de células parenquimáticas que protegen al meristemo, la *caliptra* provee protección mecánica a las células meristemáticas cuando la raíz crece a través del suelo e indica la dirección del crecimiento del meristemo porque sus células contienen estatolitos, que son granos de almidón que se hallan dentro de la célula y son muy pesados, por lo tanto se mueven en respuesta a la fuerza de gravedad y de ese modo regula el crecimiento de la raíz.

Fig. 3 Derecha: Corte semifino (0.2 μm de grosor) teñido con azul de toluidina. **Izq:** Esquema longitudinal de raíz, muestra las partes que la componen.

- Meristemo Apical
- Caliptra
- Epidermis
- Córtez
- Endodermis
- Estele



La superficie externa de la raíz es llamada epidermis, las células epidérmicas nuevas absorben agua del medio ambiente circundante y producen unos vellos o pelos radiculares los cuales incrementan el área de absorción de agua de la célula epidérmica.

Bajo la epidermis se encuentra el córtex, comprende a la mayor parte de la raíz y su función principal es almacenar almidón. Los espacios intercelulares en el córtex permiten el aireamiento de las células, lo cual es muy importante para la respiración.

La endodermis es una capa delgada formada por haces de protoxilema, es el límite más interior del córtex alrededor del tejido vascular. Las células que la conforman; contienen una suberina la cual sirve para crear una especie de barrera impermeable. De esta manera el agua sólo puede fluir hacia adentro de la raíz.

El cilindro vascular comprende todo lo que se encuentra de la endodermis hacia adentro. La parte externa es llamada también periciclo y rodea al cilindro vascular. En las plantas monocotiledóneas el xilema y el floema están distribuidos al azar (en haces alrededor del cilindro vascular), las raíces carecen de crecimiento secundario y son de forma y tamaño relativamente homogéneo.

2.5.2 Duración del ciclo celular en *Allium cepa* L.

Después de la primera mitad del siglo XX se realizaron experimentos con la intención de sincronizar el ciclo de algunas células, se usaron drogas (hidroxiurea y 5-aminouracilo), se trabajó en el marcado celular (tratamientos con colchicina o con la incorporación de timidina tritiada (553)) y en el bloqueo específico del proceso citocinético procurando no alterar la velocidad del ciclo; en esta última investigación el carácter binucleado era la condición de marcado en esas células (554-2). Uno de los tipos celulares empleados en estos estudios fueron las células meristemáticas de la raíz de la cebolla; ahí analizaron las diferencias entre longitudes de los ciclos a diferentes temperaturas, logrando comprobar la permanencia de los índices mitóticos y de las fases de cada una de ellas, aunque las duraciones de los ciclos cambiaban al modificar la temperatura, obteniéndose la valiosa conclusión que la proporción de las duraciones de cada una de las fases era constante independientemente de la duración del ciclo. (555) de igual forma se demostró el

mantenimiento de la proporcionalidad entre G1, S y G2 (papaer en mit. Plan G2 checkpoint targets late replicating DNA) a diferentes temperaturas (556).

Los datos de la Tabla 1 muestran los resultados de dichas investigaciones en la duración del ciclo celular de *Allium cepa*, las diferencias en los resultados reportados pueden deberse a las diferencias de temperatura bajo las que se llevaron a cabo los experimentos. (554)

Tabla 1 Duración del ciclo celular de *Allium cepa* estudiados con diferentes temperaturas.

autor	año	duración del ciclo celular	temperatura	duración de la mitosis
González-Fernández	1966	13.5 h	--	2.3 h
Nuti Ronchi y Arcara	1967	20.5 h	19°C	--
López-Sáez	1967	18.8 h	20° C 25° C	2.4 h 1.75 h
Matagne	1968	23 h	21°C	4 h
González-Fernández	1971	--	20° C 25° C	2.2 h 1.6 h

2.6 Diferentes tipos de microscopios

2.6.1 Microscopio óptico

Es un instrumento óptico destinado a observar objetos diminutos, haciendo perceptible lo que no lo es a simple vista, el microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Un microscopio de luz es sin duda el elemento más importante para el estudio de la morfología celular, se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. Desde su descubrimiento en el siglo XVII, el microscopio de luz ha resultado clave para los nuevos descubrimientos médicos y biológicos. La luz, que se propaga en forma de ondas, está sujeta no obstante al denominado fenómeno de difracción que limita la resolución del objeto en el microscopio.

Los efectos que limitan dicha resolución fueron descubiertos por primera vez en 1873 por el físico alemán Ernst Abbe que observó que las estructuras que se encuentran a una distancia inferior entre ellas a 200nm no podían separarse visualmente cuando son observadas mediante luz visible; cuando se les observa a través del microscopio óptico aparecen como una única entidad borrosa. Es decir; la resolución del microscopio de luz tiene como limitante la longitud onda de la luz visible.

2.6.2 Microscopio Electrónico de Transmisión

La introducción de este instrumento en la década de los 50 abrió el campo de la Citología clásica a la Biología Celular actual. Su principio es relativamente simple, puesto que la óptica usada es análoga a la del microscopio de luz (o compuesto), pero no usa la luz visible, si no que usa electrones, los cuales tienen una longitud de onda de fracciones de nanómetros.

El concepto de resolución está relacionado con la capacidad de distinguir detalles finos en una imagen. En otras palabras, es la distancia mínima r_1 a la cual podemos distinguir, claramente, dos puntos como entidades separadas. La resolución teórica del microscopio

** Un nanómetro es una millonésima parte del milímetro (10^{-9} metros). Una unidad intermedia es la micra (abreviada μm), que es la milésima de milímetro, o 1000 nm. Alguna literatura hace referencia a la unidad Ångström (abreviada Å) que es 0.1 nm y la milésima parte del micrómetro.*

electrónico es: $r_1 = \frac{0.61 \cdot \lambda}{\alpha}$

Para valores de $\lambda = 0.037 \text{ \AA}$ y $\alpha = 0.1$ radianes, la resolución nominal es 0.2 \AA .

La gran diferencia en los aumentos logrados en el MET estriba en el límite de resolución (d). Tanto en el microscopio de luz como el MET la resolución obedece a la ecuación de Abbe: $d = 0,62 / 2 AN$. Donde λ se refiere a la longitud de onda empleada para generar la imagen y AN es la abertura numérica del lente. En el caso del microscopio de luz, corresponde a $0,55 \text{ \mu m}$ (promedio del espectro visible humano) y la AN oscila alrededor de 1,3. El valor 2 se refiere a que suma la AN del objetivo y la del condensador que deben ser iguales según la ley de Rayleigh. Esto produce un límite de resolución de aproximadamente $0,22 \text{ \mu m}$ para el microscopio de luz (1). La limitante en el poder de resolución del microscopio de luz es la propia longitud de onda de la luz; lo que fue superado en el ME empleando electrones acelerados a gran velocidad (alto voltaje) de manera que se mueven en forma ondulatorio, con una que depende del voltaje de aceleración. A $100\ 000 \text{ v}$, es de aproximadamente $0,1 \text{ \AA}$; no obstante, debido a las imperfecciones o aberraciones de los lentes electromagnéticos, la resolución del MET es de $1,4 \text{ \AA}$ (5).

Un microscopio electrónico de transmisión está formado por cuatro componentes principales: una columna de óptica electrónica, un sistema de vacío, la electrónica necesaria (alimentación de las lentes para el enfoque y desviación de haz, y el generador de alta tensión para la fuente de electrones), y el software de control. ^[10]

Todo el trayecto de los electrones desde la fuente generadora hasta la pantalla emisora de la imagen está al vacío y el espécimen en observación debe ser muy fino (delgado) para permitir que los electrones lo penetren. En el Microscopio Electrónico, la fuente de luz es sustituida por un cañón de electrones incorporado en la columna que consiste en un filamento de tungsteno calentado, al vacío. Los electrones se producen ahí y son acelerados por una diferencia de potencial para lograr una longitud de onda pequeña.

El Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) consta de una columna donde está el cañón de electrones, en ella hay bobinas que crean campos electromagnéticos las cuales sustituyen las lentes de vidrio utilizadas en el Microscopio Óptico (MO). ^[8] Los campos electromagnéticos hacen las veces de lente objetiva, ocular, condensadores y lentes intermedias. Otra característica importante es que las lentes electromagnéticas son

variables; es decir, modificando la corriente que pasa por la bobina de la lente, se puede variar la distancia focal (la que determina el aumento).

Además como los electrones no son visibles al ojo humano, el MET tiene una pantalla fluorescente que tiene como finalidad modificar la longitud de onda de los electrones que chocan en ella, creando una imagen real aumentada y derecha de la muestra. Un sistema fotográfico captura la imagen formada y envía una señal a una cámara o a una computadora para adquirir la imagen que será virtual. ^[10]

La microscopía electrónica es una de las técnicas con mayor aplicación en la Física, en las Ciencias Biológicas y en las Ciencias de Materiales. Esto se debe principalmente a que permite obtener información sobre la forma, medida y distribución de entidades microestructurales de la muestra.

2.6.3 Microscopio de barrido por sonda

En los microscopios de barrido por sonda se utiliza una sonda que recorre la superficie de una muestra, proporcionando una imagen tridimensional de la red de átomos o moléculas que la componen.

La sonda es generalmente una punta muy delgada de algún alambre conductor de electricidad o de algún otro material como el silicio o el nitruro de silicio. Dicha punta puede ser tan afilada que llega a tener tan sólo un nanómetro de grosor en el extremo final de ella como radio de curvatura.

Todas las técnicas de SPM (Scanning Probe Microscopy por sus siglas en inglés) se basan en el rastreo de la superficie de la muestra por una palanca o cantilever en la que se encuentra acoplada una sonda, que se desplaza sobre la muestra siguiendo líneas paralelas.

^[11] Las alteraciones de la posición de esta sonda proporcionan información de las propiedades de la superficie de la muestra a los sensores, éstas a los detectores, los que a su vez mandan la señal a una computadora, que por medio del software produce una imagen.

Microscopio de efecto túnel

El microscopio de efecto túnel o Scanning Tunneling Microscope (STM) es un tipo importante de microscopio de barrido por sonda, fue desarrollado en 1981, ^[12] utiliza un fenómeno de la física cuántica denominado efecto túnel, es ampliamente utilizado en la industria y fundamentalmente en la investigación para obtener imágenes a una escala atómica de superficies conductoras de electricidad. Proporciona un perfil tridimensional de la superficie la cual es muy útil para caracterizar superficies rugosas, observar defectos de la superficie, determinar el tamaño y conformación de agregados y moléculas en la superficie.

La sonda se coloca a una distancia de pocos nanómetros de la superficie del material y se aplica un voltaje pequeño entre la superficie y la sonda. A causa de la poca distancia entre el material y la sonda algunos electrones se escapan a través del hueco, generando una corriente. La magnitud de la corriente del efecto túnel depende de la distancia entre la superficie y la sonda. El flujo de corriente es mayor cuando la sonda se acerca al material y disminuye cuando se aleja. A medida que el mecanismo de barrido mueve la sonda por encima de la superficie, se ajusta de modo automático la altura de la sonda para mantener constante la corriente del efecto túnel. Estos ajustes minúsculos permiten dibujar las ondulaciones de la superficie. ^[13] Después de varios barridos hacia adelante y hacia atrás se utiliza una computadora para crear una representación tridimensional del material. Modulando el voltaje que llega a la punta, estos microscopios pueden no solo ver átomos, sino moverlos, colocarlos y manipularlos. ^[17]

Microscopio de Fuerza Atómica

En 1986, G. Binnig y H. Rohrer fueron galardonados con el Premio Nobel de Física por idear el microscopio de efecto túnel. Ese mismo año, G. Binnig, C.F. Quate y Ch. Gerber, desarrollaron el primer Microscopio de Fuerza Atómica ^[14] basado en modificaciones del microscopio de efecto túnel. Este tipo de microscopía no requiere de lentes, tampoco de un sistema de iluminación y no utiliza electrones. ^[15]

El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés permite visualizar los materiales y muchas de sus propiedades con una extraordinaria resolución espacial inferior al nanómetro, presenta como ventajas a los otros tipos de metodologías que no sólo sirve para “mirar” si no también para “tocar”, puede ser utilizado para observar muestras no conductoras, como las biológicas. Además se puede obtener como producto final una imagen topográfica que involucra tres dimensiones. En los ejes X y Y se puede obtener resolución de escala nanométrica y en el eje Z se puede lograr una resolución atómica.

A medida que la sonda (cantilever) se mueve a lo largo de la superficie de la muestra los electrones de la sonda de metal son repelidos por las nubes electrónicas de los átomos de la misma. La altura de la sonda se ajusta de modo automático para mantener constante la fuerza recibida. Un sensor registra el movimiento ascendente y descendente de la sonda y entrega la información a una computadora, que a su vez la utiliza para dibujar una imagen tridimensional de la superficie del espécimen. ^[16] De este modo el microscopio de fuerza atómica (AFM) trabaja con el mismo principio que el microscopio de efecto túnel; pero, en lugar de utilizar la diferencia de potencial, se encuentra en contacto directo con la muestra y detecta la topografía de la superficie por los efectos de las fuerzas atómicas (atracción y repulsión).

En el AFM, un haz láser incide sobre la superficie de un brazo voladizo, como una palanca, en el extremo de la cual se encuentra la punta. Las deflexiones de la palanca, producidas por la interacción entre la punta y la muestra, son detectadas por un detector óptico (fotodiodo) ^[18, 19] mediante la variación del ángulo de reflexión del láser. La señal recibida por el fotodiodo es utilizada para regular y minimizar la fuerza aplicada sobre la superficie, mediante un sistema piezoeléctrico capaz de regular el movimiento de la muestra.

El rastreo de la superficie por la punta da lugar a la obtención de imágenes topográficas tridimensionales de alta resolución, tanto lateral (x, y) como vertical (z), derivadas del movimiento del piezoeléctrico. ^[20] De forma similar a otros tipos de microscopía, la muestra para AFM debe encontrarse fijada sobre un soporte sólido (la adhesión de la

