

OBSERVACION DE LA MITOSIS EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZ DE CEBOLLA (*Allium cepa*) CON EL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

Cruz-Gómez, Sarai de Jesús^{a,*}; Segura-Valdez, María de Lourdes^{b,*};
Jiménez-García, Luis Felipe^{c,*}.

*Laboratorio de Nanobiología Celular, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., México.

^a Tesista, Licenciatura en Biología, ^b Doctora, Profesor de Asignatura Ordinario B, Profesor Ordinario de Carrera Titular A T.C., ^c Doctor, Profesor de Asignatura Ordinario B, Profesor Ordinario de Carrera Titular C T.C.,
Teléfono: (55) 5622-5396 sarichuy@yahoo.com.mx

Introducción

Para la comprensión del sustrato celular de la herencia, es preciso analizar los mecanismos reguladores de eventos bioquímicos secuenciales y continuos en la célula [1]. 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.

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 [2]. 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; en los resultados de este trabajo se muestran imágenes obtenidas *in situ* [3-5] con el Microscopio de Fuerza Atómica de células de raíz de cebolla en división celular.

En la elaboración de este trabajo principalmente se usó el Microscopio de Fuerza Atómica [6], 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 [7]. En el AFM una aguja “barre” el relieve de la muestra y por medio de un programa de cómputo lo transforma en una observación que puede ser interpretada como una imagen en tercera dimensión. La muestra referida es un corte muy delgado (0.2 μm) de la punta de una raíz de cebolla que fue procesada con la técnica convencional de microscopía electrónica [8].

Objetivo

Observar y reconocer estructuras celulares correspondientes a las etapas de la mitosis en células meristemáticas de la raíz de cebolla (*Allium cepa*) con el microscopio de fuerza atómica.

Analizar si el microscopio de fuerza atómica permite resolver estructuras celulares involucradas en la expresión fenotípica de la división celular.

Metodología

Se utilizaron meristemos de raíces de cebolla obtenidos a partir de crecimiento de cebollas en agua, durante 3 a 4 días, a temperatura ambiente [9]. Las muestras se procesaron de acuerdo con técnicas estándar para microscopía electrónica, 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 marca Leica, modelo Ultracut. 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. 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 y zapping 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 [10].

Resultados

Los resultados muestran diferentes figuras mitóticas a partir de cortes de material biológico incluido en epon, muy similares a lo observado previamente en otros trabajos [11] y otros tipos de microscopios. Los criterios utilizados para definir las etapas de la mitosis fueron la compactación del material genético, su arreglo, organización y distribución a través de la célula, la presencia de la pared celular, presencia o ausencia de nucleolos.

La rotación de las imágenes y la proyección en tercera dimensión evidencian en el eje Z, las variaciones en la topografía de la muestra. El relieve muestra la textura de los elementos celulares, en donde resaltan de manera notable el nucleolo y los cromosomas.

Conclusiones

Las imágenes demuestran que las células observadas se encuentran en mitosis. Los resultados abren la posibilidad de analizar la mitosis con la resolución propia del microscopio de fuerza atómica.

Bibliografía

- [1] Alberts, B. *et al. Molecular Biology of The Cell*, 4ª ed. Garland Sciences. Nueva York. (2002).
- [2] López-Sáez, J.F., *et al.* Duration of the cell division cycle and its dependence on temperatura. *Z. Zellforsch.* 75 (1966) 591-600.
- [3] Lamond, A.I. & Earnshaw, W.C. Structure and function in the nucleus. *Science* 280 (1998) 547-553.
- [4] Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M.L., 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 (2004)191-199. Humana Press. New Jersey, USA.
- [5] Jiménez-García L.F., *et al.* 1998, Biología celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por Microscopía Electrónica y de Fuerza Atómica, *Bol. Soc. Bot.*, México 62: 5-14.
- [6] Binnig G., Quate C.F., Gerber C., Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters* 56 (1986) 930-933.

- [7] Binnig G., Rohrer H., In touch with atoms. *Reviews of Modern Physics*. 71:2 (1999) 324-330.
- [8] Spector, D.L., Goldman, R.D. & Leinwand, L.A. *Cells: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998).
- [9] Giménez-Martín, G., et al. 1965. A new method of labelling cells. *J. Cell Biol.* 26:305-309.
- [10] Segura- Valdez, M.L., *et al.*, 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 (2006) 30-33.
- [11] Jiménez-García, L.F. & Fragoso-Soriano, R.J. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* 129, (2000) 218-222.