



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**VISUALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL  
NUCLEOLO DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA*) POR  
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN  
Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA  
ELECTRÓNICA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A :**

**ASIER GARCÍA SENOSIAIN**



**TUTOR:  
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Agradezco a todos mis maestros por su dedicación, enseñanzas y ejemplo.

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del edificio Tlahuizcalpan de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Jiménez García y fue apoyado con el financiamiento de la DGAPA-UNAM a través del proyecto PAPIIT IN227810, incluyendo una beca de especialidad para Asier García Senosiain para obtener el grado de Especialista en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas de las UNAM.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
1 Microscopía electrónica de transmisión.....	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Historia.....	3
1.3 Fundamentos.....	5
1.4 Componentes.....	8
1.4.1 Cañón electrónico.....	8
1.4.2 Sistema óptico.....	10
1.4.3 Sistema de vacío.....	12
1.5 Interacción de los electrones del haz con la muestra.....	12
1.6 Preparación de la muestra.....	13
1.6.1 Fijación.....	14
1.6.2 Deshidratación.....	15
1.6.3 Inclusión.....	15
1.6.4 Corte.....	16
1.6.5 Contraste.....	16
2 Microscopía de fuerza atómica.....	17
2.1 Introducción.....	17
2.2 Historia.....	18
2.3 Fundamentos.....	19
2.4 Componentes.....	19
2.4.1 Trampolín y punta.....	19
2.4.2 Detector.....	20
2.4.3 Mecanismo de barrido.....	21
2.4.4 Sistema de retroalimentación.....	24
2.4.5 Software de adquisición.....	24
3 Nucleolo.....	24

3.1 Introducción.....	24
3.2 Componentes.....	25
3.3 Ciclo nucleolar.....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
METODOLOGÍA.....	29
1 Material biológico.....	30
2 Procesamiento del material biológico.....	30
2.1 Fijación.....	30
2.2 Postfijación.....	30
2.3 Deshidratación.....	30
2.4 Inclusión.....	30
2.5 Corte.....	31
2.6 Contraste.....	32
RESULTADOS.....	33
1 Microscopía óptica.....	33
2 Microscopía electrónica de transmisión.....	34
2.1 Estereopares.....	37
2.2 Anaglifos.....	39
3 Microscopía de fuerza atómica.....	42
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	49
FUENTES.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Microscopio electrónico de transmisión de reciente manufactura utilizado en este trabajo	2
Figura 2	Primer microscopio en superar la resolución del microscopio óptico	4
Figura 3	Disco de Airy y representación gráfica de la distribución de intensidad	5
Figura 4	Representación esquemática del ángulo $\alpha$	6
Figura 5	Comparación del microscopio óptico y el microscopio electrónico de transmisión	9
Figura 6	Representación esquemática de un cañón electrónico típico	10
Figura 7	Representación esquemática de una lente electromagnética	11
Figura 8	Interacciones elásticas e inelásticas	13
Figura 9	Rejilla de soporte para cortes ultrafinos	17
Figura 10	Microscopio de fuerza atómica de reciente manufactura utilizado en este trabajo	18
Figura 11	Primer microscopio de fuerza atómica	19
Figura 12	Representación esquemática de dos trampolines con su respectiva punta para microscopía de fuerza atómica	20
Figura 13	Representación esquemática de un sensor óptico	21
Figura 14	Representación esquemática de dos sistemas de barrido con materiales piezoeléctricos: en trípode y en tubo	23
Figura 15	Representación esquemática del arco descrito por el extremo libre de un sistema de barrido en tubo	23
Figura 16	Diagrama de flujo resumiendo la metodología empleada en el trabajo.	29
Figura 17	Micrografías de luz de células de raíz de <i>Allium cepa</i> .	33
Figura 18	Micrografías electrónicas de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i> .	34

Figura 19	Micrografías electrónicas de un nucleolo de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i> .	35
Figura 20	Micrografías electrónicas de un nucleolo de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i> .	36
Figura 21	Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de <i>Allium cepa</i> .	38
Figura 22	Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de <i>Allium cepa</i> .	38
Figura 23	Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de <i>Allium cepa</i> .	39
Figura 24	Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de <i>Allium cepa</i> .	39
Figura 25	Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 21.	40
Figura 26	Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 22.	40
Figura 27	Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 23.	41
Figura 28	Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 24.	41
Figura 29	Micrografías de fuerza atómica de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i>	42
Figura 30	Micrografías de fuerza atómica de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i>	43
Figura 31	Micrografías de fuerza atómica de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i>	44
Figura 32	Micrografías de fuerza atómica de un núcleo de una célula interfásica de <i>Allium cepa</i>	45



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Velocidad, masa y longitud de onda de electrones acelerados mediante una diferencia de potencial	8
---------	--	---

## RESUMEN

El nucleolo es un subdominio o subcompartimento del núcleo encargado de la síntesis y procesamiento del ARNr así como de parte del ensamblaje de las subunidades ribosomales. En el nucleolo pueden distinguirse tres tipos de estructura: centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular. La división del nucleolo en diferentes regiones es el resultado de las distintas etapas de procesamiento del pre-ARNr y ensamblaje de las subunidades ribosomales. Estos componentes se han estudiado mediante microscopía electrónica sin embargo, no han sido analizados a profundidad con el microscopio de fuerza atómica. En el presente trabajo se analizó la ultraestructura del nucleolo de cebolla (*Allium cepa*) mediante microscopía electrónica de transmisión y el microscopio de fuerza atómica. Las muestras fueron procesadas con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión. Para el microscopio de fuerza atómica se obtuvieron cortes semifinos que fueron montados en portaobjetos de vidrio. Los resultados muestran que mediante el microscopio de fuerza atómica es posible identificar dos de los componentes que forman el nucleolo. Con ello se contribuye a una descripción más completa de este organelo aprovechando en particular, la resolución vertical del equipo.

## ANTECEDENTES

### 1 Microscopía electrónica de transmisión

#### 1.1 Introducción

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que ha sido muy útil para la investigación en ciencias biológicas ya que nos permite observar estructuras y detalles que son invisibles aún empleando un microscopio óptico (Figura 1).

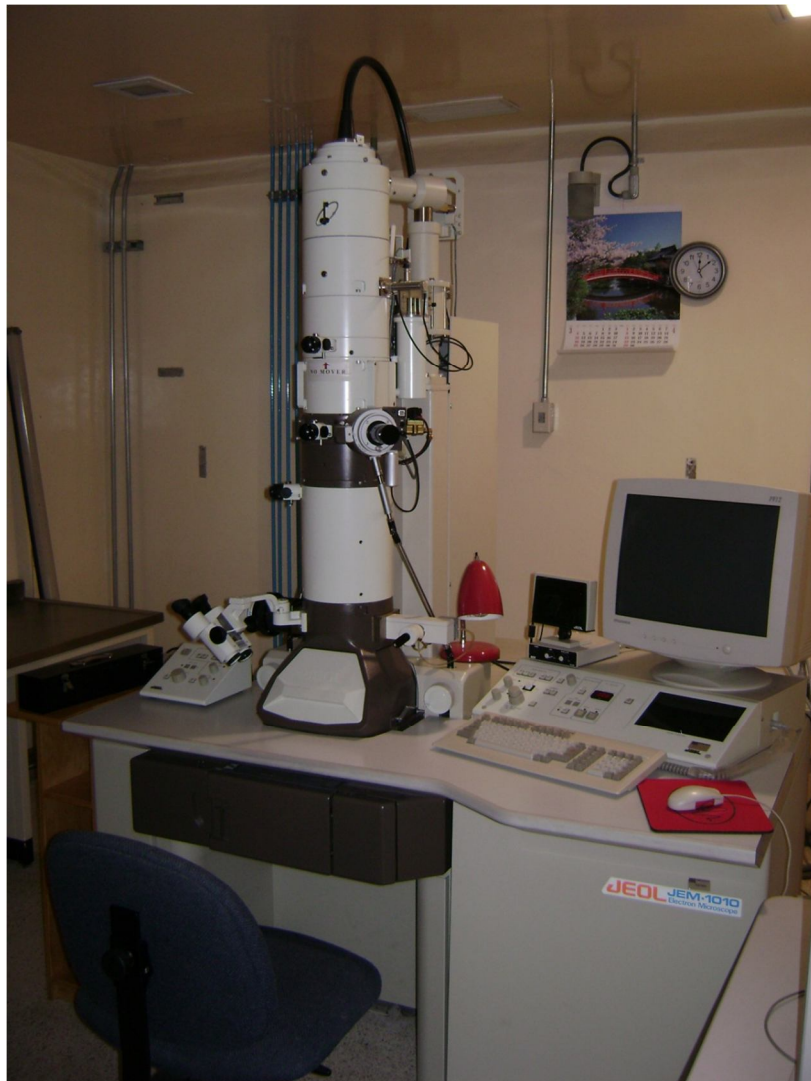


Figura 1. Microscopio electrónico de transmisión de reciente manufactura utilizado en este trabajo.

Su invención logró aumentar el alcance de la observación directa de manera comparable al desarrollo del microscopio compuesto en el siglo XVI. Su uso permitió extender nuestra visión en tres órdenes de magnitud más allá de los límites alcanzados con el microscopio óptico, haciendo posible una gran cantidad de descubrimientos. En el caso particular de las ciencias biológicas, el microscopio electrónico ha permitido definir la estructura de mitocondrias, aparato de Golgi, núcleo y membranas celulares entre muchas otras (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

## **1.2 Historia**

La construcción del primer microscopio electrónico fue precedida por dos acontecimientos importantes. El primero fue la teoría de de Broglie en 1924 que implicaba la posibilidad de que los electrones acelerados a grandes velocidades presentaran propiedades de onda como la luz visible. El segundo fue la fabricación en 1926 por parte de Busch de una lente electromagnética capaz de enfocar un haz de electrones de la misma forma que una lente de vidrio puede enfocar un haz de luz (Wischnitzer, 1981). Ambos conceptos serán explicados más adelante.

Con estas bases comenzó la carrera para construir el primer microscopio que usara electrones acelerados para formar una imagen. De manera casi simultánea, se construyeron en Alemania los dos primeros microscopios electrónicos en 1932. El grupo de Brüche y Johannson fabricó un equipo que empleaba lentes electrostáticas. Esta configuración tuvo aplicaciones limitadas. Por otro lado, el equipo de Knoll y Ruska diseñó un aparato que utilizaba lentes electromagnéticas para formar la imagen siendo este último el antecedente de los microscopios electrónicos de transmisión modernos. Ruska continuó haciendo mejoras y para 1933 había desarrollado el primer microscopio electrónico con un poder de resolución superior al del microscopio óptico (Figura 2). La resolución es la menor distancia que debe existir entre dos puntos del objeto para que puedan ser distinguidos como dos puntos en la imagen obtenida a través del equipo. En este caso un valor numérico menor representa una mejor resolución. En 1986, más de medio siglo después de su invento y como reconocimiento a la importancia del mismo, Ernst Ruska recibió el premio Nobel de Física (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

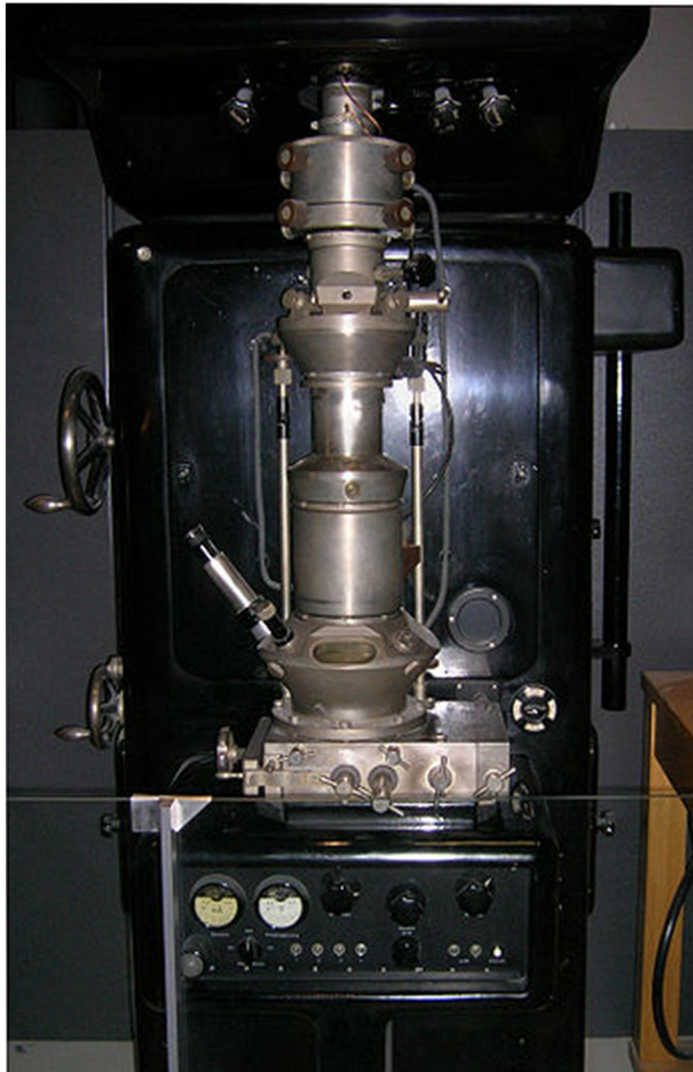


Figura 2. Primer microscopio en superar la resolución del microscopio óptico. Fue construido por Ruska en 1933. Cuenta únicamente con tres lentes: condensadora, objetiva y proyectora. Era capaz de obtener ampliaciones de 12,000x (Deutsches Museum).

Para 1938 Von Borries y Ruska habían perfeccionado el aparato hasta obtener una resolución de 10 nm, muy superior a la alcanzable con un microscopio óptico. Mejoras posteriores han permitido alcanzar resoluciones subnanométricas en la actualidad.

El primer microscopio electrónico comercial fue introducido en 1939 por la compañía Siemens y Halske. Debido a limitaciones propias de las muestras biológicas que se discutirán posteriormente, el microscopio electrónico no pudo ser aplicado con éxito significativo a la investigación en ciencias biológicas hasta los años cincuenta. Hasta entonces no se habían desarrollado las técnicas de preparación de muestras biológicas que permiten su correcta preservación y observación (Wischnitzer, 1981).

### 1.3 Fundamentos

La resolución es concepto esencial para entender la microscopía en general y electrónica en particular. Ésta se puede definir como la distancia mínima que debe existir entre dos puntos del objeto para que aparezcan como dos puntos en la imagen. A una distancia menor será imposible determinar si se trata de dos puntos o un único punto.

La resolución está limitada por el fenómeno de difracción que ocasiona que la imagen de un punto aparezca como un punto rodeado de un disco de confusión. Este disco llamado disco de Airy consiste en un punto luminoso rodeado de halos concéntricos claros y oscuros de menor intensidad (Figura 3). Al irse acercando dos puntos sus respectivos discos de confusión se irán superponiendo hasta hacer imposible la distinción entre los dos puntos (José-Yacamán y Reyes-Gasga, 1995).

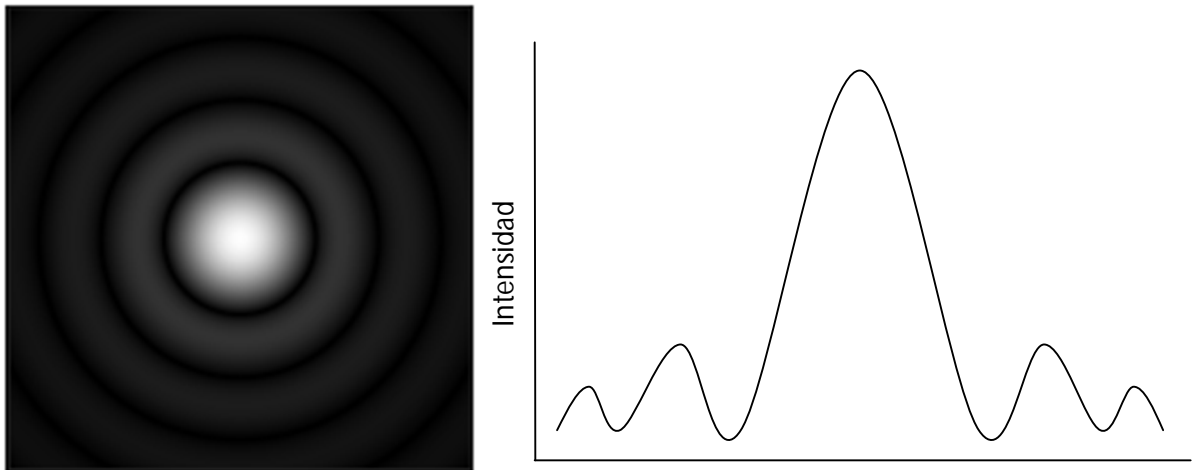


Figura 3. Disco de Airy y representación gráfica de la distribución de intensidad.