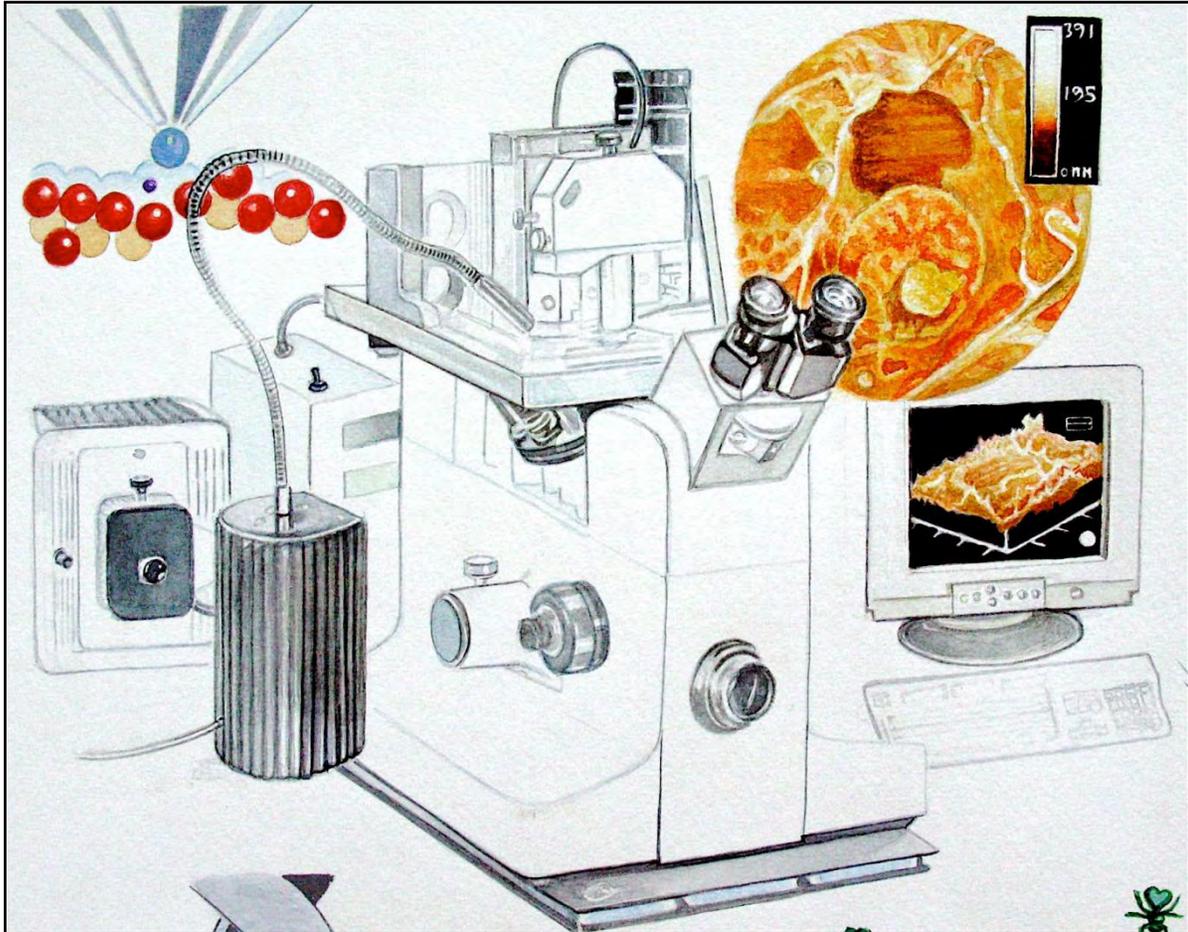


Fig. 4 Ilustración que muestra al centro el microscopio de fuerza atómica marca Veeco, modelo Bioscope. Se encuentra sobre un microscopio invertido, marca Olympus. A la izquierda se muestra el sistema externo de iluminación. En el extremo sup. izq., el principio de operación de un STM y un AFM [14]. Se ilustra el último átomo de la punta (azul), la cual recorre la superficie de la muestra (rojo). En caso del STM se mantiene constante la corriente de tunelamiento y en caso del AFM la fuerza entre la punta y la muestra que puede ser conductora o no. A un sistema se le “inyecta” energía potencial para que los electrones (morado) pasen de la punta a la muestra y viceversa. En el extremo sup. der., la imagen obtenida con el AFM de un corte de una célula de *Lacandonia schismatica*; [27] dado que el equipo asigna una tonalidad para cada punto registrado durante la medición, la cual es proporcional a las características de la superficie que están siendo analizadas (altura o densidad), genera en la imagen una gama de tonos, tomando como referencia el valor mínimo y máximo obtenido durante el análisis. En una imagen donde se desea conocer la topografía de la muestra, las partes más claras representan las regiones más elevadas, mientras que las partes más profundas, están representadas por un tono más oscuro. La barra (sobre el núcleo) corresponde a las tonalidades del relieve de la muestra obtenida en la imagen y el monitor con la misma imagen, muestra el registro en los ejes X,Y y Z.

* Ilustración de M. en A. Aldi de Oyarzabal, Facultad de Ciencias, UNAM.

muestra al sustrato se produce en general a fuerzas electrostáticas) y de manera óptima, éste debe ser atómicamente plano. La resolución de microscopio está relacionada directamente con la fineza de la punta (usualmente $100\text{-}200\ \mu\text{m}$ de largo, con una pequeña punta de silicio o de nitruro de silicio, el diámetro del pico de la punta o radio de curvatura que toca la muestra es de $15\text{-}60\text{nm}$) que se utiliza para rastrear la muestra; entre menor sea ésta, mayor resolución se alcanzará. Otros factores que intervienen en la resolución de este instrumento son la velocidad y el tamaño con que se barre la topografía de la muestra (con una velocidad menor y con barridos de tan solo algunas micras, se permite que el software adquiera mayor información), la densidad de puntos y líneas con las que sean capturadas las imágenes y la electrónica del equipo.

Las importantes ventajas que presenta el AFM frente a otros tipos de microscopios [23,24] son: relación señal-ruido muy elevada que permite la visualización de superficies a una resolución inferior al nanómetro, la capacidad de estudiar la nanoestructura de la superficie de películas de lípidos y cambios conformacionales de biomoléculas en medio acuoso y en tiempo real, además la posibilidad de medir directamente propiedades físicas de la muestra. Los tres modos de operación del instrumento son principalmente la microscopía de fuerza atómica de contacto, de no contacto y Tapping. En el presente trabajo se usó el Modo contacto o Medición de fuerzas y Tapping o Modo Intermitente; en este modo la superficie de la muestra está en contacto todo el tiempo con la punta de la sonda donde actúan fuerzas de repulsión iónica. Dicho modo permite identificar las diferencias de fricción en la superficie y variaciones en las propiedades de la muestra.

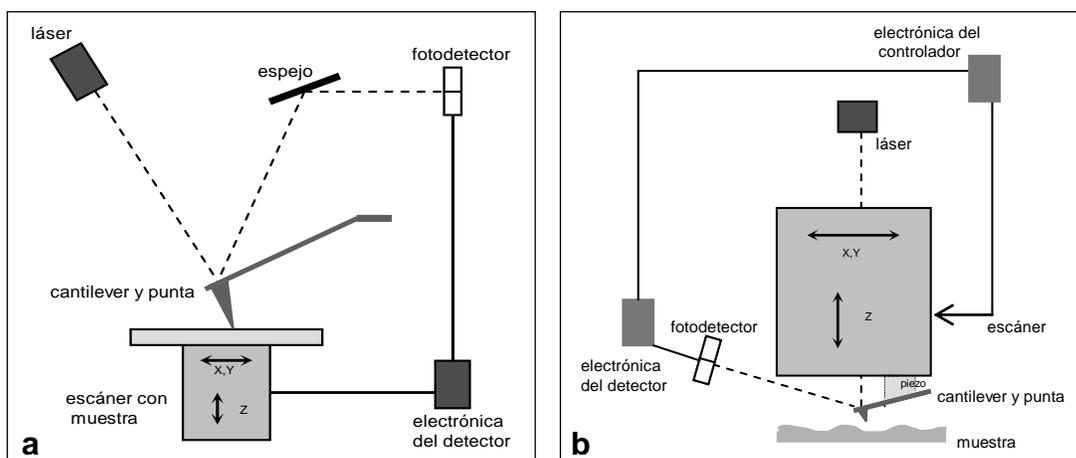


Fig. 5 Diagrama esquemático del escaneo de una muestra en el AFM. Modificado de [21]. Muestra las partes principales que intervienen en el funcionamiento de AFM con geometría 1.

Fig. 6 Esquema modificado de [22] muestra componentes de un AFM con geometría 2.

Aplicaciones del microscopio de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica se empezó a aplicar a muestras biológicas dos años después de ser desarrollada, en 1988 ^[25] aunque debido a las dificultades observadas en la manipulación y observación de este tipo de muestras, fue hasta 1992 cuando se estableció su uso biológico. ^[26,27] A diferencia de otros microscopios de elevada resolución, el AFM permite la visualización de muestras sin necesidad de tinción previa y en solución (húmedas), permitiendo la observación de muestras *in situ*, ^[28] en tiempo real y con diferentes medios acuosos biológicos de la muestra.

El AFM se ha utilizado en diversos estudios con materiales biológicos. Una de las primeras moléculas de tipo biológico que fue visualizada por AFM fue el ADN. ^[26] La visualización se realizó en aire, sobre una mica recubierta con una delgada capa de oro. Algunos ejemplos de muestras biológicas analizadas con el AFM incluyen los ácidos nucleicos, ^[29] proteínas en solución, ^[30] membranas; se ha observado también el arreglo de la pared celular en células vegetales ^[31, 32] células vivas, ^[33, 34] relaciones entre células ^[35] y la estructura y arreglo tridimensional de cromosomas metafísicos humanos, ^[36, 37, 38, 39, 40] la medición de la altura y el volumen en muestras secas ^[41] y húmedas. ^[42] Además el uso del AFM ha abarcado aplicaciones en farmacología, biotecnología, microbiología, biología estructural y genética molecular. Combinando la gran resolución espacial de las imágenes que permite el AFM, se han estudiado las características topográficas de espermatozoides humanos ^[43] para analizar defectos que pongan en riesgo a dicha célula relacionados con infertilidad o el desarrollo del embarazo. También el AFM también se ha usado en la visualización y análisis de complejos procesos biológicos ^[44, 45] *in vivo*.

Otras aplicaciones en las que se aplican las propiedades del AFM son las usadas para hacer mediciones de fuerzas de superficie, elasticidad, adhesión, rigidez, fricción o viscosidad en diversas muestras. Los estudios realizados con el AFM en cuanto a manipulación molecular permiten un mayor conocimiento de las moléculas aisladas y el control de las mismas, pudiendo dar lugar a nanosensores específicos de aplicación biológica directa. ^[46]

En la actualidad se ha modificado la constitución del AFM y según el tipo de investigación que se realice, los investigadores han innovado las técnicas y las maneras de aprovecharlo para resolver sus necesidades, lo han asociado con microscopios ópticos, confocales o de

epifluorescencia ^[47] y lo usan para manipular las muestras, para hacer surcos, devastar o cortar materiales. *Además de imágenes topográficas, el AFM permite obtener información de diferentes propiedades de la muestra, tales como adhesión, dureza, viscoelasticidad o fricción.*

La investigación con el AFM en células se ha enfocado a usarlas vivas o fijadas, húmedas o secas pero siempre completas, cuando se estudia algún componente celular (cromosomas) ha sido porque fueron extraídos. Sin embargo para el continuo desarrollo del conocimiento es también muy importante reconocer los procesos biológicos que se llevan a cabo dentro de ella. En 1998 Jiménez-García y Fragoso ^[48] con el propósito de indagar a ese respecto; utilizaron cortes de material biológico procesado con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión para llevar a cabo registro de imágenes con el microscopio de fuerza atómica. Se dieron cuenta de que esas “rebanadas” tan delgadas de tan solo unas cuantas milésimas de milímetro de las muestras biológicas contenidas en esos bloques endurecidos por la resina, tenían cierto relieve, el cual podía ser apreciado con ayuda del AFM para obtener una imagen tridimensional.

La estructura *in situ* de varios tipos celulares ha sido ampliamente estudiada, recientemente se ha comenzado a usar el AFM para éste propósito ^[28,49,50,51,52] siendo posible reconocer en las imágenes el contorno de las paredes celulares bien definidos, vacuolas, el núcleo celular, un patrón reticulado en la cromatina, poros nucleares; los resultados de dichos trabajos demuestran que la estructura celular puede ser analizada con microscopía de fuerza atómica en esas muestras procesadas de esa manera.

Tabla 2 Comparación entre 3 tipos de microscopios (MO, MET, AFM).

	Microscopio Óptico	Microscopio Electrónico de Transmisión	Microscopio de Fuerza Atómica
Medio de observación	Aire, líquido o vacío	Vacío	Aire, ambiente, líquido o vacío
Profundidad de campo	Pequeña	Pequeña	Mediana
Fuente de energía	Lámpara de incandescencia	Filamento de tungsteno	
Imagen dada por	Refracción de rayos luminosos	Dispersión de electrones	
Características de la muestra	húmeda o seca	seca, conductora de electricidad	dura, plana, no conductora y/o húmeda
Material biológico	Vivo o muerto	Muerto	Vivo o muerto
Límite de resolución	0.2 μm		0.1 a 1.0 nm
Resolución en X,Y	1,0 μm	5 nm	2-10 nm
Resolución en Z	--	--	0,05 nm
Fijadores	Aldehídos	Aldehídos Tetróxido de osmio	Aldehídos Tetróxido de osmio
Inclusión	Parafina Resina epoxica	Resina epoxica Resina acrílica	Resina epoxica Resina acrílica
Corte	Mano alzada Micrótomos	Ultramicrotomo	Ultramicrotomo
Espesor de corte	5 a 10 μm	60 a 90 nm	250 a 300 nm

3. Objetivos

Objetivo General

- Observar las fases de la mitosis de la raíz de cebolla con el microscopio de fuerza atómica.

Objetivos particulares

- Analizar si el microscopio de fuerza atómica permite resolver estructuras celulares involucradas en el sustrato celular de la herencia.
- Conocer la utilidad del DGD como una resina de inclusión para observar muestras biológicas con el AFM.

4. Hipótesis

Si la estructura de la cromatina se ha observado en interfase con el Microscopio de Fuerza Atómica en cortes semifinos de material biológico procesado para Microscopía de Electrónica de Transmisión, entonces las diferentes fases de la mitosis se pueden observar porque la cromatina está condensada formando los cromosomas.

5. Justificación

Durante la mitosis las células se dividen y dan lugar a células nuevas; siendo un proceso elemental en los organismos eucariontes, tanto su adecuado estudio como su entendimiento permiten adentrarse en la adquisición de conocimiento del sustrato celular de la herencia y de la composición íntima de la materia viva.

Estudiar muestras biológicas *in situ* con el microscopio de fuerza atómica y llegar a hacerlo con una resolución propia de dicho instrumento, permitirá adquirir una idea más clara de la continuidad genética de los organismos y de la morfología de sus sistemas de organización.

Como modelo biológico se usó *Allium cepa* porque presenta varias ventajas, entre ellas están; que las condiciones de cultivo y crecimiento de sus bulbos son fáciles y se pueden obtener varios meristemas de raíz por cada uno, es un sistema económico de fácil manejo que permite obtener resultados reproducibles en poco tiempo, el tamaño de los cromosomas es adecuado para el análisis citológico y se pueden llevar a cabo estudios sobre su organización celular *in situ*.

La posibilidad de estudiar muestras biológicas en el AFM, demostrar que las observaciones provenientes de ese microscopio son fidedignas, que la topografía y medidas obtenidas corresponden al material biológico; abre la posibilidad de que posteriormente se obtenga una mayor resolución con este tipo de instrumentos para poder adentrarse en el conocimiento de la biogénesis de la maquinaria de traducción y la visualización de los genes en acción.

6. Metodología

Se trabajó con cebollas (*Allium cepa*) comunes adquiridas comercialmente. Para obtener raíces se pusieron varios bulbos sumergidos en frascos llenos de agua a temperatura ambiente, cada bulbo sujeto con dos o tres palillos, de manera que la parte inferior de éste quedara vertical e inmerso en el agua. Al cabo de 3 a 4 días aparecieron numerosos meristemas radiculares en crecimiento con una longitud que iba de 3 a 4 cm. Se cortaron de 2-3 mm de la porción apical de las raíces sobre una placa de parafina, la cual contenía unas gotas de la solución fijadora (glutaraldehído o paraformaldehído según el tipo de resina a utilizar).

6.1 Procesamiento para resina epóxica (Epon 812)

Las raíces cortadas se colocaron en un frasco con 1ml de solución fijadora (mezcla 1:1 de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4% en PBS al 0.1 M y pH 7.2) durante 1.5 horas, extrayendo el aire por medio de una jeringa para generar un vacío durante los primeros cinco minutos. Transcurrido el tiempo de fijación, se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS y se postfijó con tetraóxido de osmio al 1% durante una hora. Se volvieron a hacer lavados de 5 minutos cada uno, con buffer de fosfatos.

La deshidratación se llevó a cabo con alcohol etílico a concentraciones graduales para evitar daños en la ultraestructura celular (30,50,70,80,90 y 96%) durante 10 minutos para cada una de ellas, asimismo se realizaron tres cambios de 15 min con etanol absoluto. Posteriormente se le hicieron a las muestras tres cambios con el agente intermediario (óxido de propileno) de 10 minutos cada uno.

Para poder cortar la muestra en rebanadas muy delgadas es necesario introducirle un material que le confiera dureza, para ello se utilizan diversos tipos de resinas que en cierto

momento son monómeros, pero bajo ciertas condiciones (T°) se vuelven polímeros, endurecen y permiten que el material en interés se pueda cortar tan delgado.

Para la preinclusión las raíces se dejaron en una mezcla hecha de una parte de óxido de propileno y una parte de Epon, al término de 20 horas a temperatura ambiente se abrieron los frascos en los que se procesó el material para lograr la completa evaporación del óxido de propileno.

