

AISLAMIENTO *IN SITU* DE NUCLEOS DE CELULAS HELA

(INSOLATION *IN SITU* OF HELA CELLS NUCLEI)

por

MANUEL BUSTOS RUIZ y BALBINA MORALES REDONDO*

Introducción.

Desde hace algunos años es conocido que ciertos detergentes no iónicos son capaces de solubilizar las estructuras citoplasmáticas de células que crecen en monocapa en un cultivo de tejidos.

En nuestro laboratorio estudiamos la dinámica y funcionalidad de las intrusiones de la membrana nuclear en células *HeLa*, por ello nos interesa aislar núcleos para observar si dichas estructuras se mantienen al eliminar la interacción núcleo-citoplasma.

Por otro lado, la técnica empleada supone un gran ahorro de tiempo, así como una menor manipulación del material de estudio, con lo que se evita en mayor grado la introducción de artificios en la estructura nuclear.

Revisión bibliográfica.

Leduc y Wilson (1959) realizaron a microscopía electrónica un estudio sobre inclusiones intranucleares en hígado de ratón y en su hepatoma. Observaron que una dieta que contenga bentonina da lugar a invaginaciones de la membrana nuclear y comprobaron histoquímicamente que el contenido de dichas inclusiones es de origen citoplasmático.

En 1963, Bernhard y Granboulan estudiaron la ultraestructura de los núcleos de varias células cancerosas y observaron que las invaginaciones que contactan con el nucleolo pueden representar vías de intercambio núcleo-citoplasmático.

En un trabajo sobre ultraestructura nuclear de células *HeLa*, Blondel y Tolmach (1964) observaron diferencias morfológicas entre los núcleos en fase G1 y S.

* Sección de biología aplicada. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Recibido para publicación el 7-6-77.

BUSTOS, M. Y B. MORALES: AISLAMIENTO DE NUCLEOS DE CELULAS HELA.

También Nawa (1968) ha puesto de manifiesto que las diferentes concentraciones y distintos tipos de suero ejercen un efecto variable sobre la morfología nuclear de células *HeLa*.

Kellermayer y Josbt (1969) realizaron un estudio de la ultraestructura de varios tipos de núcleos de células en cultivo de tejidos, mediante técnicas de polarización óptica y no observaron ninguna invaginación de la membrana nuclear con el uso del fotomicroscopio.

Estos mismos autores, en 1975, ponen a punto la técnica de aislamiento de núcleos, en cultivo de células, mediante el empleo de detergentes no iónicos.

Material y métodos.

Se cultivaron células *HeLa* en medio de Eagle suplementado con 10 p. 100 de suero fetal bovino, estéril e inactivado. Se emplearon cultivos de 48 horas que habían crecido en frascos T-15 y tubos de Leighton.

Después de este tiempo se decantó el medio y las monocapas se lavaron dos veces sucesivas con P. B. S., y a continuación se añadió de forma estéril una solución de Triton-X-100 al 0,1 p. 100 en líquido de Hanks (pH 7,13). En estas condiciones se mantuvieron los frascos durante una hora y quince minutos, a una temperatura de 20 °C. Posteriormente se decantó la solución de Triton, se añadió P. B. S. para efectuar dos lavados, y luego se llevaba en medio de Eagle a 37 °C.

Las observaciones y fotomicrografías se realizaron con un microscopio invertido Nilkon, bajo contraste defases brillante.

Resultados y discusión.

Desde el momento del aislamiento de los núcleos hasta su total lisis, transcurre un período de 60 días. Durante este tiempo la morfología nuclear fue sufriendo cambios que pasamos a describir.

A las dos horas después de haber procedido al aislamiento, la mayoría de los núcleos quedaban perfectamente adheridos al fondo de los frascos de cultivo y con la morfología característica ovalada. Algunos presentaban restos citoplasmáticos contiguos y en comunicación con la membrana nuclear (figura c, flecha).

A diferencia de lo observado por Kellermayer y Jobst (1975), según los cuales las estructuras citoplasmáticas se solubilizan después de 20 minutos del tratamiento con detergente, nosotros hemos necesitado un tratamiento de mayor duración, posiblemente debido al pH empleado.

Después de 24 horas de incubación, se observaba cómo en las "monocapas nucleares", algunos núcleos adoptaban formas más o menos irregulares y otros dismi-

núan notablemente su tamaño, constituyéndose en formaciones muy densas de cromatina (figura d).

