

ESTUDIO DEL NUCLEO DE LAS CELULAS CULTIVADAS BHK21

— **Dr. Armando Soto Escalona.**

— **Dr. Orlando J. Castejón.**

Instituto de Investigación Clínica,
Apartado 1151.
Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela.

INTRODUCCION

Las células BHK21 constituyen una línea celular con características especiales. Se ha demostrado que contienen un número euploide de cromosomas, de acuerdo con la especie de donde provienen^{1,2}, y presentan un crecimiento armónico y ordenado como el de las células no malignas³. Por otra parte, al ser inoculadas por vía subcutánea en el hámster, desarrollan fibrosarcomas³. Es conocido que las propiedades tumorales de una célula se reflejan en las características morfológicas del núcleo⁴; por lo tanto, hemos considerado de interés estudiar la estructura del núcleo de las células BHK21, para determinar si su morfología corresponde a sus propiedades in vitro.

MATERIAL Y METODO

La línea celular fue cultivada en el medio preconizado por Macpherson y Stoker⁷, el cual consiste en solución nutritiva de Eagle con doble cantidad de aminoácidos y vitaminas, fosfato de triptosa y suero de ternera. El medio contenía, además, 100 unidades de penicilina, 50 microgramos de estreptomina y 50 unidades de Fungizona por ml. Para las observaciones al microscopio de luz y de fluorescencia, las células fueron cultivadas en laminillas cubreobjeto en tubos de Leighton. Para el microscopio electrónico se utilizaron frascos de prescripción de 4 onzas.

Microscopía de luz. Las células fueron fijadas en alcohol metílico durante 15 minutos y coloreadas con Giemsa.

Microscopía de fluorescencia. Se utilizó la coloración con anaranjado de acridina, según una modificación a la técnica de

Spendlove¹¹. En lugar de solución de Carnoy, se utilizó como fijador una atmósfera de vapores de glutaraldehído durante 20 minutos, lo cual elimina el proceso de hidratación posterior a la fijación. Las células fijadas fueron lavadas luego en solución amortiguadora de McIlvaine a un pH de 3,8 durante 5 a 10 minutos. Fueron coloreadas durante 5 minutos en una solución de anaranjado de acridina al 0,01 %, preparada recientemente en la misma solución. Luego de enjuagadas durante 2 a 3 minutos en solución de McIlvaine, las laminillas fueron colocadas sobre un portaobjeto con una mezcla de 90 % de glicerina y 10 % de solución amortiguadora. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio equipado con una lámpara Osram Hb200 con filtro excitador BG12.

Microscopía electrónica. Luego de obtener una capa celular completa, se descartó el medio de cultivo y las células fueron desprendidas con una solución de tripsina al 0,25 % en solución salina regulada a pH 7,5. Una vez centrifugadas, se descartó la tripsina y fueron fijadas con una solución de glutaraldehído al 4 % en solución amortiguadora de fosfato, pH 7,5 y osmolaridad de 280 mOsm/litro. Fueron fijadas, luego, en una solución de tetraóxido de osmio al 1 % en solución amortiguadora similar, a pH 7,4 y osmolaridad de 380 mOsm/litro². Fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, incluidas en Epon 812⁶, y cortadas en un ultramicrotomo LKB provisto de una cuchilla de vidrio. Fueron coloreadas con acetato de uranilo¹³ y observadas en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1.

RESULTADOS

Microscopía de luz.

Los núcleos se observan redondeados, de contorno irregular. La cromatina forma trabéculas finas y grupos pequeños adosados a la membrana nuclear. Los nucléolos, intensamente teñidos y de contorno muy bien demarcado, son múltiples; llegando a observarse en una célula hasta 14 de ellos (Figs. 1 y 2).

Microscopía de fluorescencia.

