

Revista Chilena de Historia Natural

No. 5.

1954

Año LIV.

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

(*) Por Prof. Dr. GABRIEL GASIC y Prof. SILVIA AVILES S. (*)

INTRODUCCIÓN Esta investigación tiene por objeto contribuir con un pequeño aporte al mejor conocimiento del núcleo, cuyas dos funciones capitales, son: 1) presidir los fenómenos de herencia y variación; y 2) dirigir el metabolismo celular, base de todas las otras actividades orgánicas.

Las funciones genéticas se cumplen a través de dos tipos de divisiones: la mitosis y la meiosis. La primera ocurre en las células somáticas y germinales inmaduras, y la segunda sólo tiene lugar en células de esta última línea, en vías de maduración.

Durante la mitosis se duplica el número diploide de cromosomas, recibiendo cada célula hija igual dotación de factores hereditarios. Durante la meiosis, las células resultantes no sólo reciben la mitad de los cromosomas somáticos, sino también distintas combinaciones de genes. En virtud de este diferente comportamiento, la mitosis ha sido llamada la división de la herencia, mientras que la meiosis es la división de la variación, salvo que sobrevengan mutaciones en las células durante la multiplicación mitótica.

La segunda gran función del núcleo es la metabólica, que se ejerce cuando éste está en el período de reposo divisional. Esta función ha podido estudiarse removiendo el núcleo. En estas condiciones, el citoplasma desprovisto de éste puede llevar a cabo ciertas funciones vitales, por un

(*) Cátedra de Biología Escuela de Medicina Universidad de Chile.

(*) Cátedra de Biología Instituto Pedagógico Universidad de Chile.

tiempo limitado. Si a una amiba se le extirpa el núcleo, puede seguir moviéndose por un tiempo — aunque en forma incoordinada — y aun puede, en determinadas circunstancias, ingerir y digerir alimentos. Pero sin núcleo, la amiba no puede crecer y tampoco puede mantener sus estructuras existentes. Gradualmente, la célula nucleada se hace más pequeña hasta que finalmente, después de 24 horas o más, se desintegra.

Sin embargo, si se injerta un núcleo antes de la completa muerte del citoplasma, éste recupera el metabolismo normal y junto con el núcleo injertado, crece y se divide (Experimento del Dr. Commandon) (1).

Esto también se observa en el óvulo anucleado, si es fecundado oportunamente con un espermio, el cual le aporta el núcleo reparador (2).

Los experimentos de enucleación indican que el núcleo es necesario si una célula quiere mantener su metabolismo constructivo; pero, precisamente, no se conoce el mecanismo de acción de los genes nucleares en el proceso de las síntesis citoplasmáticas. Ultimamente, algunos investigadores han emitido la idea de que el núcleo puede enviar al citoplasma duplicados de genes o sustancias precursoras de genes citoplasmáticos y que éstos participan en la elaboración de distintos enzimas específicos (3 y 4).

Tampoco se han olvidado las investigaciones encaminadas a obtener un mayor conocimiento de la composición química del contenido nuclear, estudios básicos para la interpretación de una serie de fenómenos biológicos. Estas investigaciones se han podido realizar, en gran parte, debido al perfeccionamiento de las técnicas usadas para aislar núcleos. Métodos para prepararlos puros han sido descritos desde 1868, fecha en que Miescher, por primera vez, los aísla de células del pus. Sin embargo, la mayoría o todos ellos provocan cambios químicos o físicos acentuados de los componentes nucleares, no permitiendo su estudio. 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 (5-6-7).

A pesar de los avances logrados en el campo de la cariología, pocos estudios se han hecho destinados a conocer mejor la constitución química de la membrana nuclear y su fisiología, estructura de importancia de 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.

Cabe destacar, también, el escaso conocimiento que se tiene del significado y del mecanismo de los cambios cíclicos que sufre la membrana nuclear en el curso de la mitosis y meiosis, en la mayoría de las especies. Por qué desaparece esta membrana al final de la profase y por qué se reconstituye durante la telofase? Qué participación tienen en este fenómeno los cromosomas y el citoplasma? Qué moléculas químicas toman parte en su constitución y de dónde provienen? He aquí algunos de los tantos problemas que uno puede plantearse.

Como paso preliminar al mejor conocimiento de esta membrana, se exponen aquí algunos experimentos exploratorios.