El comienzo de lisis nuclear comenzaba a observarse transcurridas 48 horas desde el aislamiento. En este mismo momento se observa una alta elevación en el porcentaje de núcleos de diámetro reducido (figura d).

A partir de entonces, los cambios morfológicos que aparecen son los mismos que enunciamos anteriormente, si bien el ritmo de aparición de procesos líticos y la condensación del nucleoplasma se hacen notablemente más lentos, de forma gradual, hasta los 60 días (figura e). En este tiempo sólo quedan algunos núcleos muy dispersos, pobres en cromatina, de forma más o menos esférica y adheridos aun en el frasco de cultivo.

Según Nawa (1968), la aparición de células *HeLa* binucleadas y multinucleadas (fenómeno que se considera como un proceso degenerativo), se ve influido notablemente por la concentración de suero y por los días de incubación del cultivo, de tal forma que una concentración del 10 p. 100 produce un aumento en la frecuencia de tales células al tercer día de incubación y un descenso paulatino a partir del cuarto día.

Se puede establecer un paralelismo entre los resultados expuestos por Nawa y los obtenidos en nuestra experiencia, ya que la secuencia del proceso degenerativo de los núcleos aislados comienza aproximadamente en el mismo momento en que aparece el aumento en la frecuencia de células binucleadas, al emplearse la misma concentración de suero.

Las observaciones al microscopio óptico, hechas por nosotros, no posibilitan ni resuelven, creemos, la identificación de invaginaciones e intrusiones de la membrana nuclear, bien porque desaparezcan en los núcleos aislados, bien por un poder resolutivo escaso. Estos resultados no coinciden con las imágenes obtenidas mediante el microscopio electrónico por Leduc y Wilson (1959).

También hemos de indicar que aparecen procesos de fragmentación nucleolar y que algunos nucleolos establecen contacto con la membrana (figura c), de acuerdo con lo que observaron Blondel y Tolmach (1964).

Dicho contacto no sólo ocurre en la célula entera, sino que permanece durante algunos días en los nucleolos aislados, por lo que pudiera ser que se formen pequeñas intrusiones de la membrana que comunicaran el nucleolo con el exterior; intrusiones que debido a su exiguo tamaño no es posible detectar, según la hipótesis de Bernhard y Granboulan (1963).

Resumen.

A microscopía óptica, con contraste de fases, se estudian las modificaciones de núcleos de células HeLa, aislados *in situ* mediante el empleo de Triton X-100. Se observa una permanencia de las estructuras hasta los 60 días después del aislamiento.

El procedimiento no se muestra eficaz para la resolución de intrusiones e invaginaciones de la membrana nuclear.

Summary.

By optical microscope with phase contrast we have studied the modifications of nuclei from HeLa cells isolated *in situ* by means of Triton X-100. We remark the structure continuance until 60 days after isolation.

The method not effective to resolve the inclusions and invaginations of the nuclear membrane.

Bibliografía.

- Bernhard, W. and N. Granboulan, 1963. --The fine structure of cancer cell nucleus. *Exp. Cell. Res.*, 9: 19-53.
- Blondel, B. and L. J. Tolmach, 1964. --Studies on nuclear fine structure. Three phases of the HeLa cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, 37: 497-501.
- Kellermayer, M. *et al.* 1969. --Polarization-optical study of the ultrastructure of cell nuclei in tissue cultures. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.*, 18: 131-137.
- and K. Jobst, 1975. --Cytoplasmatic protein network in HeLa cells. *Histochemistry*, 44: 193-195.
- Leduc, E. H. and J. W. Wilson, 1959. -- An electron microscope study of intranuclear inclusions in mouse liver and hepatoma. *J. Bioph. Bioch. Cytol.*, 6: 427-439.
- Nawa, T. 1968. --Effects of various kinds of sera and serum concentration on the nuclei of HeLa cells. *Med. J. Shinshu Univ.*, 13: 241-254.

