

ULTRAESTRUCTURA DE LA CELULA. Seminario mensual.

— **Dr. Orlando J. Castejón S.**

Encargado de la Sección de
Microscopía Electrónica del
Instituto de Investigación Clínica.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.

El microscopio electrónico constituye en la actualidad uno de los instrumentos más poderosos para estudiar la organización de la materia viva. El análisis electronomicroscópico de la célula revela la manera como moléculas individuales están arregladas para formar la compleja estructura multilaminar de la célula. Gracias a su alto poder de resolución (10 Angstrom) es posible hacer un análisis biofísico de tejidos y correlacionar íntimamente estructura y función.

J. D. Robertson (1958), utilizando el permanganato de potasio como fijador demostró, en una gran variedad de tipos celulares, que la membrana celular es una estructura triple formada por dos líneas densas de 25 A de grosor separadas por un espacio claro de igual dimensión, siendo el espesor total de 75 A. Robertson designó esta triple estructura como **"unidad de membrana"**. Esta estructura triple corresponde al modelo de membrana celular propuesto por Davson y Danielly (1952). Estos autores, utilizando métodos fisicoquímicos, consideran que la membrana celular está formada por dos capas monomoleculares de proteínas separadas por una capa bimolecular de lípidos. Las líneas densas observadas al microscopio electrónico corresponderían a las capas moleculares de proteínas (Sjöstrand) o a los grupos hidrófilos de los lípidos y el espacio claro a la capa bimolecular de lípidos.

Los estudios realizados sobre la estructura de la capa de mielina han arrojado considerable luz sobre el conocimiento de la ultraestructura de la membrana celular. Antes del advenimiento del microscopio electrónico, la estructura lipoproteica de la membrana celular había sido estudiada mediante el mi-

croscopio de luz polarizada (Schmidt, 1937) y por métodos de difracción de rayos X (Schmidt y colaboradores, 1940; Finean, 1954). La mielina está formada por una serie de membranas superpuestas, dispuestas en paralelo. Los hallazgos sobre la ultraestructura de la membrana utilizando estos métodos físicos corresponden a las observaciones hechas con el microscopio electrónico. La Dra. Geren Uzman (1954) demostró la íntima relación entre la capa de mielina y la membrana celular en nervio periférico. Desde estas investigaciones se ha utilizado la capa de mielina como una estructura de referencia para el estudio de la membrana celular.

Usando tejidos fijados en tetraóxido de osmio y permanganato de potasio, Sjöstrand y Elfvin (1960) propusieron un modelo diferente sobre la arquitectura molecular de la membrana celular. De acuerdo a estos autores, la membrana celular es asimétrica, de 80-95 Å de espesor, y consistiría de una doble capa de lípidos colocada entre dos capas de proteínas o entre una capa de proteína y otra de poliacáridos, y en adición a estas capas, otra capa más gruesa de proteínas hacia el lado citoplasmático de la membrana celular. Esta última capa informaría por la asimetría de la membrana celular.

Actualmente se están realizando estudios sobre la arquitectura molecular de la membrana plasmática, utilizando técnicas de alta resolución en microscopio electrónico. Se trata de una nueva y fascinante experiencia tratando de correlacionar el arreglo macromolecular lipoproteico con el pasaje de moléculas solubles en agua e iones orgánicos a través de membranas celulares.

En el citoplasma de la célula Porter (1952), Palade y Porter (1952) y Sjöstrand (1953), demostraron un sistema membranoso, el cual en secciones finas de tejidos, aparece formado por túbulos, vesículas y cisternas. Este sistema ha sido llamado por Palade y Porter, **Retículo Endoplásmico**. Se estableció una diferencia entre retículo endoplásmico rugoso o granular y retículo endoplásmico agranular o liso.

El retículo endoplásmico rugoso está representado por membranas asociadas con ribosoma. Este retículo se halla notable-

mente desarrollado en células envueltas en activa síntesis de proteína como en las células pancreáticas, células de las glándulas salivares, células plasmáticas y ciertos tipos de células nerviosas. El retículo endoplásmico agranular o liso está formado exclusivamente por membranas. Puede ser observado en células hepáticas donde ha sido correlacionado con el metabolismo de los lípidos y del colesterol, en células con activa síntesis de esteroides como en las células intersticiales del testículo, en células del cuerpo lúteo, glándulas de Meibomio, células epiteliales del intestino y células del epitelio pigmentario de la retina. El retículo sarcoplásmico del músculo estriado es también una variante de retículo agranular. Se ha observado también en células relacionadas con la secreción o transporte activo de iones, como en las células parietales de la mucosa gástrica.

El retículo endoplásmico representa un sistema de membranas distribuidas en todo el citoplasma y extendido desde la membrana celular hasta la envoltura nuclear.

Objetando que el retículo endoplásmico carece de especificidad, Sjöstrand ha propuesto una terminología neutral para las membranas intracelulares, que no da idea de continuidad o relación entre ellas, designándolas con el término de "citomembranas". Este autor distingue entre alfacitomembranas o membranas en asociación con ribosomas, beta-citomembranas o membranas resultantes de la invaginación de la membrana celular como las que se observan en las células tubulares del riñón y gamma-citomembranas o membranas lisas como las membranas del complejo de Golgi.