Se incluyeron las muestras con resina pura (Epon 812) de dureza intermedia en moldes planos de silicón; cada raíz se acomodó a lo ancho y en los extremos de cada cavidad del molde, para que posteriormente se pudieran obtener cortes longitudinales de cada raíz. La polimerización del Epon se llevó a cabo en una estufa a 60°C durante 48 horas.

6.2 Procesamiento para resina acrílica (Lowicryl K4M)

La muestra se fijó con una mezcla 1:1 de paraformaldehído al 4% en PBS al 0.1 M y pH 7.2, durante una hora. Transcurrido el tiempo de fijación, a la muestra se le realizaron tres lavados de cinco minutos con el mismo buffer. Se deshidrató el tejido con alcohol metílico al 30 y 50% a 4°C durante cinco minutos con cada uno, después con metanol al 70% a -20°C por cinco minutos y con metanol al 90% también a -20°C durante 30 minutos. Después se infiltró la muestra con una solución 1:1 de metanol al 90% y Lowicryl durante una hora a -20°C , continuando con una mezcla 1:2 de metanol al 90% y Lowicryl por 30 minutos a -20°C .

Posteriormente se hicieron dos cambios de Lowicryl puro, el primero durante una hora a -20°C y el segundo durante 20 horas. Las muestras se incluyeron en cápsulas de gelatina y se polimerizaron en una cámara de luz ultravioleta a -20°C durante 48 horas a temperatura ambiente por 24 horas más.

6.2.1 Corte, tinción y contraste

Los bloques de Epon y Lowicryl se trabajaron en un ultramicrotomo modelo ultracut R, de la marca Leica y se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos.

Explico brevemente el proceso de corte; a los bloques se les talló una pirámide en el extremo donde se encontraba el tejido y se obtuvieron los cortes con cuchilla de vidrio. La cuchilla cubierta con cinta adhesiva forma una barquilla que se llena de agua y en ella son recibidas las rebanadas de los bloques, éstas se mantienen “flotando” en la interfase del aire y agua. Posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica se recogen los cortes semifinos (2 μm de grosor), se depositan sobre un portaobjetos, se fijan al vidrio con calor y se tiñen con azul de toluidina o paragón, ambas al 1%.

Del material incluido en resina epóxica se obtuvieron cortes ultrafinos (60 y 90 nm de grosor) que fueron montados en rejillas de cobre previamente cubiertas con una membrana de formvar.

La tinción de los cortes semifinos se llevó a cabo calentando suavemente el portaobjetos a la llama del mechero hasta que la gota de agua que contenía los cortes se evaporara y éstos quedaran adheridos al vidrio. Se agregaron sobre los cortes unas gotas de azul de toluidina al 1% y se calentó la laminilla hasta conseguir la emisión de vapores tenues, evitando la ebullición. Al observarse alrededor del colorante un halo de color verde, los portaobjetos se lavaron con suficiente agua y se dejaron secar para su observación.

Otros cortes semifinos de lowicryl se tiñeron con DAPI (4,6-Diamidino-2-fenilindol bicloruro) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Para el contraste de los cortes ultrafinos se hizo flotar cada rejilla sobre una gota de acetato de uranilo al 4%, durante 20 minutos, en una cámara húmeda. Se lavaron por goteo con suficiente agua bidestilada, después en otra cámara húmeda y en presencia de NaOH las rejillas se flotan sobre una gota de citrato de plomo al 0.35%, durante 10 minutos. Finalmente se lavan con agua bidestilada y se dejan secar a temperatura ambiente para su posterior observación en el MET.

6.2.2 Registro de imágenes

Los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina incluidos en Epon, se observaron en campo claro en un microscopio eclipse E800 (Nikon) con un objetivo 100X. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FLASH Point 3D FPG.

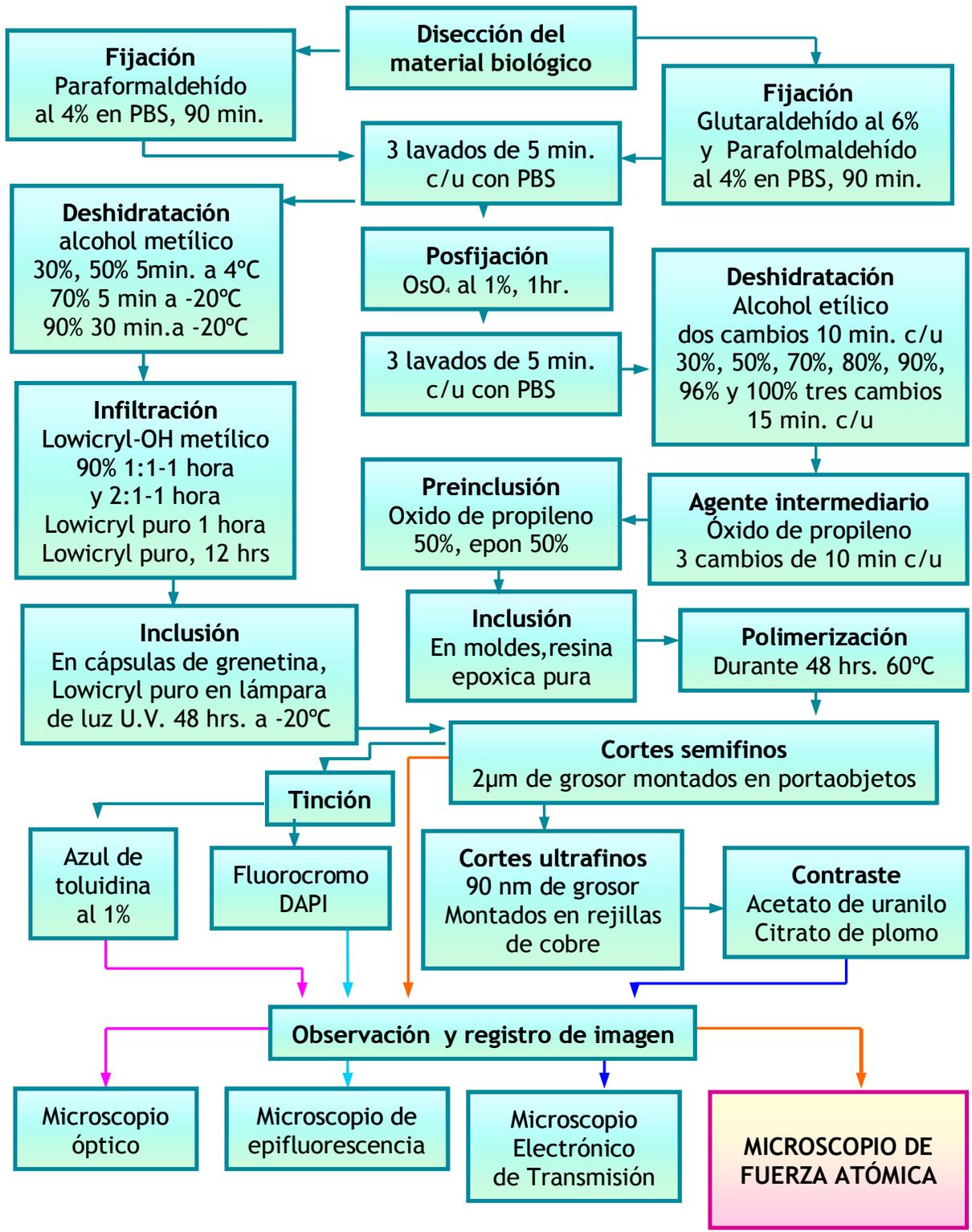
Los cortes montados en las rejillas de cobre se observaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión 1010 de la marca Jeol a diferentes aumentos, las imágenes se registraron digitalmente con el programa Scion Image.

Para la Microscopía de Fuerza Atómica se llevaron a cabo observaciones en dos equipos diferentes; en un Bioscope marca Digital Instruments con un controlador NanoScope III A y en un microscopio de tunelamiento modelo Innova, marca Veeco.

En el Innova se puede llevar a cabo la Microscopía de Fuerza Atómica y así se registraron las imágenes, en modo Tapping™. En el portamuestras de éste equipo no cabe un portaobjetos convencional por eso se usaron portaobjetos de 1 cm² para montar los cortes semifinos, después fueron pegados con una etiqueta de doble cara a un portamuestras metálico y se colocaron en el escáner de Innova para llevar a cabo la observación de las muestras que se registró en modo Tapping™ con una punta premontada TESP, de un radio de curvatura entre 10-15nm.

Las imágenes obtenidas en el Bioscope fueron registradas en modo de Contacto con una punta DNP de 20-60nm de radio de curvatura.

Todas las micrografías obtenidas fueron optimizadas con el Software para NanosScope versión 7.30.



Cuadro 2: Procesamiento de las raíces de cebolla, incluidas en resina Epóxica y Lowicryl para obtener imágenes en cuatro diferentes instrumentos. ■ Microscopio Óptico ■ Microscopio de Epifluorescencia ■ Microscopio Electrónico de Transmisión ■ Microscopio de Fuerza Atómica

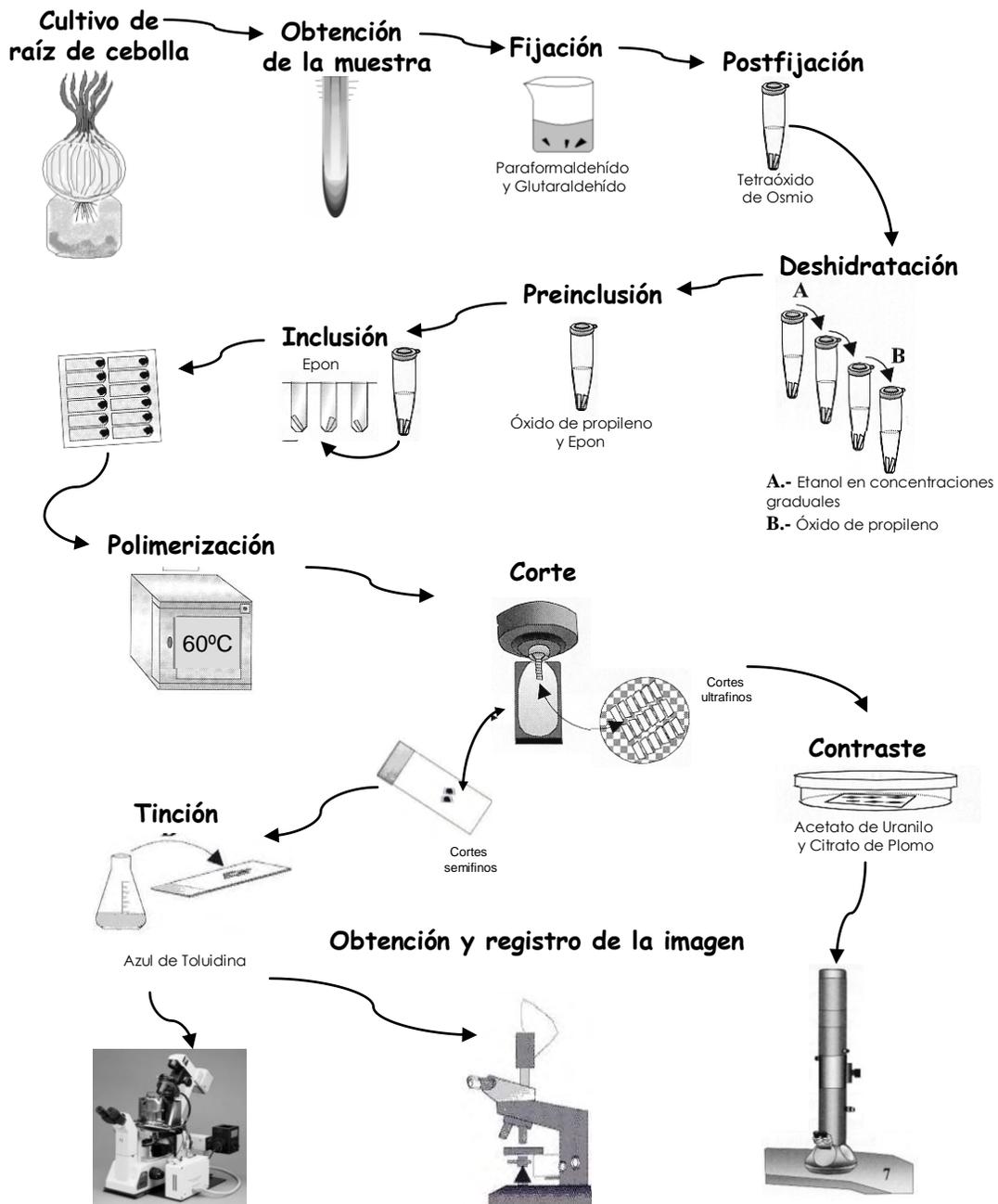


Diagrama de Flujo 1: Procesamiento de raíces de *Allium cepa* para su observación con Microscopio de Fuerza Atómica

6.3 Procesamiento de material biológico incluido en DGD (Diesterato de dietilen glicol)

Las raíces de cebolla (*Allium cepa*) se fijaron con glutaraldehído al 6% en PBS (amortiguador de fosfatos, 0.16 M a pH 7.2) como vehículo del fijador, durante tres horas. Se hicieron 3 lavados de 20 minutos cada uno con buffer PBS.

La muestra se postfijó con una solución 1:1 de tetraóxido de osmio y PBS toda la noche, se enjuagaron 2 veces con PBS haciendo cada cambio de 10 minutos cada uno.

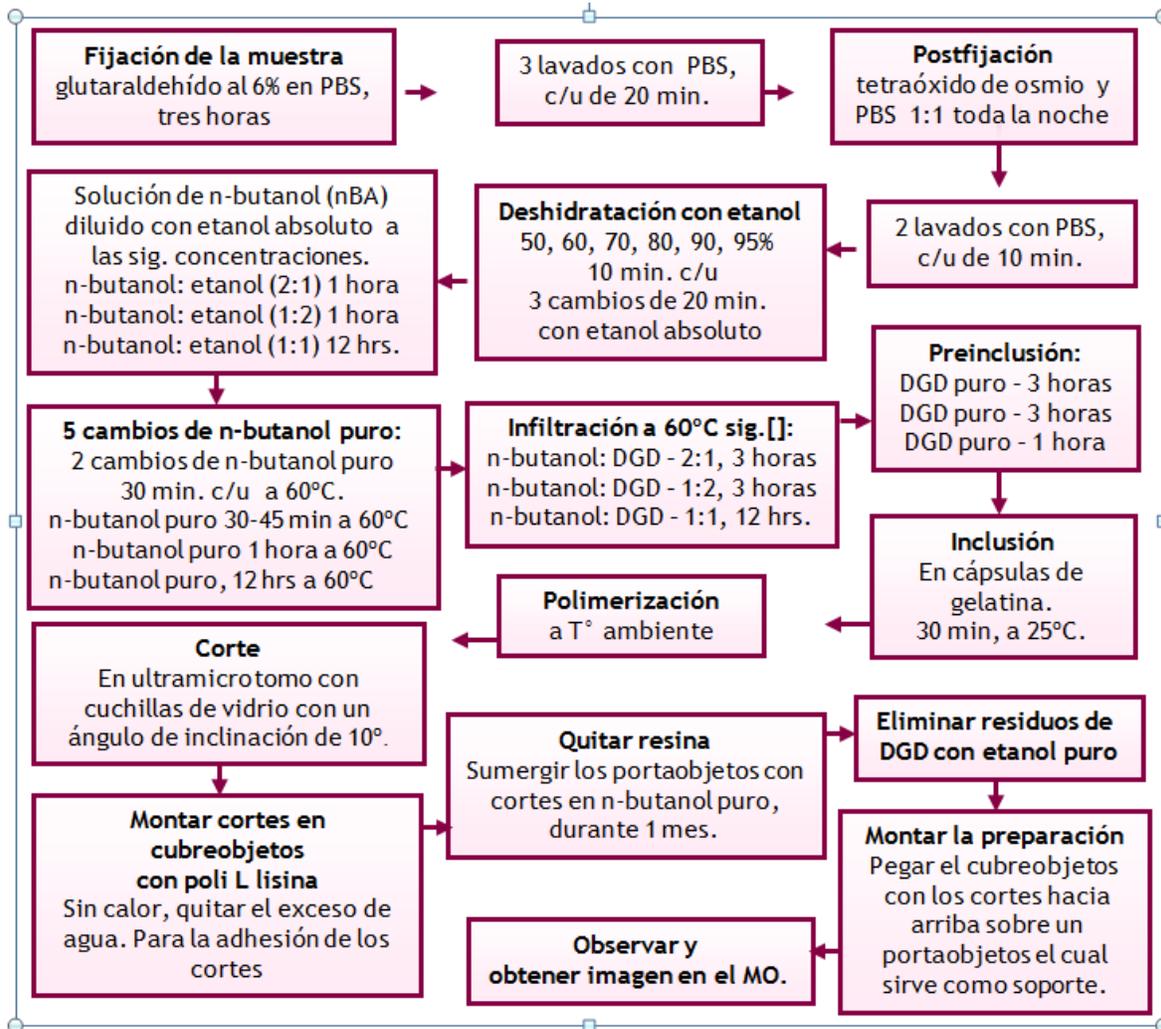
La deshidratación se llevó a cabo gradualmente primero con etanol a diferentes concentraciones (50, 60, 70, 80, 90, 95%) transcurriendo diez minutos en cada una, terminando con tres cambios de etanol absoluto de 20 minutos cada uno. El proceso continúa poniendo las raíces en una solución de n-butanol (nBA) diluido con etanol absoluto a las siguientes concentraciones: n-butanol: etanol (2:1) 1 hora, n-butanol: etanol (1:2) 1 hora, n-butanol: etanol (1:1) toda la noche. Y termina con 5 cambios de n-butanol puro a 60°C en una estufa. Los dos primeros cambios fueron de 30 minutos cada uno, el tercero fue con una duración de 30 a 45 minutos, el cuarto de 1 hora y el quinto cambio durante toda la noche.

