

Trabajos Originales

Variaciones nucleolares en la transformación celular del epitelio mamario

Ricardo Cornejo U. ^a

Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

^a Biólogo Celular, PhD.

RESUMEN

Antecedentes: En la medida que las células pertenecientes a la línea HC11 son transfectadas con el oncogén ras, asumen distintas propiedades resultando en tipos celulares transformados, modificando tanto sus componentes como sus funciones celulares, los cuales pueden ser cuantificados mediante técnicas morfométricas. *Objetivo:* Evidenciar en términos cuantitativos y morfológicos las variaciones experimentadas por los nucleolos pertenecientes a células mamarias de la línea HC11 con el decorrer del mecanismo de transformación celular. *Método:* Se estudió a nivel de la microscopía electrónica de transmisión los tipos celulares en proceso de transformación (Q6 GM), en comparación con células francamente neoplásicas (Q6 IM), cuantificando variaciones de los nucleolos y su relación con estructuras involucradas en síntesis proteica. *Resultados:* Se evidencian diferencias estadísticamente significativas en el área, volumen y longitud entre los nucleolos pertenecientes a estos tipos celulares. *Conclusión:* Las células del epitelio mamario en proceso neoplásico presentan un notable aumento de sus nucleolos y sus ribonucleoproteínas, constituyentes que generarán básicamente ribosomas libres, que sintetizarán proteínas para ser utilizadas en el decorrer de las mitosis sucesivas y desreguladas.

PALABRAS CLAVE: *Transformación celular, morfometría, nucleolos, glándula mamaria*

SUMMARY

Background: As cells belonging to the HC11 line become transfected with the ras oncogene, they assume different properties resulting in transformed cell types, with modified cell components and functions. These may be quantified by morphometric techniques. *Objective:* To provide quantitative and morphological evidence of the variations occurring in the nucleoles of HC11 line mammary cells as the cell transformation mechanism takes its course. *Method:* Transmission electron microscopy was used to study cell types in the transformation phase (Q6 GM) as compared with frankly neoplastic cells (Q6 IM), quantifying the variations between the nucleoles and their relation to structures involved in protein synthesis. *Results:* Statistically significant differences were found between the nucleoles belonging to these cell types with respect to area, volume and length. *Conclusion:* The nucleoles of mammary epithelial cells in the process of neoplasia, present a notable increase, and their constituent ribonucleoproteins will basically generate free ribosomes, synthesising proteins available for use in successive, unregulated mitosis.

KEY WORDS: *Cell transformation, morphometry, nucleoles, mammary gland*

INTRODUCCIÓN

HC11 constituye una línea de células de epitelio mamario normal derivada del linaje COMMA 1D obtenida de glándula mamaria de ratas BALB/c en mitad de preñez, las cuales retienen características de la diferenciación normal de la glándula y producen β caseína, la principal proteína de la leche (1).

Las células mamarias normales son transfectadas con el oncogén ras originando el tipo celular Q6 GM, en proceso de transformación, asumiendo nuevas y distintas características, siendo la más importante un bloqueo total del factor de transcripción específico del gen de β caseína, generando por lo tanto incapacidad para realizar esta síntesis; de igual manera, se evidencian variaciones importantes de componentes citoplasmáticos y nucleares (2).

De igual modo, las células franca y definitivamente transformadas corresponden al tipo Q6 IM, caracterizadas por la adquisición de propiedades neoplásicas de presentar tanto mitosis consecutivas y desreguladas como por su alta capacidad metastásica (3) e incentivando vías de transducción de señales involucradas en etapas de transformación maligna (4).

En este contexto, pareció interesante describir cuantitativamente las eventuales diferencias que pudiese experimentar el nucleolo, componente que, en base a su constitución ribonucleoproteica genera una determinada tasa de biogénesis ribosomal y por ende, en directa relación con una mayor o menor actividad en la síntesis proteica citosólica (5).