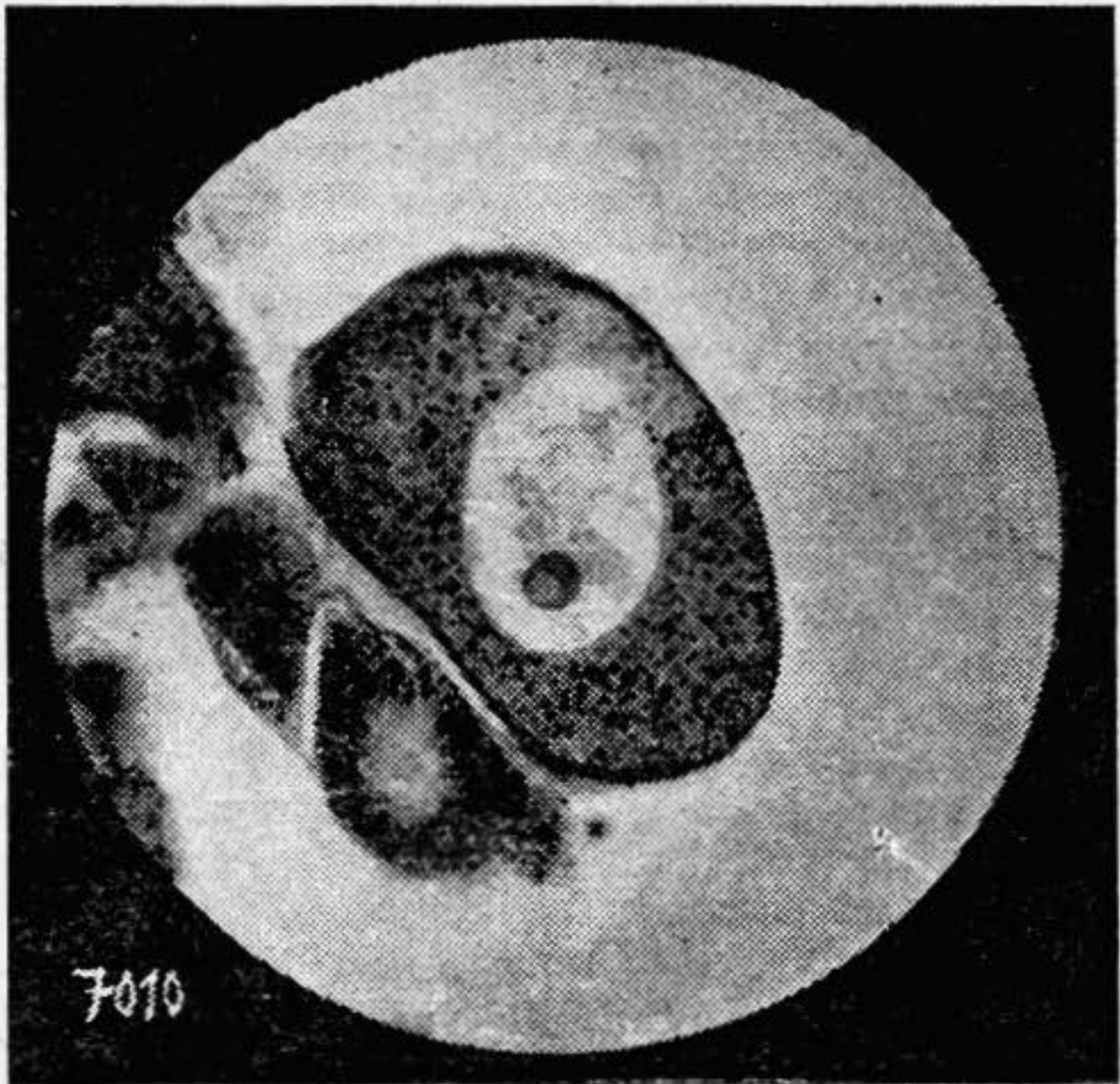


Fig. 1

Ovario de *T. niger*, corte teñido con Unna. Se aprecia la presencia de ácido ribonucleico en el nucléolo y citoplasma del ovocito.
Koritska - ocular 4 D.

En el curso de ensayos para preparar núcleos de ovocitos del erizo negro de mar *Tetrapygus niger* (Molina), 1782 (8), a fin de estudiarlos químicamente, fué descubierto que los núcleos de estas células eran muy frágiles

a la acción mecánica de un agitador de alta 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. (5).

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 rápidamente 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 la solución del 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 a la acción del agitador mecánico, no resulta fácil aislarlos del resto de los componentes citoplasmáticos. Esto ha sido conseguido, al parecer, por Zittle y Zitin, utilizando entre otros métodos el vibrador sónico. (9).

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.

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 resistencia mecánica de la membrana nuclear y la riqueza cromatínica. Revisando la literatura al respecto, vemos que 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 (10 y 11). 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 citoquímico descrito por Pollister y Ris (12), debido a limitaciones materiales, se procedió a estudiar cualitativamente al microscopio el ácido timonucleico en diferentes núcleos, teniendo en consideración que este ácido está unido a la histona, formando una de las nucleopro-

teínas cromosómicas. Con este objeto, se utilizó la coloración de Feulgen y la de Unna (13, 14, 15 y 16).

Para completar las observaciones realizadas en erizo negro de mar, se estimó de interés investigar el comportamiento de los núcleos de otras especies animales.

MATERIALES Y MÉTODO. Se utilizaron órganos de erizo negro de mar (*Tetrapygus niger*), pescada (*Merluccius gayi*), rana (*Calyptocephalus gayi*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y de ternera (*Bos taurus*). Parte de este material fué obtenido en la bahía de San Antonio y en el Matadero Municipal de Santiago, transportándose al laboratorio en las condiciones más frescas posibles. El resto, fué conseguido de conejo o de rana sacrificados por los métodos corrientes.

Para su mejor conservación, los erizos negros recién recogidos de las rocas fueron traídos a Santiago, al amanecer, colocándoseles inmediatamente en un acuario con agua de mar, fresca, traída diariamente del puerto vecino (*). Con el mismo objeto, los órganos de los animales recién sacrificados en el Matadero, fueron colocados en una bolsa de material plástico y transportados al laboratorio dentro de un termo con hielo.

Todos estos órganos, antes de ser triturados, fueron cuidadosamente disecados para eliminar envolturas capsulares y tejidos extraños, lavándoseles después con un líquido isotónico apropiado, siendo éste agua de mar para las especies marinas, Holtfreter al 10% para la rana (19) y suero fisiológico al 9 por mil, para el conejo y la ternera.

Previamente al tratamiento mecánico, se obtuvo un trozo de cada uno de los órganos indicados en el cuadro N.º 1, los que fueron fijados con Schaudinn y teñidos con hematoxilina-eosina, Van Gieson, Unna y Feulgen, de acuerdo con las instrucciones indicadas en la literatura (13, 14, 15, 16 y 17).

Para la trituración de estos órganos fué usado un agitador de alta velocidad. Este agitador está compuesto de un vaso de vidrio y de un motor eléctrico que acciona cua-

(*) Deseamos destacar en esta oportunidad la valiosa cooperación prestada por don Enrique Zúñiga, pescador de San Antonio en la recolección del material.

tro cuchillos en cruz, situados en el fondo del recipiente. De éstos, dos están incurvados hacia arriba y dos hacia abajo. La capacidad del vaso es de un litro. Al desmontar el vaso y medir la velocidad del eje transmisor del motor con un indicador de velocidad "Lightning", se encontró que el número de revoluciones ascendía a 17 mil por minuto. Los autores de esta investigación suponen que esta velocidad es más baja aproximadamente de 15 mil r. p. m. cuando el motor funciona con el vaso conectado, conteniendo unos 100 cc. de suspensión.

A fin de someter los núcleos a la fuerza mecánica cierta cantidad de órganos (más o menos 10 gr.) fué reducida a papilla mediante repetidos cortes de tijera, colocándose aquella dentro del vaso del agitador que contenía, previamente, diferentes líquidos isotónicos o ácido cítrico al 1 %, quedando finalmente una suspensión de la papilla del órgano al 10 %. En algunos casos, sólo se pudo emplear cantidades menores que 10 gr. como los casos del timo de conejo y de los órganos de erizo negro de mar, pero se mantuvo la proporción entre cantidad de órgano y cantidad de líquido de suspensión ya mencionada.

