

## Trabajos Originales

## ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LISOSOMAS: MARCADORES DE TRANSFORMACIÓN CELULAR DEL EPITELIO MAMARIO

Ricardo Cornejo U. <sup>a</sup>

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

<sup>a</sup> Biólogo Celular, PhD.

## RESUMEN

*Antecedentes:* Transformación celular es el mecanismo resultante 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. *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 los lisosomas, cuantificando variaciones del organelo responsable de la digestión celular. *Resultados:* Todos los parámetros lisosomales evaluados en el tipo celular transformado presentan diferencias significativas con respecto a la célula normal. *Conclusión:* Las drásticas modificaciones experimentadas por los lisosomas se reflejan en la adquisición de nuevas funcionalidades en la célula transformada.

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

## SUMMARY

*Background:* Cellular transformation is the result mechanism of powerful action generated by transforming oncogene 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. *Objective:* To specify the modifications that characterizes 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 lysosomes variations, trying to clarify its role in each cell type metabolism. *Results:* Everyone lysosomal parameters examined in transformed cell type present significant differences regarding to the normal cells. *Conclusion:* The drastic changes in lysosomes reflected in the acquisition of new energy requirements and metabolism in the transformed cell.

KEY WORDS: **Cellular transformation, lysosomes, 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  $\beta$  caseína, la principal proteína de la leche (1).

Estas células mamarias normales y en etapa de proliferación reciben las estimulaciones del factor de crecimiento epidérmico (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 la 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 las variaciones de componentes producto de la acción oncogénica (HC11 ras), la funcionalidad lisosomal adquiere un rol fundamental siendo responsable tanto de las actividades digestivas derivadas de los mecanismos de fago y pinocitosis como producto del proceso autofágico (5). En este contexto, considerando que los lisosomas son responsables del proceso degradativo de sustancias derivadas del medio ambiente celular y propias del citoplasma (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 micrografiaron cada uno de los tipos celulares, con un aumento de 10.500 X. Para la evaluación de las fracciones volumétricas lisosomales, fue superpuesto 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:

$$F_v = \frac{P_i}{P_t}$$

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 lisosomal fue utilizado el software Sigma Scan Pro 5.0. Con el objetivo de determinar diferencias estadísticamente significativas los datos morfométricos fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas.

## RESULTADOS

*Análisis cuantitativo.* Las fracciones volumétricas correspondientes a los lisosomas cuantificadas en los tipos celulares proliferativos y transformados se muestran en la Figura 1, evidenciando que existe una clara diferencia en la tasa de mecanismos endocitóticos y autofágicos en cada célula. Aún más, estudiadas, cuantificadas y sometidos todos los resultados obtenidos a la prueba estadística de Wilcoxon para muestras no paramétricas, con un 95% de confianza y un error de 5%, considerando un  $p=0,42$  y  $0,43$  y considerando que esta prueba establece diferencias con un valor de  $Z=$  a  $2,032$  y  $2,023$  tanto para las longitudes y áreas que poseen los lisosomas (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.

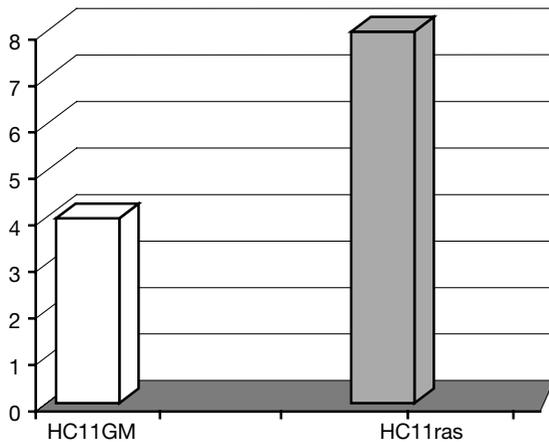


Figura 1. Fracciones volumétricas (%) correspondientes a lisosomas cuantificadas en células mamarias proliferantes (HC11 GM) y transformadas (HC11 ras).