MATERIAL Y MÉTODO

Microscopía electrónica de transmisión. Al pellet que contenía las células HC11 GM y HC11 IM se le adicionó solución de glutaraldehído 2%, en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2 y se mantuvo a temperatura ambiente, por 2 horas. Posteriormente, fue sometido a un lavado en solución de 6 g de NaCl y 73 g de sacarosa, disueltos en 1 litro de agua destilada. La posfijación se realizó en solución de tetróxido de osmio, 1%, disuelto en la solución de lavado antes descrita, durante una hora, a 40° C y acetato de uranilo 0,5%, por 18 horas. Luego de lavado el material fue deshidratado en concentraciones crecientes de acetona (30 a 100%) e incluido en Araldita 6005. Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de grosor, los que fueron tratados con acetato de uranilo 2%, durante 40 minutos y citrato de plomo 0,5%, por 10 minutos. Las muestras fueron estudiadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Phillips EM 400.

Método estereológico. A partir de los bloques

para microscopía electrónica, fueron obtenidos cortes ultrafinos, en los cuales se micrografiaron cada uno de los tipos celulares con un aumento de 10.500 X. Para la evaluación de las fracciones volumétricas de los diferentes componentes celulares, fue sobrepuesto un retículo de puntos en las micrografías electrónicas y se procedió al conteo diferencial de los puntos que incidían sobre los perfiles de los componentes celulares, calculándose la fracción volumétrica que un determinado componente ocupa, mediante la siguiente ecuación (6).

Donde:

$$Fv = \frac{Pi}{Pt}$$

Fv: fracción volumétrica del componente específico.

Pi: puntos incidentes sobre el componente en estudio.

Pt: puntos totales incidentes en la estructura celular.

Para el cálculo del área nucleolar fue utilizado el software Sigma Pro 5.0. Con el objetivo de determinar diferencias estadísticamente significativas los datos morfométricos obtenidos fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas.

RESULTADOS

En las micrografías electrónicas obtenidas de los tipos celulares tanto transfectados como transformados evidenciados en las Figura 1 y 2, se realizaron los análisis morfométricos correspondientes y los valores obtenidos sometidos a la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas, determinan diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza y un error de 5% considerando un $p=0,05$ con un valor de 0,42. Teniendo en cuenta que la prueba establece diferencias con un valor de $Z=2,032$ tanto para las longitudes, como para las áreas que poseen los nucleolos (elegidos al azar) evaluados en las células Q6 GM y Q6 IM, indican que efectivamente existen diferencias estadísticamente significativas, situación que permite constatar la variación de los nucleolos en medida que transcurre el mecanismo de transformación producto de la introducción del ras, representadas en las Tablas I y II. En este sentido, en la Figura 3 se describe con claridad este resultado evidenciándose marcadas diferencias cuantitativas entre ellos, tanto que el volumen cuantificado en la célula neoplásica es prácticamente al doble de la encontrada en la célula recién transfectada.

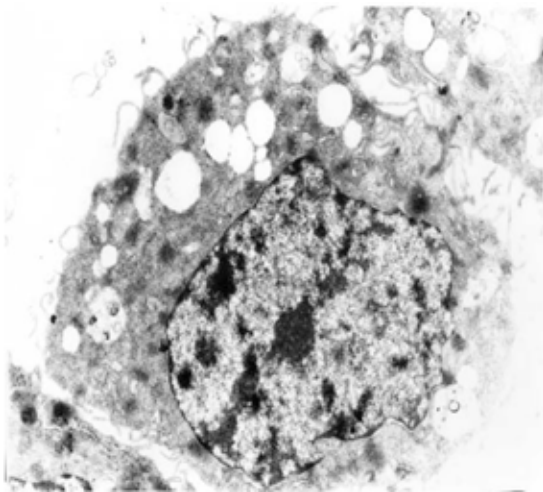


Figura 1. Micrografía electrónica de célula transfectada Q6 GM perteneciente a glándula mamaria. Se observa un gran nucleolo en el centro del núcleo rodeado por fragmentos de heterocromatina. 10.500 X.