El poder de resolución fue definido en 1873 por el científico alemán Ernst Abbe con la siguiente ecuación:

$$r = \frac{0.61 \lambda}{n \operatorname{sen} \alpha}$$

Donde:

$r$  = resolución

$\lambda$  = longitud de onda del iluminante

$n$  = índice de refracción del medio entre el objeto y la lente objetiva

$\alpha$  = ángulo que subtiende el radio de la lente objetiva y el objeto (Figura 4)

$n \operatorname{sen} \alpha$  = apertura numérica

El valor 0.61 es una constante adimensional obtenida con base en el criterio de Rayleigh (Watt, 1985).

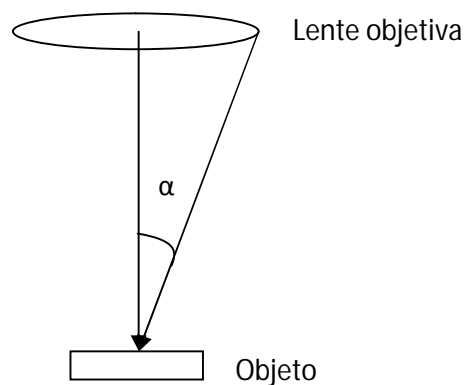


Figura 4. Representación esquemática del ángulo  $\alpha$ .

Empleando la ecuación de Abbe y valores típicos para un microscopio óptico tenemos que:

$$r = \frac{0.61 \lambda}{n \operatorname{sen} \alpha} = \frac{(0.61)(550 \text{ nm})}{1.4} = 240 \text{ nm}$$

Esta es una resolución de aproximadamente  $0.24 \mu\text{m}$  para un microscopio óptico con luz blanca. Incluso si empleáramos la luz violeta, que es la de menor longitud de onda del espectro visible (aproximadamente  $400 \text{ nm}$ ), tendríamos una resolución ligeramente menor a  $0.2 \mu\text{m}$ . Aumentar la apertura numérica no es posible ya que a finales del siglo XIX el microscopio óptico había alcanzado su límite de resolución con el perfeccionamiento de las lentes y el empleo de aceites especiales con alto índice de refracción. Una alternativa para mejorar el poder de resolución sería emplear una radiación iluminante diferente a la luz visible con una longitud de onda significativamente menor.

Como ya se mencionó, en 1924 de Broglie abrió esta posibilidad cuando demostró que una partícula tiene propiedades de onda con su correspondiente longitud de onda. Esta longitud de onda está definida por la siguiente ecuación:

$$\lambda = \frac{h}{m v}$$

Donde:

$h$  = constante de Planck

$m$  = masa de la partícula

$v$  = velocidad de la partícula (Wischnitzer, 1981)

Esto sugiere que un haz de electrones acelerados puede utilizarse como fuente de iluminación para producir imágenes y que mientras más rápido se muevan estas partículas su longitud de onda será menor y el poder de resolución será superior. Por su carga, los electrones pueden ser acelerados mediante la aplicación de una diferencia de potencial. Al irse aproximando la velocidad de los electrones a la de la luz su masa también se irá incrementando con lo que la longitud de onda resultará aún menor. La tabla 1 muestra estos valores en un amplio rango de diferencias de potencial. A una diferencia de potencial de  $100 \text{ kV}$  (utilizada frecuentemente en microscopía electrónica cuando se observan muestras biológicas) los electrones superan la mitad de la velocidad de la luz y su longitud de onda es de tan solo  $0.0037 \text{ nm}$ . Eso es casi  $100,000$  veces menor a aquella de la luz visible. A pesar de que las lentes electromagnéticas no tienen el grado de perfección que las lentes de microscopía óptica la resolución de un microscopio electrónico es



aproximadamente 1,000 veces superior en las condiciones adecuadas (Flegler y col., 1993).

Tabla 1 Velocidad, masa y longitud de onda de electrones acelerados mediante una diferencia de potencial (modificada de Watt, 1985).

<b>Diferencia de potencial (volts)</b>	<b>Velocidad (km/s)</b>	<b>Velocidad relativa a la de la luz en el vacío</b>	<b>Masa relativa a la masa en reposo</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
<b>1</b>	593	0.0020	1.0000	1.226
<b>10</b>	1876	0.0063	1.0000	0.378
<b>100</b>	5,932	0.0198	1.0002	0.1226
<b>1,000</b>	18,730	0.0625	1.0020	0.03876
<b>10,000</b>	58,460	0.1949	1.0196	0.01220
<b>100,000</b>	164,400	0.5482	1.1957	0.00370
<b>1,000,000</b>	282,200	0.9411	2.9569	0.00087
<b>3,000,000</b>	296,700	0.9890	6.8700	0.00036

## 1.4 Componentes

En varias maneras el microscopio electrónico de transmisión es similar al microscopio óptico (Figura 5). En ambos instrumentos la iluminación producida por la fuente atraviesa una muestra delgada. Posteriormente, mediante una lente objetiva se forma y amplifica una imagen del objeto. Lentes posteriores incrementan el aumento aún más. Los principales componentes del microscopio electrónico de transmisión se explicarán a continuación.

### 1.4.1 Cañón electrónico

En primer lugar está el cañón electrónico que funciona como fuente de iluminación como lo hace la bombilla de un microscopio de luz (Figura 6). El filamento sirve como fuente de electrones y usualmente está compuesto por un cable de tungsteno en forma de "V" de aproximadamente 0.1 mm de diámetro. Al calentar el filamento al vacío con una corriente directa de bajo voltaje se consigue que los electrones se desprendan por efecto termoiónico. Son estos electrones los que van a formar el haz y eventualmente resultan en la imagen del objeto. Al mismo tiempo que el filamento está emitiendo electrones se hace pasar por el filamento una corriente de muy alto voltaje (desde decenas de miles hasta unos pocos millones de volts). Esta

repele a los electrones que se desplazan hacia el ánodo colocado a continuación alrededor del eje óptico del microscopio (Reimer, 1997).

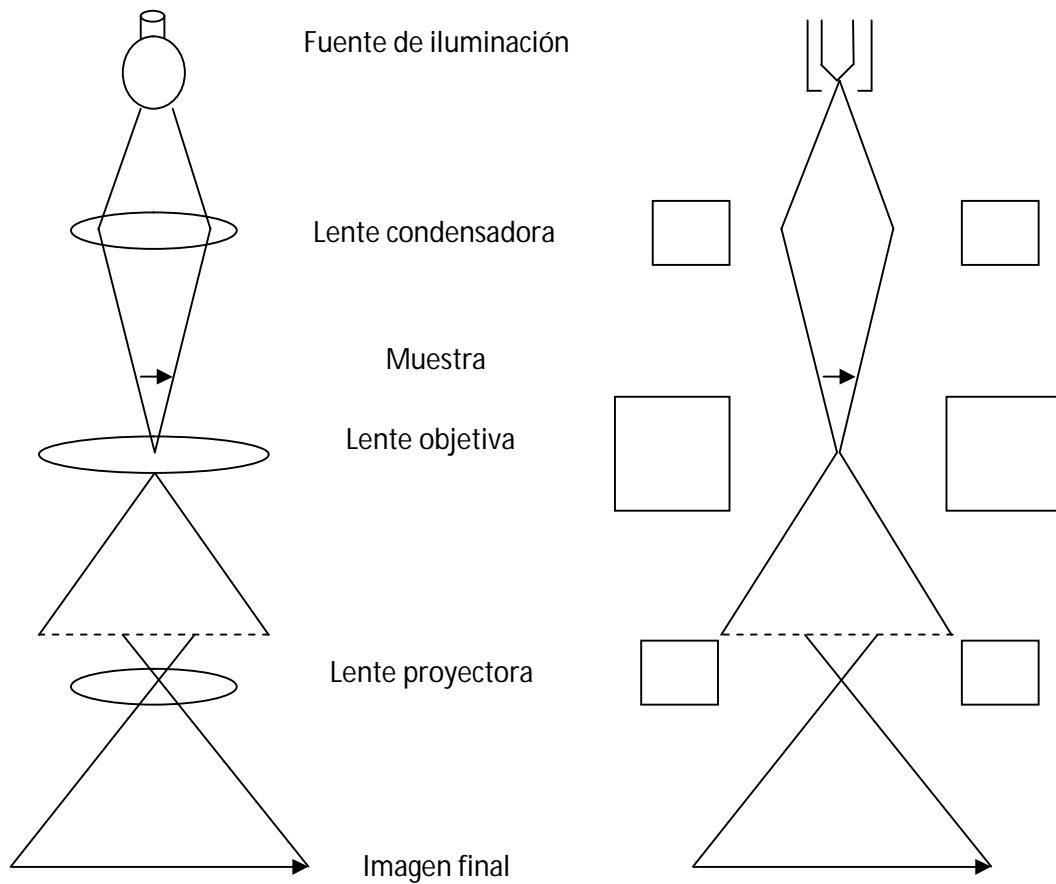


Figura 5. Comparación del microscopio óptico (izquierda) y el microscopio electrónico de transmisión (derecha).

Rodeando al filamento se encuentra el cilindro de control o de Wehnelt. Esta pieza tiene la función de limitar la dirección de emisión de los electrones. Para lograrlo se le aplica una corriente ligeramente más negativa que la del filamento que repele a los electrones. En el eje óptico, bajo la punta del filamento existe un orificio de unos pocos milímetros en el cilindro de control que permite el paso hacia el ánodo de los electrones de esa pequeña zona. A pesar de su nombre, el cilindro de control puede tener una forma cónica dependiendo del fabricante (Flegler y col., 1993).

En conjunto el filamento, cilindro de control y ánodo forman una lente electrostática convergente (la única de este tipo en el aparato) que concentra los electrones del haz en el eje óptico del microscopio.

La elección del voltaje de aceleración es muy importante ya que voltajes de aceleración bajos, por ejemplo 50 kV resultan en imágenes con un alto contraste pero baja resolución. Lo opuesto sucede con voltajes altos. En ciencias biológicas los voltajes de aceleración suelen oscilar entre 60 y 120 kV. En estudios de materiales se emplean voltajes mucho más elevados (Bozzola y Russell, 1999; Griffin, 1990).

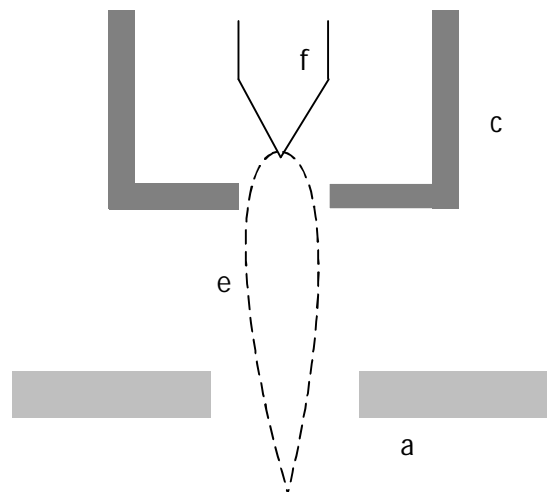


Figura 6. Representación esquemática de un cañón electrónico típico con filamento (f), cilindro de control (c) y ánodo (a). Las líneas punteadas delimitan la trayectoria de los electrones.

### 1.4.2 Sistema óptico

Un conjunto de lentes electromagnéticas se encargan de generar la imagen aumentada del objeto. Estas lentes están formadas por un embobinado cubierto en su totalidad por una pieza de hierro excepto por una apertura (Figura 7). Al hacer pasar una corriente directa por el embobinado se forma un campo magnético en esta discontinuidad. Al atravesar el campo electromagnético los electrones cambian su trayectoria. Todos aquellos que viajen paralelos al eje óptico van a converger en un punto focal. Variando la corriente se varía la intensidad del campo magnético. Esto a su vez cambia la distancia focal y con ello las propiedades de la lente. El

campo magnético requerido para modificar la trayectoria de los electrones es mayor mientras mayor sea la velocidad a la que viajan los electrones. Por lo tanto microscopios con voltajes altos requieren de lentes cada vez más poderosas (Reimer, 1997).

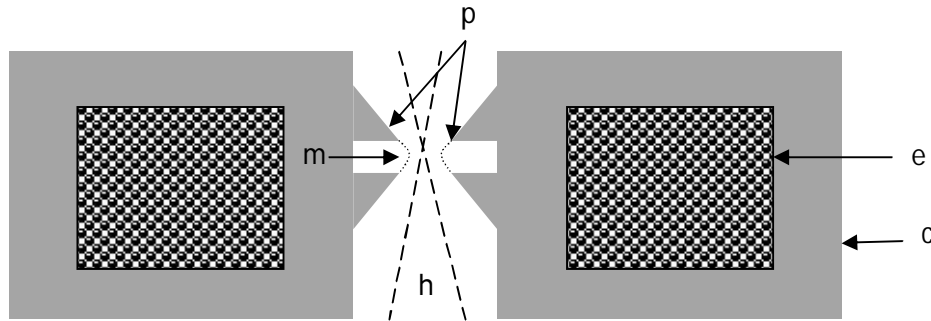


Figura 7. Representación esquemática de una lente electromagnética. Embobinado (e), cubierta de hierro dulce (c), piezas polares (p), campo magnético (m), haz de electrones (h).

Ubicadas entre el cañón electrónico y la muestra, las lentes condensadoras (usualmente dos) concentran el haz de electrones y sirven para regular la iluminación en el área de estudio. Inmediatamente después de la muestra se encuentra la lente objetiva, la más importante y perfeccionada. Esta lente forma la imagen inicial de la muestra que es aumentada por las lentes intermedias (al menos dos en los microscopios modernos) y la proyectora. No todas las lentes ubicadas después de la muestra están en funcionamiento en todo momento. Las diferentes combinaciones entre estas lentes son las que permiten obtener un gran rango de aumentos e incluso girar la imagen manteniendo el mismo aumento. En algunas fuentes todas las lentes después de la objetiva reciben el nombre de proyectoras. En otras fuentes las últimas dos lentes son denominadas proyectoras. Sea cual sea la nomenclatura el funcionamiento es el mismo.

Después de la lente proyectora se encuentra la pantalla fluorescente y la cámara analógica o digital (en microscopios modernos) que permite convertir el haz de electrones en una imagen visible para el ojo humano (Griffin, 1990; Watt, 1985).

### **1.4.3 Sistema de vacío**

Se ha mencionado anteriormente que el microscopio electrónico de transmisión funciona al vacío. Esta condición resulta indispensable ya que la presencia de moléculas de gas en el interior del equipo podría provocar descargas entre el filamento y el cilindro de control o el ánodo, además los electrones colisionarían con las moléculas de gas causando pérdida de resolución o en casos extremos impidiendo la formación de la imagen. Finalmente los filamentos son extremadamente sensibles a la oxidación por lo que el vacío prolonga su vida útil (Bozzola y Russell, 1999; Flegler y col., 1993).

Los microscopio electrónicos de transmisión operan a presiones que oscilan entre  $10^{-5}$  y  $10^{-10}$  mbar. Para lograr un vacío tan alto los microscopios cuentan con sistemas de vacío formados por al menos dos bombas. Una bomba mecánica, encargada del vacío preliminar, lleva al sistema a una presión de  $10^{-1}$  mbar y una vez alcanzada se activan las bombas de alto vacío (generalmente 2). Las bombas de alto vacío pueden ser difusoras, atrapadoras de iones o turbomoleculares y son las que llevan el vacío a niveles adecuados para el funcionamiento del aparato (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

### **1.5 Interacción de los electrones del haz con la muestra**

En un microscopio electrónico de transmisión la imagen se forma por la desviación diferencial de los electrones al interactuar con la muestra. Los electrones del haz pueden atravesar la muestra sin ser desviados o bien pueden alterar su trayectoria y en ocasiones energía mediante dos fenómenos: interacciones elásticas e interacciones inelásticas (Figura 8).

Las interacciones elásticas son las que le otorgan contraste a la muestra y ocurren cuando el electrón del haz pasa tan cerca del núcleo que la carga positiva de éste lo desvía de su trayectoria pero sin perder energía. La desviación se da generalmente en ángulos grandes provocando que los electrones impacten el diafragma que se encuentra en el plano focal posterior de la lente. Estos electrones no formarán parte de la imagen. Las interacciones elásticas son más frecuentes en muestras con átomos de elevado número atómico. Las muestras biológicas formadas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno carecen de esta propiedad. Esta limitante se soluciona al agregarle elementos de contraste

(átomos de elevado número atómico) como el uranio, el plomo y el osmio entre otros.