**Tabla I**  
**EVALUACIÓN DE LA LONGITUD ( $\mu$ ) DE 5 LISOSOMAS PERTENECIENTES TANTO A CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTES (HC11 GM) COMO TRANSFORMADAS (HC11 ras)**

Lisosomas	Células HC11 GM	Células HC11 IM
1	0,57	1,30
2	0,63	1,40
3	0,70	1,54
4	0,90	1,74
5	0,95	1,90

**Tabla II**  
**ÁREA LISOSOMAL ( $\mu^2$ ) EVALUADAS EN 5 CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTES (HC11 GM) Y TRANSFORMADAS (HC11 ras)**

Lisosomas	Células HC11 GM	Células HC11 ras
1	2,5	9,6
2	2,9	10,3
3	3,2	12,7
4	4,6	14,5
5	5,3	16,6

**Tabla III**  
**NÚMERO DE LISOSOMAS CUANTIFICADOS EN 5 CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTE (HC11 GM) Y TRANSFORMADAS (HC11 ras)**

Lisosomas	Células HC11 GM	Células HC11 ras
1	2	10
2	2	14
3	3	18
4	5	21
5	6	23

*Análisis morfológico.* Los escasos lisosomas pertenecientes a la célula proliferante se caracterizan por distribuirse al azar en todo su citoplasma (Figura 2), presentando una estructura básicamente esférica y de pequeño tamaño destacándose la presencia de su estructura membranosa rodeando un lumen que puede aparecer tanto homogénea y translúcida como electrodensa (flechas). Por otro lado, como se muestra en la Figura 3 los múltiples lisosomas encontrados en la célula transformada se caracterizan por presentar gran tamaño, disponiéndose en toda la superficie citoplasmática, evidenciando formas variadas tanto circulares como ovoides y cuya característica principal es la de presentarse como cuerpos multivesiculares en cuyo interior aparecen restos de material producto de digestión celular (flechas).

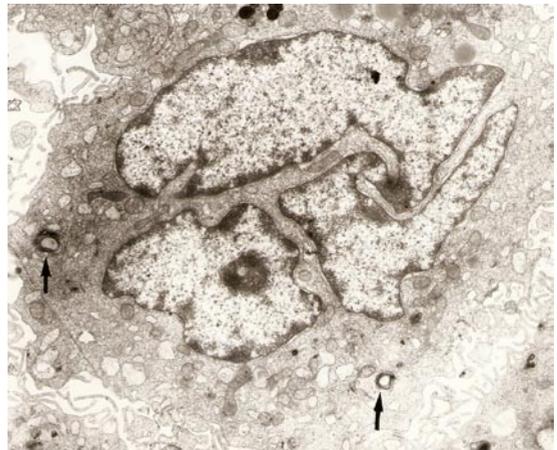


Figura 2. Micrografía electrónica correspondiente a una célula mamaria proliferante (HC11 GM), evidenciando la morfología de lisosomas (flechas) 10.500 X.

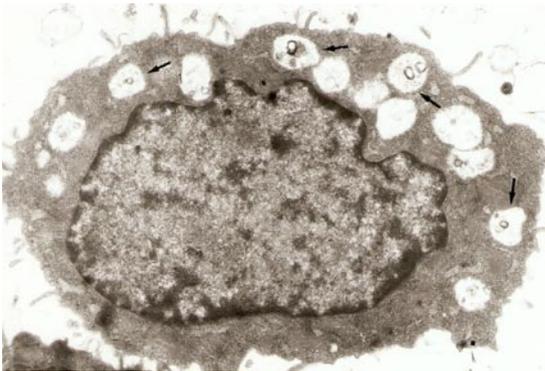


Figura 3. Micrografía electrónica correspondiente a una célula mamaria transformada (HC11 ras), evidenciando la morfología de lisosomas (flechas). 10.500 X.