Para preincluir el material se utilizaron soluciones de n-butanol: DGD y se llevó a cabo en una estufa a 60°C. El primer cambio fue de n-butanol: DGD a una dilución 2:1 durante 3 horas, el segundo fue de n-butanol: DGD – 1:2 por 3 horas y el tercero de n-butanol: DGD – 1:1 toda la noche.

La infiltración se llevó a cabo con DGD puro a 60°C; haciendo dos cambios con una duración de tres horas cada uno y el tercero duró una hora. Por último las muestras se incluyen en cápsulas de gelatina tapadas (importante evitar contacto de los bloques con la humedad del ambiente) con DGD puro a temperatura ambiente tardan 30 minutos en polimerizar. Los bloques se cortan en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio con un ángulo de inclinación de 10°.

El asa utilizada para recoger los cortes de DGD debe limpiarse (quemándola y después enfriándola con agua limpia) antes y después de levantar cada rebanada encontrada en la barquilla de la cuchilla. Se sugiere sumergir en la barquilla el asa para levantar por abajo los cortes; “se pescan”.

En la realización de cortes ultrafinos la rejilla debe ser descargada (quitarle cargas) para poder sumergirla en la barquilla y levantar por debajo los cortes ultrafinos. Esto se logra lavando la rejilla por goteo y quitando el excedente de agua de la pinza y la rejilla haciendo contacto con pequeño trozo de papel filtro.



Cuadro 3: Procesamiento de las raíces de cebolla, incluidas en DGD, Diesterato de Dietilen Glicol.

7. Resultados

En este trabajo se obtuvieron imágenes *in situ* de células en mitosis del meristemo de la raíz de cebolla con el microscopio de fuerza atómica a partir de cortes semifinos de muestras preparadas con técnicas de rutina para microscopía electrónica de transmisión. Se obtuvieron micrografías con el microscopio electrónico de transmisión; sin embargo sólo se muestra una serie de imágenes obtenidas con microscopía de luz, y micrografías de fuerza atómica de las distintas fases de la mitosis.

7.1 Imágenes obtenidas con Microscopio de Luz, inclusión en Epon

Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina para reconocer las fases de la mitosis. Las muestras se observaron en el microscopio de campo claro. La Fig. 7 muestra los resultados. En la Fig. 7^a se muestra una célula en interfase. La cromatina es reticulada y se observaron dos nucleolos.

En la 7B se observa una célula en profase. La cromatina está más condensada y se nota la presencia de un nucleolo pequeño. En la metafase (7C), no se reconoce el límite nuclear y los cromosomas se observan condensados y distribuidos en el ecuador de la célula. En la anafase (7D) los cromosomas migran a las células hijas. En telofase (7E) los cromosomas se descondensan y se adquiere la estructura de la cromatina. También se observa el surco de división celular y los nucleolos en formación.

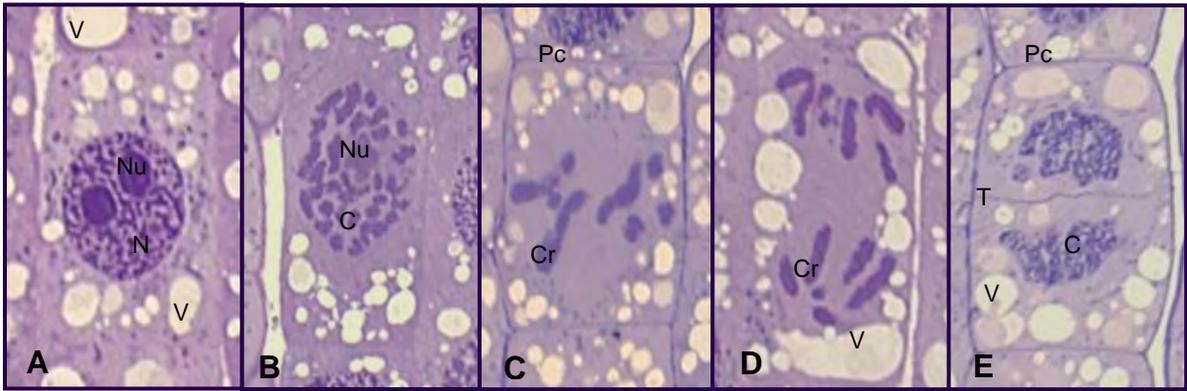


Fig. 7: Micrografías de Microscopía de Luz obtenidas a partir de cortes semifinos, 40X. A) Interfase, B) Profase, C) Metafase, D) Anafase, E) Telofase. Se señalan las siguientes estructuras V, Vacuola; N, Núcleo Celular; Nu, Nucleolo; Pc, Pared Celular, C, Cromatina; Cr, Cromosomas.

7.2 Imágenes obtenidas con Microscopio de Fuerza Atómica, inclusión en Epon

Las imágenes de figuras mitóticas obtenidas con microscopio de fuerza atómica a partir de cortes semifinos se muestran en las figuras de la 8 a la 17. La determinación de cada fase se llevó a cabo con parámetros similares a los de microscopía de campo claro, como son los límites celulares determinados por la pared celular, el espacio nuclear deformado por la cromatina o los cromosomas.

En interfase el núcleo presenta cromatina reticulada similar a lo observado con el microscopio de luz. El nucleoplasma se nota oscuro. En proyección tridimensional la resolución vertical muestra la cromatina como una red de material elevado.

En profase (Figs. 10 y 11) la cromatina es más condensada y el perfil topográfico es más evidente.

En metafase el núcleo no se observa pero sí los cromosomas como cuerpos discretos (Fig. 14) y en proyección tridimensional, como cuerpos que sobresalen sobre la superficie del corte de manera muy evidente.

En anafase (Figs. 16 y 17) los cromosomas migran a los polos y se aprecian los brazos individuales. La resolución vertical se encuentra en el rango de los cientos de nanómetros.

En telofase (Figs. 18 y 19) se ha formado el tabique celular y los nucleolos se reforman, al mismo tiempo que los cromosomas se descondensan y se comienza a apreciar el nucleoplasma.

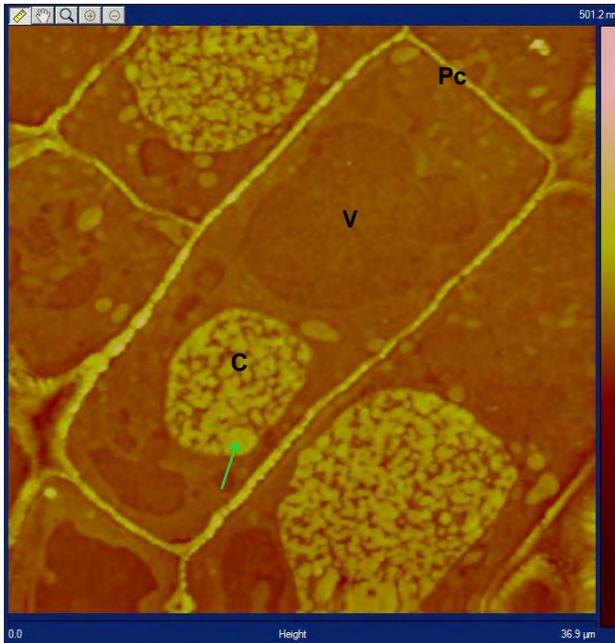


Fig. 8: Imagen topográfica de fuerza atómica en dos dimensiones obtenida con un AFM Modelo BioScope en modo de contacto con una punta DNP. Muestra células en interfase con cromatina reticulada (C) delimitadas por la pared celular (Pc), la flecha verde señala un nucleolo. Nótese la presencia de vacuolas en el citoplasma las cuales se distinguen del resto del material celular por los tonos más oscuros que presentan. Barrido de 369μm. La escala de color a la derecha de la imagen representa la profundidad de campo visual de la imagen (501.2 nm).

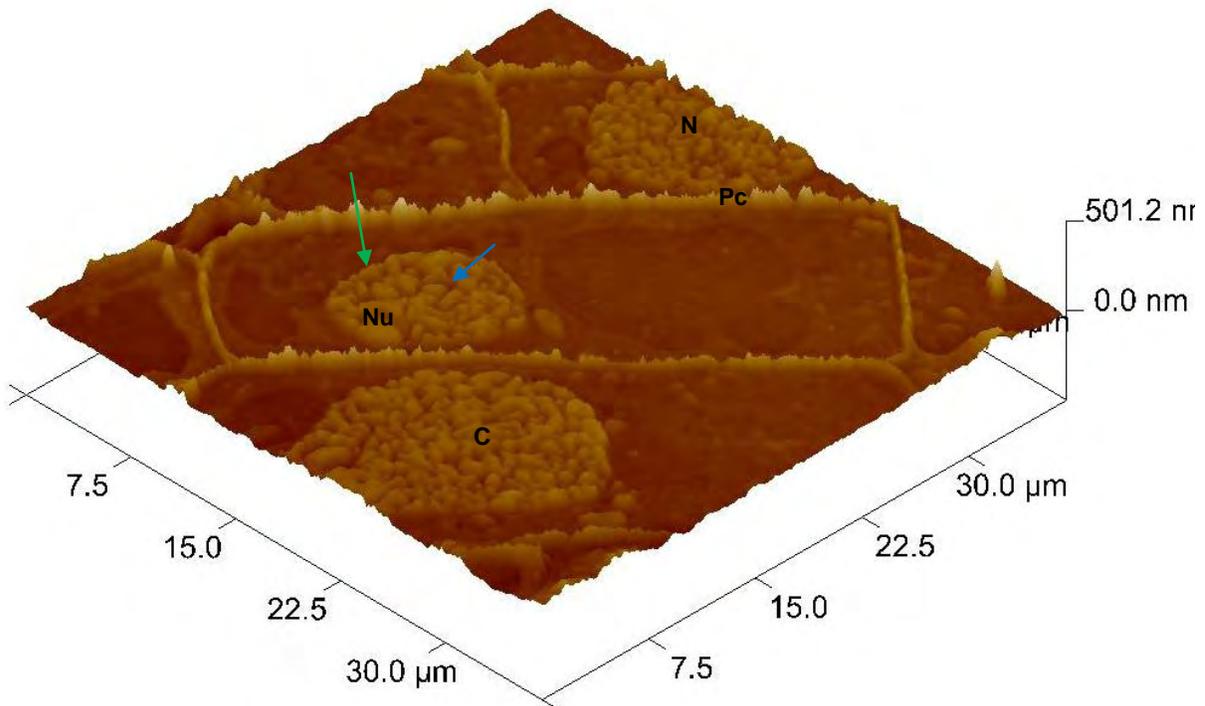


Fig. 9: Micrografía de Microscopía de Fuerza Atómica muestra una imagen en tres dimensiones de una célula de *Allium cepa* delimitada por una pared celular (Pc), núcleo interfásico (N), nucléolo (Nu), cromatina reticulada (C), límite nuclear (flecha azul), espacio intercromatiniano (flecha verde). El relieve muestra diferentes tonalidades que hacen referencia a la topografía de la muestra, el rango entre el punto más elevado y el más profundo de la muestra es de 512nm. Proyección en paralelo y girada 315° mediante el Software 7.30 de Veeco.

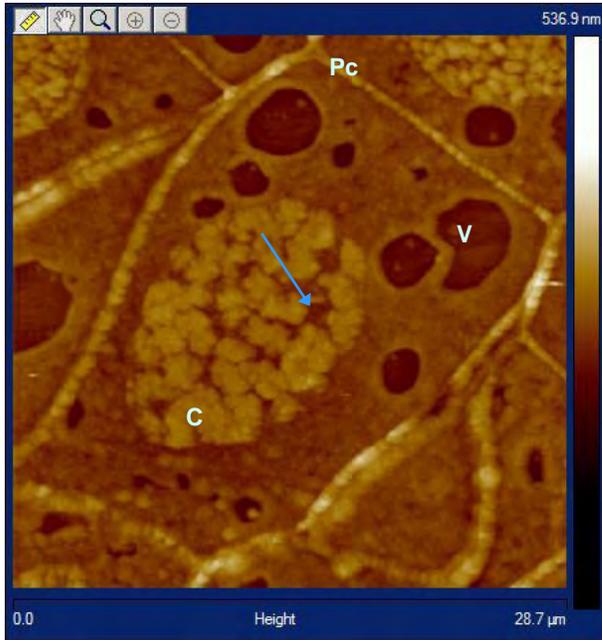


Fig. 10: Imagen de 256 líneas x 256 puntos, obtenida en modo de contacto con un microscopio de fuerza atómica (BioScope) y puntas DNP, con una velocidad de barrido de 3.30 Hz, barrido de 28.7 μ m.

Las estructuras más oscuras son las vacuolas (V), al centro en tonos amarillos la cromatina (C) y entre ella, de tonos más oscuros los espacios intercromatinianos (flecha azul).

