

II.—ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESISTENCIA MECANICA DE LA MEMBRANA NUCLEAR EN CELULAS GERMINALES Y SOMATICAS.

POR EL PROF. DR. GABRIEL GASIC L.

(Trabajo realizado en colaboración con Silvia Avilés, Instituto de Biología «Juan Noé» y Cátedra de Biología de la Facultad de Filosofía y Educación, Universidad de Chile).

El presente trabajo sólo es una comunicación preliminar de experimentos en curso destinados a estudiar algunas propiedades de la membrana nuclear, envoltura menos explorada que la membrana citoplasmática, por la posición interna del núcleo y dificultad de aislarlo. Métodos para preparar núcleos puros han sido descritos, sin embargo, desde 1868, fecha en que Miescher, por primera vez, los aísla de células del pus. Desafortunadamente, la mayoría de los métodos, o todos ellos, provocan cambios químicos o físicos acentuados de los componentes nucleares, no permitiendo su estudio biológico adecuado. Sólo, recientemente, se han dado a conocer técnicas que hacen posible la investigación de sustancias del núcleo tan sensibles como las proteínas y los enzimas (1,2).

También se ha podido aislar este órgano celular, usando el micromanipulador, lo cual será ilustrado gráficamente con una película proporcionada gentilmente por el Dr. Commandon del Instituto Pasteur de París. (1)

El uso de todos estos métodos han contribuido al conocimiento químico del contenido nuclear, objetivo principal de numerosas investigaciones, sin embargo, pocos estudios se han hecho destinados a conocer mejor la constitución química de la membrana nuclear y su fisiología en relación con los intercambios que ocurren entre el núcleo, depositario de los genes, y el citoplasma, zona intermedia, donde tienen lugar los cambios impuestos por la herencia y el medio ambiente.

En el curso de ensayos para preparar núcleos de ovocitos del erizo negro de mar *Tetrapygyus niger*, (Molina, 1872), a fin de estudiarlos químicamente, fué descubierto que los núcleos de esta célula eran muy frágiles a la acción mecánica de un agitador de alta

(1) La conferencia fué seguida de la proyección de la película mencionada. (Nota de la Redacción).

velocidad, a pesar de haber sido tratados con una solución de ácido cítrico que les confiere resistencia y de haberse hecho el experimento en una cámara a 0° C. (1). Después de varias tentativas infructuosas, en las que fueron modificadas las técnicas en uso, se quiso saber si otros núcleos del mismo animal ofrecían iguales dificultades para su aislamiento. Se pudo establecer prontamente que los núcleos del espermio y de las células de la pared intestinal, a diferencia de los núcleos de los ovocitos, podían resistir la fuerza mecánica empleada, aún cuando no se usara una solución de ácido cítrico. En esta forma se ha logrado obtener, aunque no completamente al estado puro, núcleos de células intestinales, usándose como líquido de suspensión agua de mar. A pesar de que los núcleos de los espermios resisten grandemente la acción del agitador mecánico, no resulta fácil de aislarlo del resto de los componentes citoplasmáticos. Esto ha sido conseguido, al parecer, por Zittle y Zitin, utilizando entre otros métodos, el vibrador sónico (3).

Estos primeros resultados, conseguidos después de aplicar procedimientos mecánicos uniformes, indicaban que la membrana nuclear presentaba una resistencia diferente, según el tipo de célula sometido al tratamiento mencionado.

Al tratar de interpretar el comportamiento de estos diversos núcleos frente a la acción mecánica, se pensó que las diferencias observadas podrían depender de la intensidad del metabolismo, ya que el ovocito en crecimiento es más activo que el espermio. Esto, sin embargo, no se podía aparentemente sostener, pues en la literatura había información de núcleos bastante resistentes a manipulaciones mecánicas ubicados en células de intensa actividad metabólica como son las células hepáticas de mamíferos (4). Además, en este trabajo, los núcleos de las células secretoras intestinales del erizo de mar se revelaron igualmente resistentes.

Teniendo presente que los núcleos de los ovocitos del *T. niger* son vesiculosos —una característica general de estas células germinales—, y que los núcleos de los espermios y de ciertas células intestinales son compactos o con mayor cromatina, se supuso que podría existir cierta relación entre la resistencia mecánica de la membrana nuclear y la riqueza cromatínica. Revisando la literatura, Churney indica que la envoltura del núcleo está formada probablemente por proteínas ricas en ácidos aminados básicos, pues su punto isoeléctrico muy elevado se acerca a aquel que muestra la histona del núcleo (5). Esto sugería que esta sustancia química tal vez pudiera participar en la constitución de la membrana nuclear. Como no fuera posible determinar la histona con el método citológico descrito por Pollister y Ris (6), debido a limitaciones materiales, se procedió a estudiar cualitativamente al microscopio el ácido timonucleico en diferentes núcleos, teniendo en consideración que

esta sustancia está unida a la histona, formando una de las núcleo-proteínas cromosómicas. Con este objeto, se usó la coloración de Feulgen y también la de Unna.

