

Trabajos Originales

LAS MITOCONDRIAS EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR DEL EPITELIO MAMARIO

Ricardo Cornejo U.

Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco.
Biólogo Celular, PhD.

RESUMEN

Antecedentes: La adquisición del fenotipo metastático es el resultado de la potente acción generada por oncogenes transformantes sobre una célula normal los cuales con la consiguiente expresión de oncoproteínas determinan drásticos cambios tanto en la morfología como en los volúmenes de los componentes celulares, generando una célula con diferente funcionalidad. Este mecanismo corresponde a la transformación celular. *Objetivo:* Precisar las modificaciones que caracterizan al mecanismo transformante en células de epitelio mamario transfectado con el oncogén ras (HC11ras) en comparación con su tipo celular normal (HC11GM). *Método:* Se estudió con microscopía electrónica de transmisión aplicando técnicas morfométricas a estos tipos celulares con énfasis en las mitocondrias, cuantificando variaciones del organelo generador de energía. *Resultados:* Todos los parámetros mitocondriales evaluados en el tipo celular transformado presentan diferencias significativas con respecto a la célula normal. *Conclusión:* Las drásticas modificaciones experimentadas por las mitocondrias se reflejan en la adquisición de nuevos requerimientos energéticos y metabólicos en la célula transformada.

PALABRAS CLAVE: ***Transformación celular, mitocondrias, morfometría***

SUMMARY

Background: The acquisition of the metastatic phenotype is the result of the transforming oncogene powerful action over a normal cell which with the subsequent oncoprotein expression leads to drastic changes in morphology as well as in cell components volumes, generating a cell with a different function. This mechanism relates to the cell transformation. *Objective:* To specify the modifications that characterize the transforming mechanism in mammary epithelial cells transfectated with the ras oncogene comparing them with its normal cell type. *Method:* Transmission electronic microscopy using morphometric techniques was applied to this cell types, emphasizing mitochondria variations, trying to clarify its role in each cell type metabolism. *Results:* Everyone mitochondrial parameters examined in transformed cell type present significant differences regarding to the normal cells. *Conclusion:* The drastic changes in mitochondria are reflected in the acquisition of new energy requirements and metabolism in the transformed cell.

KEY WORDS: ***Cellular transformation, mitochondria, morphometry***

INTRODUCCIÓN

Las células HC11 constituyen una línea de epitelio mamario normal derivada del linaje COMMA 1D, obtenidas de glándula mamaria de ratas BALB/c en mitad de preñez, que se disponen en contacto estrecho y formando un epitelio cúbico en monocapa. Estas células retienen características de la diferenciación normal de la glándula y sintetizan β caseína, la principal proteína de la leche (1).

Estas células mamarias normales y en etapa de proliferación, reciben las estimulaciones del EGF, agente mitogénico que se une con un receptor tirosina quinasa a nivel de la membrana plasmática fosforilando proteínas citoplasmáticas, etapa fundamental en el desarrollo de la respuesta mitogénica (2).

En medida que se realiza la introducción en las células HC11 de vectores de expresión de la proteína oncogénica Ha-ras estas asumen diferentes propiedades dando origen a un tipo celular modificado y con características neoplásicas (3,4).

En el transcurso de la transformación entre células que solo proliferan (HC11 GM) y aquellas que sufren mitosis consecutivas y desreguladas (HC11 ras), la energía celular posee un rol fundamental, siendo responsable tanto de las actividades mitóticas reguladas como del gasto energético correspondiente a la inducción mitogénica alterada (5). En este contexto, considerando que la mitocondria es el responsable del suministro del aporte energético de las células (6,7), pareció importante determinar desde el punto de vista cualitativo y morfológico, las variaciones que este organelo presenta durante el mecanismo de transformación celular.

MATERIAL Y MÉTODO

Microscopía electrónica de transmisión. Al pellet que contenía las células HC11 GM y HC11ras 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 post-fijación 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 micrografieron cada uno de los tipos celulares, con un aumento de 23.000 X. Para la evaluación de las fracciones volumétricas mitocondriales, 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 dichos organelos, calculándose la fracción volumétrica que ocupa, mediante la siguiente ecuación:

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

Donde:

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 mitocondrial fue utilizado el software Sigma Scan Pro 5.0.

