

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 eucariontes, 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 tiñeron 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 acetorceína, 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, MTT) 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 acetorceína. 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 acetorceína, 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.

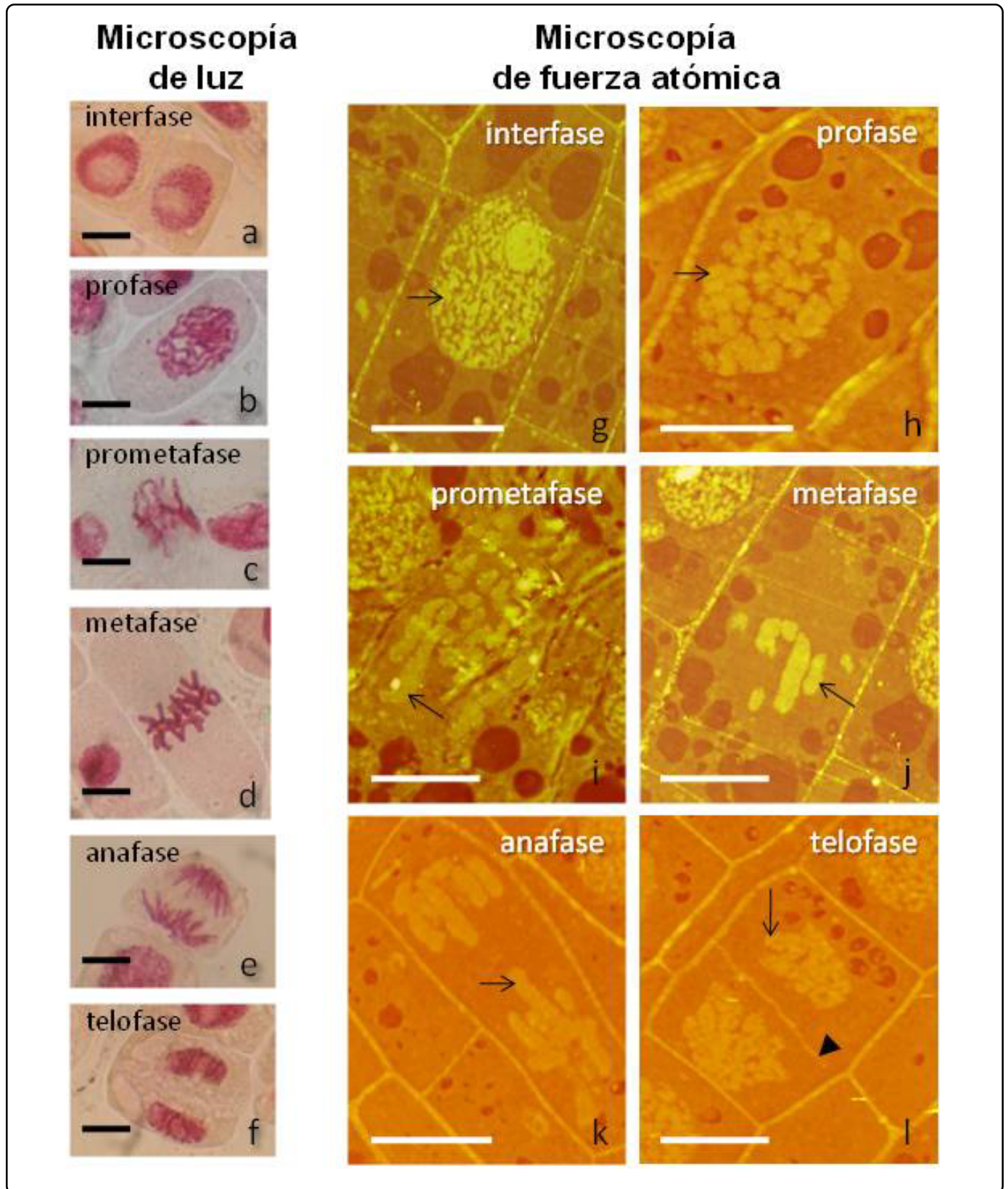


Figura 1. Micrografías de luz (a-f) y de fuerza atómica (g-l) de células en interfase (a, g) y en diferentes fases de la mitosis (b-f, h-l) en meristemas radicales de cebolla (*Allium cepa* L.). La flecha en g señala a la cromatina y las flechas en h-l señalan a los cromosomas en las diferentes fases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

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 *Lacandonia schismatica*. 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.* Nucleologenesis: U3snRNA-containing pre-nucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 955-966 (1994).