La morfología observada es la misma arriba descrita. La coloración delimita perfectamente el material ribonucleico del

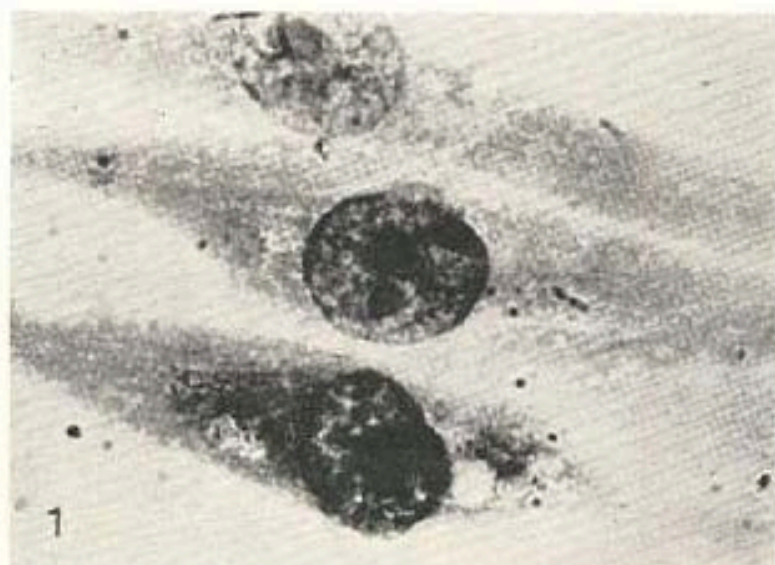


Fig. 1. Células BHK21 coloreadas con Giemsa. Se observan los núcleos grandes y condensados. La cromatina forma bandas y se adosa a la membrana nuclear.



Fig. 2. Núcleo de una célula BHK21. Obsérvese el contorno irregular y 14 nucleólos en su interior. Coloración: Giemsa.

desoxirribonucleico. Este último se observa de color amarillo verdoso, dispuesto en finas bandas, con condensaciones hacia la membrana nuclear (Fig. 3). Los nucléolos se observan anaranjados, por su contenido en ácido ribonucleico; a su alrededor se ven unas semilunas amarillo-verdosas que representan la cromatina asociada al nucléolo. Al igual que con el microscopio de luz, se observan numerosos nucléolos en cada célula.

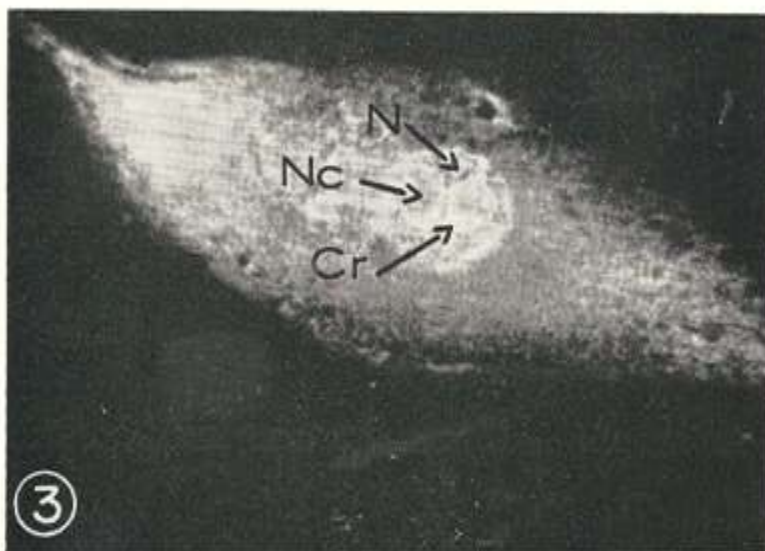


Fig. 3. Célula BHK21 coloreada con anaranjado de acridina. El núcleo contiene dos nucléolos a los cuales se les observa la cromatina asociada al nucléolo (N, núcleo; Nc, nucléolo; Cr, cromatina).

Microscopía electrónica.

Al corte se observan los núcleos ovalados (Fig. 4), con un contorno que varía de célula a célula, pero que tiende a ser irregular. La envoltura nuclear muestra invaginaciones superficiales y profundas. En algunas microfotografías, estas últimas penetran dentro de la matriz nuclear lobulando exageradamente al núcleo (Figs. 5 y 6). En la figura 7 se observa la sección transversal de una de estas invaginaciones.