Todas estas manipulaciones se efectuaron en una cámara a 0° C, a fin de evitar la autólisis espontánea del material biológico. Las soluciones se conservaron suficiente tiempo en la cámara a 0° para que tuvieran esta baja temperatura al momento de emplearlas.

Colocada la suspensión de papillas de órganos en el agitador, ésta fué sometida a la acción mecánica del aparato, durante 30 segundos, 3, 5, 6 minutos o más, según los experimentos (ver cuadro N.º 1). Al comienzo, los cuchillos del dispositivo desmenuzan la papilla de órgano hasta liberar las células completamente y, luego después, la membrana citoplasmática de éstas es destruída principalmente por fuerzas de frotamiento y de torsión, que ocurren en distintos puntos dentro del vaso cuando los cuchillos accionan. Tales fuerzas se manifiestan entre estos cuchillos y la capa más interna del líquido, entre la pared del vaso y la capa externa de la suspensión; y también en las capas de líquido entre sí al girar éstas a distinta velocidad, según la magnitud de su radio. En esta forma, las capas externas rotan más rápidamente, mientras que las internas lo hacen menos velozmente. Debido a la disposición de los cuchillos, no actúan fuerzas de compresión.

Al cabo de cada uno de los tiempos de trituración, fué tomada una muestra de la suspensión con el objeto de

efectuar frotis, además de un examen a fresco, previa tinción con orceina acética, "Fast green" en solución acuosa y pironina en solución de sacarosa al 10 %. En algunos casos, los frotis fueron efectuados con sedimentos de esta suspensión obtenidos por centrifugación, durante 10 minutos a 3.700 r. p. m.

Estos frotis se fijaron con Schaudinn (18) y se tiñeron con los métodos ya mencionados para los trozos de tejidos.

De acuerdo con la hipótesis enunciada en la introducción de este trabajo, se trató de estudiar la resistencia me-

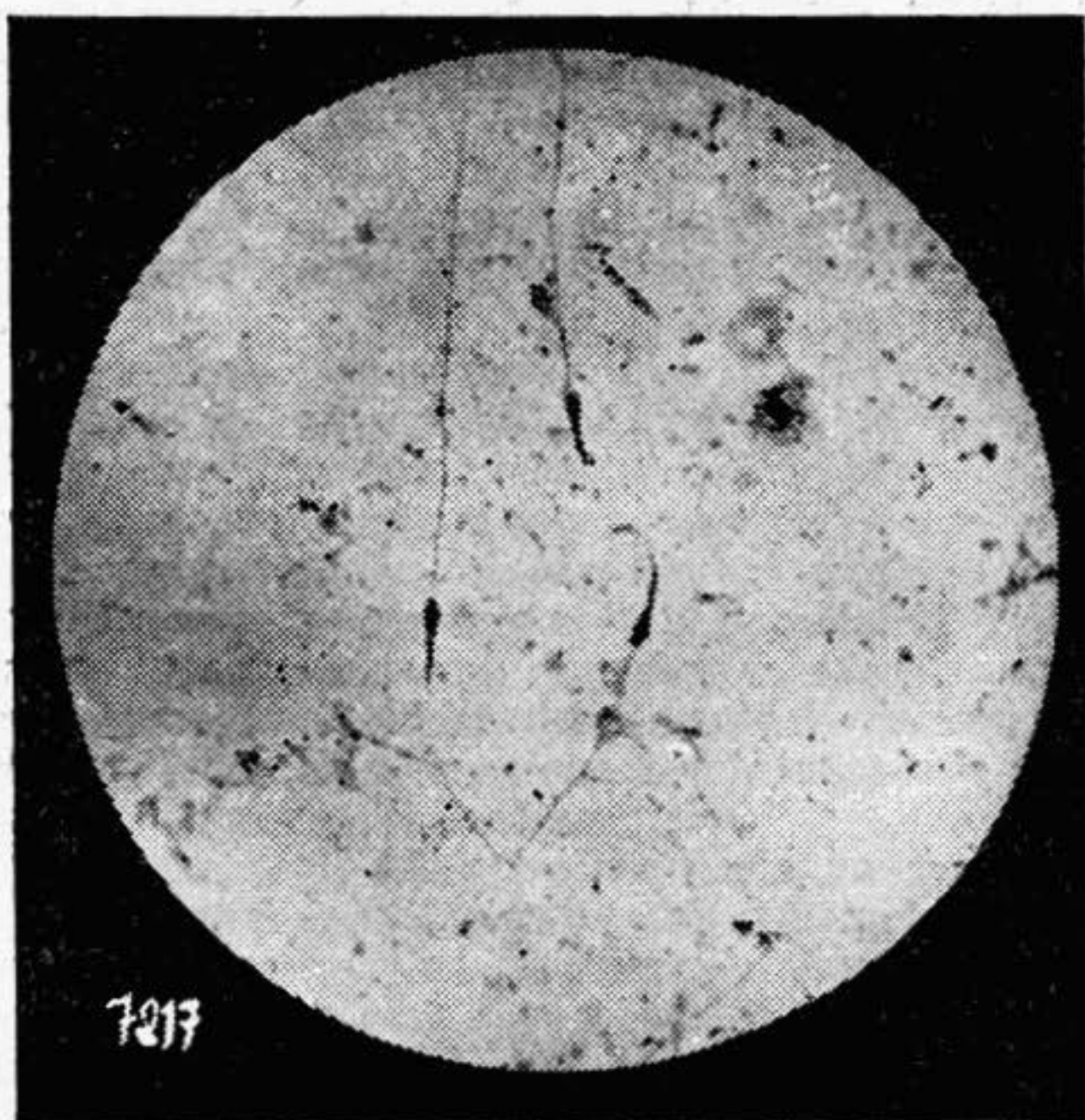


Fig. 2

Frotis de espermios de *T. niger*, teñidos con hematoxilina-eosina. Nótese la forma y la abundancia de cromatina en la cabeza.

Inmersión en aceite Zeiss 90 - ocular 10 x.

cánica de núcleos con distinta cantidad de ácido timonucleico, ya sea pertenecientes a una misma o a diferentes especies. Con este objeto, se escogieron núcleos con escasa o nula presencia de este ácido, como los que poseen los ovocitos al término del crecimiento y los vesiculosos de las células nerviosas; y también núcleos ricos en este mis-

mo ácido o con mediana cantidad de él, como los que se observan en la mayoría de los órganos.