RESULTADOS

Análisis cuantitativo. Las fracciones volumétricas correspondientes a las mitocondrias cuantificadas en los tipos celulares proliferativos y transformados se muestran en la Figura 1, evidenciando que las cantidades de energía utilizada en los mecanismos específicos y característicos de cada célula es absolutamente diferente, duplicada en las células transformadas, mas aún, estudiadas y cuantificadas tanto las longitudes y áreas que poseen las mitocondrias (elegidas por azar) como en el número de organelos evaluados en las células HC11 GM y HC11 ras, indican que existen marcadas diferencias, situación evidenciada claramente en la Tablas I, II y III, respectivamente.

Análisis morfológico. Las mitocondrias pertenecientes a la célula proliferante se caracterizan por distribuirse al azar en todo su citoplasma, presentando una estructura básicamente fusiforme y/o elíptica con numerosas crestas aplanadas o tubulares incluidas en una matriz tanto homogénea y traslúcida como densa y vacuolizada (Figura 2). características de aquellas involucradas en síntesis esteroideal.

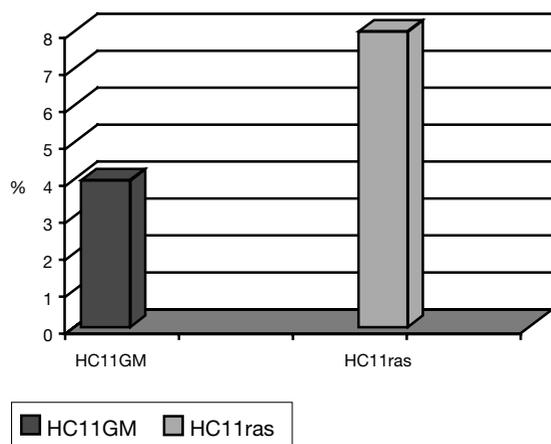


Figura 1. Fracciones volumétricas (%) correspondientes a mitocondrias cuantificadas en células mamarias proliferantes (HC11 GM) y transformadas (HC11 ras).

Tabla I
EVALUACIÓN DE LA LONGITUD (μ) DE 5 MITOCONDRIAS PERTENECIENTES TANTO A CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTES (HC11 GM) COMO TRANSFORMADAS (HC11 ras)

Mitocondrias	Células HC11 GM	Células HC11 ras
1	0,034	1,00
2	0,52	1,30
3	0,78	1,34
4	0,86	1,39
5	1,08	2,39

Tabla II
ÁREA MITOCONDRIAL (μ^2) EVALUADAS EN 5 CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTES (HC11 GM) Y TRANSFORMADAS (HC11 ras)

Mitocondrias	Células HC11 GM	Células HC11 ras
1	1,71	3,40
2	1,83	5,24
3	1,94	8,77
4	2,13	9,47
5	2,60	11,51

Tabla III
NÚMERO DE MITOCONDRIAS CUANTIFICADAS EN 5 CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTE (HC11 GM) Y TRANSFORMADAS (HC11 ras)

Mitocondrias	Células HC11 GM	Células HC11 ras
1	9	25
2	22	43
3	25	49
4	33	54
5	35	59

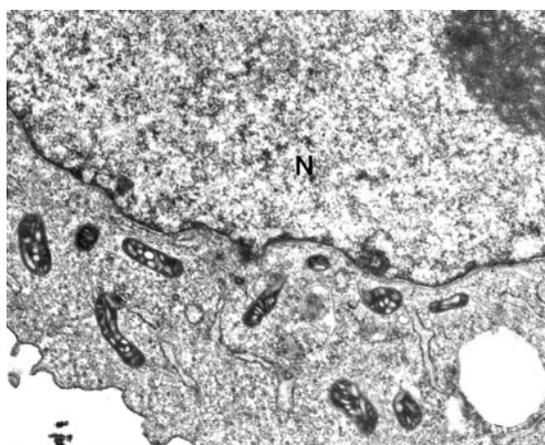


Figura 2. Sección de micrografía electrónica correspondiente a núcleo (N) y citoplasma de célula mamaria proliferante (HC11 GM), evidenciando morfología mitocondrial. 23.000 X.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 3 las mitocondrias encontradas en la célula transformada presentan formas variadas tanto circulares como fusiformes que contienen sinnúmero de crestas aplanadas incluidas en una matriz particularmente translúcida. Sin embargo, una clara diferencia con las encontradas en la célula HC11 GM se establece en una acentuada vacuolización mitocondrial resultado de pérdida de sus propiedades osmóticas que le provocan este hinchamiento (flechas)

En las mitocondrias pertenecientes tanto a células proliferantes como a las transformadas no fue posible evidenciar granulaciones correspondientes a calcio, estroncio, bario u otro constituyente almacenable, característico de la matriz mitocondrial.