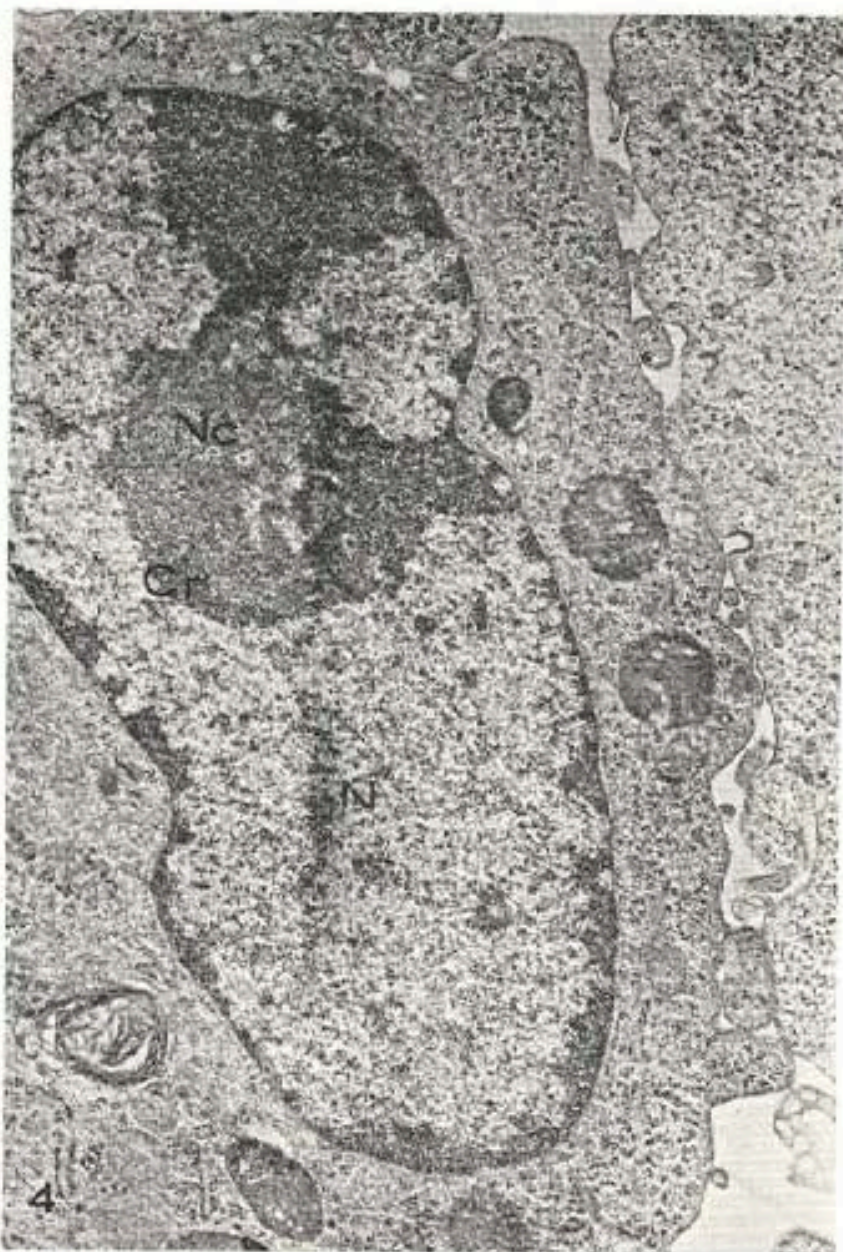


Fig. 4. Célula BRHK21. Aspecto general del núcleo de las células al microscopio electrónico. Obsérvese la forma ovalada, con ciertas indentaciones. 39.000 X.



Fig. 5. Núcleo exageradamente deformado por profundas invaginaciones que convergen hacia el nucléolo. 24.000 X.

La matriz nuclear es clara y la cromatina se dispone en la periferia, adosada a la membrana nuclear interna. A trechos, la cromatina es interrumpida por espacios claros que adoptan la forma de canales de paso hacia los poros nucleares (Figs. 7, 10 y 12). Los nucléolos son grandes, bien delimitados. Muchos de ellos se observan adosados a la envoltura nuclear. La cromatina asociada al nucléolo se observa como una estructura densa y periférica. En el cuerpo nucleolar se observan las bandas de nucléolonema (Fig. 11); además, una parte granular que corresponde a la "pars amorfa" (Fig. 8). Entre ambas estructuras existen espacios claros.