Debe hacerse presente que cualquier órgano de una especie, está constituido por varios tipos de núcleos en cuanto a la cantidad de ácido timonucleico.

A fin de verificar la hipótesis ya citada, estos distintos núcleos fueron sometidos a la acción de la fuerza mecánica, aumentándose en forma paulatina el tiempo de trituración. Primero fué de 30 segundos, luego de 3, 5 y 6 minutos. En algunos casos, las células o los núcleos en estudio recibieron tratamientos más prolongados.

Al término de cada uno de estos tiempos fué apreciada aproximadamente la cantidad total de núcleos en cada órgano, mediante el examen a fresco o de preparaciones teñidas. En algunos casos se pudo determinar el porcentaje de cada tipo de núcleos, especialmente en el cerebro de ternera, usándose frotis fijados con Schaudinn y teñidos con hematoxilina-eosina.

Como se trabajara con núcleos pertenecientes a distintas especies, hubo necesidad de suspender las papillas de órganos en medios isotónicos variables: en agua de mar, en los casos en que fueron usadas especies marinas; Holtfreter al 10 %, en las observaciones efectuadas con ranas; y en suero fisiológico, en los experimentos con mamíferos. En algunos trabajos, además de usarse los líquidos isotónicos correspondientes, fué también empleada una solución de ácido cítrico al 1 %, sustancia que mantiene la integridad de los núcleos después del tratamiento habitual, por lo menos en ciertas células. Los núcleos tratados en esta forma sirvieron de controles adicionales, a fin de conocer la diferencia de resistencia mecánica entre núcleos suspendidos en ácido cítrico y los no suspendidos en él, al ser sometidos al mismo tiempo de trituración.

Posteriormente, además de la apreciación histoquímica de ácido timonucleico de los núcleos que resistían la fuerza mecánica en distintas condiciones, se estimó necesario medir el tamaño de los núcleos tanto en las secciones de tejidos como en los frotis de triturados, haciendo presente que la acción mecánica altera su forma y tamaño.

RESULTADOS. Como ya se ha dicho en el capítulo precedente, los núcleos de los diversos órganos pertenecientes a especies distintas fueron sometidos a diferentes tiempos de trituración, examinándose al término de cada uno de es-

tos tiempos preparaciones de la suspensión o los frotis fijados y teñidos.

El cuadro I resume la cantidad de núcleos observada al fresco en diferentes condiciones, sin tomar en consideración su tamaño, forma o composición química. Sin embargo, para la estimación cuantitativa de los núcleos en los frotis, después de la acción trituradora, se tomó en cuenta la mayor o menor cantidad de éstos que tiene cada órgano antes de ser tratado. Así, en esta forma, hay órganos ricos en núcleos, como el timo y el testículo; en cambio, los hay otros que son pobres en estos elementos.

Los resultados obtenidos en el *T. niger*, después de 30 segundos de trituración, indican destrucción de las células del ovario y del intestino, persistiendo en este último órgano un número relativamente abundante de núcleos de distintos tamaños y formas. Los triturados de ovarios no muestran ningún núcleo vesiculoso grande, pero sí algunas esferas pequeñas de dudosa interpretación.

En el caso del intestino, el aspecto de los núcleos es diferente, según si se emplea agua de mar o ácido cítrico como líquido de suspensión. Cuando se usa el primer líquido, se observan núcleos limpios, libres de citoplasma; en tanto que con el ácido cítrico al 1% no es posible aislar la mayoría de los núcleos, por adherirse a éstos algunos restos de citoplasma.

Trabajando con testículos del *T. niger*, no se observó destrucción de los núcleos de los espermios, mostrando estas células germinales motilidad después de 30 segundos de trituración. No se observó cambios de los núcleos espermáticos, aun cuando la acción mecánica del agitador fué prolongada por 10 minutos.

En la pescada, el análisis de los núcleos del ovario dió un resultado parecido al del erizo negro de mar, observándose al examen al fresco una que otra esfera, pero no núcleos vesiculosos.

En la rana chilena, la cantidad de núcleos en distintos triturados de órganos al cabo de 30 segundos, fué semejante a lo ya visto en el *T. niger*. Aumentando los efectos de la fuerza mecánica, el número de núcleos espermáticos no sufrió cambios apreciables a los 3 y 6 minutos; en cambio, hubo destrucción casi total de los núcleos intestinales al término del primer tiempo. En este animal, también se estudió la resistencia de los núcleos hepáticos, mostrando éstos un comportamiento muy parecido al de los núcleos intestinales.

En el conejo y en la ternera no ha sido posible apreciar la resistencia del núcleo de los ovocitos, por encontrarse éstos en menor cantidad que en los animales inferiores y rodeados de gran cantidad de tejido de sostén. Sólo fué estudiado el comportamiento de los núcleos del cerebro, timo, hígado y riñón. Al cabo de 30 segundos de trituración, se observaron numerosos núcleos libres de cerebro y una cantidad moderada de núcleos de los demás órganos de conejo, cuando fué usado suero fisiológico co-

