

## Ultraestructura del núcleo mitótico en *Leishmania mexicana* ssp. Reconstrucción tridimensional del huso mitótico y placas densas

Francisco Ureña

Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica

(Recibido el 26 de febrero de 1987)

**Abstract:** The ultrastructure of mitotic nuclei of the promastigote *Leishmania mexicana* ssp. was studied by serial thin sections and three-dimensional reconstructions of each divisional stage. At the beginning of nuclear division (equatorial stage), a set of six dense plaques located about the equatorial region of the nucleus and a microtubular spindle develops in the two opposing poles of the nucleus (two sets of polar microtubules). The microtubular mitotic spindle is entirely intranuclear with the nuclear membrane persisting through mitosis. The polar spindle consists of a discrete bundle of about 50 microtubules and the equatorial spindle is formed by about 100 microtubules. The spindle may contain several continuous microtubules, but no microtubular organizing centres were observed in association with the spindle. The plaques and hemiplaques are associated with microtubular bundles; some of the spindle microtubules converge on kinetochore-like plaques. It is suggested that the spindle has a special significance in the physiology of mitosis. The two sets of hemiplaques may guide the separation of the daughter genomes. At the beginning of the elongational stage the mitotic plaques split into halves and each set of half-plaques migrates to one pole. It is concluded that the dense plaques play a kinetochore-like role and thus *Leishmania mexicana* ssp. may have six chromosomal units. Mitotic events of this species are essentially similar to those of *Trypanosoma cruzi*.

En los organismos inferiores la división del núcleo (Mitosis y Meiosis) reviste modalidades diversas y en general ésta se efectúa de una manera muy diferente del modelo clásico de división mitótica de las células de los metazoos. Numerosos trabajos sobre muy diversos aspectos de los mecanismos básicos de la división nuclear en organismos inferiores, han sido publicados en los últimos años (Vickerman y Preston 1970; Fuller 1976; Wells 1977; Heath 1978, 1980; Dodge 1973; Hollande 1972, 1974; Kubai 1975; Pickett-Heaps 1969, 1974, 1975; Heywood y Magee 1976; Bary y Vickerman 1979; Solari 1980a, b, 1982, 1983; Solari y De Souza 1983). En el grupo de protozoos que presenta un tipo particular de división nuclear tenemos a los flagelados y entre ellos al género *Leishmania*, que carece del aparato mitótico clásico (huso, asteres y centriolos), a la vez que se desconoce el mecanismo de segregación de genomas, que dota a las células hijas de un equipo génico

completo. Chakraborty *et al.* (1962) y Chakraborty y Das Gupta (1962), demostraron que *Leishmania donovani* se reproduce por un proceso de endomitosis, en el cual la membrana nuclear se encuentra presente durante todo el proceso de división, hasta completar la cariocinesis. Bianchi *et al.* (1969) localizan el huso mitótico endonuclear en *Leishmania tropica* en división y Croft (1979) en *Leishmania hertigi*. El comportamiento del huso dentro del núcleo, la presencia de cinetocoros, la existencia y número de placas densas y el mecanismo regular de distribución de la cromatina no han sido demostrados en este género.

En el presente trabajo, se describe la ultraestructura del núcleo, en su proceso evolutivo durante la mitosis y se hace la reconstrucción tridimensional del huso y placas densas, en el estado ecuatorial de la división, en una especie del complejo *Leishmania mexicana*.