El término "Ergastoplasma", nombre genérico a menudo usado para designar una región de la célula, no se adapta a la moderna exploración molecular de la estructura celular.

Además de los ribosomas adheridos a las membranas intracitoplasmáticas, también se hallan ribosomas distribuidos libremente en el citoplasma. Los ribosomas se caracterizan por ser gránulos osmiofílicos, de 150A y de un contenido de aproximadamente 30% del ácido ribonucleico citoplasmático. Los ribosomas han sido relacionados a la síntesis proteica. La correlación entre ácido ribonucleico citoplasmático y síntesis proteica fue demostrada por Casperson y colaboradores (1950) y por Brachet (1950). De acuerdo a estos investigadores el ácido ribonucleico citoplasmático se deriva del ácido ribonucleico del nucléolo.

La significación de las membranas citoplasmáticas es aún oscura. Según Sjöstrand (1953) representaría el principio básico para la organización de los componentes citoplasmáticos en unidades supramoleculares, de importancia primaria para ciertas funciones como transducción, síntesis, concentración, control y regulación.

El microscopio electrónico ha permitido hacer un estudio detallado de los organelos citoplasmáticos. Palade (1953) y Sjöstrand (1953) han descrito las **mitocondrias** como estructuras ovoideas o alargadas limitadas externamente por una doble membrana, una externa y otra interna. El grosor de estas membranas es de 50-60Å. La membrana mitocondrial interna se invagina para formar las crestas mitocondriales, las cuales se hallan incluidas dentro de la matriz mitocondrial. En tejidos fijados con tetraóxido de osmio las membranas mitocondriales externa e interna muestran una estructura triple semejante a la ya descrita por Robertson para las membranas celulares y se hayan separadas por un espacio de aproximadamente 80 Å de espesor. No obstante, después de fijación con permanganato de potasio, las membranas mitocondriales muestran una estructura heptalaminar (Robertson, 1959) o penta o heptalaminar (Sjöstrand, 1962) y el espacio entre ellas desaparece formando ambas membranas una estructura compuesta. En este sentido un nuevo arreglo molecular para las membranas mitocondriales ha sido propuesto por Sjöstrand (1963). De acuerdo a este investigador, la membrana mitocondrial estaría formada por unidades estructurales globulares de lípidos en lugar de una capa continua de lípidos, cubiertas por dos capas de proteínas. Esto requiere un más detallado análisis experimental.

Estudios de alta resolución a nivel de la membrana mitocondrial interna (Fernández-Morán, 1961) han revelado la existencia de subunidades estructurales o partículas elementales, de 80-100 Å las cuales se considera contienen las enzimas de la cadena de transporte electrónico (enzimas respiratorias) y las enzimas fosforilizantes (Green 1959).

Lehninger (1959) y Green (1960) han demostrado bioquímicamente las enzimas del ciclo de Krebs y del ciclo de los ácidos grasos en la matriz mitocondrial. Los estudios realizados hasta el presente demuestran que las mitocondrias constituyen

verdaderas factorías bioquímicas o fuentes de poder de la célula donde las transformaciones de la energía respiratoria tiene lugar y donde el ATP (Adenosintrifosfato) es formado.

El complejo de Golgi ha sido otro de los organelos intracelulares cuya estructura y función ha sido ampliamente conocida por estudios con microscopio electrónico. Los trabajos de Sjöstrand y Hanson (1954) y de Dalton y Félix (1956) mostraron que estaba formado por dobles membranas lisas, sin asociación con ribosomas, (Membranas de Golgi) vacuolas y gránulos o vesículas. Las dobles membranas de Golgi, de 60-70 Å de grosor, se disponen en paralelos y se unen en sus extremos formando cavidades aplanadas.

El análisis químico del complejo de Golgi, mediante ultracentrifugación, ha demostrado que está constituido principalmente por fosfolípidos. Estudios histoquímicos revelan además la existencia de altos niveles de fosfatasa ácida.

El complejo de Golgi ha sido relacionado desde Cajal (1914) con la secreción celular. Los estudios realizados con el microscopio electrónico, muestran participación del complejo de Golgi en la segregación y concentración de los productos secretorios de la célula. En las células con alta biosíntesis de proteína, como en las células pancreáticas, se ha demostrado mediante técnicas autorradiográficas (Caro, 1961, Warshawsky 1963 la existencia de productos de síntesis proteica dentro del complejo de Golgi. También se le ha comprobado participación en la elaboración de las membranas de los gránulos de zimógeno (Sjöstrand y Hanzon, (1961).

Se le ha dado papel al complejo de Golgi en el almacenamiento de productos secretorios formados en otras partes de la célula. De Robertis y colaboradores (1959) han estudiado la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en la médula suprarrenal. Las catecolaminas aparecen en el citoplasma cerca de la membrana nuclear, algunas de las vesículas del complejo de Golgi se llenan de un material denso correspondiente a las catecolaminas y luego estas vesículas aumentan de tamaño y se movilizan hacia la superficie celular. Se desconoce cuál es la función del complejo de Golgi en las células no secretorias y especialmente en las células nerviosas donde se observa bien desarrollado.