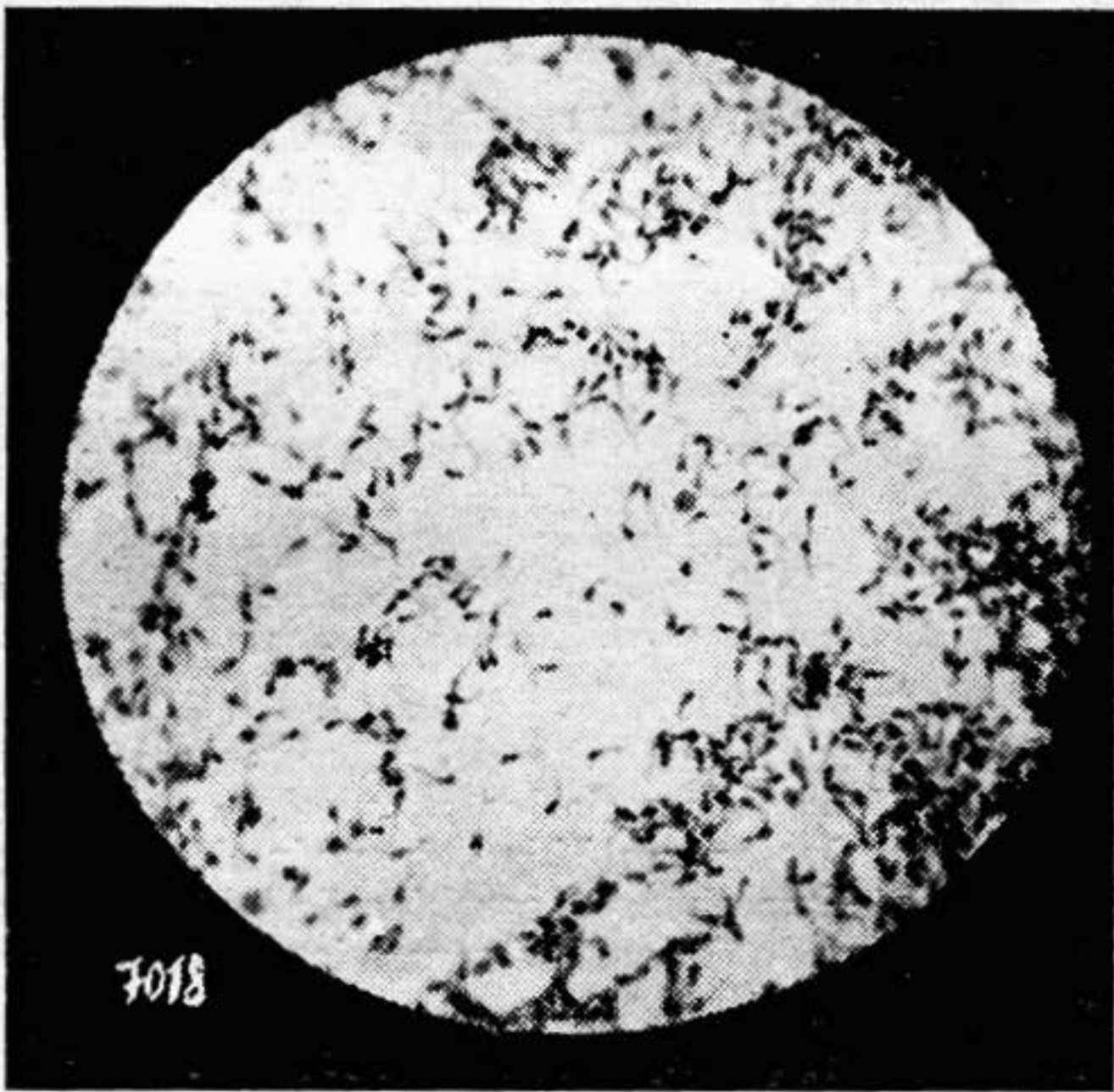


Fig. 3

Frotis de espermios sometidos a la fuerza mecánica durante 30 segundos. Tinción con Feulgen. Las cabezas toman intensamente la reacción.

Inmersión en aceite Zeiss 90 - ocular 10 x.

mo líquido de suspensión. Empleando ácido cítrico, se notó un ligero aumento de estos núcleos. En el caso de la ternera, a los 30 segundos, se apreciaron numerosos núcleos libres de los órganos mencionados, no observándose, al parecer, diferencias según el líquido de suspensión empleado.

Prolongando la trituración a 3 minutos y en suero fisiológico, fueron destruidos numerosos núcleos libres que disminuyeron considerablemente en todos los casos, en especial en el material hepático de conejo. Con ácido cítrico, la destrucción no fué tan acentuada en el timo, hígado y principalmente no lo fué en el riñón del conejo.

A los 6 minutos, la fuerza mecánica del triturador produjo la desintegración de los núcleos suspendidos en suero fisiológico, siendo esta desintegración mayor en el cerebro, timo e hígado de conejo, mostrándose los núcleos renales de este animal relativamente más resistentes.