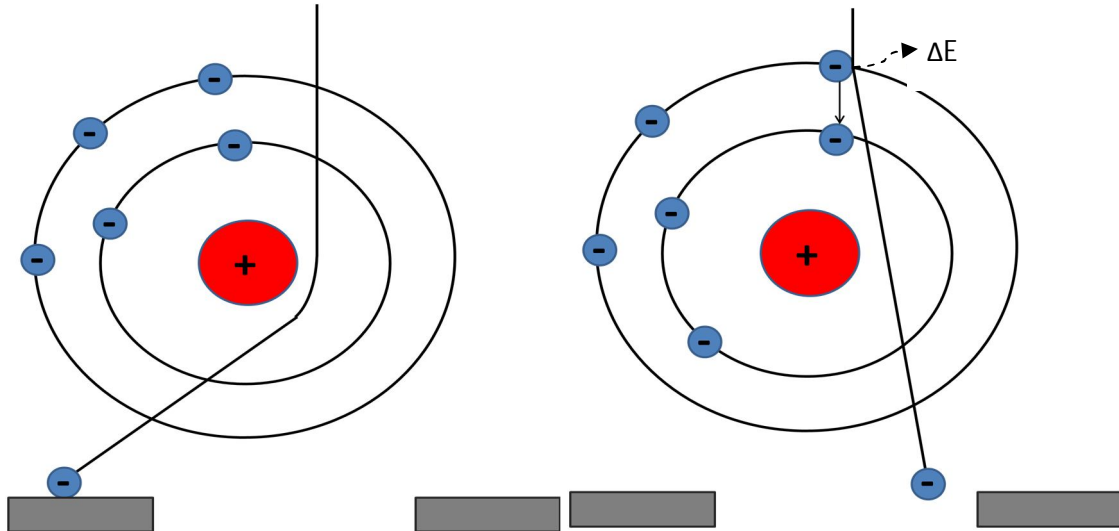


Figura 8. Interacciones elásticas (izquierda) e inelásticas (derecha).

Las interacciones inelásticas resultan cuando el electrón del haz impacta un electrón de un átomo de la muestra. Con este choque el electrón de la muestra es excitado y enviado a un orbital de mayor energía o expulsado del átomo. Al volver el electrón a su orbital original la diferencia de energía es liberada en forma de rayos X o de luz visible. En este tipo de interacción los electrones del haz pierden parte de su energía y son desviados en ángulos pequeños por lo que si llegan a formar parte de la imagen contribuyendo al ruido. Este tipo de interacciones contribuyen al calentamiento de la muestra que puede resultar severamente dañada pudiendo incluso ser sublimada contaminando la columna del microscopio. Las interacciones inelásticas aumentan de manera dramática con el espesor de la muestra por lo que se vuelve imperativo el corte de la muestra en secciones de tan solo unas decenas de nanómetro (Reimer, 1997; Sjöstrand, 1967).

## 1.6 Preparación de la muestra

Por la concepción y construcción del aparato, la muestra no puede ser observada sin ser previamente procesada. Salvo en situaciones extraordinarias, la muestra biológica debe cumplir con las siguientes características:

- Ser pequeña ya que únicamente es observable un área de dos milímetros de diámetro.
- Estar fijada mediante métodos físicos o químicos para conservar su ultraestructura desde su recolección hasta la observación.
- Encontrarse deshidratada con el fin de no alterar el vacío de la columna.
- Ser delgada para permitir el paso de los electrones y disminuir las interacciones inelásticas.
- Estar contrastada mediante la incorporación de átomos de elevado número atómico (Bozzola y Russell, 1999).

### 1.6.1 Fijación

La fijación es el proceso de inmovilizar los componentes celulares para preservar su estado nativo hasta el momento de su análisis en el microscopio. Ésto se puede lograr mediante métodos físicos o químicos. Los métodos físicos consisten en enfriar la muestra a muy altas velocidades para evitar que el agua cristalice y cause alteraciones en la morfología celular.

Por otro lado, la fijación química (aplicada en este trabajo) es la más empleada y utiliza soluciones de formaldehído y/o glutaraldehído. Estos aldehídos reaccionan con los ácidos nucleicos, lípidos, glúcidos y especialmente con las proteínas a las cuales desnaturalizan y privan de su función evitando la degradación enzimática de componentes celulares. (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

El formaldehído es el aldehído más sencillo ya que cuenta con un único átomo de carbono. Tiene la capacidad de difundirse a gran velocidad a través del tejido pero realizando una fijación relativamente deficiente. El glutaraldehído tiene una velocidad de difusión menor pero sus dos grupos funcionales le permiten realizar una fijación de gran calidad ya que una misma molécula puede reaccionar con dos proteínas o con dos zonas de la misma proteína. La combinación de ambos aldehídos resulta en una mejor preservación de la ultraestructura por sus características complementarias. (Hayat, 1986; Sjöstrand, 1967).

Después de la fijación primaria con aldehídos es frecuente realizar una fijación secundaria con una solución de tetraóxido de osmio. Este compuesto reacciona

con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados y logra una muy buena preservación de las membranas tanto al exterior como al interior de las células. Además funciona como un contrastante que va a permitir observar la estructura de las membranas celulares (Gonzalez-Santander, 1968).

Para que la fijación sea efectiva, la muestra debe estar cortada en fragmentos muy pequeños, de no más de 1 mm<sup>3</sup>.

### **1.6.2 Deshidratación**

Generalmente la deshidratación se hace sustituyendo el agua de la muestra con series de concentración creciente de etanol o acetona hasta llegar a una concentración del 100% dejando las muestras listas para la inclusión.

En el caso de las muestras deshidratadas con etanol que van a ser incluidas en resinas epóxicas es necesario emplear un compuesto intermediario que sea soluble tanto en el compuesto deshidratante como en la mezcla de inclusión. Este compuesto primero desplaza el etanol y después es desplazado por la resina. El intermediario usado con mayor frecuencia es el óxido de propileno (Spector y col., 1998).

### **1.6.3 Inclusión**

Para permitir el corte de la muestra en secciones de decenas de nanómetros es necesario que esté embebida por un material que posea las propiedades mecánicas de las que carecen la mayoría de las muestras biológicas. Estos materiales llamados resinas son monómeros plásticos que una vez que han penetrado la muestra son polimerizados formando una red que va a contener el material a analizar (Sjöstrand, 1967).

Existen dos tipos de resinas: las epóxicas y las acrílicas. Las resinas epóxicas más comunes son: Epon 812, Araldita y Spurr. Estos materiales tienen buena estabilidad bajo el haz de electrones acelerados, presentan poco encogimiento de la muestra durante la polimerización y son las resinas de elección para estudios de



ultraestructura. Las resinas acrílicas más empleadas son: LR White, Lowicryl y LR Gold. Este tipo de resinas son menos estables bajo el haz de electrones y al polimerizarse presentan retracción del volumen, lo cual altera la ultraestructura. Sin embargo, tienen la propiedad de preservar mejor la actividad enzimática y los epítomos de las macromoléculas por lo que son seleccionadas para estudios de inmunolocalización (Gonzalez-Santander, 1968; Spector y col., 1998).

#### **1.6.4 Corte**

Existen tres motivos principales para cortar la muestra en secciones delgadas. En primer lugar, los electrones acelerados a los voltajes habituales en ciencias biológicas (40-120 kV) no tienen la energía suficiente para atravesar muestras de gran espesor. En segundo lugar, la imagen tomada en un microscopio electrónico de transmisión es una representación bidimensional de un espacio tridimensional. Los componentes celulares presentan un solapamiento que es mayor mientras mayor sea el grosor del corte. Finalmente y como ya se mencionó, los cortes gruesos incrementan la cantidad de interacciones inelásticas lo cual calienta la muestra pudiendo llegar a sublimarla. Esto es una fuente de contaminación muy importante que va a abatir la resolución del microscopio.

Los cortes deben tener un espesor menor que 100 nm e idealmente menor que 60 nm. El corte debe tener un grosor lo más homogéneo posible y no presentar rasgaduras o pliegues. Secciones tan delgadas se logran mediante el uso de un ultramicrotomo y cuchillas de vidrio o de ser posible, diamante. Una vez obtenidos los cortes, se van a colocar sobre rejillas de soporte circulares de 3 mm de diámetro hechas generalmente de cobre, níquel u oro (Figura 9) (Hayat, 1986). Las rejillas empleadas en este trabajo están hechas de cobre, tienen un enrejado cuadrícula y están recubiertas en una de sus caras por una membrana de Formvar que proporciona mayor estabilidad a los cortes de material biológico.

#### **1.6.5 Contraste**

Las muestras biológicas están compuestas en su mayor parte por elementos de bajo número atómico (carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno principalmente). Las imágenes de estos átomos tienen un contraste muy bajo por el número limitado de interacciones elásticas con los electrones del haz. Para incrementar el contraste se agregan compuestos que contienen átomos de elevado número atómico. Estos

compuestos deben de ser estables bajo el haz de electrones y no reaccionar con las rejillas que sirven de soporte para los cortes (Gonzalez-Santander, 1968).

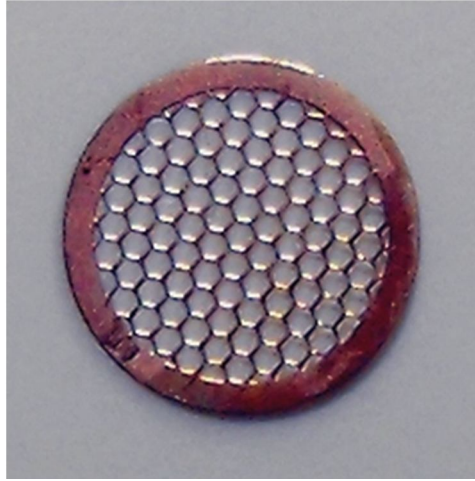


Figura 9. Rejilla de soporte para cortes ultrafinos.

Existen contrastantes preferenciales que resaltan ciertas estructuras de la célula sin embargo lo más usual es utilizar contrastantes generales. El contacto con soluciones de acetato de uranilo y citrato de plomo es la forma más empleada para otorgar contraste a las muestras biológicas (Spector y col., 1998).

## **2 Microscopía de fuerza atómica**

### **2.1 Introducción**

El microscopio de fuerza atómica permite analizar muestras biológicas con una gran resolución empleando un principio distinto a la microscopía electrónica. Este tipo de microscopio recorre la superficie de una muestra dando información de la estructura en sus tres dimensiones. Tiene la significativa ventaja de poder analizar muestras biológicas en condiciones cercanas a las fisiológicas (Figura 10) (Jena y Hörber, 2002).

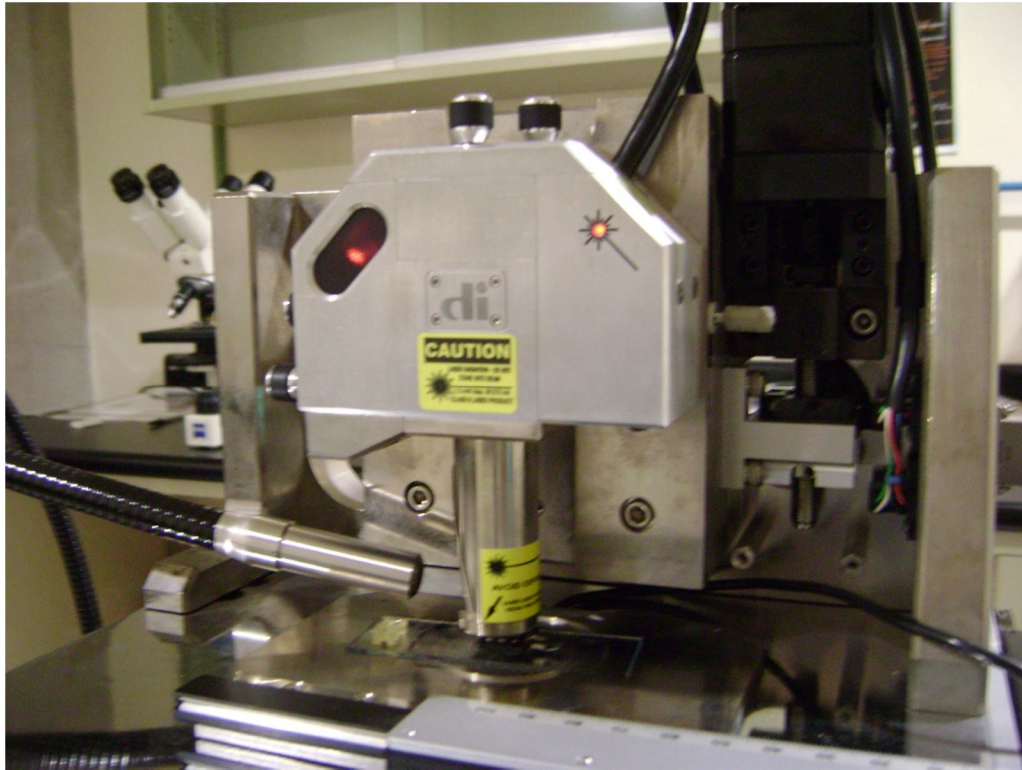


Figura 10. Microscopio de fuerza atómica de reciente manufactura utilizado en este trabajo.

## 2.2 Historia

El microscopio de fuerza atómica tiene su antecedente en el microscopio de efecto túnel ideado a principios de los años ochenta (Binnig y col., 1982). En este instrumento un electrodo se encuentra separado de la muestra conductora por un aislante (usualmente aire). Al acercarse lo suficiente ( $<1$  nm) algunos electrones pueden atravesar la barrera por un proceso cuántico llamado efecto túnel. La corriente de electrones es altamente estable y depende de la distancia que separa ambos conductores. La posibilidad de medir y controlar esta corriente es la que otorga al microscopio de efecto túnel su altísima resolución vertical ( $<0.1$  nm) (Birdi, 2003). Un aumento de la distancia de tan solo  $0.1$  nm provoca una disminución de la corriente en un orden de magnitud. La importancia de este invento quedó rápidamente demostrada por lo que Binnig y Rohrer recibieron en 1986 el premio Nobel junto con Ruska, el diseñador y constructor del primer microscopio electrónico de transmisión (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Con el microscopio de efecto túnel es posible resolver la estructura atómica de la superficie de muestras conductoras, sin embargo, no existía una técnica que permitiera análisis similares de muestras aislantes. Esta limitación fue superada con la construcción del primer microscopio de fuerza atómica (Figura 11) (Binnig y col., 1986). Esta invención abrió la posibilidad de analizar muestras biológicas sin la necesidad de tratamientos previos.

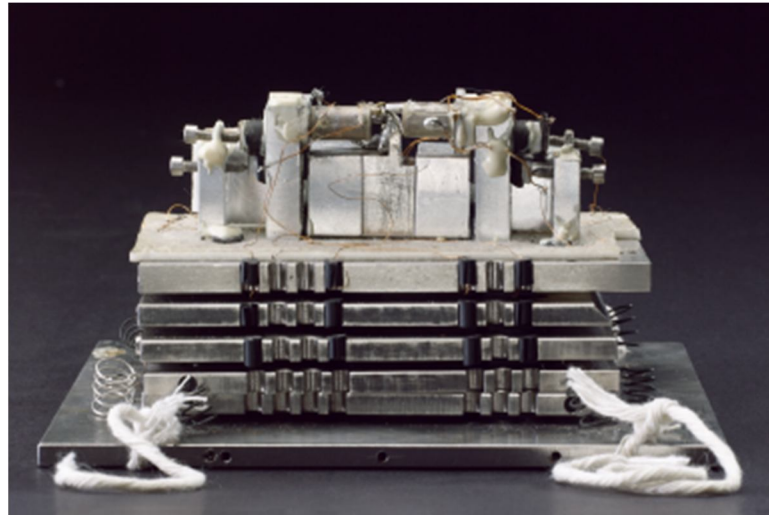


Figura 11. Primer microscopio de fuerza atómica construido en 1985 (Science Museum).

## 2.3 Fundamentos

El principio detrás del microscopio de fuerza atómica es sencillo, su complejidad reside en la dificultad técnica de su construcción. El instrumento genera imágenes barriendo la superficie de la muestra con una diminuta punta de manera similar a como un ciego palpa la superficie de los objetos para conocer su forma, textura y dureza (Morris y col., 1999).