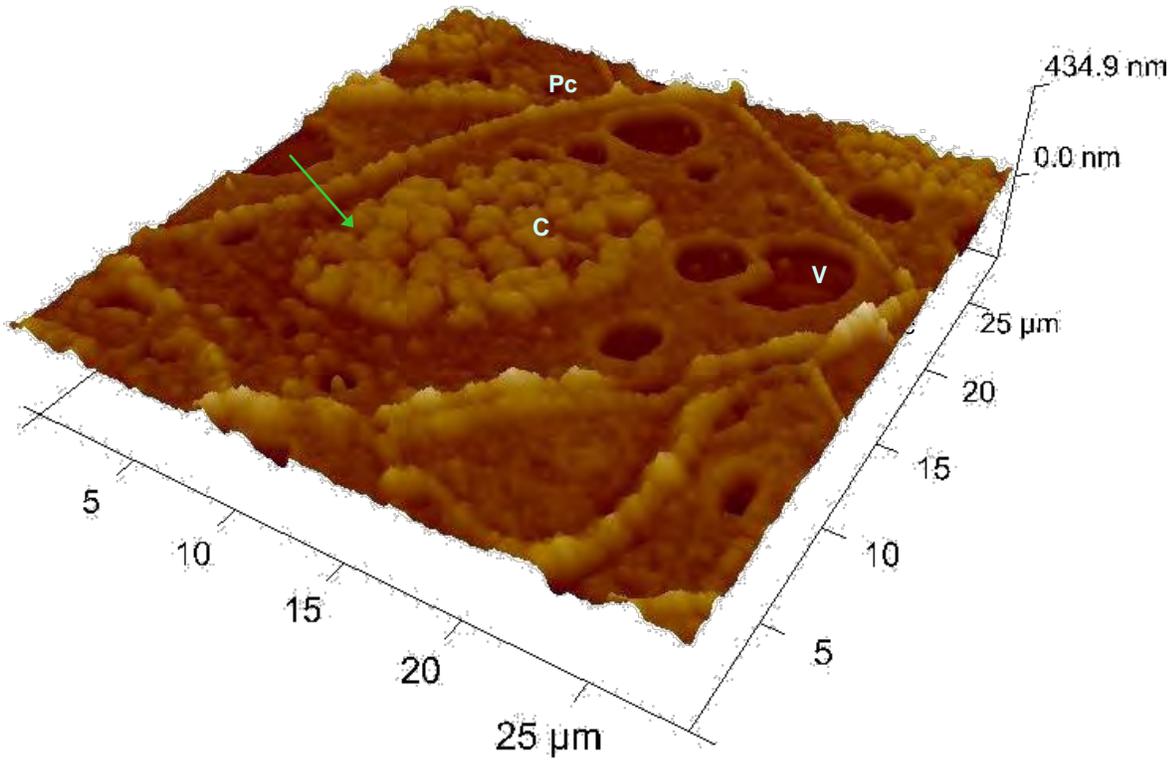


Fig. 11: Proyección en perspectiva de una micrografía de Microscopía de Fuerza Atómica. Imagen obtenida en un Bioscope en modo de contacto y optimizada con el Software 7.30 de Veeco para NanoScope. Rotación de 329°. Área rastreada en los ejes X y Y de 28.7 μ m y en el eje Z de 434.9 nm. Al centro, célula en profase, nótese la cromatina (C), los espacios intercromatinianos (flecha verde) y la variedad en la coloración y topografía de la muestra.

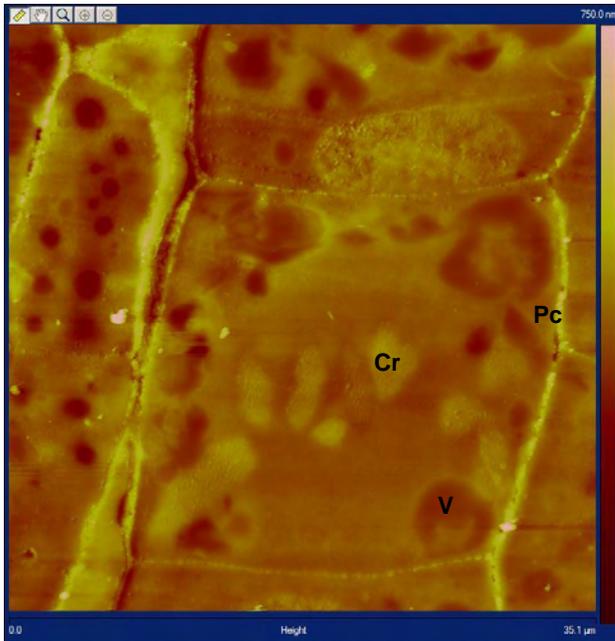


Fig. 12: Micrografía obtenida con Microscopía de Fuerza Atómica-Innova, en modo Tapping que muestra una célula en metafase. Nótese con ayuda de la escala de color presentada a la derecha de la imagen; en el centro de la célula de tonos amarillos y con material más denso, los cromosomas (Cr) alineados en el ecuador celular, es claro también el límite celular (Pc) y la vacuolas (V) del material. Imagen de altura, barrido de 35.1 μm .

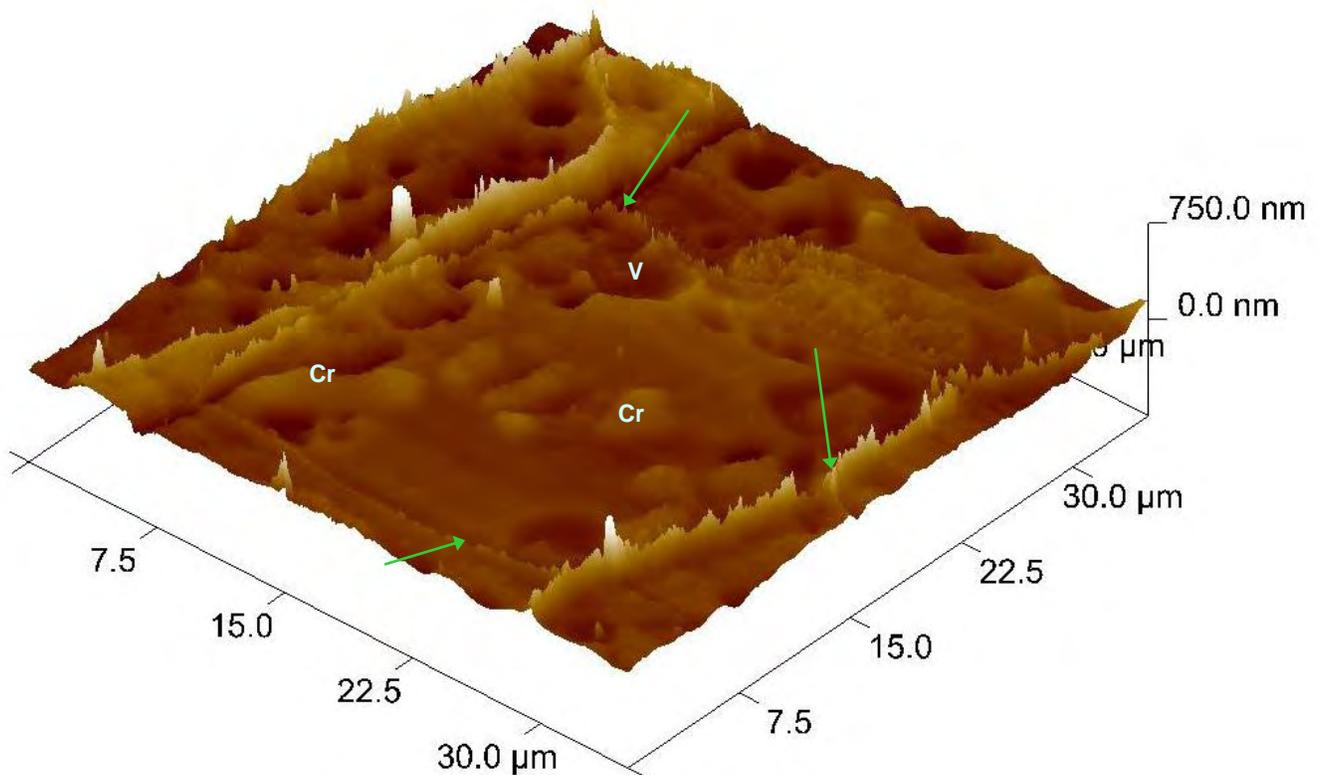


Fig. 13: Proyección tridimensional en paralelo obtenida con un Innova (microscopio de fuerza atómica) en modo de Tapping con una punta premontada TESP de un radio de curvatura que oscila entre los 10 y los 15nm. El barrido tiene 35.1 μm por lado y una concentración de 512 líneas x 512 puntos. Proyectada con el Software 7.30 para NanoScope. Las flechas verdes señalan las paredes celulares, al centro de un material más tupido y de tonos más claros se encuentran los cromosomas (Cr). Las vacuolas (V) se notan con hendiduras en la topografía de la muestra.

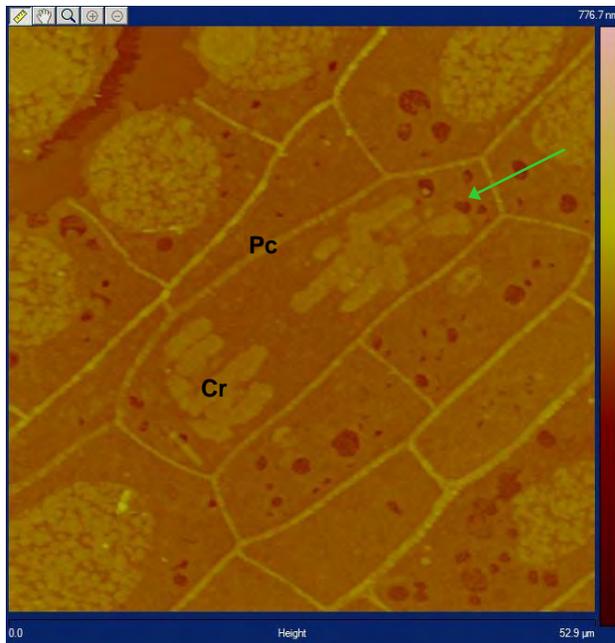


Fig. 14: Imagen de altura obtenida con un microscopio de fuerza atómica que muestra al centro una célula en Anafase. Obsérvese la escala de color a la derecha de la imagen, nótese la variedad de tonos en la imagen que evidencian variedad en la topografía de la muestra. Las vacuolas (flecha verde) rojas y los cromosomas (Cr) y paredes celulares (amarillos).

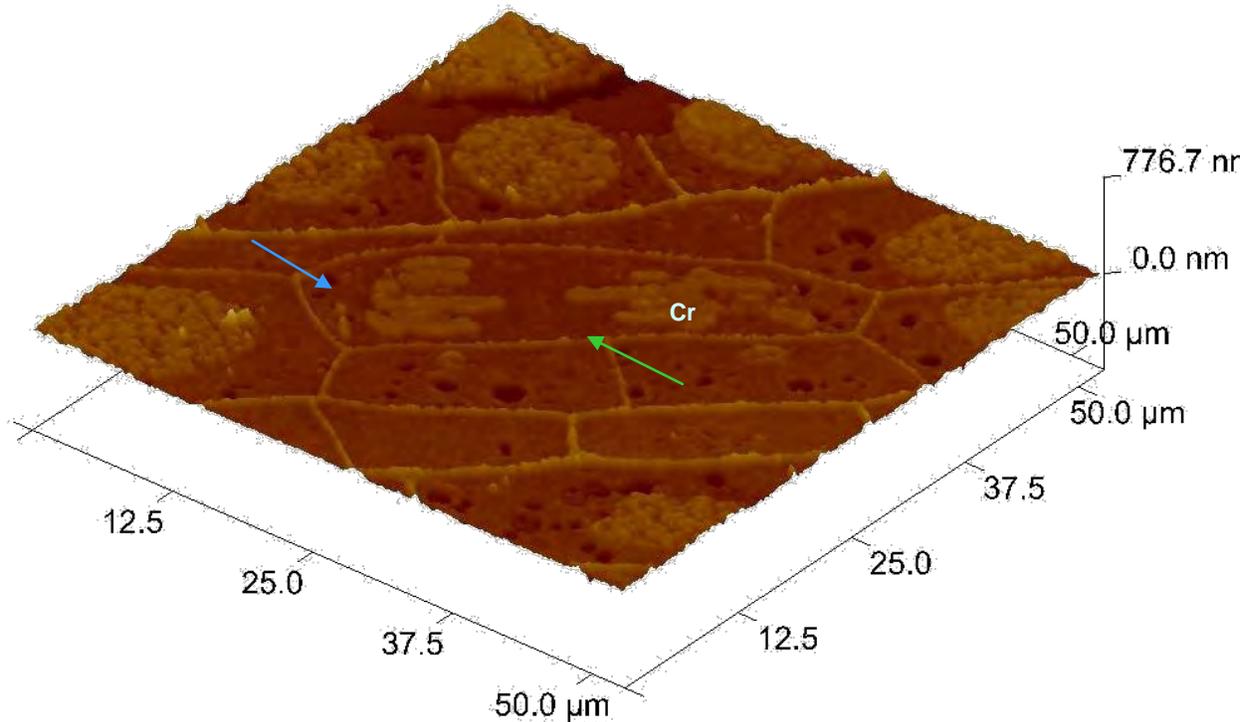


Fig. 15: Proyección en paralelo de un barrido de 52.9 μm de lado, obtenido en un BioScope con puntas DNP, velocidad de barrido de 2.39 Hz, imagen de 256 puntos x 256 líneas. Muestra al centro una célula en Anafase con los cromosomas (Cr) alineados hacia los polos. Se hallan señaladas Vacuolas (flecha azul) y paredes celulares (flecha verde). Girada 312° con el Software 7.30 para NanoScope.

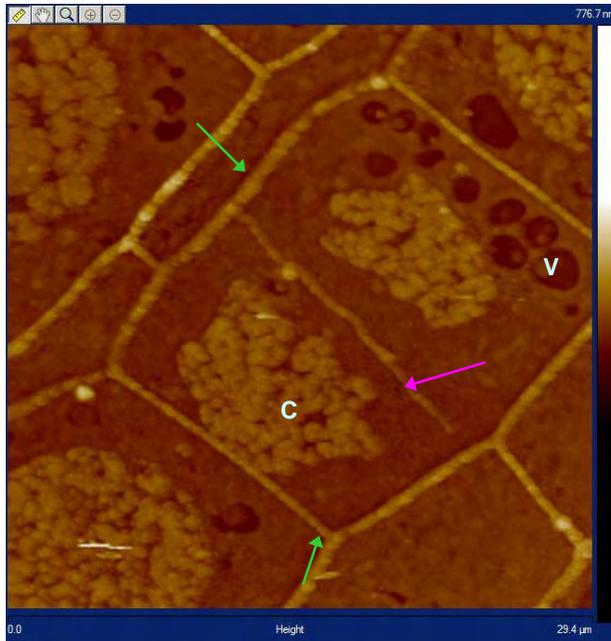


Fig. 16: Imagen de Microscopía de Fuerza Atómica que muestra una célula en telofase. Modo de contacto, barrido de 29.4 μm, a una velocidad de 1.13 Hz, 256 líneas x 256 puntos. Tabique (I) de división celular señalado con la flecha rosa, paredes celulares (Pc) limitando las células, cromatina (C) y vacuolas (V) presentes.

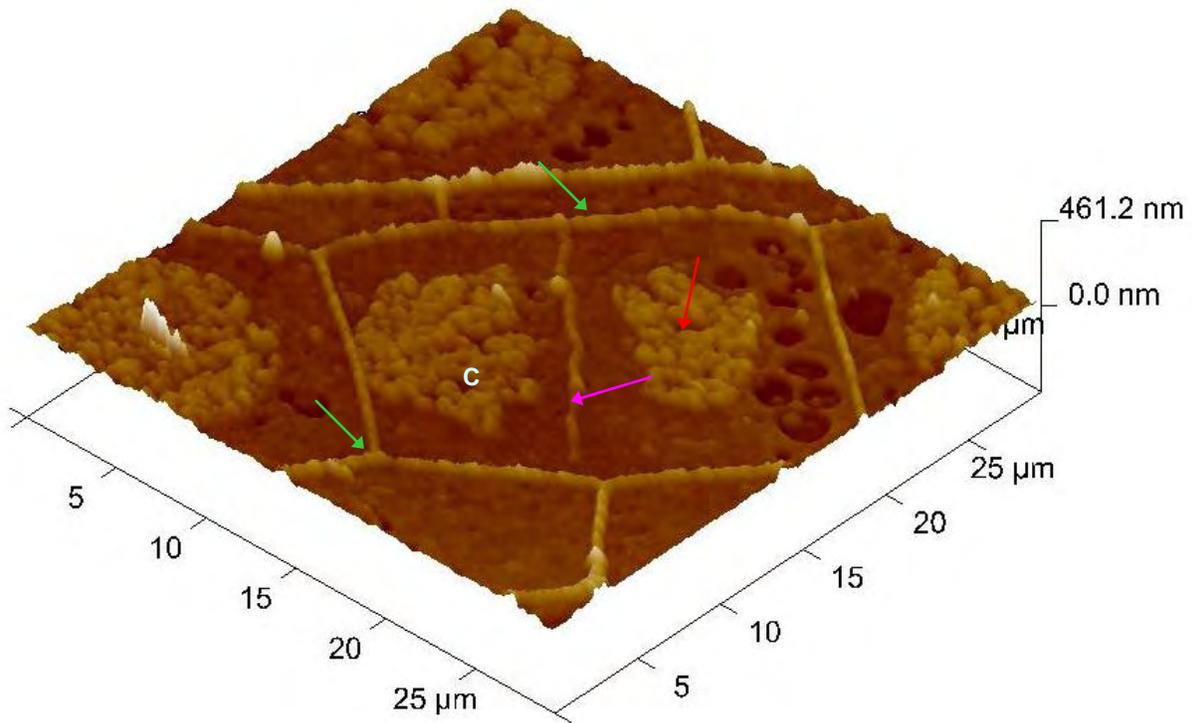


Fig. 17: Proyección tridimensional en paralelo de una célula en Telofase, girada 317° obtenida con un BioScope en modo de contacto. Las flechas verdes señalan las paredes celulares, la flecha rosa muestra el tabique que separa a las células hijas, la cromatina (C) se observa más conspicua y es evidente también el espacio intercromatiniano (flecha roja). La imagen en el eje Z alcanza 461.2nm de altura.