Es de hacer notar, la asociación existente entre la situación de los nucléolos y las invaginaciones de la membrana nuclear. Con escasas excepciones, el nucléolo parece ser el sitio hacia donde convergen tales invaginaciones.



Fig. 6. Núcleo de BHK21. Al igual que en la anterior figura, las invaginaciones lobulan al núcleo. 30.000 X.



Fig. 7. Invaginaciones (I) tomadas en el plano del corte. Se diferencian de una inclusión nuclear, por la doble membrana que lo rodea. La membrana más interna corresponde a la membrana nuclear externa. 30.000 X.

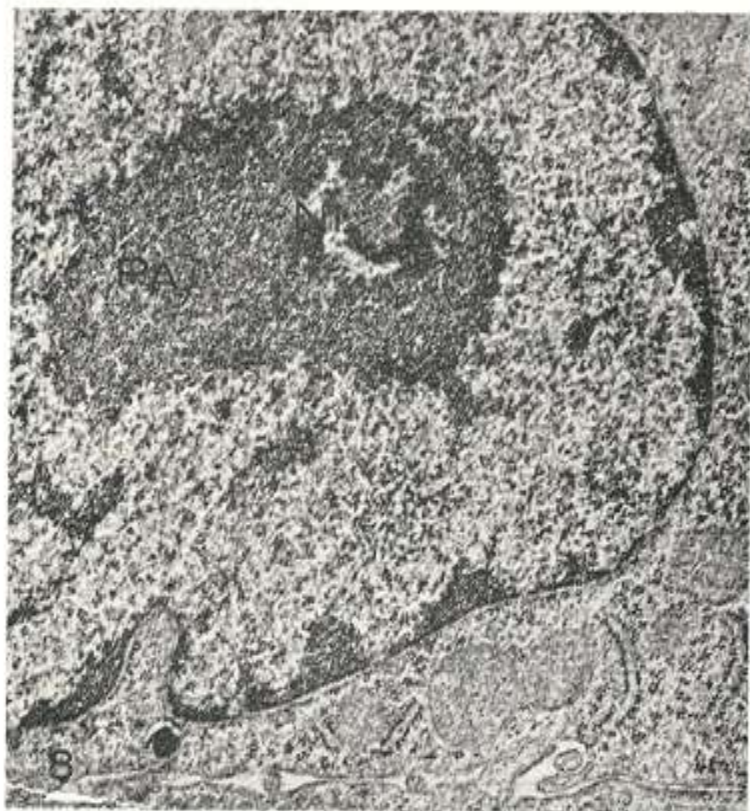


Fig. 8. Núcleo de BHK21. Se observan todos los componentes del nucleólo (NI, nucleolonema; PA, pars amorfa; Cr, cromatina). 30.000 X.

La membrana nuclear es doble, con la cisterna perinuclear bien delimitada. Los poros nucleares son abundantes y en algunas microfotografías de cortes tangenciales (Fig. 9) se observan de un tamaño aproximado de 80 milimicras.



Fig. 9. Corte tangencial del núcleo mostrando varios poros de la membrana. 30.000 X.

Fig. 10. El nucléolo está en contacto con la membrana nuclear a través de una delgada capa de cromatina. Obsérvense los canales abiertos en ella hacia la membrana nuclear (Cr, cromatina). 30.000 X.

Fig. 11. Dos nucléolos bien desarrollados. Uno en contacto con la membrana nuclear, y otro hacia el centro del núcleo. 30.000 X.



Fig. 12. Los canales mencionados se continúan con los poros de la membrana nuclear, como se observa en este corte de orientación tangencial (Cr, cromatina; P, poros). 30,000 X.