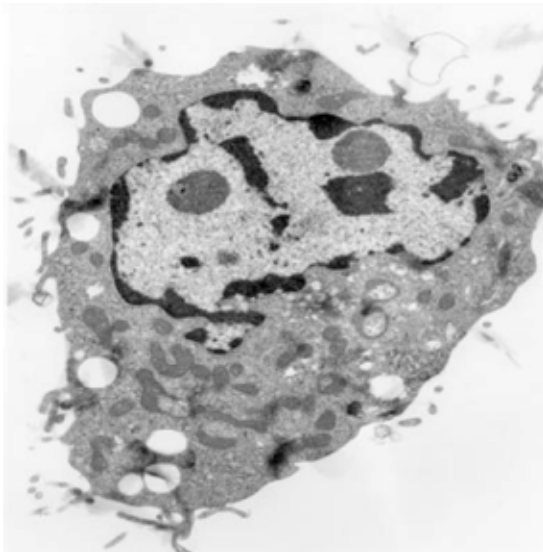


Figura 2. Micrografía electrónica perteneciente a célula neoplásica Q6 IM de glándula mamaria. Se observa un par de nucleolos de forma regular en ambos lados del núcleo. Se aprecia eucromatina de ubicación central y grumos de heterocromatina tanto en la región medial como asociada al envoltorio nuclear. 10.500 X.

Tabla I
ÁREA NUCLEOLAR (μ^2) EVALUADA EN CINCO CÉLULAS DE GLÁNDULA MAMARIA PERTENECIENTES AL TIPO TRANSFECTADO (Q6 GM) Y NEOPLÁSICAS (Q6 IM) ELEGIDAS AL AZAR

Nucleolos	Células Q6 GM	Células Q6 IM
1	3,5	7,4
2	5,3	9,0
3	6,8	11,3
4	7,4	12,7
5	9,2	16,2

Tabla II
EVALUACIÓN DE LA LONGITUD (μ) DE CINCO NUCLEOS PERTEENECIENTES A CÉLULAS DE GLÁNDULA MAMARIA TRANSFECTADAS (Q6 GM) Y NEOPLÁSICAS (Q6 IM) ELEGIDAS AL AZAR

Nucleolos	Células Q6 GM	Células Q6 IM
1	1,5	2,0
2	1,6	2,7
3	1,7	2,8
4	1,7	3,0
5	1,9	3,1

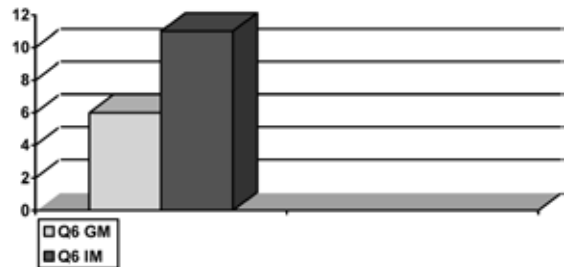


Figura 3. Evaluación de las fracciones volumétricas (%) de nucleolos pertenecientes a células transfectadas (Q6 GM) y neoplásicas (Q6 IM) perteneciente a glándula mamaria.

En este mismo contexto, la Tabla I describe claramente la diferencia expresada en micrones cuadrados de las áreas de nucleolos perteneciente a 5 células Q6 IM elegidas al azar, pudiéndose precisar nuevamente que el organelo es evidentemente mayor que los encontrados en las 5 células en proceso de transfección.

Finalmente, en la Tabla II se evidencia con precisión y se reafirma la acentuada diferencia expresada en micrones correspondiente a la longitud de nucleolos encontrada al evaluarse el organelo, tanto en células recién transfectadas, como definitivamente neoplásicas y evidentemente mayor en estas últimas.

DISCUSIÓN

De acuerdo al dogma fundamental de la biología molecular, la información contenida en la secuencia nucleotídica de las hebras del DNA, se expresan o transcriben en moléculas simples originando los tipos de RNAs, entre ellos el ribosomal, el cual junto con proteínas provenientes del citoplasma originan las ribonucleoproteínas que conformarán el o los nucleolos. Por tanto, este organelo contiene las materias primas para la biogénesis de los ribosomas, componente celular donde será leído el mensaje que porta el RNA mensajero para la formación de nuevas proteínas y por ello, en términos genéricos, es posible argumentar que: *"grandes nucleolos o mas de uno indica que aquel tipo celular tendrá probabilidad de formar nuevos ribosomas y la célula se especializará en efectuar síntesis proteica"* (7).

Considerando los resultados obtenidos, derivados de la cuantificación morfométrica de los valores pertenecientes a los nucleolos presentes en los tipos celulares Q6 GM y Q6 IM, se puede concluir definitivamente que el tipo celular francamente neoplásico se caracteriza por presentar nucleolos voluminosos y cuantitativamente mayores, tanto en lo relativo a las fracciones volumétricas como áreas y longitudes en relación a los evaluados en la célula recién transfectada con el ras.