## DISCUSIÓN

Los datos morfométricos aquí presentados describen que las células en proceso proliferativo y altamente indiferenciadas carecen de organelos, situación que concuerda con lo descrito en 1975 por Junqueira y Salles (8), en el sentido que han demostrado que las células indiferenciadas prácticamente no poseen organelos, incluyendo lisosomas, cuya traducción funcional en este caso, está representada por escasos mecanismos de endocitosis y autofagia.

En este mismo sentido Trump y cols (9), ya describían que la autofagia es un mecanismo característico de las células que siguen el curso normal de los procesos de diferenciación, abandonando las fases indiferenciadas de la mera proliferación y crecimiento celular.

Por otra parte, la transfección de estas células mamarias mediante el oncogén ras, se traduce en el cese inmediato de la síntesis láctea debido al bloqueo del factor de transcripción del gen de  $\beta$  caseína y con la consiguiente adquisición de un fenotipo neoplásico (10). Este dato es importante, puesto que en 1987 Fawcett (11) describió en epitelio mamario normal un aumento en el número de lisosomas en medida que sobreviene el término de la lactación, o sea, comenzando el período de involución de la glándula mamaria, evidenciándose, como en nuestros resultados, gran cantidad de lisosomas secundarios bajo la forma de cuerpos multivesiculares conteniendo porciones de organelos como retículo endoplasmático granular, mitocondrias o gránulos de secreción en su interior. Este proceso de autofagia tendría como objetivo una eventual remodelación de estas células transformadas.

En este mismo sentido, nuestros resultados muestran claramente que los lisosomas sufren diversas modificaciones con el decorrer del mecanismo de transformación, y resulta evidente un drástico aumento tanto en el volumen, número y longitud, como en las áreas de estos organelos. Estos datos son coincidentes con lo informado por Trump y cols (9), quienes plantean que cuando las células normales son sometidas a injurias sub-letales (tal como la transfección con el ras), se generan múltiples lisosomas producto de activos procesos autofágicos.

Visualizando las variaciones experimentadas por los lisosomas con el devenir del mecanismo de transformación, resulta obvio que corresponde al reflejo de alteraciones en el metabolismo de las células y por tanto, puede concluirse que la evaluación de este organelo, cuantificados en células transformadas, expresan notables incrementos y por tanto, estos drásticos aumentos en todos los parámetros cuantificados, determinan un sólido marcador del proceso de transformación celular en este epitelio mamario (12).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Marte BM, Jeschke M, Graus-Porta D, Taverna D, Hofer P, Groner B, *et al.* Neu differentiation factor he-regulin 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. Hynes N, Taverna D, Cairtona M, Stiefel U, Taverna D, Ball R, *et al.* The v-ras and Ha-ras oncogenes inhibit transcription from the beta-casein gene promoter by suppression of a mammary gland specific transcription factor. In: Li J. *Hormonal Carcinogenesis*. Berlin, Springer Verlag, 1993;164-71.
5. Darnell J, Lodish H, Baltimore D, *Molecular Cell Biology*. Editorial Scientific American Books, New York, 1990; 559-669.
6. Junqueira L, Carneiro J. *Biología Celular y Molecular*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Sao Paulo, 1997;99-101.
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. Junqueira L, Salles L. *Ultraestrutura e função celular*. Editorial Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, 1975;20-102.
9. Trump B, Berezsky I, Collan Y, Kahng M, Mergner W. ReZcent studies on the pathophysiology of ischemic cell injury. *Beitr Pathol* 1976;158:363-88.

10. 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.
  11. Fawcett D. *Tratado de Histología*. Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1987;240-36.
  12. Cella N, Cornejo R, Montes G, Hynes N, Chammas R. The lysosomal-associated membrane protein LAMP-1 is a novel differentiation marker for HC11 mouse mammary epithelial cells. *Differentiation* 1996;61:113-20.
-