## 2.4 Componentes

### 2.4.1 Trampolín y punta

Una pequeñísima punta montada en el extremo de un trampolín es la que interacciona con la superficie de la muestra (Figura 12). En el primer microscopio

de fuerza atómica la punta era un diamante cuidadosamente adherido a un trampolín de oro (Binnig y col., 1986). Actualmente, los materiales más comunes para su fabricación son silicón y nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Son considerados elementos desechables pues la punta en ocasiones se rompe o cambia de forma con el uso. La sustitución de la punta es un procedimiento sencillo que se puede llevar a cabo en pocos minutos (Eaton y West, 2010).

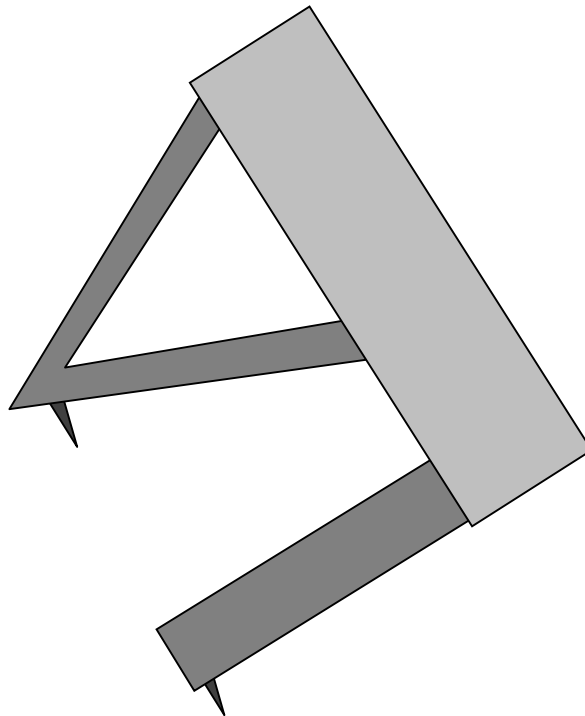


Figura 12. Representación esquemática de dos trampolines con su respectiva punta para microscopía de fuerza atómica. El esquema no está a escala.

### 2.4.2 Detector

La mayoría de los microscopios de fuerza atómica actuales utilizan sensores ópticos pues con ellos se puede obtener buenas resoluciones siendo al mismo tiempo un sistema sencillo y relativamente económico (Figura 13). Este mecanismo tiene la desventaja de requerir alineamiento constante (Morris y col., 1999).

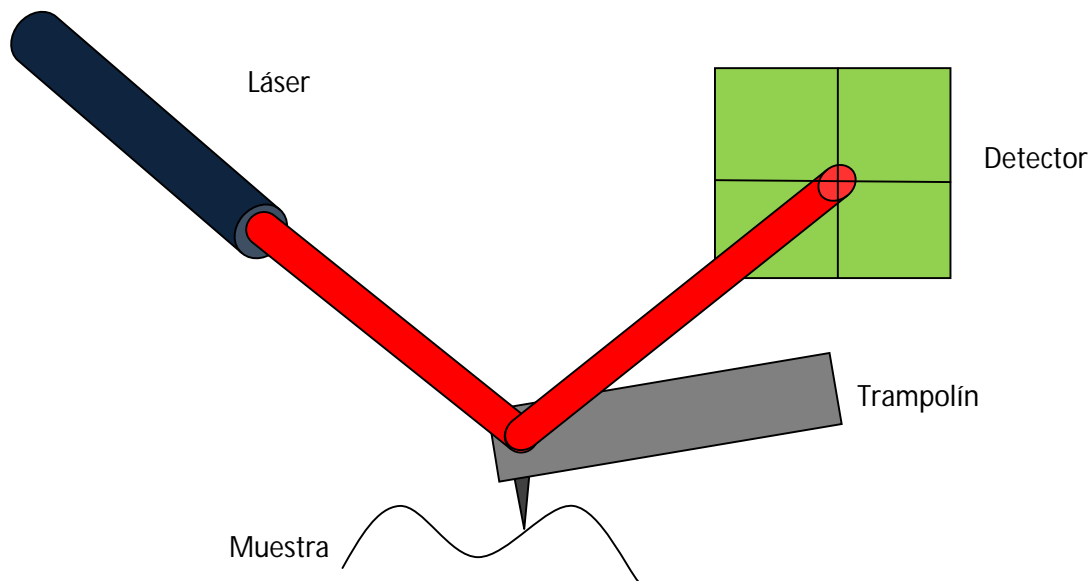


Figura 13. Representación esquemática de un sensor óptico.

El sistema consiste en apuntar un láser al reverso del trampolín. Esta zona del trampolín está cubierta por una delgada capa de metal que le permite reflejar la luz. Al moverse el trampolín, el láser es reflejado en distintos ángulos con lo cual se modifica el punto de incidencia en un fotodetector. Un pequeño movimiento del trampolín resulta en un gran cambio en la posición del láser en el fotodetector (Braga y Ricci, 2004).

### 2.4.3 Mecanismo de barrido

Existen dos configuraciones de microscopios de fuerza atómica. En unos la punta recorre la superficie de la muestra que se encuentra estática (como es el caso de este trabajo). En otros equipos el trampolín con la punta se encuentran fijos y la muestra es desplazada. Cualquiera que sea el caso se requiere de un sistema de barrido que permita controlar de manera muy precisa el contacto entre la muestra y la punta (Braga y Ricci, 2004).

El sistema de barrido se basa en el uso de materiales piezoeléctricos que son cristales no conductores con la capacidad de generar diferencias de potencial en su

superficie al ser sometidos a tensión mecánica. El fenómeno opuesto también ocurre y es aprovechado en microscopía de fuerza atómica. Al ser sometido a una diferencia de potencial entre dos caras opuestas el cristal piezoeléctrico cambia su geometría. Los materiales piezoeléctricos cambian de forma pero su volumen se mantiene constante.

En el microscopio de fuerza atómica los piezoeléctricos más comunes son de titanato de bario-plomo ( $\text{PbBaTiO}_3$ ) y titanio-zirconato de plomo (abreviado PZT),  $\text{Pb}(\text{Zr}_x\text{Ti}_{1-x})\text{O}_3$  donde  $0 < x < 1$ . Estos materiales son muy sensibles y pueden alterar su forma de manera muy controlada (Eaton y West, 2010).

En los primeros microscopios de efecto túnel el mecanismo de barrido consistía de tres bloques de material piezoeléctrico (uno para cada eje) acomodados en forma de trípode. Actualmente es mucho más común el acomodo en forma de cilindro o tubo (Figura 14). Este arreglo hace posible el barrido de áreas más amplias con un mecanismo más compacto, lo cual mejora el desempeño del aparato. Esta disposición presenta dos desventajas; la primera es que el extremo libre del cilindro describe un arco y no una línea recta por lo que la imagen se crea en forma de tazón (Figura 15). Esto resulta más evidente en barridos de grandes superficies pero puede ser corregido mediante el software que acompaña al microscopio. La segunda desventaja es la baja velocidad de barrido (Braga y Ricci, 2004).

Idealmente, la forma de los materiales piezoeléctricos cambiaría de manera directa al voltaje pero todos presentan en mayor o menor grado un comportamiento no lineal. La histéresis provoca que el material tienda a permanecer en su forma inicial. Cuando el material se expande en una dirección hay una no linealidad negativa y al contraerse hay una no linealidad positiva. El deslizamiento ocurre cuando el material es sometido a un cambio repentino de voltaje. El material va a continuar expandiéndose o contrayéndose aún cuando el voltaje haya dejado de cambiar (Cohen y col., 1994; Morris y col., 1999).

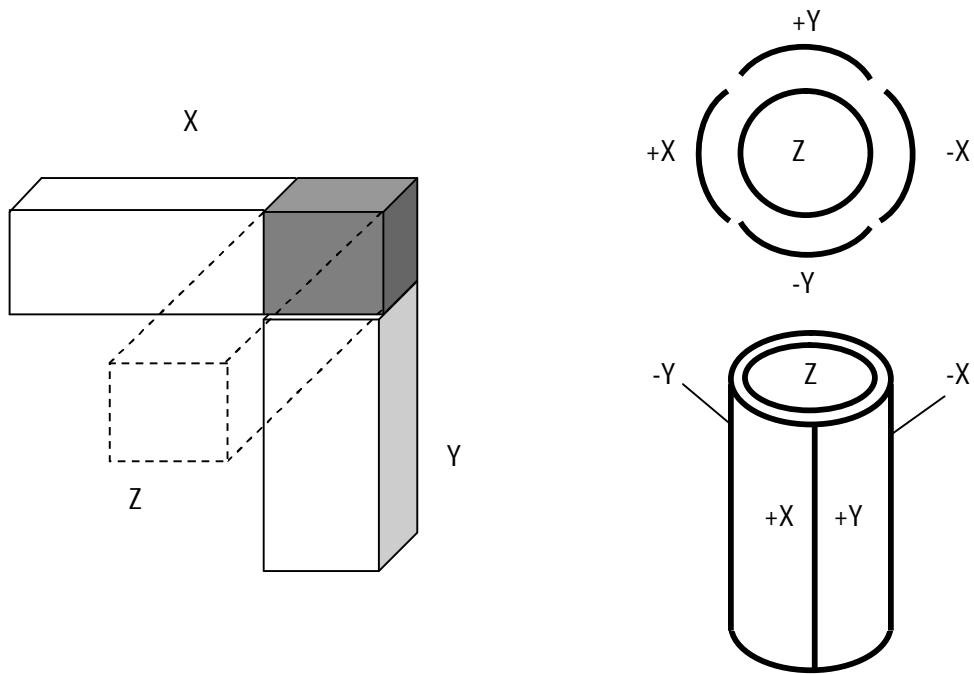


Figura 14. Representación esquemática de dos sistemas de barrido con materiales piezoeléctricos: en trípode (izquierda) y en tubo (derecha).

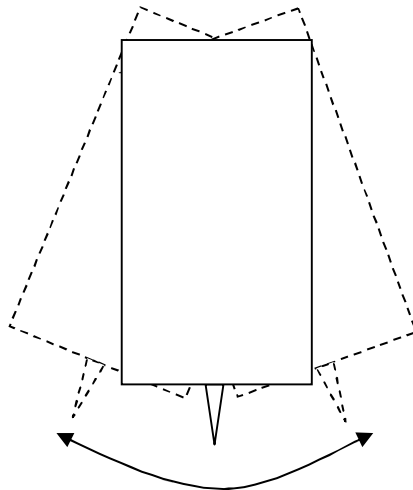


Figura 15. Representación esquemática del arco descrito por el extremo libre de un sistema de barrido en tubo.



#### **2.4.4 Sistema de retroalimentación**

El microscopio de fuerza atómica tiene una gran sensibilidad y aplica una fuerza diminuta sobre la muestra ( $<10^{-9}$  N) (Birdi, 2003) en parte gracias a un sistema de retroalimentación en el cual la señal captada por el detector es usada para controlar los piezoeléctricos. Este sistema se encarga de mantener constante la fuerza entre la punta y la muestra. Por ejemplo, cuando la punta se encuentra con una partícula sobre la superficie de la muestra los piezoeléctricos la alejan de ésta. De manera opuesta, si la punta se encontrara con “un valle” los piezoeléctricos la harían descender para mantener el contacto con la muestra (Eaton y West, 2010).

#### **2.4.5 Software de adquisición**

Ya que este aparato, a diferencia de los microscopios convencionales, no capta directamente una imagen del objeto es necesario tener un software que transforme la información obtenida, a través del detector, en una imagen que pueda ser observada por el ojo humano.

Los parámetros de barrido se establecen por medio de una interfaz gráfica la cual presenta las imágenes generadas. Este software suele incluir además la opción de procesamiento de la imagen que hace posible rotar en tres dimensiones la imagen, realizar mediciones, ajustar el contraste, entre otras posibilidades.

### **3 Nucleolo**

#### **3.1 Introducción**

El nucleolo es un subdominio o subcompartimento del núcleo encargado de la síntesis y procesamiento del ARNr así como de parte del ensamblaje de las subunidades ribosomales. (Jiménez-García y Merchant, 2003). Se trata de la estructura más conspicua dentro del núcleo celular. Está formado por ADNr, ARNr en distintas etapas de maduración, enzimas procesadoras de ARNr, ARN pequeño nucleolar, proteínas ribosomales y ribosomas parcialmente ensamblados (Alberts y col., 2008). En la mayoría de las células encontramos entre una y cinco de estas regiones especializadas que miden entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$  (Pollard y Earnshaw, 2008). El tamaño del nucleolo varía dependiendo de la síntesis de ribosomas en una célula y

momento particulares. Células con un alto nivel de síntesis de ribosomas presentan un mayor volumen nucleolar (Lewin y col., 2007).

### **3.2 Componentes**

En el nucleolo pueden distinguirse tres tipos de estructura: centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular. La división del nucleolo en diferentes regiones es el resultado de las distintas etapas de procesamiento del pre-ARNr y ensamblaje de las subunidades ribosomales (Lodish y col., 2008).

La transcripción de los genes ribosomales comienza en los límites entre los centros fibrilares y el componente fibrilar denso. El procesamiento del pre-ARNr obtenido comienza en la región fibrilar densa y avanza a medida que el ARN migra hacia el componente granular. Estas estructuras visibles por microscopía electrónica aparecen como regiones bien definidas, sin embargo las proteínas nucleolares que intervienen en la síntesis de ribosomas circulan constantemente entre el nucleolo y el nucleoplasma en células interfásicas (Sirri y col., 2008).

El nucleolo se puede clasificar de acuerdo a la distribución de estas estructuras pudiendo ser reticulado o anular. Los nucleolos reticulados se caracterizan por una red de fibras llamada nucleolonema, integrada por componente fibrilar denso. Usualmente presentan centros fibrilares pequeños. Los nucleolos anulares o compactos se caracterizan por tener centros fibrilares de tamaño variable rodeados de componente fibrilar denso que no forma una red en este tipo de nucleolo (Bittar, 1995).

A su vez es posible distinguir en plantas dos tipos de centros fibrilares: homogéneos y heterogéneos. Los homogéneos como su nombre lo indica presentan una estructura uniforme a diferencia de los heterogéneos en los que se pueden identificar fibras densamente empaquetadas. Estas fibras corresponden a la cromatina condensada como resultado de niveles bajos de transcripción (Risueño y col., 1982).

El tamaño y distribución de los tres tipos de estructura del nucleolo son indicadores de la actividad celular. En células de cebolla (*Allium cepa*) con poca actividad se han observado centros fibrilares grandes y poco numerosos así como escaso componente granular. Células más activas (en proliferación por ejemplo) presentan numerosos centros fibrilares pequeños rodeados por componente fibrilar denso. El componente granular es abundante en este tipo de células (Bassy y col., 2000).

### **3.3 Ciclo nucleolar**

El nucleolo se disgrega en la profase y vuelve a ensamblarse en la telofase a partir de las regiones organizadoras nucleolares. Al inicio de la profase los componentes de la maquinaria de procesamiento del pre-ARNr se alejan del ADNr y se distribuyen por la superficie de todos los cromosomas (Sirri y col., 2008).

La transcripción del ADNr es reprimida cuando la célula entra en mitosis y se mantiene en este estado por la fosforilación de componentes de la maquinaria de transcripción por la proteína CDK1-cyclin B. Durante este periodo la maquinaria de transcripción permanece asociada al ADNr en las regiones organizadoras nucleolares (Hernández-Verdun, 2006).

Se ha sugerido que la estructura nucleolar se regenera como resultado de la transcripción del ADNr. En la telofase tardía reinicia la transcripción por parte de la ADN polimerasa I y otros componentes nucleolares son reclutados al sitio de la transcripción. De esta manera se forman los pequeños cuerpos prenucleolares en cada región organizadora del nucleolo. Posteriormente estos cuerpos se fusionan formando estructuras mayores poco numerosas (Shaw y Doonan, 2005).

## **HIPÓTESIS**

El nucleolo observado mediante el microscopio de fuerza atómica presentará una estructura heterogénea. Al menos dos de los componentes del nucleolo podrán ser diferenciados con esta técnica.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Observar y comparar la estructura del nucleolo de cebolla en el microscopio electrónico de transmisión y en el microscopio de fuerza atómica.

### **Objetivos específicos**

- Preparar el material biológico para su estudio con microscopía electrónica.
- Seleccionar la región de interés del tejido.
- Obtener cortes semifinos montados en portaobjetos de vidrio.
- Obtener cortes ultrafinos montados en rejillas con membranas de Formvar.
- Visualizar los cortes semifinos y ultrafinos mediante microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de transmisión respectivamente.
- Identificar componentes de la ultraestructura del nucleolo.
- Comparar las imágenes y la información obtenidas mediante los dos equipos.

