

ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES OBTENIDAS CON EL MICROCOPPIO ELECTRONICO

J.A.Subirana, S.Muñoz-Guerra, A.B.Martínez e I.Fita

Cátedra de Tecnologías Químicas Especiales
Escuela T.S.de Ingenieros Industriales de Barcelona

Resumen. Se describe la metodología utilizada en el tratamiento digital de fotografías de fibras de cromatina obtenidas con la ayuda del microscopio electrónico. El método consiste básicamente en un filtrado de paso bajo y otro complementario de paso alto, que ponen claramente de manifiesto la estructura en "superbeads" de las fibras de cromatina.

INTRODUCCION

La microscopía electrónica ha permitido determinar la ultraestructura de numerosos componentes de la célula. Sin embargo, la organización molecular de los cromosomas no ha podido determinarse, pues éstos aparecen como un conjunto desordenado de fibras de 25-30 nm de diámetro. Recientemente se ha demostrado que estas fibras están constituidas por unas subunidades denominadas nucleosomas. Los nucleosomas están constituidos por un núcleo proteico rodeado por ADN. El conjunto se asemeja a un cilindro de 11nm de diámetro y 6nm de altura. Uno de los objetivos actuales de la Biología Molecular es precisamente determinar cómo se organizan estos nucleosomas para dar lugar a las fibras de 25-30nm. Existen dos modelos de organización. El modelo más simple es el denominado solenoidal, según el cual (Finch y Klug, 1976) los nucleosomas se organizan en forma de hélice para dar lugar a las fibras de 25-30nm de diámetro. Un modelo más complejo, para el que existe alguna evidencia, supone que grupos de 15 a 20 nucleosomas se organizan en unidades de orden superior que se han denominado "superbeads" (Meyer y Renz, 1979).

El objetivo de este trabajo es analizar las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de cromatina de esperma de Holothuria tubulosa, que es un material idóneo por poseer una cromatina con unas fibras de 25-30nm de gran regularidad.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizó cromatina de Holothuria tubulosa que se incluyó en un material plástico. La inclusión se seccionó en un microtomo y los cortes así obtenidos se tiñeron con acetato de uranilo y se fotografiaron a unos 20,000 aumentos en el Microscopio Electrónico. Las fotografías así obtenidas se digitalizaron en un aparato Optronics. Zonas seleccionadas se sometieron a un proceso de filtrado y se representaron gráficamente con la ayuda del ordenador PDP del Centro de Cálculo de la U.P.B. El proceso de filtrado (filtro de paso bajo) consistía en promediar el valor de la densidad óptica de varios elementos ("pixels") de la fotografía y representar su valor medio en el centro de la zona promediada. La diferencia entre la fotografía original y la filtrada se obtenía también, denominándose filtro de paso alto.

RESULTADOS

Se analizaron por el método descrito unas cuarenta fibras obtenidas por distintos tratamientos de los núcleos de partida e inclusión en cuatro tipos de plástico distintos. En todos los casos se obtuvieron análogos resultados, mostrándose un ejemplo en la figura 1. En ella puede verse que el filtro de paso bajo resalta claramente unas subunidades a lo largo de la fibra de cromatina de 30 a 35nm de longitud. Esto indica claramente que existe una periodicidad de organización a lo largo de las fibras de cromatina que es compatible con el modelo citado más arriba de las "superbeads". Por otra parte el filtro de paso alto muestra la presencia de zonas claramente diferenciadas cuyo tamaño podría corresponder a los nucleosomas que constituyen las fibras de cromatina. La proyección sobre el eje de la fibra muestra la existencia de una periodicidad de 10-13nm en el filtro de paso alto, que puede indicar el tipo de ordenación de los nucleosomas en la fibra de cromatina.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran claramente que las fibras de cromatina tienen una periodicidad de 30-35nm, indicando que los nucleosomas se organizan en grupos de 20 aproximadamente para dar lugar a "superbeads". Estas estructuras podrían estar formadas por nucleosomas organizados en hélice, con una distorsión regular cada 3 ó 3,5 vueltas.