Un estudio preliminar de cortes histológicos de las gónadas y del intestino del erizo negro de mar, reveló inmediatamente que el núcleo de los ovocitos al término de su crecimiento era pobrísimo en ATN y que los núcleos de los espermios mostraban gran riqueza de este componente (es de interés notar que ambos gametos se originan de células goniales con discreta cantidad de ATN, pero en el curso de la gametogénesis las células femeninas pierden esta sustancia mientras que los elementos germinales masculinos la forman en considerable cantidad). El otro órgano examinado, el intestino, evidenció núcleos con una disposición variable del ATN, presentándose en los pequeños en toda la superficie y en los grandes, en la periferia y alrededor de los nucléolos, principalmente.

Los mismos métodos de tinción se aplicaron a frotis de triturados celulares provenientes de los órganos mencionados, para investigar la integridad o destrucción de los núcleos liberados y la presencia y disposición del ATN. Al cabo de 30 segundos de trituración, se observó total destrucción de los núcleos de los ovocitos, conservando aparentemente su integridad los núcleos de las otras células investigadas. Llamó especialmente la atención la resistencia de los espermios, los cuales mantuvieron en apariencia íntegra su morfología al término del tiempo indicado, mostrándose aún móviles. Sometidos a trituraciones por mayor tiempo, hasta 15 minutos, y examinados al fresco no dieron muestra de ser destruidos, al menos morfológicamente. Desde el punto de vista químico, los núcleos liberados o las cabezas de espermios dieron coloraciones semejantes a aquellas observadas en los cortes histológicos.

En vista de estos resultados obtenidos en el erizo de mar, se consideró de interés investigar el comportamiento de núcleos de otras especies, incluyendo uno o más representantes de los flagelados, peces, anfibios y mamíferos.

Un estudio muy preliminar de este material, confirmó la fragilidad de la membrana nuclear de los ovocitos en la rana (*Calyptocephalus gayi*) y en la pescada (*Merluccius gayi*) y mostró que los núcleos que contienen ATN revelaban una resistencia mecánica variable. Suspendiendo células en su medio isotónico natural en una cámara a 0° C y sometiendo a éstas por un tiempo variable a la acción mecánica, se vió que los núcleos de las células nerviosas presentaban una resistencia comparativamente mayor que los núcleos de las células hepáticas y de los linfocitos. Esto se pudo observar, al menos, en la ternera y en el conejo. El tiempo necesario para la destrucción total de los núcleos de las células hepáticas fué más o menos igual en estas especies y en la rana, y al parecer algo mayor que en el caso de los linfocitos.

En los triturados de órganos se puso también de relieve una gran resistencia de los núcleos de los capilares sanguíneos y de las células conjuntivas de sostén, evidenciando estos núcleos en general una distribución aparentemente uniforme del ATN, pero en estos casos, como en los espermios, resulta algo difícil relacionar la resistencia con la cantidad de esta sustancia, pues no se han obtenido núcleos libres.

Gracias a la gentileza del Dr. Tulio Pizzi, de la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Chile, se pudo también estudiar la resistencia de los núcleos del *Trypanosoma cruzi* y conjuntamente con este investigador se observó que el ATN se dispone en la periferia del macronúcleo, formando un rodete, y que en el microcinetonúcleo, se halla distribuido en toda la superficie. Trabajando en las condiciones usuales, el microcinetonúcleo en este experimento preliminar, no pareció mostrarse más resistente que el macronúcleo.

De todos los resultados relatados, merece destacarse especialmente la resistencia observada en los núcleos de las células nerviosas, que por su aspecto vesiculoso se parecen mucho a los núcleos de los ovocitos. Por esta semejanza, se pensó en un primer momento que serían también muy frágiles, pero para sorpresa de los autores pronto se puso de relieve que tenían una resistencia mayor aún que la de los núcleos de las células hepáticas, mencionados especialmente en la literatura por esta propiedad.

Al buscar una explicación a este hecho —pues originariamente se había supuesto que la resistencia dependería de la cantidad de ATN por unidad de volumen— se descubrió que este fenómeno guardaba más bien relación con la distribución de esta sustancia. Como se puede ver en las figuras que se proyectan, los núcleos de las células nerviosas a diferencia de los núcleos de los ovocitos muestran en la periferia un rodete de ácido timonucleico adosado a la superficie interna de la membrana nuclear. Observando éste con mayor detención, en distintos planos, se tiene la impresión que esta capa de revestimiento interno formara un canastillo esférico. Contrastante con este aspecto, la vesícula germinal carece totalmente de esta envoltura y junto con ello muestra una gran fragilidad. Extendiendo esta investigación a otros núcleos, todavía no completada y sujeta a confirmación futura, se apreció en los cortes de tejidos que el ATN se dispone en bloques en los linfocitos maduros y periféricamente en los linfocitos jóvenes y en las células renales y hepáticas.