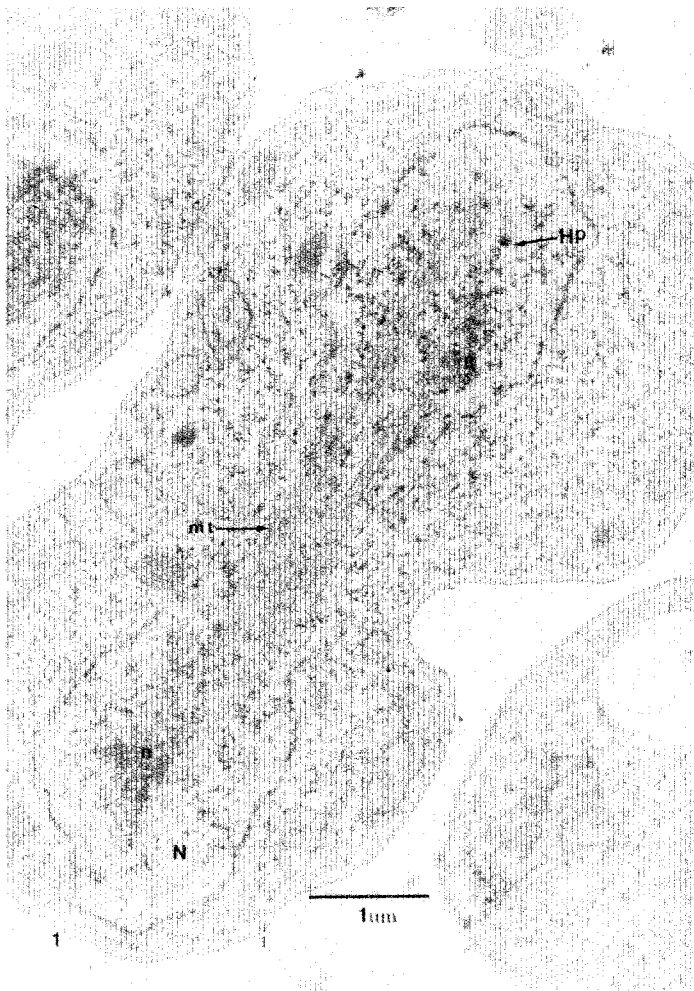


Fig. 1. Sección longitudinal de un núcleo mitótico en el estadio elongacional. Una hemiplaca ocupa la zona polar. N: Núcleo, n: nucleolo, mt: microtúbulos, Hp: hemiplacas. X25.000.

#### MATERIAL Y METODOS

**Cultivo de la cepa:** se usó *Leishmania mexicana* ssp. (F-5, cepa Sasardi Panamá 1235). Fue cultivada en un medio Senekije con 10% de sangre de conejo desfibrinada y lisada. Se incubó con agitación a 25°C hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico temprano. Las células fueron "cosechadas" y lavadas en solución salina amortiguadora (PBS) por centrifugación durante 10 minutos a 7.000 g.

**Microscopia Electrónica:** Las células fueron prefijadas durante la centrifugación (7.000g) por 10 minutos con glutaraldehído al 1.5% en

PBS. Luego fueron fijadas como sedimento a 22°C durante una hora con glutaraldehído al 3% y ácido tánico al 1% en cacodilato de sodio 0,1 M y pH 7,3. Las células se postfijaron a 4°C durante una hora en OsO<sub>4</sub> al 1% en cacodilato de sodio 0,1 M y pH 7,3. El sedimento fue deshidratado con etanol, incluido en resina Spurr, y cortado con navaja de diamante en secciones seriadas de colores plateado y gris con un ultramicrótomo Sorvall MT2, y recogidas en rejillas de un solo agujero cubiertas con membrana de colodión de acuerdo con el método descrito por Solari (1970). Las secciones fueron teñidas 25 minutos en acetato de uranilo al 1% en alcohol etílico de 50 grados y 20 minutos en citrato