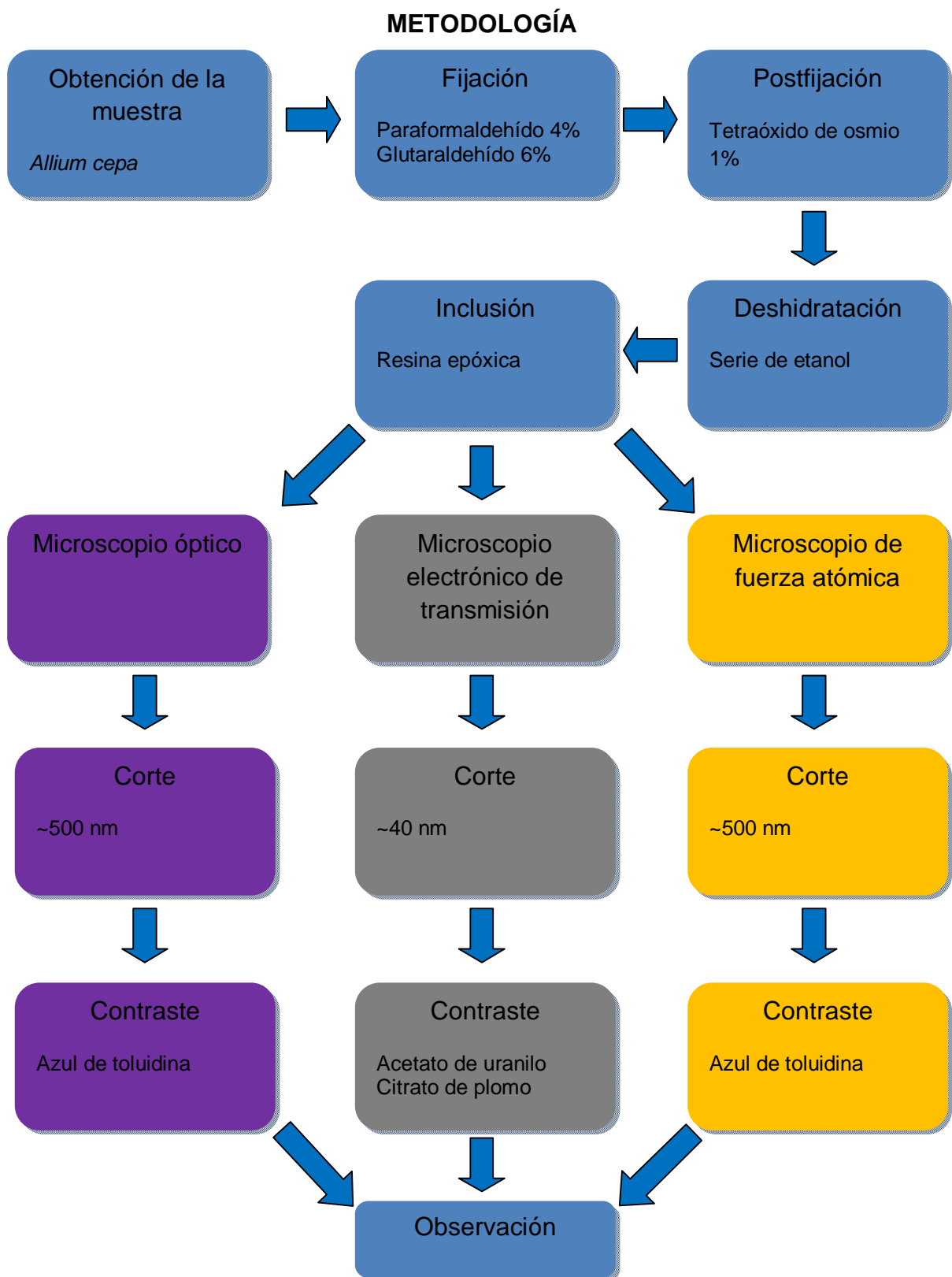


Figura 16. Diagrama de flujo resumiendo la metodología empleada en el trabajo.

## **1 Material biológico**

Se utilizaron cebollas (*Allium cepa*) que fueron parcialmente sumergidas en agua para promover el crecimiento de las raíces.

## **2 Procesamiento del material biológico**

### **2.1 Fijación**

Se cortó con una navaja el extremo apical de las raíces (aproximadamente 1 mm) e inmediatamente se sumergieron los fragmentos en una solución fijadora de glutaraldehído al 6 % y paraformaldehído al 4 % en amortiguador de fosfatos salino (PBS, phosphate buffered saline). Se dejaron las muestras en esta solución en un frasco tapado durante 16 horas a temperatura ambiente.

Una vez concluido este periodo se retiró la solución fijadora de las muestras y se hicieron 8 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

### **2.2 Postfijación**

Una vez retirado el PBS del último lavado se agregó tetraóxido de osmio al 2 % peso/peso diluido en una proporción 1:1 en PBS para obtener una concentración final de 1 %. Se tapó el frasco y se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 12 horas.

### **2.3 Deshidratación**

Pasado ese tiempo se retiró la solución de tetraóxido de osmio y se deshidrataron las muestras con soluciones de etanol de concentración creciente (30, 50, 70, 80, 90 y 96 %). Se hicieron los cambios de solución cada 5 minutos. Posteriormente se hicieron 3 cambios de 5 minutos cada uno con etanol absoluto.

### **2.4 Inclusión**

Siguiendo la deshidratación se hicieron 3 cambios de 5 minutos con óxido de propileno. A continuación se sustituyó con una mezcla de óxido de propileno y

resina epóxica en proporción 2:1. Las muestras permanecieron en esta mezcla 2 horas. Posteriormente se sustituyó esta mezcla por una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina. Las muestras permanecieron en esta mezcla por 24 horas. Pasado este tiempo se destapó el frasco para promover la evaporación del óxido de propileno y un aumento gradual en la concentración de la resina.

Las muestras fueron transferidas a moldes donde se cubrieron con la resina. Una vez agregada la resina, las muestras se colocaron en los extremos de los moldes para facilitar su manipulación posterior. Para acelerar la polimerización de la resina los moldes se mantuvieron en una estufa a una temperatura de 60 °C durante 24 horas.

## **2.5 Corte**

Los bloques se colocaron en un soporte y se retallaron manualmente con una navaja hasta obtener una pirámide trunca con una cara superior con la menor cantidad posible de resina. Una vez hecho esto el bloque junto con el soporte se sujetó al brazo del ultramicrotomo.

Empleando cuchillas de vidrio triangulares de 2.5 cm y 45° se hicieron cortes de aproximadamente 500 nm para microscopía óptica y de fuerza atómica. Por otro lado, los cortes para microscopía electrónica fueron de aproximadamente 40 nm. Todos los cortes se hicieron con un ángulo de 4° entre la vertical y la cara anterior de la cuchilla.

Una vez desprendidos del bloque los cortes se deslizaron sobre la superficie del agua en la barquilla de la cuchilla donde fueron recogidos, en el caso del microscopio óptico y de fuerza atómica, con un asa de cobre en. Se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio limpio en el cual se adhirieron al exponer la parte inferior del portaobjetos al calor generado por un mechero de alcohol. Los cortes para microscopía electrónica fueron recogidos en rejillas de cobre de 3 mm recubiertas con membrana de Formvar.



## **2.6 Contraste**

Para microscopía óptica y de fuerza atómica los cortes se tiñeron con azul de toluidina. En el caso de los cortes para microscopía electrónica se contrastaron con una solución de acetato de uranilo al 4 % durante 30 minutos. Una vez hecho esto, los cortes se lavaron por goteo con agua bidestilada colocando después las rejillas con los cortes en una solución de citrato de plomo al 0.35 % por 10 minutos. Finalmente, se volvieron a lavar las rejillas por goteo con agua bidestilada.

## RESULTADOS

### 1 Microscopía óptica

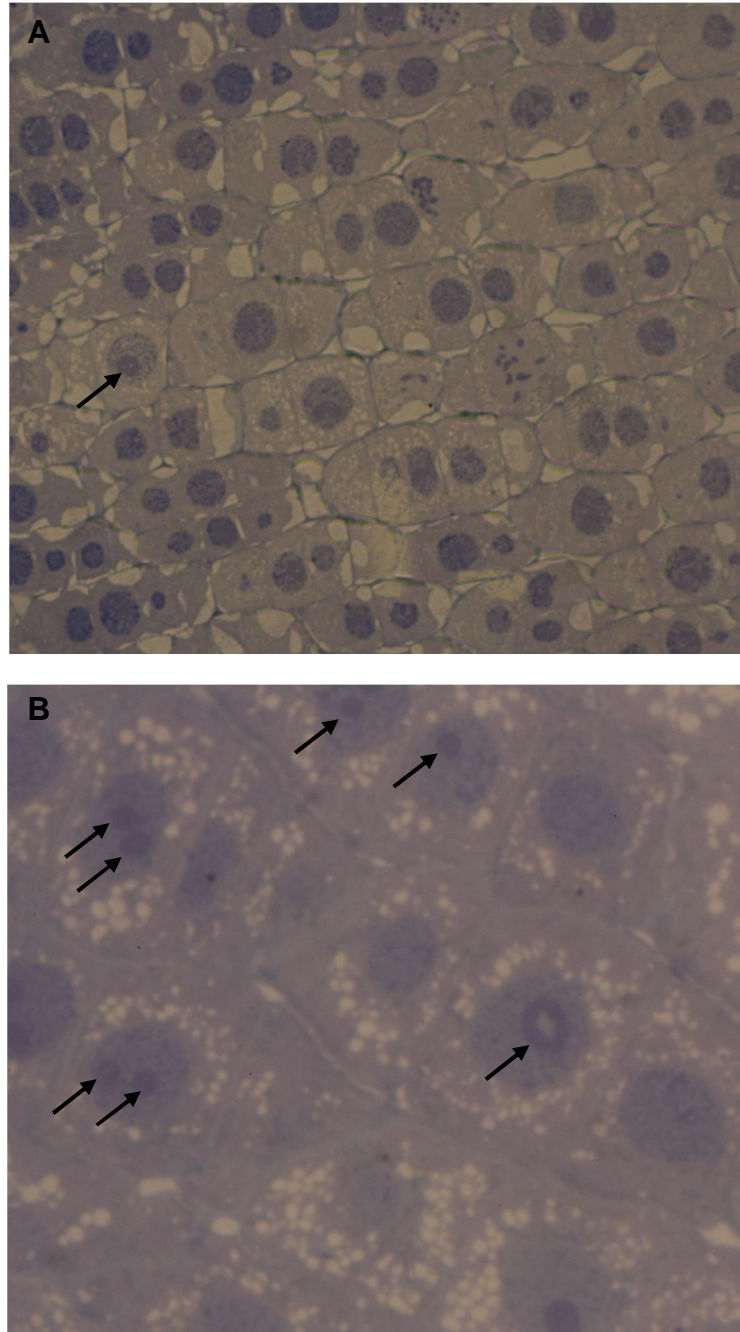


Figura 17. Micrografías de luz de células de raíz de *Allium cepa*. Las flechas señalan nucleolos prominentes. A) Imagen tomada a 400 aumentos. B) Imagen tomada a 1,000 aumentos.

## 2 Microscopía electrónica de transmisión

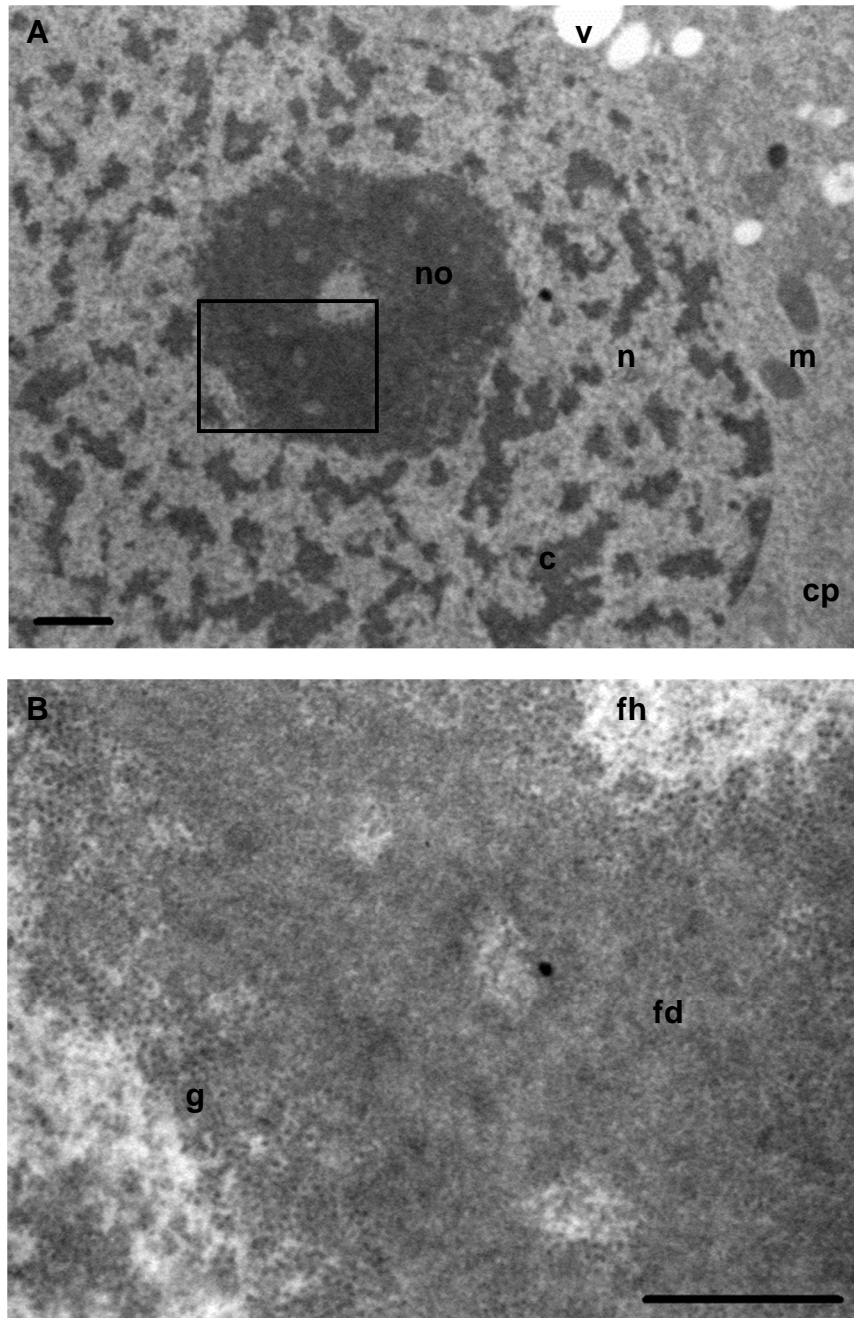


Figura 18. Micrografías electrónicas de una célula interfásica de *Allium cepa*. A) Es posible distinguir las siguientes estructuras: citoplasma (cp), núcleo (n), cromatina (c), nucleolo (no), vacuolas (v) y mitocondrias (m). Imagen tomada a 8,000 aumentos. Barra 1  $\mu\text{m}$ . B) Aumento de A. Son visibles los componentes del nucleolo: centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd), componente granular (g). Imagen tomada a 40,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