De estas observaciones se desprende que la disposición periférica del ATN, formando un revestimiento más o menos continuo, estuvo relacionada en los experimentos efectuados con la mayor resistencia. Esta correlación parece existir también en materiales no usados por los autores, como resulta de comparar la estructura cromatínica del núcleo de las amibas y la resistencia que muestra

éste a las manipulaciones mecánicas, según los trabajos del Dr. Commandon. Por una feliz coincidencia se puede proyectar en esta oportunidad una película filmada por este investigador francés sobre injerto y remoción de núcleos en amebas —cedida graciosamente al Instituto de Biología «Juan Noé»—, y algunos diapositivos del Prof. Neghme sobre núcleos de estos protozoos. En estos últimos se puede ver que la cromatina forma una especie de costra por dentro de la membrana nuclear y en derredor al centro cinético, disposición que guarda grandes semejanzas con los núcleos de las células nerviosas y que refuerzan las observaciones de este trabajo.

Establecida esta relación, los problemas que surgen son los siguientes: ¿En qué forma la presencia y distribución del ATN condiciona la resistencia de la membrana nuclear y cómo se explican las variaciones de ésta en los distintos núcleos? ¿Qué importancia biológica tiene este fenómeno en fisiología celular?

Sin descartar la posibilidad de que el ATN contribuya a la síntesis de proteínas que forman la membrana nuclear, teniendo ésta un espesor variable según los casos, es muy probable que el ácido mencionado, altamente polimerizado, refuerce físicamente esta envoltura por dentro, debido a su capacidad de formar estructuras muy resistentes como son los cromosomas y que soportan grandes tracciones (7). La magnitud de la resistencia, por otra parte, dependería también del número y manera de agruparse de las fibrillas submicroscópicas del ácido timonucleico, pues la propiedad estudiada tiene valores diferentes en los distintos núcleos hasta ahora investigados. Es posible todavía que existan variaciones fisiológicas de la resistencia dentro de una misma clase de célula.

Es digno de recalcar en este momento que los núcleos que evidencian ATN están entre aquellos que poseen cromosomas más o menos ricos en núcleo-histona y que esta fracción es la que puede experimentar cambios de volumen, extendiéndose o contrayéndose, según el líquido en suspensión, como lo han demostrado Mirsky y Ris en núcleos y cromosomas aislados (8). Probablemente, en los núcleos en permanente reposo como son los de las células cerebrales, incapaces de multiplicarse, los cromosomas están extendidos al máximo, disponiéndose el ATN en la parte más externa de éstos, en aquella porción que contacta con la membrana nuclear, para cumplir funciones metabólicas o funciones de defensa mecánica en este tejido tan vital. No se debe olvidar que el cerebro es un tejido muy frágil y que normalmente se halla protegido por una envoltura ósea. Si en casos especiales, un traumatismo llegara a lesionar el citoplasma de las células nerviosas, probablemente la resistencia mecánica que muestra el núcleo evite la destrucción total de éstas y permita su recuperación.

Una adaptación diferente necesitan en cambio los ovocitos, por lo menos en los huevos de ciertos invertebrados. Aquí la elimi-

nación de ciertas secreciones ovulares que activan los espermios y la capacidad de éstos de penetrar y fertilizar el huevo depende grandemente de que la membrana se rompa y libere el enquiema nuclear. Si esto no ocurre, no se eliminan las gamonas y tampoco tiene lugar la normal transformación del espermio dentro del huevo, no siendo posible la fertilización (9).

Para terminar, los autores de esta comunicación preliminar desean hacer presente que estas investigaciones se han llevado a cabo en corto tiempo y que no ha sido posible consultar toda la bibliografía del tema, por el reciente incendio que ha destruido la Escuela de Medicina, sin embargo, tienen la impresión que este trabajo sugiere un nuevo método de exploración de las funciones de la membrana nuclear, permitiendo tal vez conocer mejor su fisiología y sus relaciones con los cromosomas. Posiblemente, el fascinante problema del mecanismo de acción de los genes pueda ser abordado mejor cuando se logre avanzar en el estudio de la frontera celular, a través de la cual transitan mensajeros químicos que envía el núcleo —genéticamente estable— al citoplasma, moldeado por las fuerzas de la herencia y del medio ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Dounce, A. L. 1943. Enzyme Studies on Isolated Cell Nuclei of Rat Liver. *J. Biol. Chem.*, 147: 685.
2. Dounce, A. L. 1943. Further Studies on Isolated Cell Nuclei of Normal Rat Liver. *J. Biol. Chem.*, 151: 221.
3. Zittle, C. A. and Zitin, B. 1940. The amount and Distribution of Cytochrome Oxidase in Bull Spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, 144: 99.
4. Claude, A. 1941. Particulate Components of Cytoplasm. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 9: 263.
5. Churney, L. 1946. The Physico-Chemical Properties of the Nucleus. Univ. Pennsylvania. Bicentennial Conference, p. 113 (Citado por De Robertis, Nowinsky y Saez. *Citología General. El Ateneo. Buenos Aires*, p. 127).
6. Pollister, A. W. and Ris, H. 1947. Nucleoprotein Determination in Cytological Preparations. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 12: 147.
7. Ris, H. (Comunicación personal).
8. Ris, H. and Mirsky, A. E. 1949. The State of the Chromosomes in the Interphase Nucleus. *J. Gen. Physiol.*, 32: 489.
9. Wilson, E. B. 1924. *The Cell in Development and Heredity.* MacMillan, New York, p. 404.