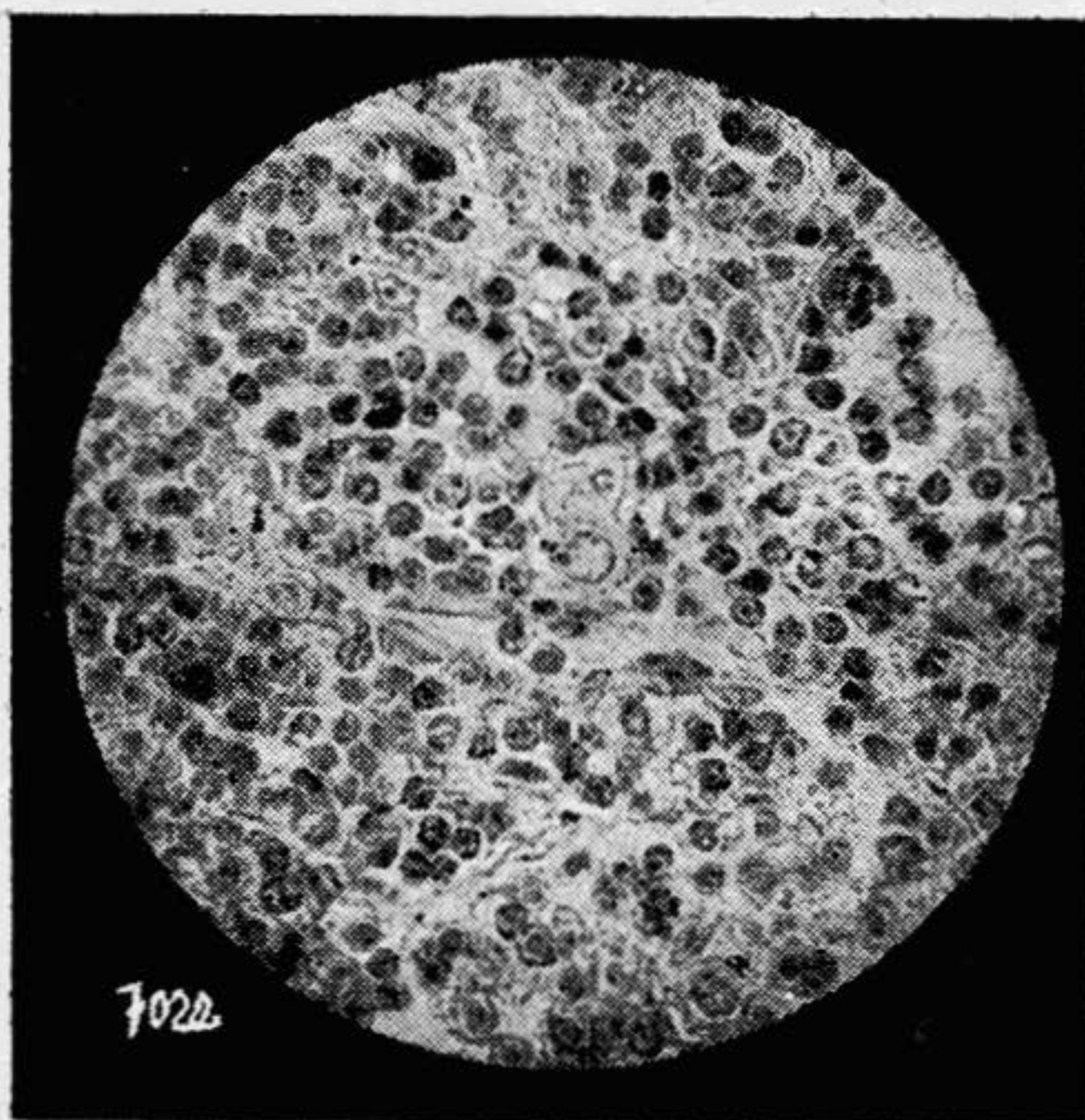


Fig. 4

Corte de timo de laucha teñido con Feulgen. Obsérvese distintos tipos de núcleos, según la cantidad de ácido timonucleico.

Inmersión en aceite Zeiss 90 - ocular 10 x.

Al emplear ácido cítrico, los distintos núcleos tanto del conejo como de la ternera mostraron según parece mayor resistencia, con excepción de los núcleos del timo del conejo y del cerebro de la ternera.

En la ternera, también los núcleos fueron tratados mecánicamente durante cinco minutos, apreciándose al usar suero fisiológico total destrucción de los núcleos del timo y una desintegración menor de los núcleos del cerebro y del hígado. El ácido cítrico no modificó aquí la resistencia de los núcleos del cerebro.

En el cuadro N.º 1 se puede ver que usando suero fisiológico u otro líquido isotónico, hay una disminución de la cantidad total de núcleos, a medida que aumenta el tiempo de trituración. En cambio, esta disminución es menor en los controles adicionales con ácido cítrico como líquido de suspensión.

Fué de interés determinar en un experimento el porcentaje relativo de cada clase nuclear. Este nucleograma se pudo establecer en diferentes frotis de cerebro de ternera, triturado en presencia de suero fisiológico, durante 30 segundos y cinco minutos y en presencia de ácido cítrico, durante 30 segundos, cinco y seis minutos.

El examen de las cifras del cuadro N.º 2 revela iguales porcentajes relativos de los distintos tipos de núcleos en triturados de 30 segundos, ya sea que éstos se obtengan con uno u otro líquido de suspensión. Al prolongar la acción mecánica del agitador, por cinco minutos, se ve en ambos nucleogramas una ausencia total de los núcleos vesiculosos y una disminución de los núcleos de tipo intermedio en suspensión con suero fisiológico (de 45 a 26%); debido a la caída de esta cifra, se observa un aumento relativo de los porcentajes de núcleos macizos (de 53 a 74%). Estas mismas modificaciones del nucleograma, con pequeños cambios, se aprecian en los frotis de triturados con ácido cítrico, a los 6 minutos.

A fin de contar 200 núcleos de cada frotis, después de los distintos tiempos de trituración, hubo que aumentar el número de campos microscópicos examinados, pues como lo demuestra el cuadro I, la cantidad total de núcleos disminuye globalmente, a medida que se prolongan los efectos de la fuerza mecánica.

Los distintos tipos de núcleos se clasificaron, tomando en cuenta su contenido en ácido timonucleico, por unidad de volumen. Los núcleos vesiculosos prácticamente no lo contenían, como por ejemplo los núcleos de los ovocitos al término del crecimiento y los núcleos de las células nerviosas del cerebro. Estos últimos, presentaban solamente una capa de este ácido, alrededor de su nucléolo.

CUADRO I

CANTIDAD APROXIMADA DE NUCLEOS DESPUES DE DISTINTOS TIEMPOS DE TRITURACION

(Observación al fresco)

Especie	Organos	Suspensión	30"	3'	5'	6'	10'
T. niger	Ovarios	A. C.	+ ?				
		A. M.	+ ?				
	Testículos	A. C.	+++				
		A. M.	+++				+++
	Intestinos	A. C.	+++				
		A. M.	+++				
M. gayi	Ovarios	A. M.	+	+			
C. gayi	Ovarios	H.	+	+			
	Testículos	H.	+++	+++		+++	
	Intestinos	H.	++	-			
	Hígado	H.	+++	-			
O. cuniculus	Cerebro	A. C.	+++	++		++	
		S. F.	+++	++		+	
	Timo	A. C.	+++	++		+	
		S. F.	++	+		+	
	Hígado	A. C.	+++	++		++	
		S. F.	++	+		-	
	Riñón	A. C.	+++	+++		++	
		S. F.	++	+		+	
B. taurus	Cerebro	A. C.	+++	++	+	+	
		S. F.	+++		+	-	
	Timo	S. F.	+++	+	-		
	Hígado	S. F.	+++	+	+		
Riñón	A. C.	+++				+++ ?	

A. C. = ácido cítrico; A. M. = agua de mar; S. F. = suero fisiológico;
 H. = Holtfreter al 10%
 +++ = numerosos núcleos; ++ = mediana cantidad de núcleos;
 + = pocos núcleos; + = núcleos muy disminuídos;
 - = ausencia de núcleos. -

Los núcleos de tipo macizo muestran una gran abundancia de ácido timonucleico, cubriendo totalmente la superficie de éstos. Este tipo de núcleo fué observado —utilizando cortes de órganos— en la cabeza de espermio, en la cápsula conjuntiva del ovario y en la capa externa del intestino del *T. niger*; en ciertas células del timo y de la neuroglia, y también en la células de los capilares sanguíneos de otros animales.

Entre ambos se encuentra el núcleo de tipo intermedio, presente en casi todos los órganos; en particular, en los astrocitos del cerebro, linfocitos jóvenes, célula hepática y célula renal.