8. Discusión

En este trabajo se observaron las de diferentes fases de la mitosis con el microscopio de Fuerza Atómica a partir de cortes semifinos de raíz de cebolla procesada con la técnica convencional de microscopía electrónica de transmisión con resina epóxica.

Las figuras corresponden a diferentes fases de la mitosis pues la morfología de los elementos celulares es similar y comparable a lo observado con el microscopio de luz.

De acuerdo a la escala en ambos tipos de imágenes, la observación de la cromatina es de tipo reticulada, correspondiente en ambos casos a elementos fibrosos de similares dimensiones; así como se ha visto la cromatina reticulada en trabajos previos con microscopía de fuerza atómica ^[16, 21, 28, 48].

La morfología de los brazos de los cromosomas tanto en su posición central en metafase como en anafase en los polos, observada en las micrografías de fuerza atómica corresponde con las descripciones morfológicas clásicas^[8]. La telofase ha sido determinada por el surco de división, el tamaño de los núcleos hijos, que es más pequeño y la descondensación de los cromosomas.

La posibilidad de analizar con el microscopio de fuerza atómica, la reactivación de la expresión genética se deduce de la capacidad para observar los espacios nucleoplásmicos presentes en la telofase, por lo que este trabajo abre esa posibilidad.

9. Conclusión

Las diferentes fases de la mitosis se pueden visualizar con el microscopio de fuerza atómica a partir de cortes semifinos de raíz de cebolla procesada para microscopía electrónica de transmisión.

El AFM nos permite ver las imágenes de las diferentes fases de la mitosis en la raíz de cebolla en tercera dimensión con una resolución mayor que con el MET.

Referencias bibliográficas

- 1) Quiroz, M.E. (2003). Hacia una didáctica de la investigación. Ed. Castillo. Monterrey. México.
- 2) Jiménez, L.F. (2006). Conocimientos fundamentales de Biología. Vol I. Pearson/Educación. México.
- 3) Klug, W.S. & Cummings, M.R. (2005). Essentials of Genetics. 5ª ed. Pearson/Prentice Hall, Nueva Jersey.
- 4) De Robertis Hib. et al. (2004). Fundamentos de Biología Celular y Molecular. 4a ed. El Ateneo. Argentina.
- 5) Díaz-Martínez, L.A. et al. (2007). Mitosis: Cohesión sin cohesina, su regulación. En Program and Abstracts, X Ibero-American Congreso on Cell Biology. (2007). SIBC. UNAM. México.
- 6) Hooke, Robert, 1635-1703. 1989. Micrografia, o, algunas descripciones fisiológicas de los cuerpos diminutos realizadas mediante cristales de aumento con observaciones y disquisiciones sobre ellas. Madrid : Alfaguara. 742 p.
- 7) Margulis, L. 1993. Simbiosis in Cell Evolution microbial communities in the Archean an Proterozoic Eons. Freeman Co. New York. 2nd ed.
- 8) Alberts, B. et al. (2002). Molecular Biology of The Cell, 4ª ed. Garland Sciences. Nueva York.
- 9) Jiménez, L.F. y H. Merchant. (2003). Biología Celular y Molecular. Prentice Hall. México.
- 10) Ford, Brian J. (2002). El nacimiento del microscopio. ContactoS. 45:29-38.
- 11) Lanfranconi, M. (2001). Historia de la Microscopía. Univ. del Mar de Plata. 34: 49-57.
- 12) Berón Homero, María Paula. (2002) Introducción a la Biología; Historia de la Teoría Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar de Plata. Argentina. Ed. C.T. Necesarios. 86-92

- 13) Vázquez Nin G.H., Echeverría O., 2000. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. Fondo de Cultura Económica. México. Mex.
- 14) FEI Electron Optics. 2002. Todo lo que quiso saber sobre la Microscopía Electrónica. Hillsboro. USA.
- 15) Hyams, J.S. y Brinkley, B.R. (1989). Mitosis, Molecules and Mechanisms. Academia Press. San Diego. CA.
- 16) Giménez-Martín, G. (2007). Proliferación celular: Un recorrido. En Program and Abstracts, X Ibero-American Congreso on Cell Biology. (2007). SIBC. UNAM. México.
- 17) López-Saez, J.F., Risueño, M.C., Giménez-Martín, G. (1966). Inhibition of cytokinesis in plant cell. J. Ultrast. Res. 14: 85-92.
- 18) Binnig G., Rohrer H., 1987. Scanning tunneling microscopy-from birth to adolescence. Rev. Mod. Phys. 59:3, 615-625.
- 19) Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E., 1982. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy, Physical Review Letters 49: 57-61 Jul.
- 20) Binnig G., Rohrer H., 1999. In touch with atoms. Reviews of Modern Physics. 71:2 324-330.
- 21) Binnig G., Quate C.F., Gerber C., 1986. Atomic Force Microscope, Physical Review Letters 56: 930-933 Oct.
- 22) Jiménez-García, L.F. y Fragoso Soriano, R., 2000. Atomic Force Microscopy of the Cell Nucleus. Journal of Structural Biology. 129, 218-222.
- 23) Fragoso Soriano, R.J., 2000, Estudio de la estructura celular de *Lacandonia schismatica* por microscopia de fuerza atómica. Tesis, Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- 24) Gimzewski, J.K.; Joachim, C., 1999. Nanoscale science of single molecules using local probes. Science, 283, 1683-1688.
- 25) Alexander, S.; Helleman, L.; Marti, O.; Schneir, J.; Elings, V.; Hansma, P.K. 1989. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. J. Appl. Phys., 65, 164-167.
- 26) Meyer, G. y Amer, N.M., 1988. Novel optical approach to atomic force microscopy. Appl. Phys. Lett., 53, 1045-1047.

- 27) Velegol S.B., Pardi S., Li X., Velegol D. y Logan B.E., 2003. AFM Imaging Artifacts due to Bacterial Cell Height and AFM tip Geopmetry. *Langmuir*. 19:851-857.
- 28) Braga, P.C. y Ricci, D., 2004 How the Atomic Force Microscope Works. En: Braga, P.C. y Ricci, D. Eds. *Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology 242*: 3-12. Humana Press. New Jersey, USA.
- 29) Veeco Instruments Inc. 2003. SPM Training Notebook. Santa Barbara. USA.
- 30) Firtel, M.; Beveridge, T.J., 1995. Scanning Force Microscopy in Microbiology. *Micron*, 26, 347-362.
- 31) Dufrêne, Y.F. y Lee, G.U., 2000. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta*, 1509, 14-41.
- 32) Worcester, D.L.; Miller, R.G.; Bryant, P.J., 1988. Atomic force microscopy of purple membranes. *J. Micros.*, 152, 817-821.
- 33) Bustamante C.D., Keller R., 1995. Scanning Force Microscopy in Biology, *Physics Today*, 32-38.
- 34) Bustamante, C.; Vesenka, J. 1992. Tang, C.L.; Rees, W.; Guthod, M.; Keller, R. Circular DNA imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 31, 22-26.
- 35) Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M.L., 2004. Visualizing Nuclear Structure in situ by Atomic Force Microscopy. En: Braga, P.C. y Ricci, D. Eds. *Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology 242*:191-199. Humana Press. New Jersey, USA.
- 36) Ikeda, S. y Morris, V.J., 2002. Fine-Stranded and Particulate Aggregates of Heat-Denatured Whey Proteins Visualized by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules*, 3, 382-389.
- 37) Pereira, R., S. 2001. Atomic force microscopy as a novel pharmacological tool. *Biochem. Pharmacol.* 62, 975-983.
- 38) Jiménez-García L.F., Reynoso R, Fragoso R, Agredano-Moreno LT, Segura-Valdez ML, Gonzalez S, Ramos CH, Martínez E. 1998, *Biología celular de Lacandonia schismatica. Análisis por Microscopía Electrónica y de Fuerza Atómica*, *Bol. Soc. Bot., México* 62: 5-14.
- 39) Zamora Cura, A. L. Tesis doctoral en proceso. Facultad de Ciencias. UNAM.

- 40) Zamora Cura, A. L. (2006) Estudio del núcleo interfásico de *Soridium sprucean* Miers por microscopía de luz, electrónica y de fuerza atómica. Tesis de Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 41) Segura- Valdez, M.L., et al., 2006. Observaciones sobre la estructura del Núcleo de las Células del Meristemo de Raíz de cebolla (*Allium Cepa* L.) con el Microscopio de Fuerza Atómica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1):30-33.
- 42) Ramírez Nuñez, A.L., 2007. Biología celular de los gránulos de *Lacandonia schismatica*. Tesis, Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- 43) Birdi K.S., 2003, *Scannig Probe Microscopes. Applications in Science and Technology*, CRC Press, Press, USA.
- 44) Esau, K., 1985. *Anatomía Vegetal*. 3ª ed. Ediciones Omega. Barcelona. España. 601 p.
- 45) Cronquist A., 1988. *An Integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, USA. 1073-1076 pp.
- 46) Dahlgren, RMT., Clifford, HT., Yeo, PF., 1985. *The families of Monocotyledons*. Springer Verlag, Berlin; Heidelberg. 290-291 pp.
- 47) Fernández, María del Socorro. (1988) Efectos cromosómicos por insecticidas carbamicos en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* y *Allium cepa*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 48) Šýkorová. E., et al. 2006. Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. *American Journal of Botany*. 93,6: 814-823.
- 49) Lewis, J.F., 1984. The development and dynamics of the root apical meristem. *Amer. J. Bot.* 71 (9): 1308-1314.
- 50) De la Torre, A., et al. 1971. Cell Flow and its Application to the Estimate of Cell Cycle Parameters in Meristems. *Biol.ZBL.* 90: 707-710.
- 51) Grant W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*. 99, 273-291.
- 52) Giménez-Martín, G., et al. 1965. A new method of labelling cells. *J. Cell Biol.* 26:305-309.

- 53) López-Sáez, J.F., et al. 1966. Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature. *Z. Zellforsch.* 75: 591-600.
- 54) González-Fernández, A. et al., 1971. Interphase development and beginning of mitosis in the different nuclei of polynucleate homokaryotic cells. *Chromosoma*. 36: 100-112.
- 55) Steedman, H.F., 1960. Ester Wax 1960: a Historical Embedding Medium. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 101 (4):459-62.
- 56) Capco, D. G., Krochmalnic, G., and Penman, S. 1984. A New Method of Preparing Embedment-free Sections for Transmission Electron Microscopy: Applications to the Cytoskeletal Framework and Other Three-dimensional Networks. *The Journal of Cell Biology*. 98:1878-1885.
- 57) Taleporos, P. 1974. Diethylene glycol distearate as an embedding medium for high resolution light microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 22(1):29-34.
- 58) Graham, E.T. 1982. Improved diethylene glycol distearate embedding wax. *Stain Technol.* 57(1):39-43.
- 59) McKerracher, L. J. and Heath I.B. Comparison of polyethylene glycol and diethylene glycol distearate embedding methods for the preservation of fungal cytoskeletons.
- 60) Gajkowska, B. Cholewinski, M. and Gniadecki, R. 2000. Structure of cytomatrix revealed by embedment-free electron microscopy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 60(2):147-158.
- 62) Vázquez Nin, G.H., Echeverría Martínez, O. M., Jiménez García, L. F. (2003). "El núcleo celular interfásico. Morfología y función" en: "Biología Celular y Molecular" L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds.). Prentice Hall. México.
- 63) Segura M.N., (2001). El citoesqueleto en plantas durante la mitosis y la citocinesis. *Avances y perspectivas*. Vol 20. 389-394.
- 64) Vázquez-Nin G.H. y Bernhard W., (1971), Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruc. Res.* 36: 842-460.
- 65) González Jiménez Marco Antonio. (2000). Estudio ultraestructural y citoquímico de los gránulos intercromatinianos en núcleo en interfase y mitosis de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y cebolla (*Allium cepa*). Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM, Facultad de Ciencias.
- 66) McIntosh, J.R. AND koonce, M.P. 1989. Mitosis. *Science*, 246: 622-628.

- 67) Lodish, *et al.*(2008). *Molecular Biology of the Cell*. Freeman Press. 6a ed. New York.
- 68) Mitchison, T.J. and Salmon, E.D. (2001). Mitosis: a history of division. *Nature Cell Biology*. 3:E17-E21.

Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas
Universidad Nacional Autónoma de México
revistatip@yahoo.com
ISSN (Versión impresa): 1405-888X
MÉXICO

2006

María de Lourdes Segura Valdez / Sarai de Jesús Cruz Gómez / Roberto López Cruz /
Reyna Lara Martínez / Lourdes Teresa Agredano Moreno / Luis Felipe Jiménez García
OBSERVACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA DEL NÚCLEO DE CÉLULAS DEL
MERISTEMO DE RAÍZ DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA* L.) CON EL MICROSCOPIO
DE FUERZA ATÓMICA

Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, , año/vol. 9, número 001
Universidad Nacional Autónoma de México
Mexico, México
pp. 30-33

OBSERVACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA DEL NÚCLEO DE CÉLULAS DEL MERISTEMO DE RAÍZ DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) CON EL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

María de Lourdes Segura-Valdez, Sarai de Jesús Cruz-Gómez, Roberto López-Cruz, Reyna Lara-Martínez, Lourdes Teresa Agredano-Moreno y Luis Felipe Jiménez-García
Lab. de Nanobiología Celular, Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F.
E-mails: mlsv@hp.fciencias.unam.mx, sarichuy@yahoo.com.mx, robertolc@hotmail.com, rlm@hp.fciencias.unam.mx, ltam@hp.fciencias.unam.mx, lfjg@hp.fciencias.unam.mx

RESUMEN

La estructura *in situ* del núcleo de la célula ha sido ampliamente estudiada con el microscopio de luz y con el microscopio electrónico. Recientemente se ha comenzado a utilizar el microscopio de fuerza atómica para este propósito. En este trabajo se presentan observaciones con el microscopio de fuerza atómica sobre la estructura del núcleo a partir de cortes semifinos de material preparado con métodos estándar para microscopía electrónica. En los núcleos de las células de la raíz de cebolla se observan elementos nucleares como los cúmulos de cromatina compacta, espacios que corresponden al nucleoplasma, poros nucleares y nucléolos. Las imágenes son similares a estructuras observadas con el microscopio de campo claro, aunque la resolución es mayor.

Palabras Clave: Cebolla, cromatina, microscopía de fuerza atómica (AFM), núcleo, nucléolo.

ABSTRACT

The *in situ* structure of the cell has been extensively studied by light and electron microscopy. Recently, atomic force microscopy has been also used to this aim. In this study, atomic force microscopy observations on the nuclear structure are presented from semi-thin sections of material prepared for standard methods of electron microscopy. In the onion root tip cell nuclei, clumps of compact chromatin, nucleoplasm space, nuclear pores and nucleoli are observed. Those images well correspond to those observed by bright field, although at higher resolution.

Key Words: Onion, chromatin, atomic force microscopy (AFM), nucleus, nucleolus.