DISCUSION

En los últimos quince años han aparecido gran cantidad de reportes que han contribuido a aumentar de manera notable los conceptos sobre morfología nuclear. (Para una revisión de la bibliografía ver ref. 10). Las invaginaciones, indentaciones, dobleces y otras irregularidades del contorno nuclear, han sido clásicamente tomadas como resultado de artefactos de fijación. Sin embargo, Rose¹ ha demostrado, en un detallado estudio de dinemicrografía en contraste de fases y citoquímica, que muchas de estas formas son producto de la actividad nuclear. Algunas células muestran mayor variación en la morfología nuclear que otras y esto, posiblemente, coincide con variaciones en la actividad biológica específica. Fuse y colaboradores⁴ han hecho una comparación de este tipo, entre varias cepas de células

cultivadas. En el mismo cultivo se observan diferentes estados de actividad; esta aseveración puede corroborarse si se compara el núcleo de la célula de la figura 4 con los núcleos de las figuras 5 y 6. Hay una estrecha relación entre la existencia de las invaginaciones y la situación de los nucleólos. Ha sido demostrado que en los nucleólos se forma el ácido ribonucleico ribosómico y posiblemente también, las ribosomas⁷. Estos poseen el citoplasma por mecanismos hasta ahora no bien conocidos⁸. La gran actividad de síntesis que poseen estas células debe estar relacionada con una gran producción de ARN en el nucleólo. Una manera rápida de transportarla al citoplasma pudiera ser la de aumentar la superficie de la membrana nuclear, con la consiguiente producción de invaginaciones y deformaciones en su morfología. En la figura 7 se observan tres estructuras que semejan inclusiones nucleares; para la presencia de doble membrana las identifica como invaginaciones, siendo la membrana que se observa más internamente, la membrana nuclear externa. Las inclusiones citoplasmáticas en el núcleo pierden la membrana más interna. Estas estructuras presentan, además, un contenido de densidad similar a la matriz citoplasmática y algunos ribosomas libres. Las invaginaciones descritas también están en contacto con el nucleólo.

Por otra parte, estas deformaciones nucleares han sido descritas como características de núcleo de las células malignas⁹. Ciertamente, las células 3H-K21, a pesar de que provienen de un tejido aparentemente normal¹⁰, han sufrido una transformación al estabilizarse como línea celular. Defendi y colaboradores³ han demostrado, que estas células producen una alta incidencia de fibrosarcomas al ser inocuadas, por vía subcutánea, en el hómster. Otros autores¹⁰, indican una variable proporción de fibrosarcomas de acuerdo a la cepa utilizada, sin embargo, en mayor o menor grado, todas producen el mencionado fibrosarcoma.

El núcleo de la célula 3H-K21 presenta, al microscopio de luz, un número variable de nucleólos, generalmente más de dos. En una de las microfotografías se observa una célula con 14 nucleólos (Fig. 2). El aumento del número de nucleólos ha sido relacionada con un aumento en el número de cromosomas¹. Sin embargo, éste no parece ser el caso en estas células, ya que varios autores^{11,12} han demostrado que tienen un número euploide de cromosomas; aunque sí le confieren cierto grado de varia-

ciones. Tal parece que la presencia de nucléolos múltiples en estas células está en relación con su gran actividad biosintética. La estructura del nucléolo está bien conservada y corresponde a las descripciones de Bernhard¹. Lettre y colaboradores⁵ han demostrado, por métodos citoquímicos y de microscopía óptica y electrónica, que el nucléolonema es una formación compleja, compuesta de diferentes materiales, siendo su esqueleto de naturaleza cromosómica. Llama la atención que, cuando el nucléolo se pone en contacto con la membrana nuclear, nunca lo hace directamente sino a través de una banda de cromatina, la cual a su vez está interrumpida por espacios claros que terminan en la membrana nuclear. La presencia de estos canales pudiera ser debida a un artefacto producido por el glutaraldehído. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que estas estructuras existan in vivo y que hayan sido preservadas por el fijador.

La irregularidad de la forma del núcleo nos ha permitido obtener cortes de orientación transversal, donde se observan detalladamente los poros nucleares. En la cromatina cercana a la membrana nuclear se observan canales de paso, pero no se observa material nucleolar atravesándolos; ni tampoco en las cercanías de la membrana nuclear externa. Se sabe que de alguna manera este material pasa del nucléolo al citoplasma, pero no se ha encontrado una evidencia morfológica del mecanismo de transporte.