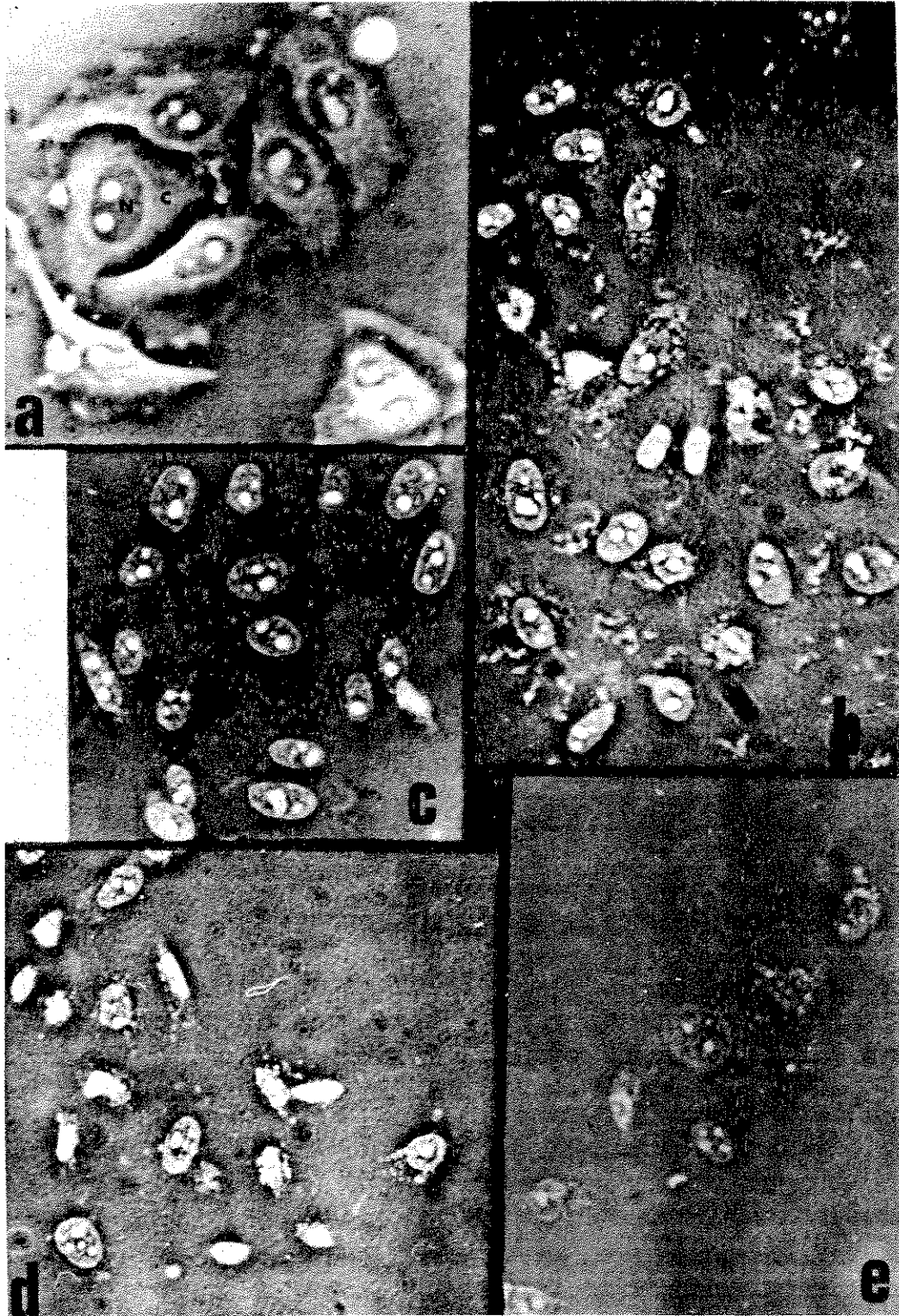


FIGURA 1. Explicación de la lámina: a) Detalle de células *HeLa in vivo* a las 48 horas de cultivo. b) Células en proceso de aislamiento nuclear. Nótese restos citoplasmáticos. 30 minutos de tratamiento con Triton. c) Núcleos aislados 2 horas después del aislamiento. Se observan escasos restos de citoplasma (flecha). d) A las 24 horas. Aparición de fenómenos líticos y condensación de cromatina. e) 60 días después del aislamiento. La mayoría de los núcleos se han lisado; persisten algunos núcleos con escasez de cromatina.

N-núcleo; C-citoplasma; Nu-nucleolos; R C- restos citoplasmáticos.

a, b, c, d, e: contraste de fases, x 200.