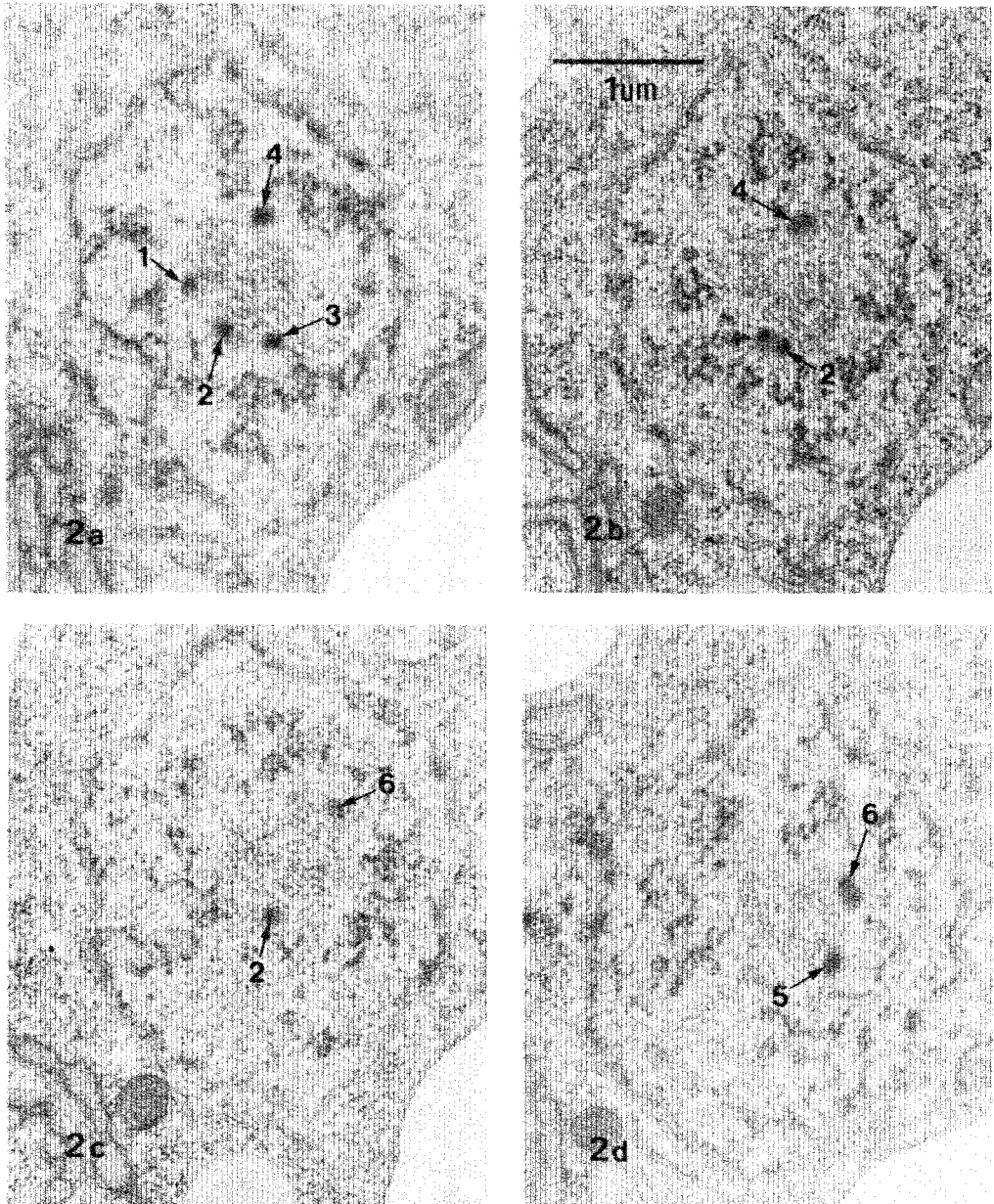


Fig. 2a-2d: Secciones seriadas finas, a través de un núcleo mitótico, en estadio ecuatorial. Las placas son numeradas de 1 a 6. X20.000.

de plomo. Las micrografías electrónicas fueron tomadas en series a magnificación constante. La reconstrucción tridimensional fue hecha con base en dibujos de la membrana nuclear, las placas densas, y otras estructuras celulares, en láminas plásticas transparentes, de acuerdo con el método descrito por Solari (1970). Para la descripción ultraestructural de los diferentes

estados de la división, se usó la nomenclatura utilizada por Solari (1980), para el género *Trypanosoma*.