RESUMEN

Se estudió la estructura del núcleo de las células cultivadas BHK21 utilizando el microscopio de luz, de fluorescencia y electrónico. El núcleo se observó de forma irregular con digitaciones que penetraban profundamente en la matriz nuclear, lobulándolo exageradamente. Los dobleces de la membrana nuclear permitieron la obtención de cortes de orientación tangencial, donde se apreciaron los poros nucleares en cortes frontales. En la cromatina replegada hacia la membrana nuclear interna, se apreciaron canales de comunicación con los poros nucleares. Se encontró un número múltiple de nucléolos y se observó que, salvo en escasas excepciones, todas las invaginaciones de la envoltura

nuclear se dirigen hacia el sitio de localización del nucléolo. Se discute el papel de los hallazgos obtenidos.

SUMMARY

The nuclear structure of 3HK21 cultured cells was studied with light, fluorescence and electron microscopy. The nucleus was irregular in shape with deep infolding of the nuclear envelope which lobulated it exagerately. These infoldings allowed us to obtain tangential sections where the nuclear pores were observed in the frontal plane. Chromatin adhered to the inner nuclear membrane showed channels to the nuclear pores. A multials number of nucleoli was found for each cell, and, with few exceptions, it was found that all the infoldings of the nuclear envelope converged to the site of localizaton of the nucleoli.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BERNHARD, W. "Ultrastructural aspects of normal and pathological nucleolus in mammalian cells". International symposium on the nucleolus, its structure and function. National Cancer Institute monograph N° 23. Pág. 13. 1966.
- 2 — CASTEJON, O. J. "Fijación química de tejidos para microscopía electrónica". Invest. Cien. N° 22: 11. 1967.
- 3 — DEFENDI, V.; LEHMAN, J.; KRAEMER, P. "Morphologically normal hamster cells with malignant properties". *Virology*, 19: 592. 1963.
- 4 — FUSE, Y.; PRICE, Z.; CARPENTER, C. M. "A comparison of the fine structure of cultured MAC-21 and HeLa cells". *Cancer Res.* 23: 1658. 1963.
- 5 — LETTRE, R.; SIEBS, W.; PAWELETZ, N. "Morphological observations on the nucleolus of cell in tissue culture, with special regard to its composition". International symposium on the nucleolus, its structure and function. National Cancer Institute monograph N° 23. Pág. 107. 1966.
- 6 — LUFT, J. H. "Improvement in epoxy resin embedding methods". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409. 1961.

- 7 — MACPHERSON, I.; STOKER, M. "Polyoma transformation of hamster cell clones — an investigation of genetic factors affecting competence". *Virology*. 16: 147. 1962.
 - 8 — OBERLING, C.; BERNHARD, W. "The morphology of the cancer cell". Brachet, J.; Mirsky, A. *The cell*. Vol. V. Pág. 405. Academic Press, New York. 1961.
 - 9 — FERRY, R. P. "On ribosome biogenesis". International symposium on the nucleolus, its structure and function. National Cancer Institute monograph N° 23. Pág. 527, 1966.
 - 10 — ROSE, G. G. "Nuclear folds versus intranuclear inclusions in tissue cultures". *J. Roy. Microscop. Soc.* 83: 373. 1964.
 - 11 — SPENDLOVE, R. "Microscopic techniques". Maramorosch, K.; Koprowski, H. *Methods in Virology*. Vol. III. Pág. 475. Academic Press, New York. 1967.
 - 12 — STOKER, M.; MACPHERSON, I. "Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives". *Nature*. 203: 1355. 1964.
 - 13 — WATSON, M. L. "Staining tissue sections for electron microscopy with heavy metals". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 475. 1958.
-

"Es imposible separar la ciencia en "pura" y "aplicada", y aún menos subordinar una a la otra. La ciencia no puede ser constreñida ni a su aspecto utilitario ni a su aspecto filosófico".

Vladimir Kourganoff
"La Investigación Científica".

"Algunas veces la idea central sobre la que se basa una investigación resulta de la aplicación o transferencia de una nueva técnica o un nuevo principio que ha sido descubierto en otro campo. El procedimiento de hacer avances en esta forma puede denominarse el método de "transferencia". Este es probablemente el procedimiento más fácil y el que da más frutos, siendo el que más se usa en la investigación con cierto fin... Los progresos científicos son tan difíciles de conseguir que toda estratagema útil debe ser usada...".

W. I. B. Beveridge
"The Art of Scientific Investigation".