En este contexto, entonces, en las células Q6 IM la presencia de grandes nucleolos les imprimen características de generadoras de una elevada tasa de biogénesis ribosomal y por tanto esta célula se caracteriza por su elevada actividad sintetizadora de proteínas. Esta afirmación tiene validez puesto que como ha sido demostrado que esta célula neoplásica efectúa mecanismos mitóticos sucesivos y desregulados, para lo cual, básicamente ribosomas libres y minoritariamente adheridos a la membrana del retículo endoplasmático, deben sintetizar grandes cantidades de proteínas correspon-

dientes para efectuar dichos procesos de división celular.

Efectivamente, puesto que datos morfométricos muestran que las fracciones volumétricas de retículo endoplasmático rugoso, evaluada en ambos tipos celulares, describe que Q6 IM presenta un volumen equivalente a 1,64% en tanto Q6 GM contiene 4,20%, es decir, triplicado con respecto a la célula neoplásica (8).

El dato morfométrico anterior es de gran importancia puesto que apunta entonces a definir el rol de los grandes nucleolos descritos en Q6 IM con respecto a la biogénesis ribosomal, donde efectivamente estos organelos sintetizados pasarán a formar parte de ribosomas libres del citoplasma, lugar donde serán sintetizadas las proteínas de consumo interno responsables de la progresión de la división celular, como por ejemplo: tubulina para la biogénesis microtubular de las fibras del huso mitótico y/o enzimas necesarias para colonizar diferentes tejidos blancos en las correspondientes metástasis, entre otras proteínas (9).

Concomitante con este hecho, ha sido ya demostrado que estas células presentan fracciones volumétricas de eucromatina en porcentajes muy elevados, evidenciando, que la expresión génica para codificar ARN ribosómicos y proteínas para la progresión del proceso mitótico de este tipo celular es también constante y elevada (10).

Por el contrario, la constitución nucleolar evaluada en células recién transfectadas con el ras, se interpreta como que la correspondiente biogénesis ribosomal genera ribosomas que serán mayoritariamente adheridos a las membranas del retículo endoplasmático rugoso (presente en volumen y porcentaje importante en Q6 GM), lugar en donde se sintetizarán, como ya fue expresado, tanto proteínas de exportación que constituirán parte de la matriz extra-celular, como mayoritariamente y en alto porcentaje, enzimas lisosómicas que constituirán estos organelos como cuerpos multivesiculares, presentes en gran cantidad y característicos de este tipo celular (11).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ball R, Friis R, Schoenenberger C, Doppler W, Groner B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120 kD protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J* 1988;7:2089-95.
2. Happ B, Hynes N, Groner B. Ha-ras and v-raf oncogenes, but not int-2 and c-myc interfere with the lactogenic hormone dependent activation of the mammary gland specific transcription factor. *Cell Growth Differ* 1993;4:9-15.

3. Schlatter B, Waghorne C. Persistence of Ha-ras- induced metastatic potential of SPI mammary tumors despite loss of the Ha-ras shuttle vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9986-90.
 4. Reuther G, Der C. The ras branch of small GTPases: ras family members don't fall far from the tree. *Curr Op Cell Biol* 2000;12(2):157-65.
 5. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Alvarez M, Fraile B, Anadon R, Saez F. *Biología Celular* Editorial Interamericana- McGraw-Hill, 2007. p387.
 6. Weibel E. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969;26:235-302.
 7. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana, 2003, p622.
 8. Cornejo R. Tesis de Doctorado. Universidad de Sao Paulo, Brasil, 1996, p127.
 9. Kampfer S, Hellbert K, Villunger W, Doppler W, Baier G, Grunicke H, Uberall F. Transcriptional activation of c-fos by oncogenic Há-ras in mouse mammary epithelial cells requires the combined activities of PKC-lambda, épsilon and zeta. *EMBO J* 1998;17(14):4046-55.
 10. Marte B, Jeschke M, Graus-Porta D, Hofer P, Groner B. Neu differentiation factor heregulin modulates growth and differentiation of HC11 mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1995;9(1):14-23.
 11. Cornejo R. Análisis morfométrico de lisosomas: Marcadores de transformación celular del epitelio mamarario. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2009;74(2):83-7.
-