## RESULTADOS

**Estadio preliminar:** Los núcleos interfásicos se caracterizan por ser redondos, con pequeñas

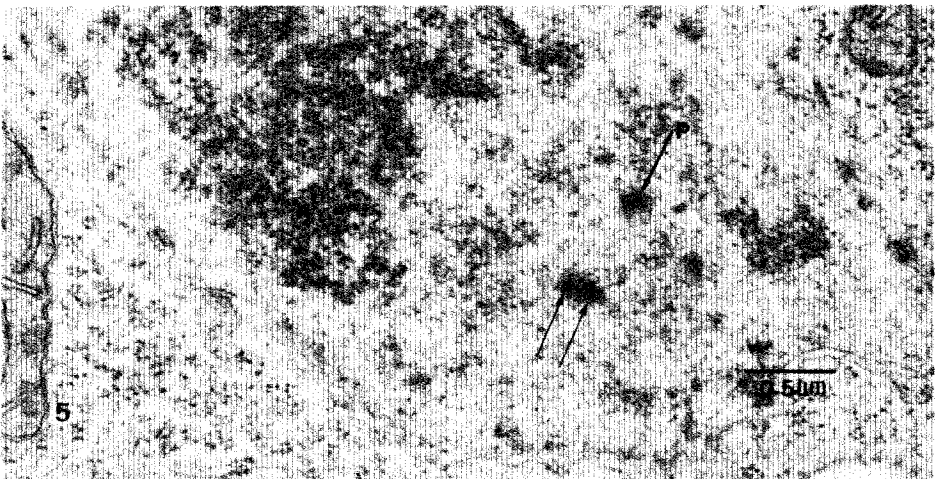
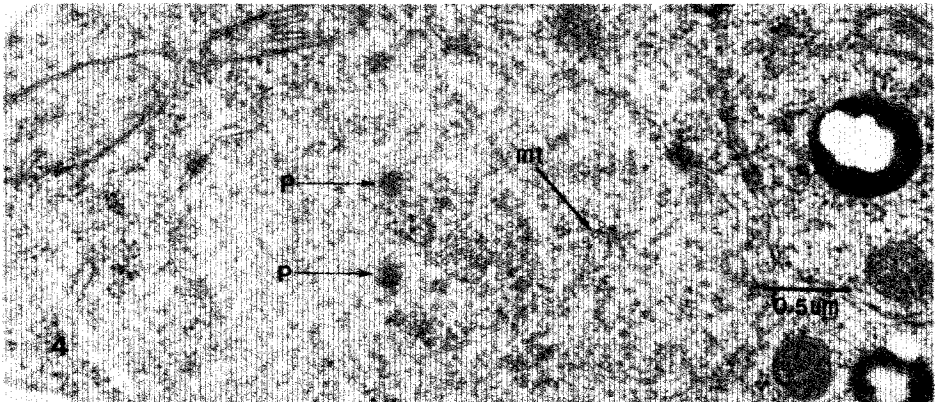
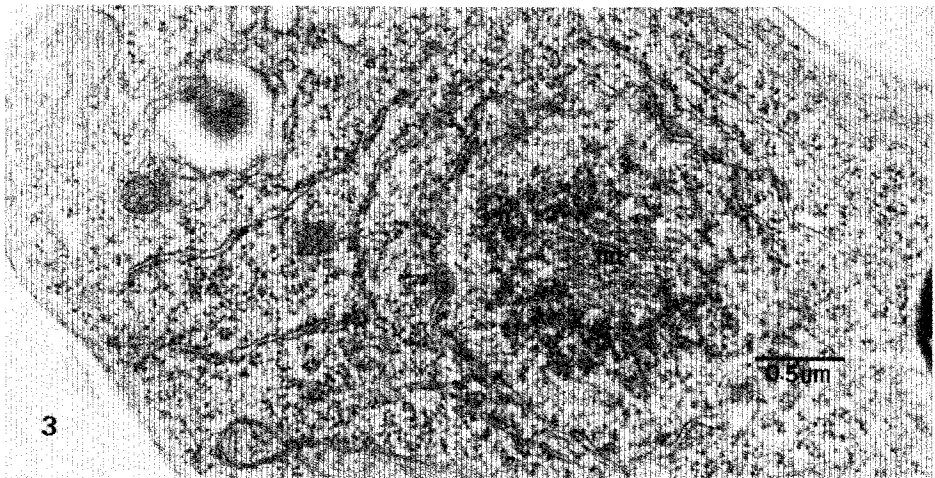


Fig. 3. Sección transversal de un núcleo mitótico. El haz de microtúbulos se observa ocupando una zona central y rodeado por material nucleolar. n: nucleolo, mt: microtúbulos. X30.000.

Fig. 4. Sección transversal de un núcleo mitótico. P: placas, mt: microtúbulos. X36.000.

Fig. 5. Sección de un núcleo mitótico iniciando el estadio elongacional. La doble flecha señala una placa dividiéndose en hemiplaques. P: placa densa, n: nucleolo. X.36.000.

masas densas de cromatina localizadas principalmente en contacto con la membrana nuclear. El resto de la cromatina es homogénea. Un nucléolo grande de forma esférica, formado principalmente por un material granular de gran densidad electrónica, ocupa generalmente una zona central en el interior del núcleo. Al inicio del proceso de la división celular el núcleo sufre cambios en su morfología: su forma redonda se mantiene, pero las masas densas de cromatina disminuyen de tamaño y densidad electrónica. La cromatina se torna más homogénea y su densidad electrónica es similar a la del citoplasma. El nucléolo aumenta de tamaño, sus gránulos van perdiendo densidad electrónica, pero siempre ésta es mayor que la de la cromatina. La envoltura nuclear permanece intacta y no se localizan en el nivel ultraestructural los microtúbulos del huso.