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios de biología celular y molecular han contribuido a la concepción actual sobre la organización funcional del núcleo celular. El núcleo es un organelo que presenta una gran cantidad de compartimientos y es muy dinámico. La presencia de compartimientos fue vista a partir de los estudios de microscopía de luz y electrónica combinadas con métodos de

inmunolocalización e hibridación *in situ*¹⁻³. La noción de dinámica ha surgido principalmente de esos estudios⁴, aunque de manera más notable de estudios de microscopía de fluorescencia y confocal en los que se detecta y sigue en el tiempo la expresión de productos proteicos derivados de la expresión de genes acoplados en construcciones moleculares con la proteína fluorescente verde (GFP)⁵.

estructura a escala nanométrica y conocer las posibles aplicaciones de este instrumento en estudios que nos ayudarán a entender la estructura y función de este organelo, en donde reside la mayor parte del genoma de las especies eucariontes.

El microscopio de fuerza atómica fue inventado hace 20 años¹⁰. Su potencial de lograr resolución molecular y atómica lo han colocado en una posición fundamental para el análisis de la materia a escala nanométrica, sin el problema de la preparación de material que debe colocarse en un ambiente de vacío, como sucede con el microscopio electrónico. Sus aplicaciones en el área de materiales desde entonces ha sido intenso. En el área biológica, sin embargo, su uso es más reciente. Principalmente se ha utilizado en el análisis de moléculas aisladas y procesos moleculares *in vitro*¹¹. Más aún, su uso en el análisis *in situ* de la estructura celular es más reciente.

En este trabajo presentamos nuevas observaciones de la estructura nuclear de células del meristemo de la raíz de la cebolla (*Allium cepa*) con el microscopio de fuerza atómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron meristemos de raíces de cebolla obtenidos a partir de crecimiento de cebollas en agua, durante 3 a 4 días, a temperatura ambiente.

Procesamiento de muestras. Las muestras se procesaron de acuerdo con técnicas estándar para microscopía electrónica de transmisión descritas anteriormente¹². En breve, se tomaron los meristemos de la raíz de cebolla y se fijaron con glutaraldehído al 6% en amortiguador PBS a pH 7.2 durante 16 horas. Las muestras después se lavaron con PBS y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante varias horas. Posteriormente se enjuagaron y se deshidrataron en una serie de etanol a concentraciones graduales, finalizando con óxido de propileno. La preinclusión se llevó a cabo con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica, en proporción 1:1 durante 16 horas. Finalmente las muestras se incluyeron en resina epóxica durante 16 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de unos 200 nm de espesor, con una cuchilla de vidrio y utilizando un ultramicrotomo modelo Ultracut (Leica). Los cortes se montaron al calor sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina. Otros cortes se montaron sobre portaobjetos y no fueron teñidos.

Microscopía de luz. Los cortes semifinos teñidos se observaron en campo claro en un microscopio eclipse E800 (Nikon) con un objetivo 100X planapocromático. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3D FPG.

Microscopía de fuerza atómica. La observación con el microscopio de fuerza atómica se llevó a cabo de acuerdo a protocolos previamente descritos^{7,9}. De manera resumida, los

cortes semifinos teñidos o sin teñir se observaron con un microscopio de fuerza atómica modelo BioScope (Digital Instruments, Santa Barbara CA, USA) operando en modo de contacto con un controlador Nanoscope IIIa. El microscopio trabaja sobre un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon). Se utilizó un scanner de 100 μm y puntas de nitruro de silicio de 20-50 nm de radio de curvatura (modelo NP). Se utilizaron velocidades de barrido de entre 1.969 a 1.285 Hz, una fuerza de 10 nN y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias.

RESULTADOS

Microscopía de luz. Utilizando campo claro, las células del meristemo de la raíz se observan definidas por la presencia de pared celular y el citoplasma con vacuolas, así como con un núcleo voluminoso en donde se aprecia la cromatina reticulada y nucléolos prominentes (Figura 1).

Microscopía de fuerza atómica. Con el microscopio de fuerza atómica, en cortes semifinos se distinguen las células por la presencia de pared celular. A bajo aumento, en el interior de la célula se observa el citoplasma con vacuolas, así como el núcleo celular interfásico voluminoso (Figura 2). A mayor aumento, en el núcleo celular se observan discontinuidades a lo largo de la envoltura nuclear. En el interior del núcleo, se notan las hebras de cromatina compacta en forma de red, embebidas en el espacio del nucleoplasma. Asimismo, se nota un cuerpo redondo voluminoso (Figura 3). La proyección en tercera dimensión de esta figura muestra la textura de los elementos nucleares, en donde resalta de manera notable el nucléolo (Figura 4).

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos obtenido imágenes de células del meristemo de la raíz de cebolla con el microscopio de fuerza

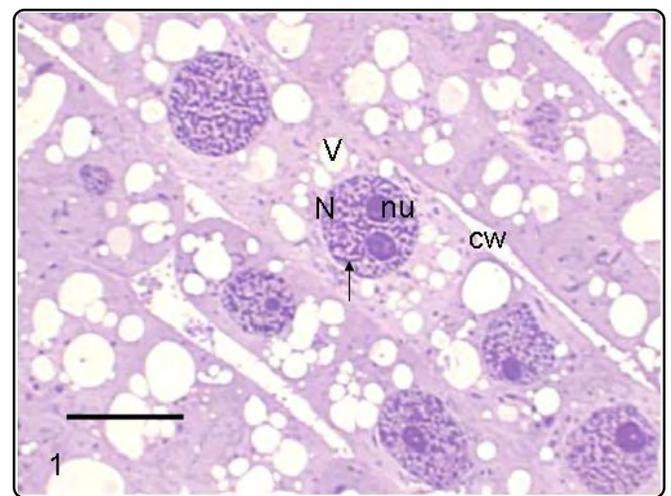


Figura 1. Micrografía de luz de células del meristemo de la raíz de cebolla. Las células se definen por la presencia de paredes celulares (cw). En las células, el citoplasma contiene vacuolas (V), un núcleo (N) grande y redondo con cromatina reticulada (flecha) y nucléolo (nu). Azul de toluidina. Barra, 10 μm .

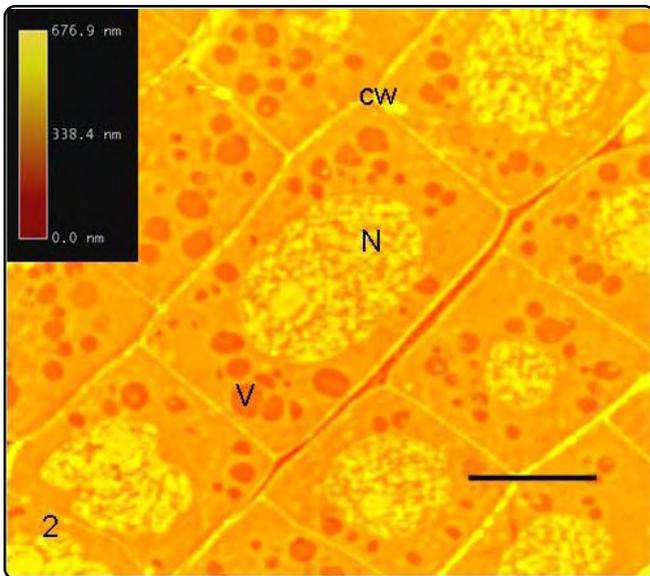


Figura 2. Micrografía de fuerza atómica de células del meristemo de raíz de cebolla. Aumento bajo en donde se observan las células con pared celular (cw). Se observan vacuolas (V) y núcleos (N) redondos. Barra, 10 µm.

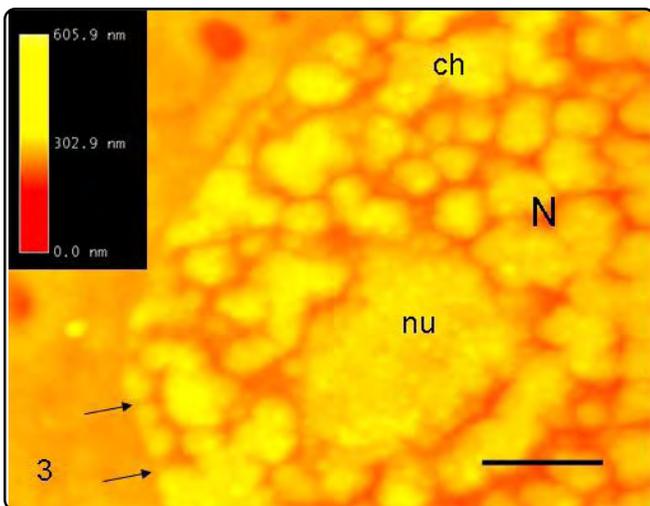


Figura 3. Micrografía de fuerza atómica de células del meristemo de raíz de cebolla. Aumento mayor en el que se observa un núcleo celular. Dentro del núcleo interfásico (N) se muestran tanto la cromatina reticulada (ch) como el nucléolo (nu) y los poros nucleares (flechas). Barra, 2 µm.

atómica a partir de cortes semifinos de muestras preparadas para microscopía electrónica de transmisión.

Anteriormente se ha intentado utilizar un enfoque similar para observar la estructura celular¹³ y nuclear de otras plantas como *Lacandonia schismatica*⁶⁻⁷ y *Ginkgo biloba*⁸. En efecto, en el caso de *Ginkgo biloba*, utilizamos las imágenes de la cromatina reticulada como un criterio adicional al de microscopía de luz y microscopía electrónica.

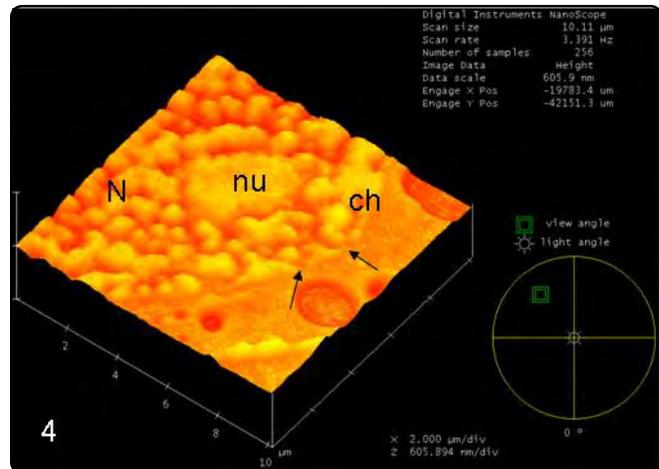


Figura 4. Micrografía de fuerza atómica en proyección 3D a partir de la figura 3. Dentro del núcleo interfásico (N) se muestran tanto la cromatina reticulada (ch) como el nucléolo (nu) y los poros nucleares (flechas).

Los criterios utilizados para concluir que se trata de estructuras celulares son:

- 1) Los límites de las células se definen por la presencia de paredes celulares evidentes.
- 2) Las dimensiones de las células son similares si se obtienen con microscopía de luz o de fuerza atómica.
- 3) Las células presentan en su interior espacios en el citoplasma que corresponden a vacuolas.
- 4) El organelo voluminoso en el interior celular corresponde por su forma redonda y posición central al núcleo.
- 5) En el interior del mismo se observa una red de filamentos gruesos que también se observan en microscopía de luz y que corresponden a lo que se ha descrito en la literatura como cromatina reticulada, presente en varios tipos celulares de diferentes plantas como la cebolla (*Allium cepa*), el ginkgo (*Ginkgo biloba*)⁸, *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*¹⁴. Las discontinuidades a lo largo de la envoltura nuclear corresponden a poros nucleares, como se ha mostrado anteriormente⁷. Además, los poros nucleares aislados han sido estudiados en detalle con el microscopio de fuerza atómica¹⁵.

Recientemente hemos estado estudiando las posibilidades del uso de la microscopía de fuerza atómica en el análisis de la estructura celular *in situ*. Para ello hemos utilizado un protocolo que consiste en la preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión y la generación de cortes de células y tejidos^{7,9}. De esta forma, aunque el microscopio es un instrumento de análisis de superficies, cada corte de las células representa una superficie cuya textura corresponde a su vez a la estructura de la célula, como hemos documentado previamente.

En este trabajo hemos obtenido imágenes de células del meristemo de raíz de cebolla, lo que abre mayores posibilidades de análisis a escala nanométrica debido a que se ha estudiado previamente con microscopía de luz y electrónica. En particular, hemos

validado el uso del microscopio de fuerza atómica en el estudio de estas células, lo que nos permitirá posteriormente profundizar en el estudio de estructuras nanométricas como los ribosomas o el nucléolo en resinas hidrosolubles o en cortes por congelación.

CONCLUSIONES

Las estructuras nucleares observadas con el microscopio de fuerza atómica en cortes semifinos de meristemas de la raíz de cebolla, corresponden a poros nucleares, cromatina compacta reticulada y nucléolos. Estas estructuras son similares a las observadas en este estudio con el microscopio de campo claro y a aquellas que se han publicado utilizando el microscopio electrónico. Este trabajo deja abierta la posibilidad de estudiar la estructura nuclear con alta resolución sin las limitantes de trabajar en condiciones de vacío.

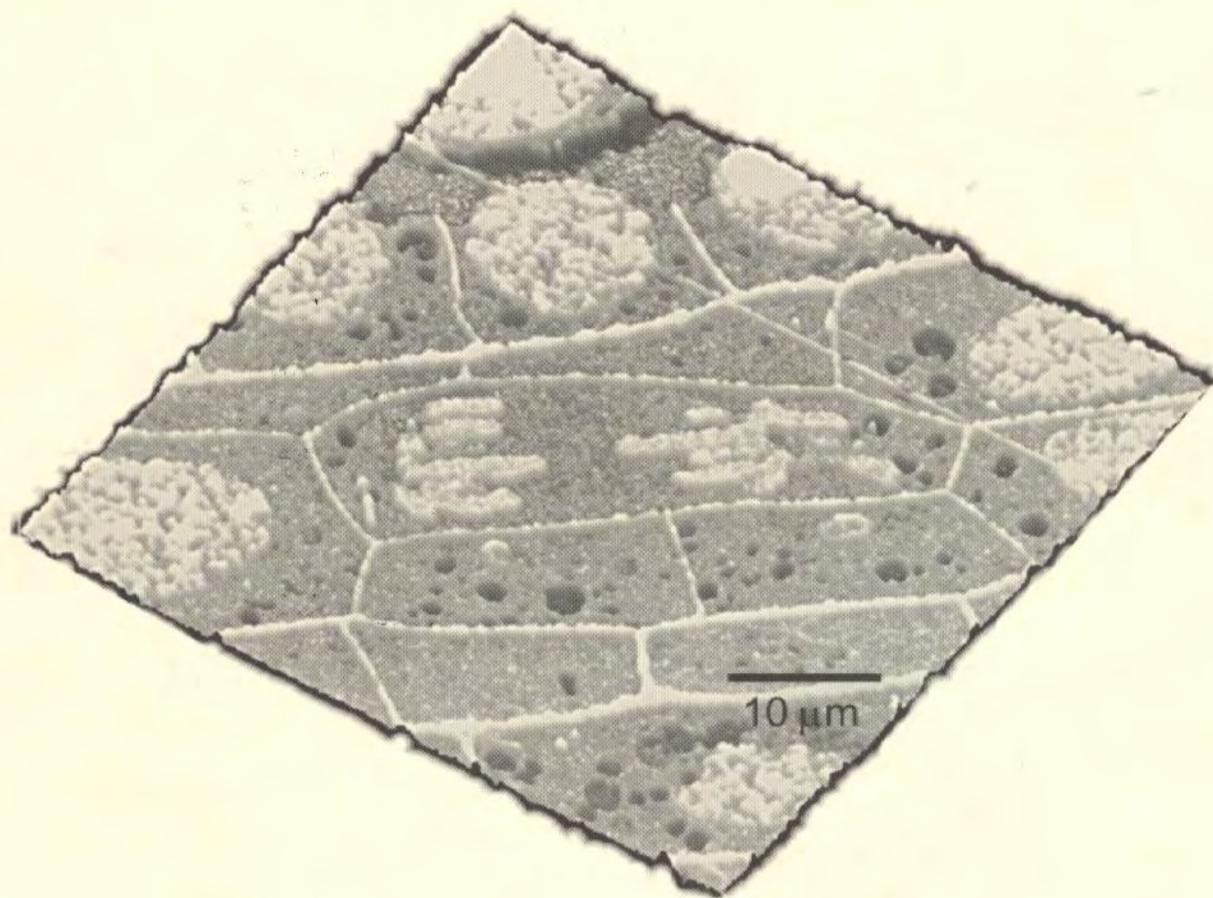
AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por DGAPA-UNAM IN215106, IN221202.