Un examen de las dimensiones de estos distintos tipos de núcleos efectuados en cortes de órganos, dan aproximadamente las medidas que se consignan en el cuadro N.º 3.

DISCUSIÓN. Los resultados ya expuestos indican que la cantidad de núcleos en general en los triturados, disminuye a medida que aumente el tiempo de exposición de éstos a la fuerza mecánica y que los distintos tipos de núcleos ofrecen una resistencia diferente a la acción de esta fuerza más allá de cierto tiempo de trituración. Se muestran más frágiles los núcleos vesiculosos de los ovocitos y de las células nerviosas del cerebro y más resistentes los núcleos macizos de células pertenecientes a diferentes órganos. Los núcleos de tipo intermedio, ofrecen una resistencia media entre estos dos extremos. Debe llamarse la atención, sin embargo, que estos resultados obtenidos no son enteramente comparables, pues algunos de los núcleos macizos se hallan en células más resistentes a los efectos mecánicos, ya sea por su particular arquitectura o por la presencia de dispositivos protectores extracelulares. Entre éstos, se debe citar al núcleo de los espermios, cuya singular resistencia puede ser atribuída posiblemente a la solidez de la membrana citoplasmática que lo recubre y a la existencia probable de una armazón fibrilar entre ésta y el núcleo, descrita en la literatura al menos para otros espermios (2). Aumentando la fuerza mecánica se logra separar la cabeza de la cola, pero no se tiene seguridad alguna de un aislamiento del núcleo del resto de las estructuras de la cabeza del espermio. Todos estos puntos deberán ser confirmados en nuevos experimentos.

Otros núcleos macizos resistentes son los de los capilares sanguíneos del cerebro y de otros órganos. Al parecer, son difícil de aislar, pues las células endoteliales que lo contienen muestran resistencia a los traumatismos, especialmente aquellas del cerebro que presentan además por fuera un enrejado de fibrillas colágenas. Secciones de estos capilares sanguíneos mostrando este enrejado externo, se ha podido observar claramente en triturados al fresco.

Si bien es cierto que en estos casos la resistencia de los núcleos macizos puede ser discutida por las razones dichas, se puede observar, sin embargo, núcleos macizos auténticamente aislados y que resisten la fuerza mecánica por un tiempo considerable, aunque su real origen puede ser discutido. Estos núcleos, en el caso del cerebro, pueden provenir de astrocitos fibrosos y de células de la microglia, pero tampoco puede descartarse la posibilidad de una procedencia capilar si las células de los vasos capilares son suficientemente tratadas mecánicamente para que sus núcleos se liberen de los dispositivos protectores de sostén.

No obstante estas reservas, los autores creen que existen diferencias en la capacidad de resistir de los distintos núcleos, dependiendo esta propiedad de la misma membrana nuclear.

Como se puede ver en el cuadro II y en experimentos comparativos de resistencia de los núcleos en la especie *T. niger*, existe cierta correlación entre este fenómeno y la cantidad de ácido timonucleico. Los núcleos que son pobres en esta sustancia como los de los ovocitos y los vesiculosos de las células nerviosas, son sumamente frágiles a la fuerza mecánica, mientras que los que poseen abundante ácido timonucleico, como los núcleos macizos aislados de los cerebros de conejo y ternera y del intestino del *T. niger*, muestran una resistencia relativamente grande. Núcleos con cantidad intermedia de este ácido, como los que presentan algunas células intestinales, las células hepáticas y renales y los astrocitos protoplasmáticos, manifiestan, en cambio, una resistencia moderada. Esto parecería a primera vista confirmar la hipótesis de trabajo de los autores, pero un análisis cuidadoso de los distintos tipos de núcleos también indica que existe igual correlación en-

CUADRO II

PORCENTAJES DE LOS DIFERENTES TIPOS DE NUCLEOS EN CEREBROS DE TERNERA, DESPUES DE DISTINTOS TIEMPOS DE TRITURACION

(Observados en frotis fijados y teñidos)

Líquido de suspensión	30''	5'	6'
A. C.	n. v. = 2.5%	n. v. = 0	n. v. = 0
	n. i. = 48 %	n. i. = 47.5%	n. i. = 29%
	n. m. = 49,5%	n. m. = 52,5%	n. m. = 71%
S. F.	n. v. = 2 %	n. v. = 0	
	n. i. = 45 %	n. i. = 26%	
	n. m. = 53 %	n. m. = 74%	

A. C. = ácido cítrico al 1%

S. F. = suero fisiológico

n. v. = núcleo vesiculoso ;

n. i. = núcleo intermedio

n. m. = núcleo macizo

CUADRO III

TERMINO MEDIO, EXPRESADO EN MICRONES, DE LOS DIAMETROS MAYORES DE DIFERENTES TIPOS DE NUCLEOS

Especie	Organo	n. v.	n. i.	n. m.
B. taurus	Cerebro	13,2 x 8,2	5,9 x 5,3	5,3 x 3,8
	Timo			3,8 x 3,2
	Hígado		5,8 x 4,9	
	Riñón		6,8 x 5,4	

n. v. = núcleo vesiculoso

n. i. = núcleo intermedio

n. m. = núcleo macizos

tre la resistencia mecánica y el tamaño de los núcleos, siendo más resistentes los pequeños y más frágiles los grandes, de acuerdo con las dimensiones expuestas en el cuadro III. En frente de estos hechos, se plantea el problema de cuál de las dos correlaciones es la realmente valedera, o de si ambas son igualmente importantes, para explicar el fenómeno estudiado.

Este problema tal vez podría ser resuelto, trabajando con núcleos vesiculosos pequeños y núcleos macizos grandes. Si el primer material puede ser encontrado en protozoos —amebas por ejemplo— no resulta fácil, en cambio, hallar núcleos del segundo tipo. Estos posiblemente puedan observarse en algunos elementos patológicos como las células tumorales gigantes que, por atipia nuclear, presentan un núcleo grande e hipercromático. Se debe advertir, sin embargo, que los núcleos vesiculosos pequeños de los protozoos, no se asemejan enteramente a los vesiculosos grandes usados en este trabajo, pues aquellos presentan, a pesar de su aspecto, una cantidad moderada de ácido timonucleico, que se dispone periféricamente por dentro de la membrana nuclear o alrededor de un cuerpo central llamado cariosoma. Esto se puede ver particularmente en los núcleos de las amebas que, en experimentos de micro-manipulación, llevados a cabo por Commandon, muestran una considerable resistencia a las intervenciones celulares que tienen por objeto remover o injertar este órgano celular.