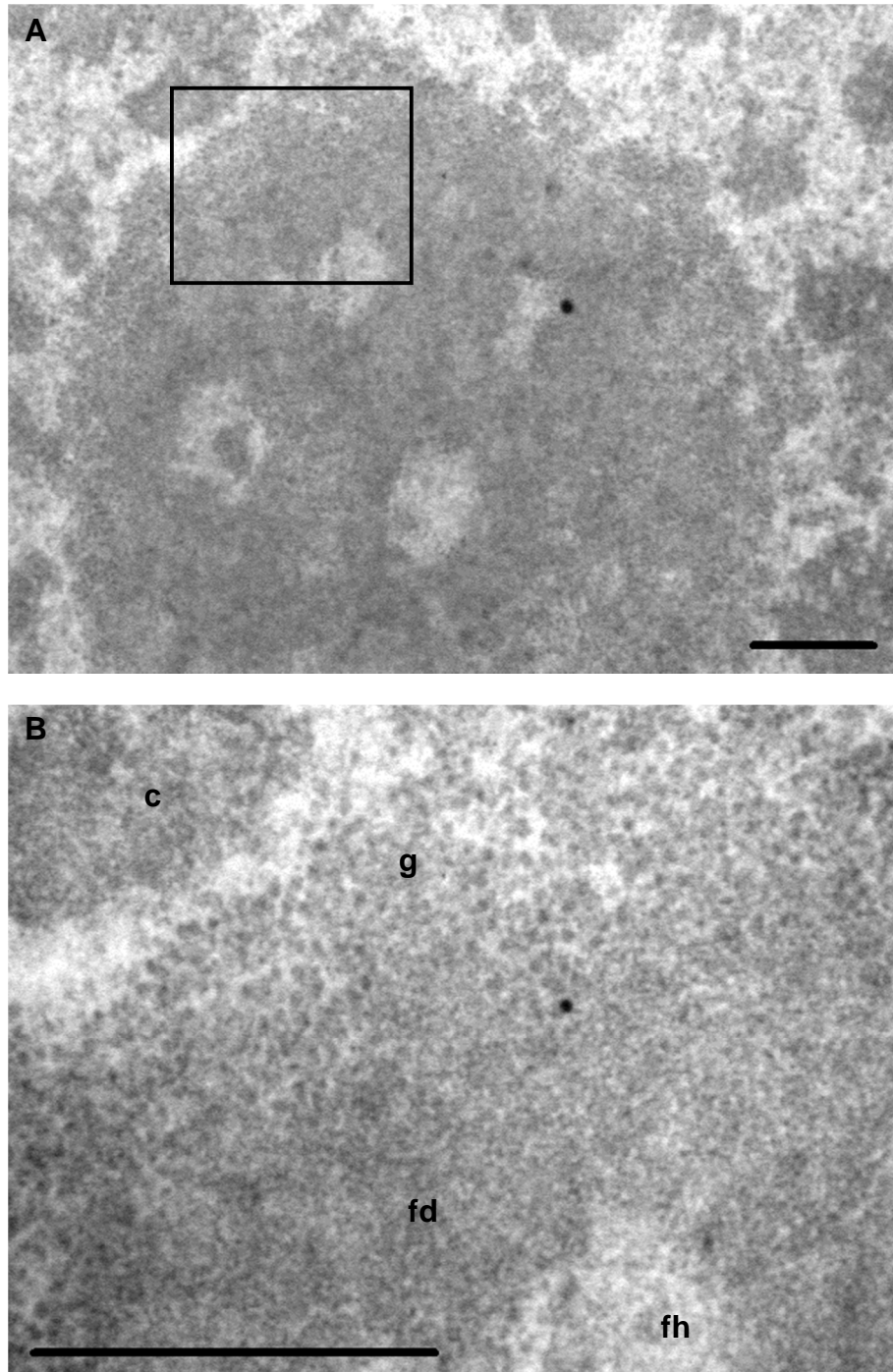


Figura 19. Micrografías electrónicas de un nucleolo de una célula interfásica de *Allium cepa*. A) Imagen tomada a 25,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ . B) Aumento de A. Es posible distinguir los componentes del nucleolo: centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd) y componente granular (g) además de la cromatina (c). Imagen tomada a 80,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

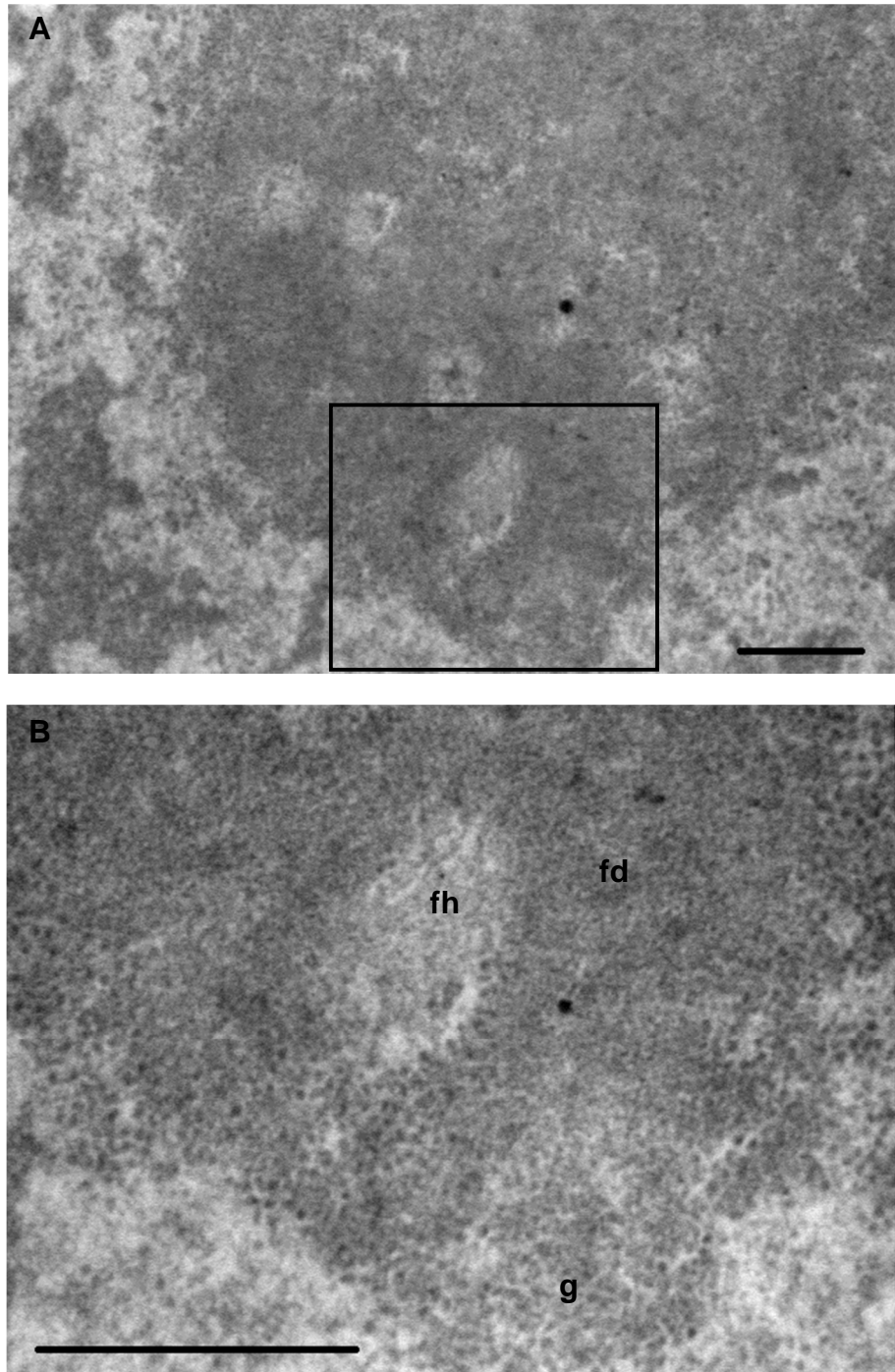


Figura 20. Micrografías electrónicas de un nucleolo de una célula interfásica de *Allium cepa*. A) Imagen tomada a 25,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ . B) Aumento de A. Se distinguen los componentes del nucleolo: centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd), componente granular (g). Imagen tomada a 60,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

## 2.1 Estereopares

Un microscopio electrónico de transmisión genera una imagen bidimensional de un cuerpo tridimensional. Esto provoca una pérdida de información pues hay superposición de estructuras. En una micrografía convencional no es posible discernir que objetos se encuentran en un plano superior o inferior. Incluso, varias estructuras pueden aparecer como una sola en la imagen. Esta limitación puede ser en parte resuelta con la utilización de estereopares.

El principio de esta técnica es sencillo. Los ojos de un observador tienen puntos de vista diferentes. El cerebro se encarga de procesar la información obtenida a través de los dos ojos para dar una impresión de profundidad. En la fotografía estereoscópica se emplea una cámara con dos lentes separadas o bien una cámara en dos posiciones distintas para registrar una escena desde dos puntos de vista. Las imágenes se le presentan al observador de manera que cada ojo vea de manera independiente una imagen. De esta forma se logra dar la impresión de tridimensionalidad a través de dos imágenes bidimensionales (Watt, 1985).

En el microscopio electrónico de transmisión los estereopares se obtienen inclinando el espécimen unos grados en un sentido para capturar una imagen. A continuación, se inclina la preparación en el sentido opuesto y se captura la segunda imagen.

Para observar el efecto se colocan las micrografías en la misma línea horizontal. Con práctica algunas personas pueden relajar los músculos de los ojos haciendo que éstos miren directamente al frente, únicamente a la micrografía que les corresponde. El cerebro se encarga entonces de fusionar las imágenes obtenidas por cada ojo. Lograr esto puede llevar tiempo e incluso resultar imposible para una parte importante de la población. Con el fin de solucionar esta limitación se pueden emplear dispositivos de mayor o menor complejidad que aíslan las imágenes para que cada ojo vea una de manera independiente cada micrografía.

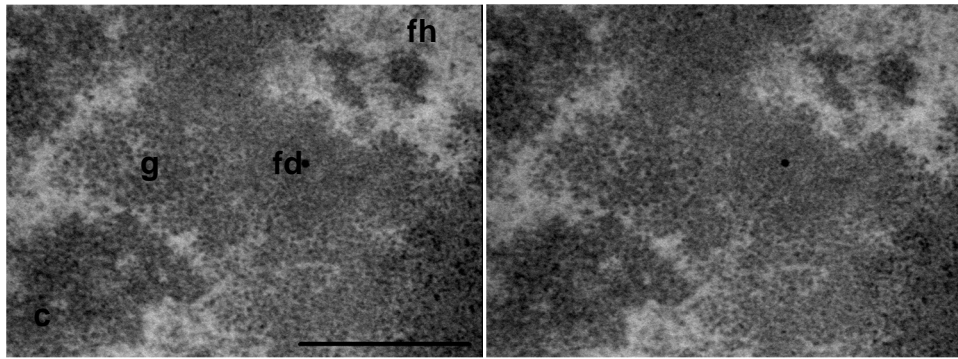


Figura 21. Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de *Allium cepa*. Se distinguen los componentes del nucleolo: centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd) y componente granular (g) así como la cromatina (c). Imágenes tomadas a 60,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

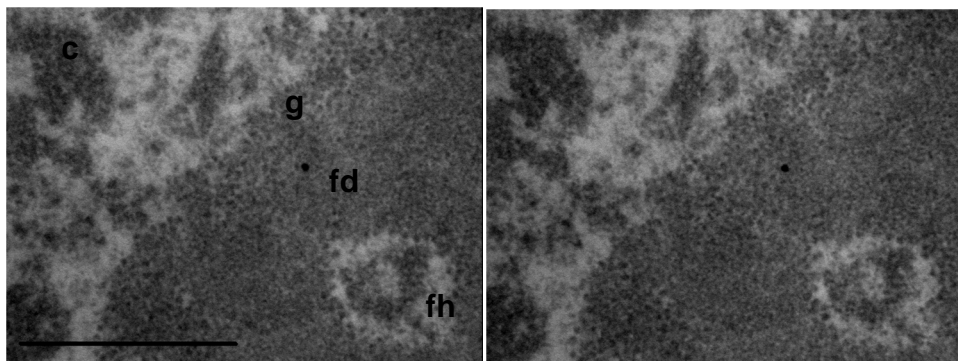


Figura 22. Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de *Allium cepa*. Se distinguen los componentes del nucleolo: centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd) y componente granular (g). También es visible la cromatina (c). Imágenes tomadas a 80,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

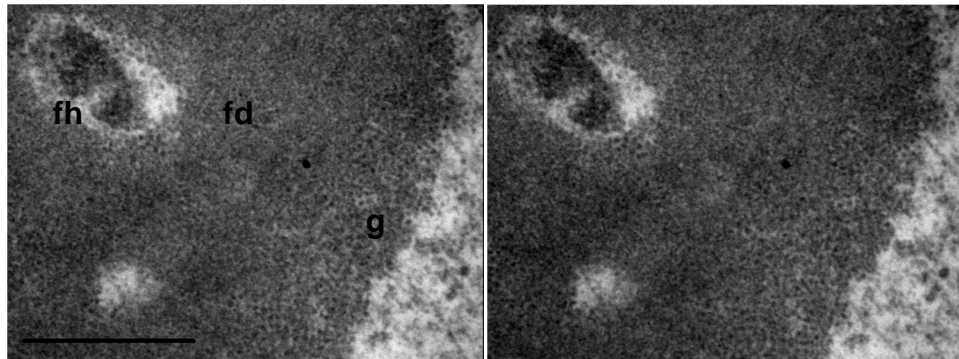


Figura 23. Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de *Allium cepa*. Se distinguen los componentes del nucleolo. Centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd) y componente granular (g). Imágenes tomadas a 60,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

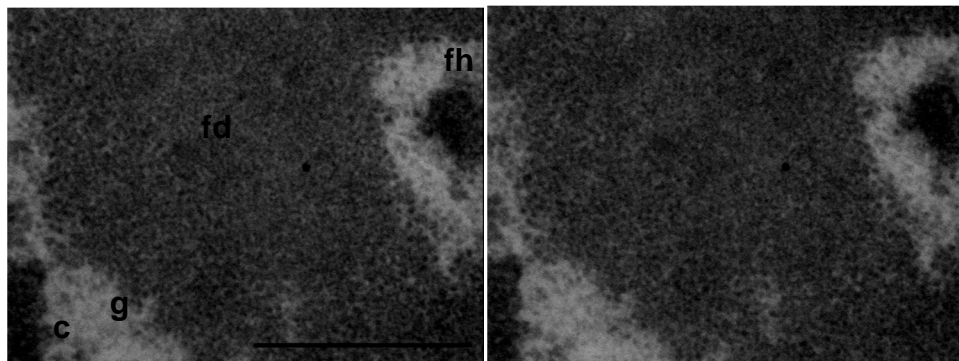


Figura 24. Estereopares de un nucleolo interfásico de una célula de *Allium cepa*. Se distinguen los componentes del nucleolo: centro fibrilar heterogéneo (fh), componente fibrilar denso (fd) y componente granular (g) así como la cromatina (c). Imágenes tomadas a 80,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

## 2.2 Anaglifos

Otra técnica empleada desde hace tiempo consiste en imprimir las dos micrografías superpuestas pero diferenciadas por color (anaglifos). Al observar el conjunto con lentes que filtren los colores se logra que cada ojo vea únicamente la imagen que le corresponde y el cerebro del observador se encarga de combinar la información.