REFERENCIAS

1. Spector, D. L. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 265-315 (1993).
2. Spector, D.L. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* **114**, 2891-2893(2001).
3. Lamond, A.I. & Earnshaw, W.C. Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547-553 (1998).
4. Jiménez-García, L.F. & Spector, D.L. *In vivo* evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* **73**, 47-59 (1993).
5. Misteli, T. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* **291**, 843-847 (2001).
6. Jiménez-García, L.F. et al. Biología celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **62**, 5-14 (1998).
7. Jiménez-García, L.F. & Fragoso-Soriano, R.J. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* **129**, 218-222 (2000).
8. Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L. & Jiménez-García, L.F. Lacandonia granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. *Biol. Cell* **94**, 511-518 (2002).
9. Jiménez-García, L.F. & Segura-Valdez, M. de L. en Atomic Force Microscopy: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology (eds. Braga, P.C. & Ricci, D.) 191-199 (Humana Press, New Jersey, 2004).
10. Binnig, G., Quate, C.F. & Gerber, Ch. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933(1986).
11. Hansma, H.G. et al. Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review. *J. Struct. Biol.* **119**, 99-108 (1997).
12. Spector, D.L., Goldman, R.D. & Leinwand, L.A. Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998).
13. Ushiki, T., Hitomi, J., Ogura, S., Umemoto, T. & Shigeno, M. Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arch. Histol. Cytol.* **59**, 421-31 (1996).
14. Jiménez-García, L.F. et al. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell* **75**, 101-110 (1992).
15. Stoffler, D., Fahrenkrog, B. & Aebi, U. The nuclear pore complex: From molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 391-401 (1999).

Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

VISUALIZACIÓN DE LA MITOSIS CON EL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

María de Lourdes Segura-Valdez, Sarai de Jesús Cruz-Gómez,
Roberto López-Cruz, Guadalupe Zavala^a y Luis Felipe Jiménez-García

Lab. de Nanobiología Celular, Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México. ^aInstituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México. E-mails: mlsv@hp.fciencias.unam.mx, sarichuy@yahoo.com.mx, robertolc@hotmail.com, gzavala@ibt.unam.mx, lfjg@hp.fciencias.unam.mx.

RESUMEN

En eucariotes, la división celular generalmente ocurre por medio de la mitosis. En estudios previos hemos documentado la posibilidad de estudiar la estructura celular *in situ* con el microscopio de fuerza atómica, con énfasis en la estructura nuclear en interfase. En este trabajo mostramos que las diferentes etapas de la mitosis pueden ser visualizadas con este instrumento, lo que abre la posibilidad de estudiar este fenómeno en el rango nanométrico.

Palabras Clave: Anafase, cromosomas, metafase, microscopía de fuerza atómica (AFM), mitosis, profase, prometafase, telofase.

ABSTRACT

In eukaryotes, cell division generally takes place by mitosis. In previous studies we documented the possibility of studying *in situ* cell structure by atomic force microscopy, and specially the interphase cell nucleus. Here we show that different stages of mitosis can be visualized with this instrument, therefore offering the possibility to study this phenomenon at the nanoscale.

Key Words: Anaphase, chromosomes, metaphase, atomic force microscopy, mitosis, prophase, prometaphase, telophase.

INTRODUCCIÓN

El análisis de la estructura celular con el microscopio de luz y electrónico ha producido un gran conocimiento sobre la morfología y función de la célula¹⁻⁵. La invención del microscopio de fuerza atómica en 1986⁶ ofrece la posibilidad de estudiar a las células con este nuevo tipo de microscopio, a escala nanométrica. Sin embargo, su uso en biología casi se ha limitado más al análisis de moléculas aisladas⁷ y muy pocos trabajos se avocan a estudios de la estructura celular *in situ*⁸⁻¹².

Recientemente, se han obtenido micrografías de fuerza atómica de la estructura celular, con énfasis en la estructura del núcleo en interfase⁹⁻¹².

En este trabajo presentamos observaciones de células de cebolla (*Allium cepa*) en mitosis, lo que abre la posibilidad del análisis de esta etapa del ciclo celular con el microscopio de fuerza atómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron meristemos radicales de cebolla (*Allium cepa*), desarrollados a partir de cebollas sumergidas en agua a temperatura ambiente.

Procesamiento de muestras

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a procedimientos estándar de microscopía electrónica de transmisión¹³. Brevemente, los meristemos de la raíz de cebolla se fijaron en glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4% en PBS a pH 7.2 durante 16 horas. Las muestras se lavaron con PBS y se postfijaron

con tetraóxido de osmio al 1% durante dos horas. Se enjuagaron y se deshidrataron en una serie de soluciones de alcohol etílico a concentraciones graduales (70%, 80%, 90%, 96% y 100%). Después se trataron con óxido de propileno al 100%. La preinclusión se llevó a cabo con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica, en proporción 1:1 durante 16 horas. Las muestras se incluyeron en resina epóxica durante 16 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de unos 200 µm de espesor, con una cuchilla de vidrio y utilizando un ultramicrotomo modelo Ultracut (Leica). Los cortes se colocaron sobre portaobjetos de vidrio, se fijaron por calor y se teñieron con azul de toluidina o no fueron teñidos.

Microscopía de luz

Las micrografías obtenidas en campo claro se tomaron a partir de tejido fresco de los meristemos apicales de raíz de cebolla teñidos con acetoriceína, tratados con ácido clorhídrico para disgregar las células, montadas en portaobjetos de vidrio para su observación inmediata en campo claro en un microscopio eclipse E800 (Nikon) con un objetivo 100X planapocromático. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3DFPG.

Microscopía de fuerza atómica

Los cortes semifinos teñidos o sin teñir se observaron con un microscopio de fuerza atómica modelo BioScope (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, USA) operando en modo de contacto con un controlador Nanoscope IIIa^{8,10}. El microscopio trabaja sobre un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon). Se utilizó un scanner de 100 µm y puntas de nitruro de silicio de 20-50 nm de radio de curvatura (modelo NP). Se utilizaron velocidades de barrido de entre 1.969 a 1.285 Hz, una fuerza de 10 nN y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias.

RESULTADOS

Microscopía de luz

Con microscopía de campo claro, se observaron las diferentes fases de la mitosis en células de meristemo apical de raíz de cebolla teñidas con acetoriceína. Las diferentes fases se reconocieron por la morfología de los cromosomas y el núcleo interfásico (Figura 1 a-f).

En interfase, la cromatina es reticulada y los núcleos presentan nucléolos prominentes (Figura 1a). En profase (Figura 1b) los cromosomas comienzan a condensarse y terminan de hacerlo en prometafase (Figura 1c). En metafase se alinean en el ecuador (Figura 1d) y las cromátidas se separan en anafase (Figura 1e). En telofase los cromosomas se descondensan y forman los núcleos hijos (Figura 1f).

Microscopía de fuerza atómica

Con el microscopio de fuerza atómica se obtuvieron imágenes de las diferentes fases de la mitosis a partir de cortes semifinos. Las

diferentes fases fueron reconocidas por algunas características de cada una de ellas. La interfase se reconoce por el núcleo en donde la cromatina reticulada es prominente y el nucléolo es grande (Figura 1g). En profase, los cromosomas se han condensado y el nucléolo ya no es visible (Figura 1h). En prometafase los cromosomas están condensados pero no se han alineado en el centro de la célula (Figura 1i) como ocurre más adelante en la metafase (Figura 1j). En anafase, las placas de cromosomas migran a cada célula hija (Figura 1k). En telofase, los núcleos se conforman de nuevo y los cromosomas se descondensan, a la vez que el nucléolo y las paredes celulares de las células hijas comienzan a ser evidentes (Figura 1l).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo mostramos células en diferentes etapas de la mitosis visualizadas con el microscopio de fuerza atómica, a partir de meristemos de raíz de cebolla que han sido preparados para microscopía electrónica de transmisión. Como comparación se han utilizado imágenes de células de meristemos de cebolla preparadas con acetoriceína, visualizadas con microscopía de luz de campo claro.

Anteriormente hemos mostrado la posibilidad de estudiar la estructura celular interna *in situ*^{9,12} y en un trabajo reciente visualizamos núcleos de células de cebolla en etapa de interfase¹⁴.

Las diferentes fases de la división celular o mitosis fueron descritas con el microscopio de luz desde el siglo XIX¹⁵⁻¹⁶ y hoy en día son reconocidas en todos los textos de biología celular y molecular¹⁻⁵. Por ello, las diferentes fases de la mitosis pueden ser reconocidas con relativa facilidad de acuerdo a parámetros morfológicos como la condensación de la cromatina y de los cromosomas, así como la integridad de los núcleos celulares o la formación de los surcos de división.

Los resultados del presente trabajo y estudios previos de la etapa de interfase¹⁴ pueden facilitar el estudio del ciclo celular completo con el microscopio de fuerza atómica. Por ejemplo, se puede analizar la estructura del núcleo durante la etapa de reactivación celular durante la telofase, en particular durante el proceso de la nucleogénesis¹⁷.

CONCLUSIÓN

La interfase y las diferentes fases de la mitosis como profase, prometafase, metafase, anafase y telofase en células de cebolla, han sido reconocidas *in situ* con el microscopio de fuerza atómica trabajando en modo de contacto a partir de cortes semifinos de material preparado para microscopía electrónica de transmisión. La comparación con imágenes de microscopía de luz de material similar, corrobora estas observaciones.

AGRADECIMIENTOS

El laboratorio de Nanobiología Celular cuenta con financiamiento de PAPIIT DGAPA-UNAM IN215106.

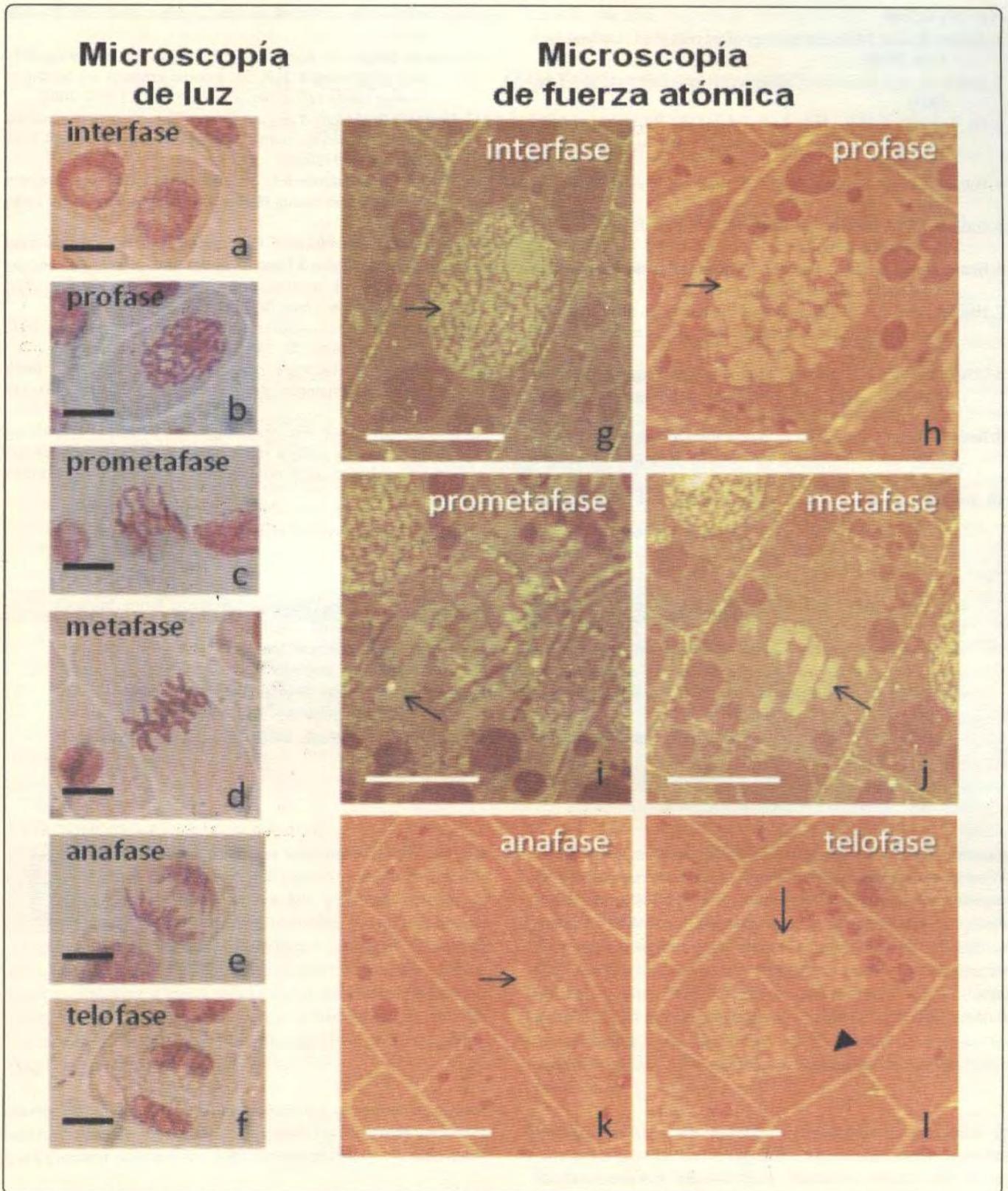


Figura 1. Micrografías de luz (a-f) y de fuerza atómica:(g-l) de células en interfase (a, g) y en diferentes fases de la mitosis (b-f, h-l) en meristemas radicales de cebolla (*Allium cepa* L.). La flecha en g señala a la cromatina y las flechas en h-l señalan a los cromosomas en las diferentes fases de la división celular o mitosis. Barras, 10 μm.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., *et al.* Molecular Biology of the cell (4th ed., Garland, New York, 2002).
2. Lodish, H., *et al.* Molecular Cell Biology (6th ed., Freeman, New York, 2008).
3. De Robertis, E.M.F., Hib, J. & Poncio, R. Biología Celular y Molecular de E.D.P. de Robertis (El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 2001).
4. Pollard, T.D. & Earnshaw, W.C. Cell Biology (Sauders, New York, 2002).
5. Jiménez, L.F. & Merchant, H. Biología Celular y Molecular (Prentice Hall, México, 2003).
6. Binnig, G., Quate, C.F. & Gerber, Ch. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933 (1986).
7. Hansma, H.G., *et al.* Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review. *J. Struct. Biol.* **119**, 99-108 (1997).
8. Ushiki, T., Hitomi, J., Ogura, S., Umemoto, T. & Shigeno, M. Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arch. Histol. Cytol.* **59**, 421-431 (1996).
9. Jiménez-García, L.F., *et al.* Biología celular de *Lacandoniaschismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **62**, 5-14 (1998).
10. Jiménez-García, L.F. & Fragoso-Soriano, R.J. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* **129**, 218-222 (2000).
11. Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L. & Jiménez-García, L.F. *Lacandonia* granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. *Biol. Cell* **94**, 511-518 (2002).
12. Jiménez-García, L.F. & Segura-Valdez, M.L. Visualizing Nuclear Structure *in situ* by Atomic Force Microscopy. *Meth. Mol. Biol.* **242**, 191-199 (2004).
13. Spector, D.L., Goldman, R.D. & Leinwand, L.A. Cells: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998).
14. Segura-Valdez, M.L., *et al.* Observaciones sobre la estructura del núcleo de células del meristemo de raíz de cebolla (*Allium cepa* L.) con el microscopio de fuerza atómica. *TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.* **9(1)**, 30-33 (2006)
15. Strasburger, E. Die controversen der indirekten kerntheilung. *Arch. F. mikrosk. Anat.* **23**, 246-304 (1884).
16. Flemming, W. Beiträge zur kenntniss der zelle und ihrer lebenserscheinungen. *Arch. F. mikrosk. Anat.* **18**, 151-259 (1879).
17. Jiménez-García, L.F. *et al.* Nucleogenesis: U3snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 955-966 (1994).