**Estadio ecuatorial:** Cuando las restantes zonas de heterocromatina se descondensan, queda un núcleo grande, aproximadamente esférico, con una cromatina muy homogénea, característico de una célula en estado muy temprano de la división. Al inicio de este estado, se hacen visibles 6 pequeños cuerpos (placas densas) de gran densidad electrónica en la zona ecuatorial del núcleo, y un huso mitótico formado por microtúbulos muy finos (200 Å). (En *L. donovani* también sucede lo mismo, observación sin publicar). Las placas tienen un diámetro mayor y uno menor; el mayor señala la dirección de los polos nucleares, y éste es paralelo a los microtúbulos del huso; su longitud promedio es de 1800 Å. El diámetro menor tiene una longitud promedio de 900 Å (Figs. 2a-2d, 3, 4). El huso mitótico está formado por dos grupos de microtúbulos muy finos (200 Å), que se inician en los polos nucleares, en una zona cercana a la membrana nuclear interna, y corren al ecuador del núcleo. El número de microtúbulos contados en secciones transversales polares es de 40 a 48 y en la zona de superposición en el ecuador celular es 71 a 120; estos números son aproximados por la dificultad de discernir algunos de ellos, que no fueron contados (Figs. 2a-2d, 1, 3, 9).

Conforme avanza este estado, el núcleo va cambiando su forma por una ligeramente ovalada y se observan microtúbulos en estrecha relación con las placas densas que ocupan el plano ecuatorial del núcleo (Figs. 2a-2d, 4, 6, 7). Al final del estado ecuatorial las placas se dividen

en hemiplacas y se observan en contacto con microtúbulos del huso, que finalizan en la placa o pasan tangencialmente a ella (Figs. 5, 6, 7). En este estado ecuatorial, el nucléolo va aumentando de tamaño y cambia su forma redonda por una alargada, su material granular se torna más fino y su densidad electrónica disminuye y se observa en estrecha relación con los microtúbulos que corren en su interior y con las placas que generalmente ocupan la periferia de éste.

**Estadio elongacional:** El núcleo cambia su forma ovalada por otra parecida a la de un maní (Figs. 1,8). Los microtúbulos del huso se observan en una disposición prácticamente paralela y separados por espacios muy pequeños (Figs. 1,8). Las hemiplacas se separan y emigran en dos grupos hacia las zonas polares, siempre en contacto con microtúbulos del huso. El número de hemiplacas contadas en la zona polar es igual al de la zona ecuatorial. El nucleolo toma una forma similar a la del núcleo, ya que se observa alargado con dos grandes masas nucleolares unidas por una pequeña zona central (Figs. 1, 8, 9). En este estado la célula presenta una invaginación en la zona central, perpendicular al eje de migración de las placas y cromatina (Figs. 1, 8). Un pequeño puente, ocupado prácticamente por las fibras del huso y pequeñas cantidades de material nucleolar, conecta los dos futuros núcleos (Fig. 9). La invaginación de la célula continúa en forma paralela a la elongación del núcleo.

**Estadio reorganizativo:** El puente que une las dos grandes masas de cromatina se rompe, originando dos núcleos hijos que toman de nuevo la forma esférica característica. Se forman las pequeñas masas densas de cromatina que ocupan zonas interiores del núcleo y cercanas a la membrana nuclear. El huso desaparece y las placas ya no son visibles al microscopio electrónico. El nucléolo reduce su tamaño, se torna esférico y su densidad electrónica aumenta.

## DISCUSION

Los resultados demuestran que *Leishmania mexicana ssp* presenta un tipo de división nuclear conocido con el nombre de mitosis "cerrada", con huso interno. Este tipo de división mitótica, ya había sido observada en varios géneros de la familia Tripanosomatidae (Vickerman