Los trabajos realizados hasta el momento, no permiten sacar conclusiones o avanzar hipótesis sobre el rol que podría tener disposiciones especiales del ácido timonucleico y la forma del núcleo sobre la resistencia considerada. Las observaciones hasta ahora efectuadas, todavía incompletas, parecen indicar que la disposición de la cromatina no juega un papel en la resistencia mecánica, pero antes de afirmar esta idea será necesario repetir los experimentos ya expuestos y solicitar la cooperación de un físico, para interpretar mejor los datos de laboratorio que se obtengan.

Además de las correlaciones ya citadas, conviene mencionar finalmente aquí las relaciones que existen entre el fenómeno de resistencia y la intensidad del metabolismo celular. Un análisis somero, hace ver que las células que tienen una mayor capacidad de síntesis proteica, presen-

tan una envoltura nuclear frágil, mientras que las células de núcleos macizos muestran menor actividad en este sentido. Esta diferencia es clara si se compara el metabolismo de la célula huevo y el metabolismo del espermio, en cuanto a la capacidad de sintetizar materiales de reserva proteicos. También esta actividad de síntesis parece ser muy intensa en las células nerviosas, según los trabajos de Hyldén (20), presentando el núcleo de estas células gran analogía morfológica con el del ovocito. Ambos son grandes, pobres en ácido timonucleico y poseedores de un gran nucléolo, organoide nuclear indicador de gran actividad metabólica. Además de esto, los citoplasmas de estos dos tipos de células poseen abundante ribonúcleoproteína.

Muy probablemente, la mayor intensidad del anabolismo del citoplasma presuponga un mayor intercambio de material entre este último y el núcleo y por lo tanto, un mayor aumento de la permeabilidad de la membrana nuclear. En estas circunstancias, por fenómenos de adaptación funcional, esta envoltura presentaría el menor espesor posible.

De ser verídica esta última suposición, la resistencia mecánica guardaría relación con el espesor de la membrana nuclear y no con el volumen del núcleo, dependiendo a su vez el grosor de esta envoltura, de la cantidad de nucleohistona, según la hipótesis enunciada en la introducción de esta Tesis.

R E S U M E N

En el presente trabajo se estudia la resistencia mecánica de diversos tipos de núcleos aislados de células provenientes de especies y órganos diferentes y se observa que la propiedad de resistir a cierta fuerza mecánica, guarda relación con el tamaño y la cantidad del ácido timonucleico del núcleo y la intensidad metabólica de la célula.

La capacidad de síntesis proteica de distintos tipos de células, correlacionada con el fenómeno de la resistencia que se analiza y con el aspecto del núcleo, parecen indicar que la mayor fragilidad de la membrana nuclear de los núcleos vesiculosos aislados podría deberse a un menor espesor de esta envoltura, dependiendo esto a su vez de la cantidad de nucleohistona, según la hipótesis enunciada por el autor. Los núcleos macizos presentan una resistencia

mayor, debido a que tendrían una membrana nuclear más espesa, producida probablemente por la nucleohistona que contienen en gran cantidad.

REFERENCIAS

- 1.—Película filmada por el Dr. Commandon del Instituto Pasteur de París, sobre injerto y remoción de núcleos en amebas, cedida gentilmente al Instituto de Biología «JUAN NOE», por su autor.
- 2.—WILSON, E. B. — The Cell in Development and Heredity. Mac Millan, New York. p. 465, 1924.
- 3.—SPIEGELMAN, S. — The Physiology and Genetic Significance of Enzymatic Adaptation.— *Annals of Missouri Botanical Garden* 32: 139-163, 1945.
- 4.—SONNEBORN, T. M. — Beyond the Gene.— *American Scientist*. 37: 33, 1949.
- 6.—DOUNCE, A. L. — Further Studies on Isolated Cell Nuclei of Normal Rat Liver. *J. Biol. Chem.*, 151: 221, 1943.
- 7.—THE ROCKEFELLER FOUNDATION. — Annual Report. New York. p. 123, 1948.
- 8.—CLARK, H. L. — A Catalogue of the Recent Sea — Urchins. New York. p. 72, 1925.
- 9.—ZITTLE, C. A. and ZITIN, B. — The amount and Distribution of Cytochrome Oxidase in Bull Spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, 144: 99, 1941.
- 10.—CHURNEY, L. — The Physico-Chemical Properties of the Nucleus.— *Univ. Pennsylvania. Bicentennial Conference*, p. 113, 1941.
- 11.—DE ROBERTIS, NOWINSKY y SAEZ. — *Citologia General*. El Ateneo, Bs. As., p. 127, 1946.
- 12.—POLLISTER A. W. and RIS, H. — Nucleoprotein Determination in Cytological Preparations. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 12: 147, 1947.
- 13.—BENSLEY R. R. and S. H. BENSLEY.—*Handibook of Histological and Cytological Technique*.— The University of Chicago Press. Chicago-Illinois. p. 135, Fourth Impression, 1947.
- 14.—DI STEFANO, S. H.—A Cytolchemical Study of the Feulgen Nuclear Reaction. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 34: 3: 75-80, 1948.
- 15.—DARLINGTON, C. D. and La COUR L. F. — The Handling of Chromosomes.— George Allen and Union Ltd. London p. 52-60-120. Second Edition, 1947.

- 16.—**COWDRY E. V.** — Microscopic Technique in Biology and Medicine. The Williams and Wilkins Company. p. 190, 1943.
- 17.—**CONN, H. J. and DARROW, M. A.** — «Staining Procedures». Biological Stain Commission Biotich Publications, Geneva, N. Y., U.S.A. p. 2-14 (I) y III A 2-19; 1946.
- 18.—**PANTIN C. F. A.** — Notes on Microscopical Technique for Zoologists.— At the University Press. Cambridge, p. 58, 1948.
- 19.—**HAMBURGER VIKTOR.** — A Manual of Experimental Embriology. The University of Chicago Press. Chicago, Illinois, p. 26, 1942.
- 20.—**CASPERSSON, T.** — The Relations Between Nucleic Acid and Protein Synthesis Symposia of the Society for Experimental Biology. 1 : p. 140, 1947.

Impreso el 30 de Septiembre de 1954.