DISCUSIÓN

Las mitocondrias como organelos generadores

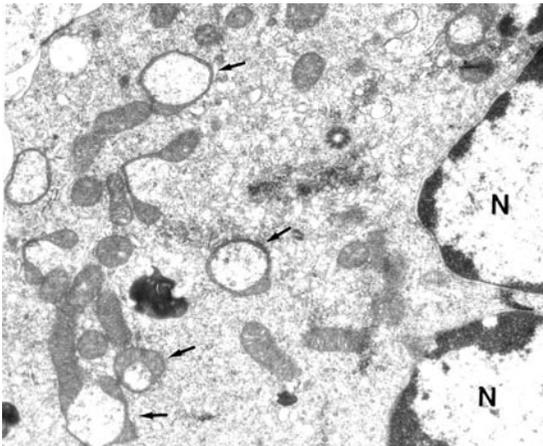


Figura 3. Sección de micrografía electrónica correspondiente a núcleo (N) y citoplasma de célula mamaria transformada (HC11 ras), evidenciando morfología mitocondrial normal y modificada (flechas). 23.000 X.

de la energía poseen un rol fundamental en numerosos e importantes funciones celulares entre los cuales se destacan la mitosis, crecimiento, energía para el metabolismo, apoptosis, diferenciación y transformación celular (8).

Considerando los resultados obtenidos al comparar morfológicamente células HC11 GM con HC11ras, se observa claramente que las mitocondrias sufren diversas modificaciones con el decorrer del mecanismo de transformación resultando evidente un drástico aumento tanto en el volumen, número, en la longitud y en las áreas de estos organelos. Este considerable aumento, sin duda, es responsabilidad de los acentuados requerimientos energéticos proveniente de la inducción mitogénica descontrolada provocada por el oncogen ras (9,10).

En directa relación con el hecho descrito anteriormente, cabe consignar que la fracción volumétrica correspondiente al retículo endoplasmático rugoso encontrada y evaluada en las células transformadas es menor que la cuantificada en células normales, quizás como resultado de una exacerbación de la síntesis de proteínas específicas para enfrentar el consumo interno generado por los activos mecanismos mitóticos desregulados característico de este tipo celular transformado (11).

Los datos mostrados anteriormente son coincidentes a los comunicados por otros investigadores (12) los cuales han evaluado morfológicamente tanto volumen como número de mitocondrias en células epiteliales visualizando un considerable aumento de estos parámetros respecto al organe-

lo y asegurando que estos cambios cuantitativos mitocondriales son evidentemente reflejo de alteraciones en el metabolismo de las células durante procesos que se traducen en variaciones morfofuncionales.

CONCLUSIÓN

La evaluación de las mitocondrias evaluadas en células transformadas mediante las consiguientes técnicas morfológicas expresan notable incremento en: número, áreas, longitud y volumen y que entonces, estos drásticos aumentos en todos los parámetros cuantificados, determinan un sólido marcador del proceso de transformación celular en este epitelio mamario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marte BM, Jeschke M, Graus-Porta D, Taverna D, Hofer P, Groner B, Yarden Y, Hynes, NE. Neu differentiation factor heregulin modulates growth and differentiation of HC11 mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1995;9:14-23.
2. Normanno N, Ciardello F. EGF related peptides in the pathophysiology of the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997;2:143-51.
3. Egan S, Wright J, Greenberg A. Molecular determinants of metastatic transformation. *Environ Health Perspect* 1991;93:91-5.
4. 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.
5. Russo J, Tait L, Russo I. Morphological expression of cell transformation induced by c-Ha-ras oncogene in human breast epithelial cells. *J Cell Sci* 1991;99:453-63.
6. Tandler B, Hoppel C. *Mitochondria*; Academic Press, Londres; 1972; 6-34.
7. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana, Madrid España, 2003; 622-31
8. Alirol E, Martinou J. Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? *Oncogene* 2006;7:4706-16
9. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779-827.
10. Cornejo R. Análisis morfológico y ultraestructural de componentes asociados a síntesis proteica en células mamarias normales y transformadas. *Int J Morphol* 2004;22:221-4.
11. Cornejo R. Variaciones de componentes celulares en epitelio mamario transfectado con el oncogén ras. *Rev Chil Cs Med Biol* 2002;12:13-6.
12. White F, Gohari K. Stereological studies of differentiation in hamster cheek pouch epithelium: variations in the volume and frequency of mitochondria. *J Anat* 1983;136:801-19.