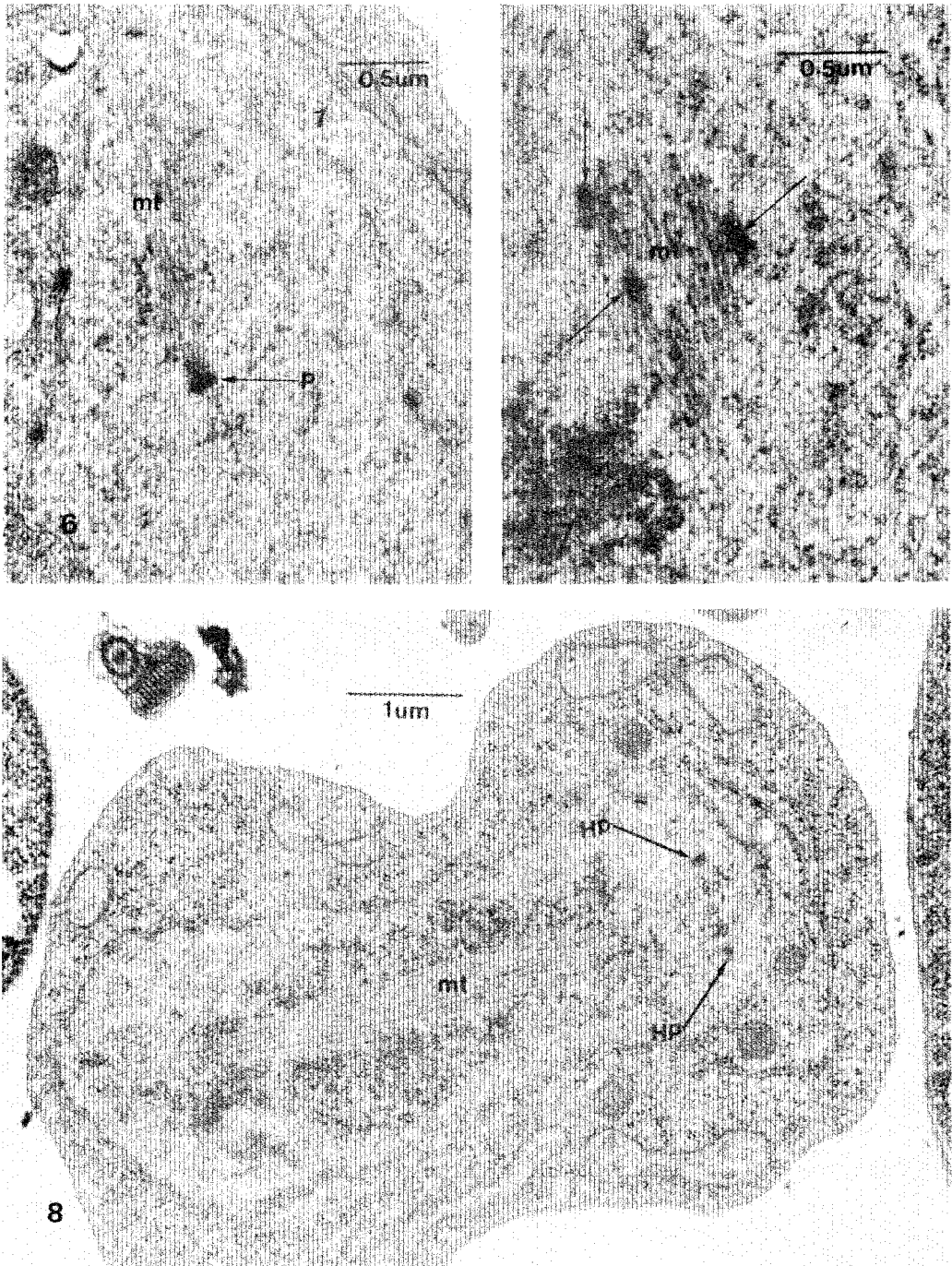


Fig. 6. Sección longitudinal de un núcleo mitótico. Se observan varios microtúbulos asociados a una placa. P: placa densa, mt: microtúbulos. X30.000.

Fig. 7. Sección de un núcleo mitótico. Los microtúbulos del huso se observan asociados a las placas densas. Unos terminan en ellas y otros pasan tangencialmente. P: placa densa, mt: microtúbulos. X36.000.

Fig. 8. Sección longitudinal de un núcleo mitótico, en el estadio elongacional; el núcleo tiene ya una forma de maní, y las hemiplacas ocupan la zona polar. Hp: hemiplaca, mt: microtúbulos, n: nucleólos.