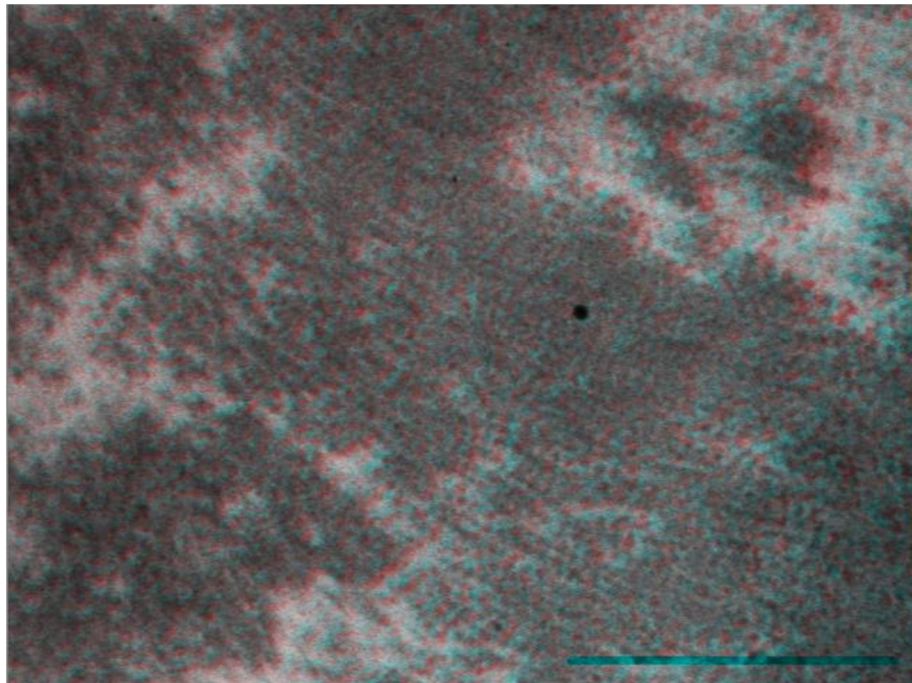


Figura 25. Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 21. Imágenes tomadas a 60,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

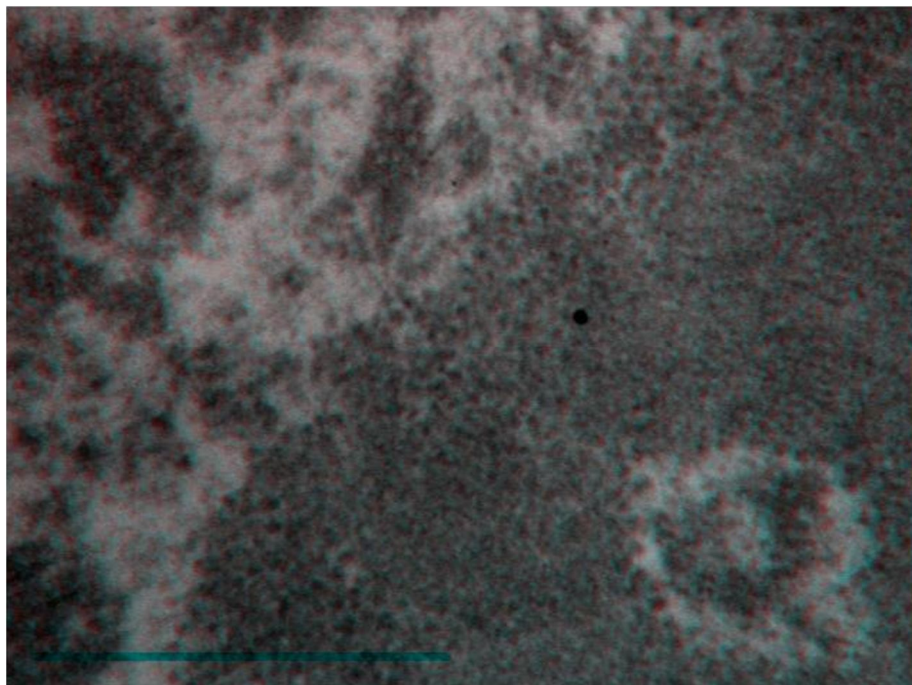


Figura 26. Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 22. Imágenes tomadas a 80,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

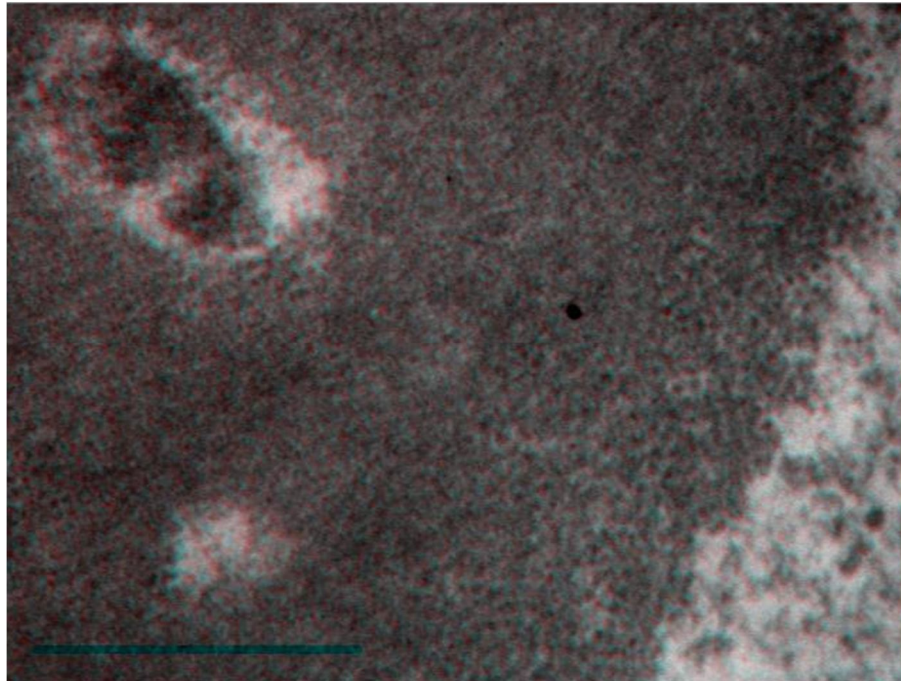


Figura 27. Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 23. Imágenes tomadas a 60,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

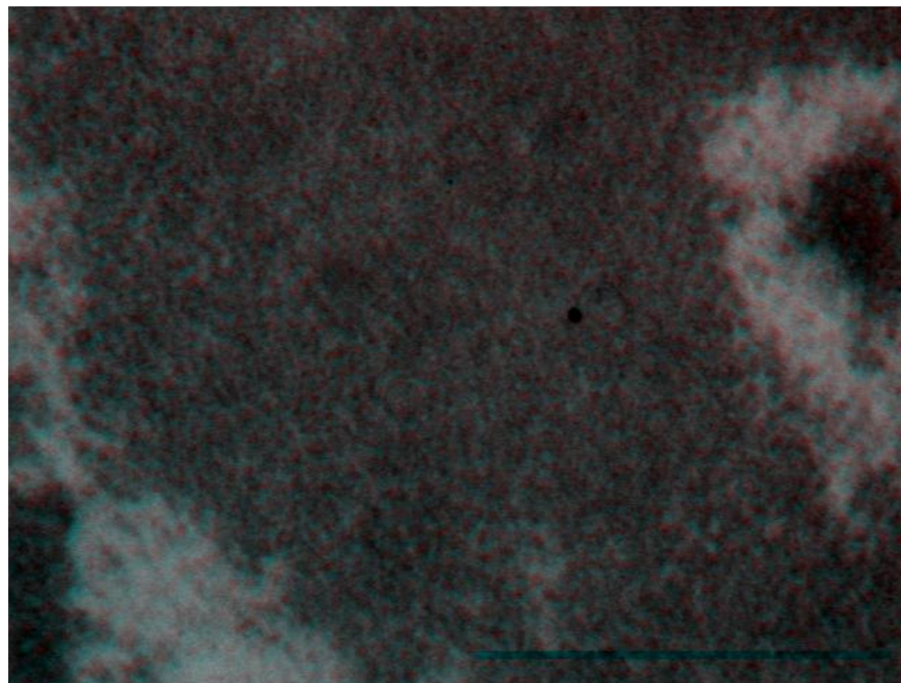


Figura 28. Anaglifo formado a partir de las imágenes en la figura 23. Imágenes tomadas a 80,000 aumentos. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

### 3 Microscopía de fuerza atómica

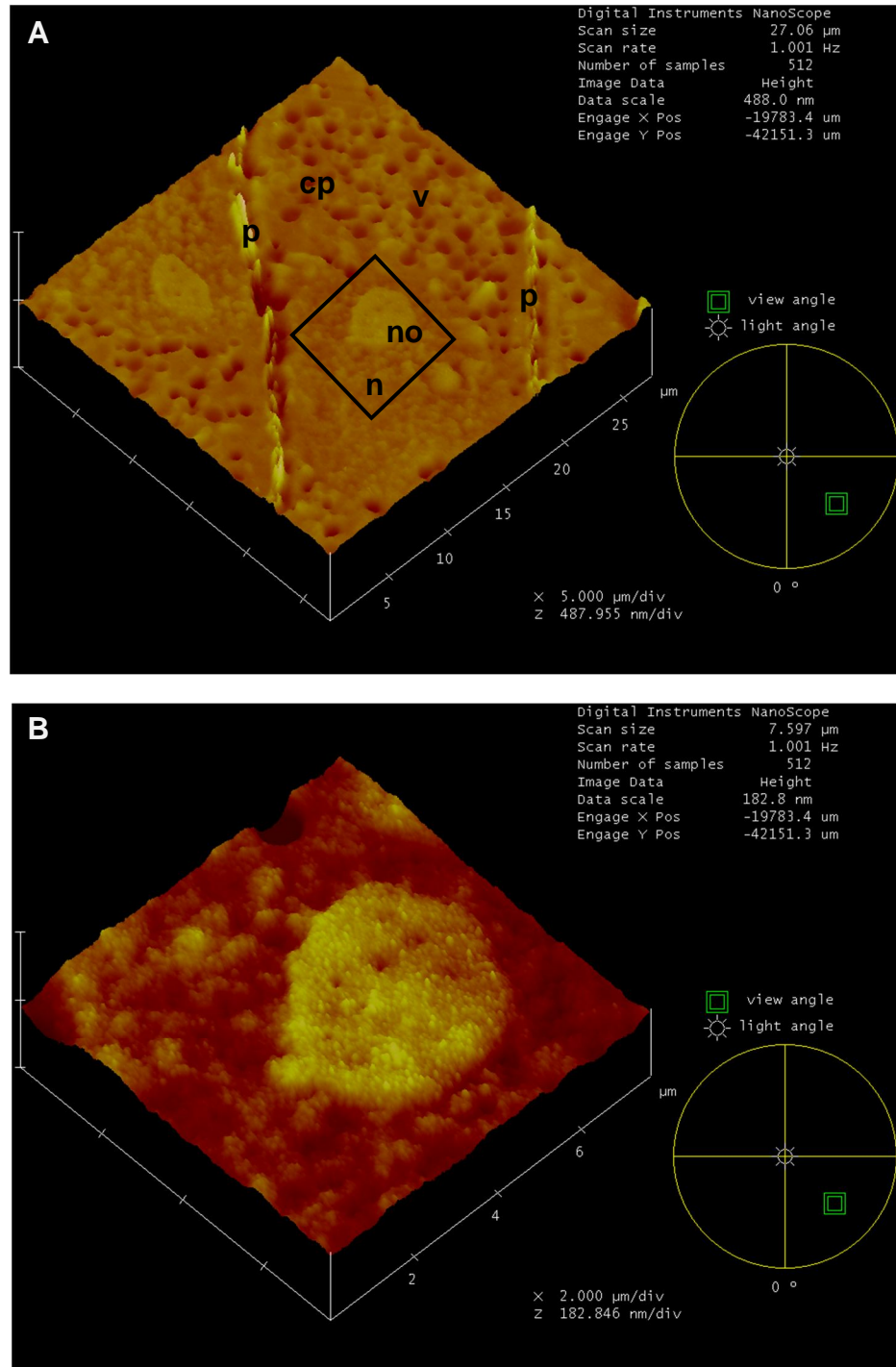


Figura 29. A) Micrografía de fuerza atómica de una célula interfásica de *Allium cepa*. Es posible distinguir las siguientes estructuras: citoplasma (cp), núcleo (n), nucleolo (no), pared celular (p) y vacuolas (v). B) Acercamiento del nucleolo en A. en ella se aprecia la estructura heterogénea de este organelo.

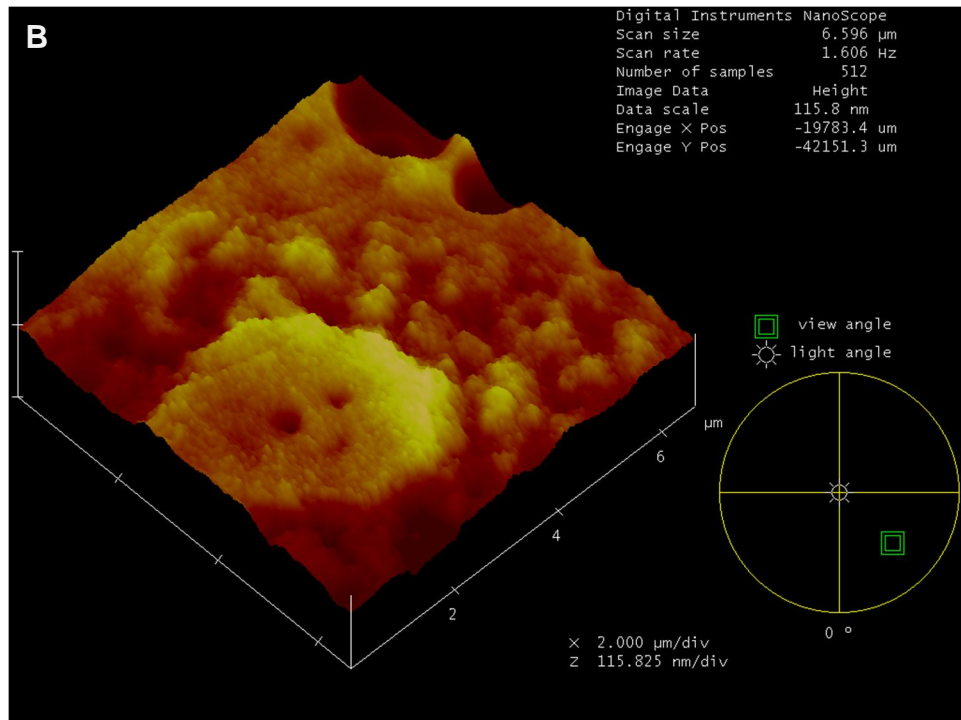
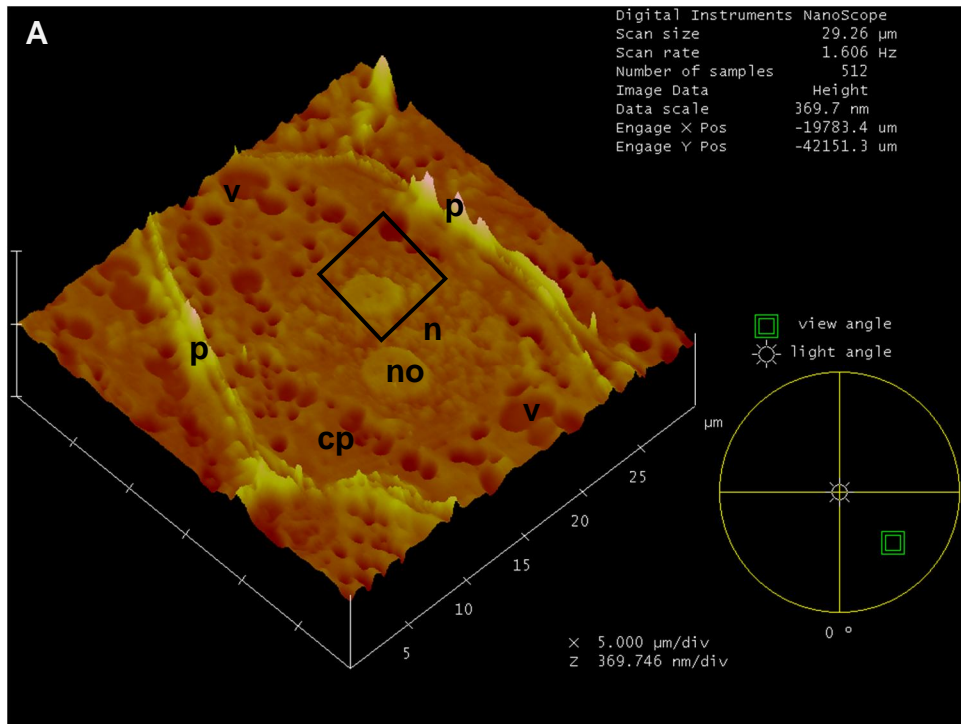


Figura 30. A) Micrografía de fuerza atómica de una célula interfásica de *Allium cepa*. Las siguientes estructuras son visibles: citoplasma (cp), núcleo (n), nucleolo (no), pared celular (p) y vacuolas (v). B) Acercamiento del nucleolo en A con una evidente la estructura heterogénea.