Desde un punto de vista técnico, nuestros estudios muestran que el proceso de filtrado permite obtener información adecuada sobre la estructura de muestras biológicas estudiadas por Microscopía Electrónica.

Para proseguir este estudio es preciso determinar si las estructuras observadas en el filtro de paso alto corresponden realmente a nucleosomas. Por otro lado estamos tratando de obtener información en tres dimensiones a partir de las imágenes bidimensionales disponibles.

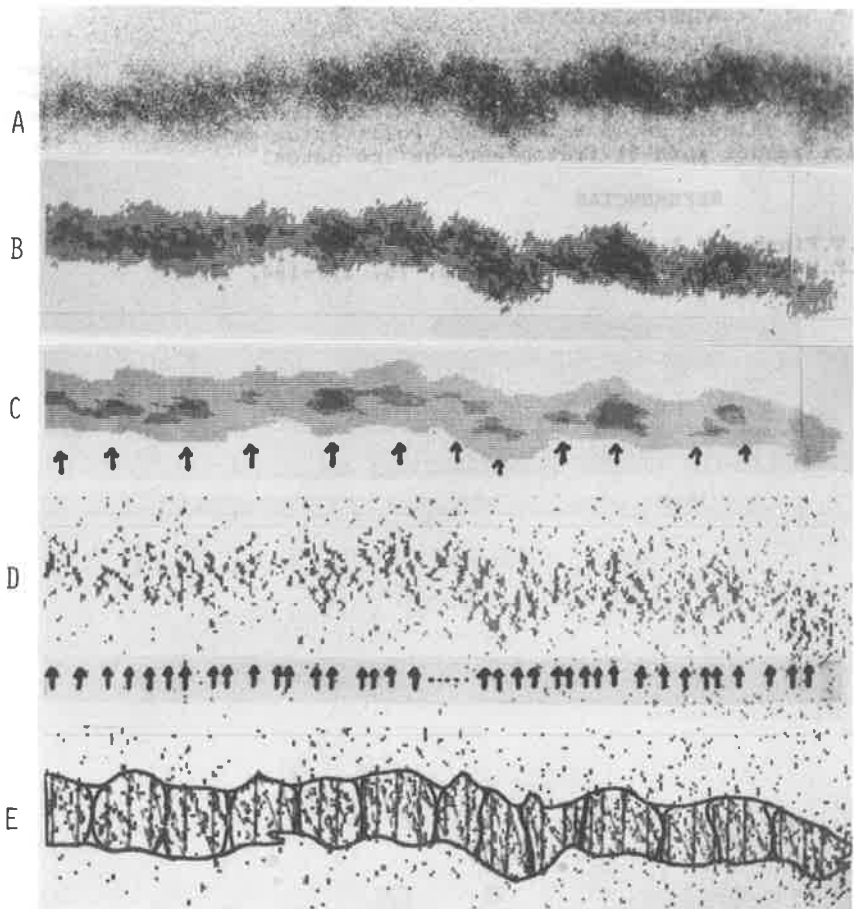


Figura 1

- A) Fotografía de una fibra de cromatina
- B) Digitalización de la fotografía A.
- C) Filtro de paso bajo, en el que se indican las periodicidades existentes por sendas flechas. El tamaño de la ventana de filtración fué de 9×1 "pixels"
- D) Filtro de paso alto. Las flechas indican la posición de máximos en la proyección sobre el eje de la fibra
- E) Modelo ilustrando una posible trayectoria de los nucleosomas en la fibra de cromatina.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Carrascosa del Instituto de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid su amabilidad al digitalizar las fotografías usadas en este estudio, así como al Centro de Cálculo de la Universidad Politécnica de Barcelona las facilidades para el tratamiento de los datos.

REFERENCIAS

- J.T.Finch and A.Klug, Proc.Nat.Acad.Sci. 73, 1897-1901, 1976
G.F.Meyer and M.Renz, Chromosoma, 75, 177-184, 1979