Fig. 9. Sección longitudinal de un núcleo mitótico, en el estadio elongacional tardío. Los microtúbulos se observan ocupando el interior de un delgado puente y la cromatina de los núcleos hijos está completamente separada. N: núcleo, n: nucleolo, mt: microtúbulos. X18.000.

y Preston 1970; Heywood y Weiman 1978; Solari 1980a, b, 1982). La presencia de la membrana nuclear durante todo el proceso de la división y la existencia de un huso intranuclear habían sido confirmadas por Bianchi *et al.* (1969) en *Leishmania tropica* y Croft (1979) en *Leishmania hertigi*. Mis observaciones sobre el huso mitótico y placas densas, en una especie del complejo *Leishmania mexicana*, concuerdan con las descritas por Solari (1980a, b, 1982), quien en estudios ultraestructurales en varios miembros de la familia de los tripanosomatídeos, demostró que las fibras del huso corren de los polos al ecuador del núcleo y que existe una estrecha relación entre éstas y las placas

densas. La presencia de 6 placas densas en el nivel del ecuador nuclear en *Leishmania mexicana* spp (como en *Leishmania donovani*, observación sin publicar), en estadios tempranos de la división, su separación en hemiplacas y migración de éstas a los polos nucleares en el estadio elongacional, en estrecha relación con las fibras del huso, demuestran que en este flagelado también, desde el punto de vista ultraestructural y fisiológico, hay una relación entre el material cromosómico y el huso microtubular, aunque los cromosomas no sean visibles; con un especial significado en la separación de los genomios. Estos fenómenos parecen estar más enlazados con los de aquellos organismos que poseen

cromosomas definidos, independientemente de que participen de una mitosis "abierta" o cerrada", con o sin persistencia de la membrana nuclear. Aunque los microtúbulos jueguen un papel equivalente al de las fibras cinetocóricas; en cuanto a su origen, la ausencia de centriolos, la existencia de la membrana nuclear durante la división y la no observación de centros organizadores de microtúbulos en asociación con el huso, deja sin resolver el problema de las estructuras nucleares o extranucleares, que originan el huso en este organismo.

La presencia de las placas densas en núcleos en división, fueron descritas por varios autores. Así, Vickerman y Preston (1970) las describieron en *Trypanosoma rhodesiense*, De Souza y Meyer (1974) en *Trypanosoma cruzi* y Heywood y Weinman (1978) en *Trypanosoma cyclops*. Una descripción y análisis más completos y detallados, sobre: el número de las placas, relación con las fibras del huso, y su comportamiento durante la división nuclear, en el género *Trypanosoma cruzi*, fue hecha por Solari (1980a, 1980b, 1982). Este autor sugiere que las placas, por su número, duplicación y migración y su relación con el huso en un núcleo en división, están en relación con el cromosoma y que pueden jugar un papel similar al de los cinetocoros. Las observaciones ultraestructurales en *Leishmania mexicana*, en relación con la presencia, duplicación y migración de las placas densas, en un núcleo en división, indican que esta especie se comporta de una manera similar al género *Trypanosoma* y corroboran la información obtenida por Solari (1983) en varios miembros de la familia de los tripanosomatídeos, y refuerzan sus ideas en relación con la dinámica de las fibras del huso y placas densas en estos géneros.

En conclusión, el núcleo mitótico presenta una morfología muy diferente a la de la célula en estadio de interfase. Las modificaciones ultraestructurales más características son: aumento de tamaño, cambio de forma y densidad del núcleo y nucléolo, formación intranuclear del huso mitótico y seis placas densas en el estadio ecuatorial. El número de placas indica que *Leishmania mexicana* podría tener 6 unidades cromosómicas.

#### RESUMEN

Se estudió mediante cortes ultrafinos seriados, la ultraestructura del núcleo mitótico en una especie del complejo *Leishmania mexicana*.

Al inicio de la división nuclear, un grupo de seis placas densas se localiza en la región ecuatorial del núcleo y un huso microtubular se forma entre dos polos opuestos. El huso mitótico es completamente intranuclear, con la membrana nuclear presente en todo el proceso de la división. Los husos polares están formados por aproximadamente 50 microtúbulos, y el ecuatorial (zona de superposición) por aproximadamente 100 microtúbulos. No se observó centros organizadores de microtúbulos en relación con el huso. Las placas y hemiplacas aparecieron en asociación con grupos de microtúbulos, que finalizan en ellas o pasan tangencialmente. Esto sugiere que el huso tiene un especial significado en la fisiología del desplazamiento de las hemiplacas durante la separación de los genomas. Al inicio del estado de elongación, las placas se dividen en mitades y cada grupo emigra a un polo opuesto. Se concluye que las placas juegan un papel similar al de los cinetocoros y así *Leishmania mexicana* tendría seis unidades cromosomales. Los eventos mitóticos en esta especie son esencialmente similares a los observados en *Trypanosoma cruzi*.