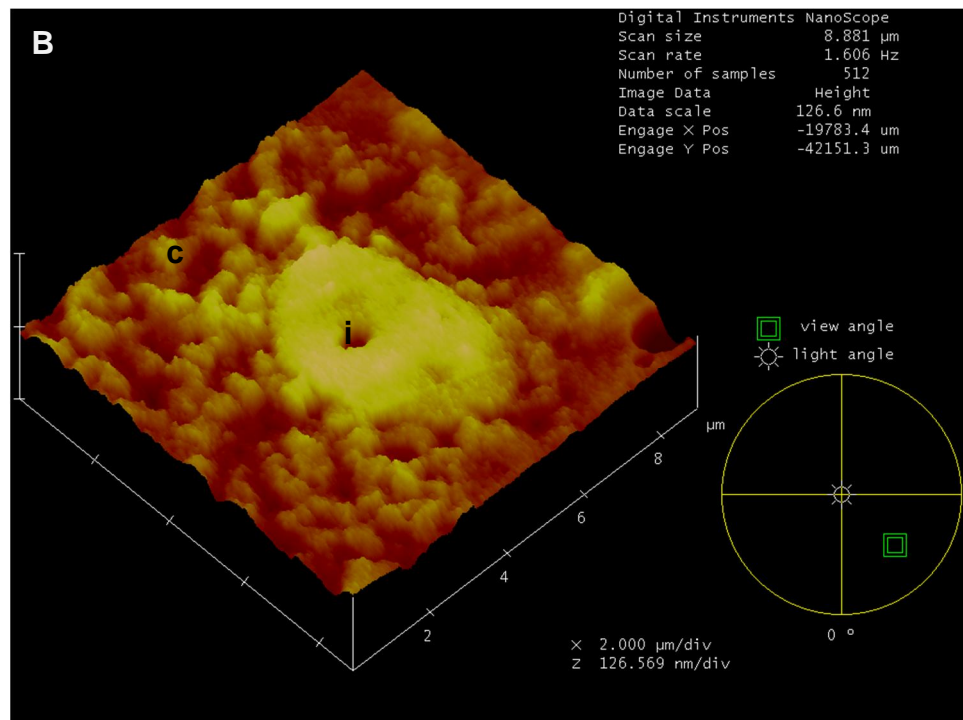
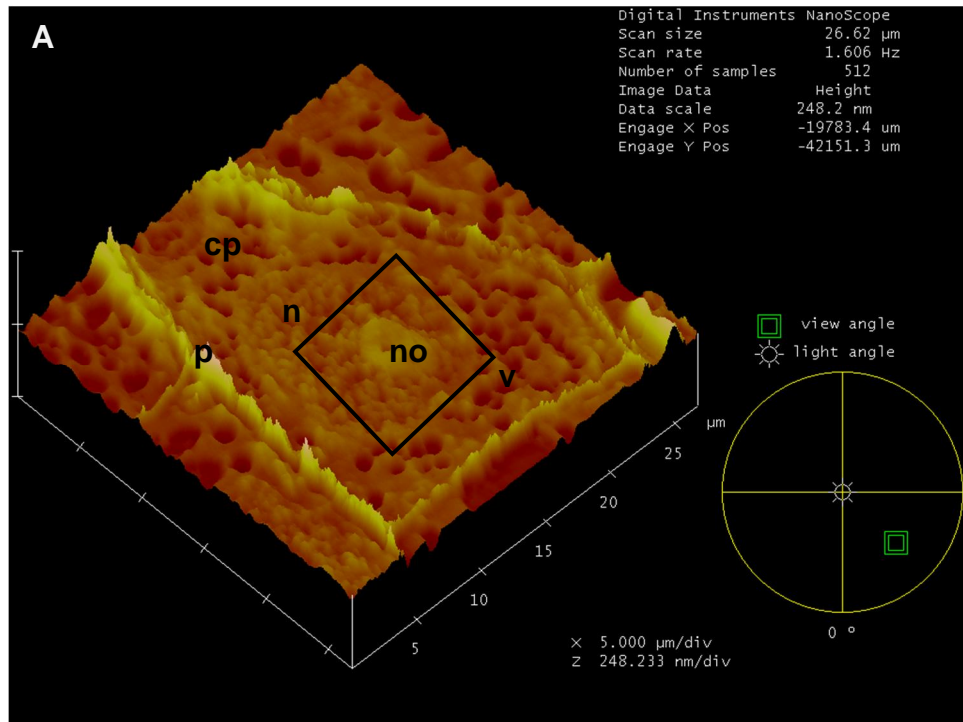


Figura 31. A) Micrografía de fuerza atómica de una célula interfásica de *Allium cepa*. Es posible distinguir las siguientes estructuras: citoplasma (cp), núcleo (n), nucleolo (no), pared celular (p) y vacuolas (v). B) Acercamiento del nucleolo en A. en ella se aprecian la cromatina condensada (c) y un prominente intersticio (i).

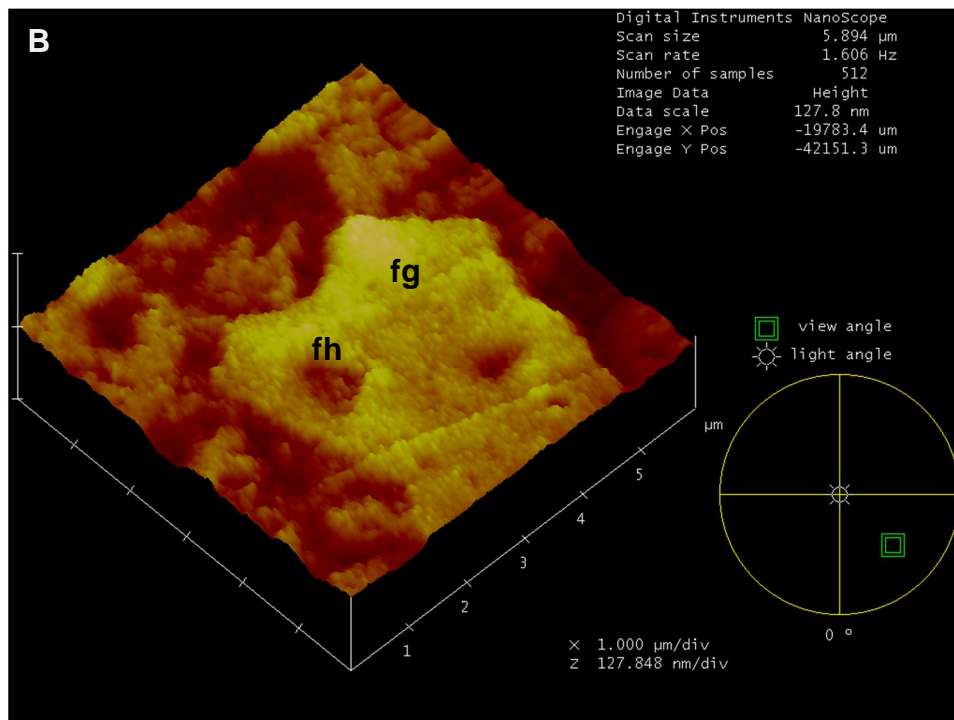
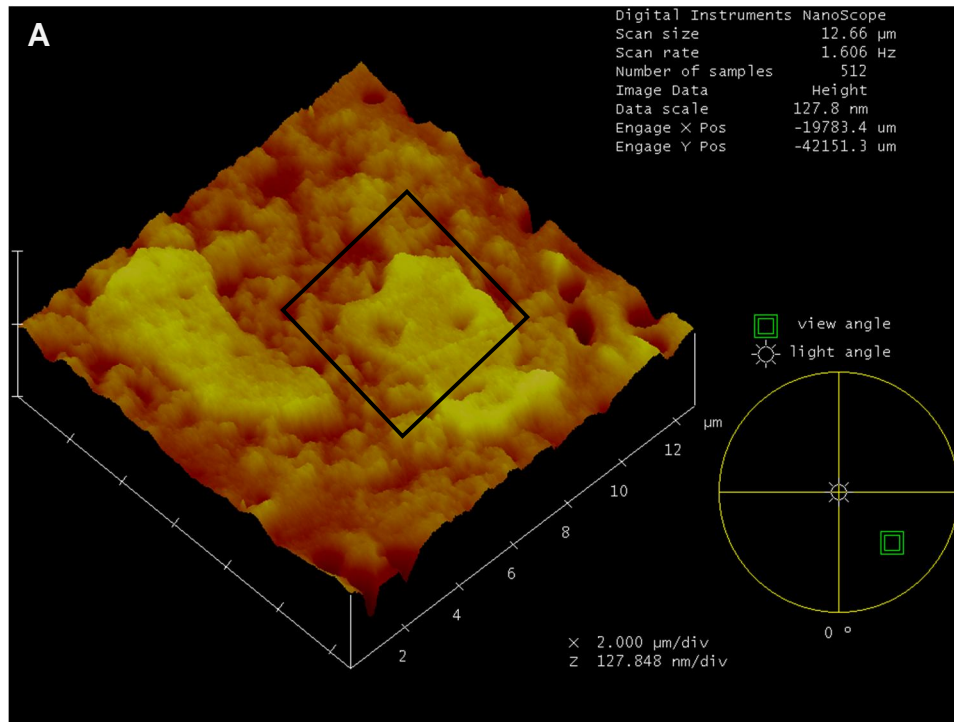


Figura 32. A) Micrografía de fuerza atómica de un núcleo de una célula interfásica de *Allium cepa*. Se observan dos nucleólos con estructura heterogénea. B) Acercamiento de uno de los nucleólos en A. En él se aprecian una estructura similar a un centro fibrilar heterogéneo (fh) y componente fibrogranular (fg).

## DISCUSIÓN

Las observaciones hechas mediante el microscopio óptico permitieron evaluar la calidad del procesamiento del material biológico antes de continuar con el procedimiento. En caso de no encontrarse alteraciones en el tejido, el microscopio óptico se empleó para seleccionar las áreas que posteriormente serían analizadas con los microscopios de mayor resolución.

A continuación, la preservación del material biológico fue evaluada con mayor detalle en el microscopio electrónico de transmisión. Se tomaron en cuenta la integridad de los organelos y la ausencia de precipitados como evidencias de un correcto manejo de las muestras.

La identificación de los componentes del nucleolo en las micrografías electrónicas sirvió para validar la técnica y además para proveer de puntos de comparación a lo observado en las imágenes obtenidas mediante el microscopio de fuerza atómica. En el presente trabajo los tres componentes del nucleolo (centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular) pudieron ser identificados con facilidad en las micrografías electrónicas (Figuras 18-20).

Los centros fibrilares aparecen en las micrografías electrónicas como zonas claras, siendo el resultado de las limitadas interacciones de los electrones del haz con esta parte de la muestra. Estas estructuras presentan en su interior material de mayor densidad a los electrones lo cual permite clasificarlos como centros fibrilares heterogéneos.

El componente fibrilar denso, como su nombre lo indica, se manifiesta como una estructura compacta cuya densidad no permite el libre paso de los electrones del haz.

El componente granular está presente principalmente en la periferia del nucleolo. El estudio de su conformación se ve facilitado con las técnicas de observación en

tercera dimensión. La formación de estereopares o anáglifos permite discernir en que plano se encuentran los gránulos e incluso distinguir gránulos independientes que por la superposición de estructuras pueden aparecer como uno solo en las imágenes bidimensionales.

La observación de los cortes de material biológico mediante el microscopio de fuerza atómica demuestra que éstos no tienen una superficie completamente lisa. Las estructuras celulares que presentan mayor resistencia al corte, como la pared celular, aparecen en planos superiores a las estructuras con menor resistencia como es el caso de las vacuolas. Esta diferencia en el eje z permite diferenciar diversos organelos de la célula.

En el caso del nucleolo resulta evidente la heterogeneidad de su estructura (Figuras 29 y 30). Existe una diferencia en el relieve que es resultado de la dureza diferencial que poseen los componentes que forman el nucleolo.

En las micrografías de fuerza atómica es posible distinguir dos componentes en la estructura del nucleolo. Por un lado estructuras similares a centros fibrilares que en ocasiones presentan material en su interior de manera semejante a los centros fibrilares heterogéneos identificados en microscopía electrónica. Rodeando estas estructuras se encuentra un componente fibrogranular (Figura 32). La resolución obtenida no permite hacer una clara distinción entre el componente fibrilar denso y el componente granular.

Los intersticios son espacios presentes dentro de algunos nucléolos que se pueden identificar por su gran tamaño, forma esférica, y ausencia de estructuras en su interior. Al observarlos mediante el microscopio de fuerza atómica resultan particularmente notorios porque además de presentar las características anteriores se distinguen por tener una mayor profundidad respecto al plano del corte que las estructuras que componen al nucleolo (Figura 31).

Los principios de la microscopía de fuerza atómica permiten hacer observaciones en tiempo real de muestras móviles. Además, los tratamientos que se deben aplicar



al material biológico no son tan drásticos como en el caso de la microscopía electrónica. En un futuro estas ventajas podrían permitir estudiar el nucleolo, su estructura, organización y dinamismo en condiciones más cercanas a las fisiológicas.

## CONCLUSIÓN

El nucleolo de células interfásicas de raíz de cebolla (*Allium cepa*) observado mediante el microscopio de fuerza atómica presenta una estructura heterogénea. Con su uso es posible diferenciar dos de los componentes que lo forman.

## FUENTES

**Alberts**, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **2008**. Molecular Biology of the Cell. Quinta Edición. 362-365.

**Bassy**, O., Jiménez-García, L. F., Echeverría, O. M., Vázquez-Nin, G. H., Moreno Díaz de la Espina, S. **2000**. High resolution detection of rRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by in situ hybridization. Biology of the Cell. Vol 92: 59-70.

**Binning**, G., Quate, C. F., Gerber, Ch. **1986**. Atomic force microscope. Physical Review Letters. Vol 56: 930-933.

**Binning**, G., Rohrer, H., Gerber, Ch., Weibel, E. **1982**. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. Physical Review Letters. Vol 49: 57-61.

**Birdi**, K. S. **2003**. Scanning Probe Microscopes Applications in Science and Technology. CRC Press. Pp. 9-37.

**Bittar**, E. E. **1995**. Cellular Organelles. Elsevier. 73-92.

**Bozzola**, J. J. y Russell, L. D. **1999**. Electron Microscopy. Jones and Bartlett Publishers. Segunda edición. 149-201.

**Braga**, P. C. y Ricci, D. **2004**. Atomic Force Microscopy Biomedical Methods and Applications. Humana Press. Pp. 3-37.

**Cohen**, S. H., Bray, M. T., Lightbody M. L. **1994**. Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy. Plenum Press. Pp. 321-325.

**Eaton**, P. y West P. **2010**. Atomic Force Microscopy. Oxford University Press. Pp. 9-25.

**Flegler**, S. T., Heckman, J. W., Klomparens, K. L. **1993**. Oxford University Press. 13-63.

**Gonzalez-Santander**, R. **1968**. Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. Aguilar. Pp. 29-43, 193-213, 507-515.

**Griffin**, R. L. **1990**. Using the Transmission Electron Microscope in the Biological Sciences. Ellis Horwood. 80-87.

**Hayat, M. A. 1986.** Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy. Academic Press Inc. 5-22, 126-155.

**Hernández-Verdun, P. 2006.** The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. Histochemistry and Cell Biology. Vol 126: 135-148.

**Jena, B. P. y Hörber, H. 2002.** Atomic Force Microscopy in Cell Biology. Academic Press. Pp. 51-90.

**Jiménez-García, L. F., Merchant, H. 2003.** Biología Celular y Molecular. Pearson Educación. 378-381.

**José-Yacamán, M. y Reyes-Gasga, J. 1995.** Microscopía Electrónica Una Visión del Microcosmos. Fondo de Cultura Económica. 17-21.

**Lewin, B., Cassimeris, L., Lingappa, V. R., Plopper, G. 2007.** Cells. Jones and Bartlett Publishers. 210-212, 235-236.

**Lodish, H., Beck, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. 2008.** Molecular Cell Biology. Sexta Edición. W. H. Freeman and Company. 358-363.

**Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P. 1999.** Atomic Force Microscopy for Biologists. Imperial College Press. Pp. 5-32.

**Pollard, T. D., Earnshaw, W. C. 2008.** Cell Biology. Elsevier. Segunda Edición. 232-236.

**Reimer, L. 1997.** Transmission Electron Microscopy Physics of Image Formation and Microanalysis. Springer. Cuarta edición. 79-91, 143-177.

**Risueño, M. C., Medina, F. J., Moreno Díaz de la Espina, S. 1982.** Nucleolar Fibrillar Centres in Plant Meristematic Cells: Ultrastructure, Cytochemistry, and Autoradiography. Journal of Cell Science. Vol. 58: 313-329.

**Shaw, P., Doonan, J., 2005.** The Nucleolus. Playing by Different Rules? Cell Cycle Vol 4.1: 102-105.

**Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., Hernández-Verdun, D. 2008.** Nucleolus: the fascinating nuclear body. Histochemistry and Cell Biology. Vol 129: 13-31.

**Sjöstrand, F. S. 1967.** Electron Microscopy of Cells and Tissues. Volume 1: Instrumentation and Techniques. Academic Press. 93-125, 138-186.

**Spector**, D. L., Goldman, R. D., Leinward L. A. **1998**. Cells a Laboratory Manual. Volume 3: Subcellular Localizaton of Genes and Their Products. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 120-121.

**Vázquez Nin**, G. H. y Echeverría, O. **2000**. Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica. 13-91.

**Watt**, I. M. **1985**. The Principles and Practice of Electron Microscopy. Cambridge University Press. 6-31.

**Wischnitzer**, S. **1981**. Introduction to Electron Microscopy. Pergamon Press. Tercera edición. 1-87.