#### REFERENCIAS

- Bianchi, L., E.G. Rondanelli, G. Garosi & G. Gerna. 1969. Endonuclear mitotic spindle in the leptomonad of *Leishmania tropica*. J. Parasitol. 55: 1091-1092.
- Bary, J.D. & Vickerman, K. 1979. Tripanosoma Brucei: Loss of variable antigens during transformation from bloodstream to procyclic form in vitro. Exp. Parasitol. 48:313-324.
- Chakraborty, J., A. Guha & N.N. Das Gupta. 1962. Citology of the flagellate form of *Leishmania donovani* with consideration of the evidence for abnormal nuclear division. J. Parasitol. 48:131-136.
- Chakraborty & N.N. Das Gupta. 1962. Mitotic cycle of the kala-azar parasite *Leishmania donovani*. T. Gen. Microbiol. 28:541-545.
- Croft, S.L. 1975. Ultrastructural study of the nucleus of *Leishmania hertigi*. Protistologica. 15:103-110.
- De Souza, W., & H. Meyer. 1974. On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. J. Protozool. 21:48-52.
- Dodge, J.D. 1973. The fine structure of algae cells. Academic Press. London & New York. 261 pp.



- Frank, W.W., & P. Reau. 1973. The mitotic apparatus of a zigomicete, *Phycomyces blakes leeamus*. Arch. Microbiol. 90:121-130.
- Fuge, H. 1974. The arrangement of microtubules and the attachment of chromosomes to the spindle during anaphase in Tipulid spermatocytes. Chromosoma (Berl.). 45:245-260.
- Fuge, H. 1977. Ultrastructure of the mitotic spindle. Int. Rev. Cytol., suppl. 6:1-58.
- Fuller, M.S. 1976. Mitosis in fungi. Int. Rev. Cytol. 45:113-153.
- Heath, I.B. 1978. Experimental studies of mitosis in fungi. In I.B. Heath (ed.), Nuclear division in the fungi, New York. Academic Press.
- Heath, I.B. 1980. Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis. Int. Rev. Cytol. 64:1-79.
- Heywood, P. & P.T. Magee. 1976. Meiosis in protists. Some structural and physiological aspects of meiosis in algae, fungi and protozoa. Bacteriological Reviews 40:190-240.
- Heywood, P. & D. Weinman. 1978. Mitosis in the hemoglagellate *Trypanosoma cyclops*. J. Protozool. 25:287-293.
- Hollande, A. 1972. Le déroulement de la cryptomitose et les modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de Protozoaires. Ann. Biol. 11:427-466.
- Hollande, A. 1974. Etude comparée de la mitose syndinienne et de celle des Peridimans libres et des Hypermastigines. Infrastructure et cycle évolutif des syndinides parasites de Radiolaires. Protistologia. 10:413-451.
- Kubai, D. 1975. The evolution of the mitotic spindle. Int. Rev. Cytol. 43:167-277.
- Pickett-Heaps, J.D. 1969. The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. Cytobios. 1: 257-280.
- Pickett-Heaps, J.D. 1974. The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. Biosystem. 6:36-48.
- Pickett-Heaps, J.D. 1975. Aspects of spindle evolution. Ann. New York Acad. Sciences. 253:352-361.
- Ris, H. 1975. Primitive mitotic mechanisms. Biosystem. 7:298-304.
- Solari, A.J. 1970. The spatial relationship of the X and Y Chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. Chromosoma (Berl.). 29:217-236.
- Solari, A.J. 1980a. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. Chromosoma (Berl.). 78:239-275.
- Solari, A.J. 1980b. Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. Exp. Cell. Res. 127:457-460.
- Solari, A.J. 1982. Nuclear ultrastructure during mitosis in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. J. Protozool. 29:330-331.
- Solari, A.J. 1983a. The ultrastructure of mitotic nuclei of *Blastocrithidia triatoma*. Z. Parasitenkd. 69: 3-15.
- Solari, A.J., & W. de Souza. 1983b. Presence and comparative behavior of mitotic plaques in five species of Trypanosomatidae. 7:28-43.
- Vickerman, K. & T.M. Preston. 1970. Spindle microtubules in the dividing nuclei of Trypanosomes. J. Cell. Sci. 6:365-383.
- Wells, K. 1977. Meiotic and mitotic divisions in the Basidiomycotina. p. 337-374. In T.L. Rost & E.M. Gifford (eds.). Mechanisms and control of cell division.