Los lisosomas fueron descubiertos mediante centrifugación diferencial por De Duve (1957). Al microscopio electrónico aparecen como cuerpos densos, redondeados u ovals, de 0.5-1.5 micras de diámetro y rodeados por una unidad de membrana. En los lisosomas se han identificado seis tipos de enzimas: fosfatasa, catepsinas, glicooxidasas, sulfatasas, ribonucleasas y desorribonucleasas... Los lisosomas son considerados como reservorios de enzimas para la digestión de los materiales tomados por la célula por pinocitosis o fagocitosis.

Otro tipo de estructuras subcelulares son los **microcuerpos**, descritos por Rhodin (1954) en túbulos proximales del riñón. Son de 0.1-0.5 micras de diámetro y están rodeados por una unidad de membranas. Se desconoce su función exacta.

Los estudios submicroscópicos del **centríolo** han sido realizados por Bernhard y De Harven (1956), Amano y Besis (1958). Se pueden observar dos centríolos en la región del complejo de Golgi. Cada centríolo representa una estructura cilíndrica de aproximadamente 500 milimicras de largo y 150 milimicras de diámetro. La pared del cilindro está formada a su vez por 9 pequeños cilindros, de 150-200 Å de diámetro, dispuestos simétricamente y con sus ejes longitudinales en paralelo. Alrededor del centríolo se disponen dos estructuras pericentriolares o satélites, caracterizados por masas densas de unos 700 Å. Se desconoce su función exacta. Se han correlacionado con la formación de estructuras fibrilares.

Entre las inclusiones que se observan en el citoplasma se destacan los **gránulos de glucógeno**. Estos gránulos han sido estudiados al microscopio electrónico por Revel, Napolitano y Fawcett (1960). Aparecen como estructuras densas de 200-400 Å de diámetro.

Los **lípidos** forman generalmente inclusiones homogéneas, densas, fuertes osmiofílicas. Esta última característica depende de su contenido en ácidos grasos insaturados, los cuales son los reductores del ácido ósmico usado como fijador. Generalmente las inclusiones del lípido no muestran membrana limitante. Existe una forma de inclusiones del lípido llamadas **figuras mielínicas** caracterizadas por un arreglo concéntrico de membranas siguiendo un patrón semejante a la de la capa de mielina de los nervios periféricos. Estas inclusiones representan generalmente degeneración membranosa de la célula.

En cuanto a la estructura fina del núcleo, Watson (1955) estudiando diferentes tipos de células en mamíferos, demostró que está limitado externamente por la envoltura nuclear. Esta envoltura está formada por dos membranas, la membrana nuclear externa e interna. Estas membranas de 80 A de espesor están separadas por un espacio llamado cisterna perinuclear, de 100A de ancho y hasta 2.500 A en regiones dilatadas. La membrana nuclear externa parece ser continua con las membranas del retículo endoplásmico. La envoltura nuclear se halla interrumpida a nivel de los poros nucleares, sitios donde la membrana nuclear interna y externa se hacen continuas. A nivel de esos poros, de aproximadamente 500A de diámetro, el contenido nuclear y citoplasmático se hallan en contacto directo. Cuando estos poros se estudian a alta resolución se observa la presencia de una membrana fina o diafragma.

El nucléoplasma muestra un conglomerado de partículas de dimensiones y densidad variable. Algunos de ellos son de aproximadamente 150A de diámetro, semejantes a los ribosomas del citoplasma. Partículas más densas y gruesas tienden a agruparse en masas las cuales pueden observarse adheridas a la membrana nuclear interna. Estas masas parecen corresponder a la cromatina observada en el microscopio de luz.

El microscopio electrónico ha contribuido poco al conocimiento de la estructura del núcleo, probablemente debido a que el método de fijación utilizado, generalmente tetraóxido de osmio, no hace una preservación satisfactoria. Se requiere una investigación más amplia y detallada para establecer, hasta qué punto, el componente granular del nucléoplasma representa artefactos de precipitación de las nucleoproteínas o la preservación de los elementos existentes en la célula viva.

El nucléolo está compuesto de gránulos apretados, de 150 A de diámetro, los cuales se creen son ácidos ribonucleicos. Estos gránulos forman bandas o un plexo en forma de red. Entre los espacios dejados por esta red se observan gránulos más finos que han sido identificados como ácido desoxiribonucleico.

Permanece aún oscura la caracterización submicroscópica de las proteínas básicas, protaminas o histonas, de las proteínas ácidas o proteínas no histónicas, como las proteínas residuales y las enzimas nucleares (nucleocidofosforilasa, fosfa-

tasa alcalina, nucleotidofosfatidasa).

La pinocitosis o mecanismo de transporte por vesículas ha sido estudiado a nivel submicroscópico. Palade en 1953 observó la presencia de vesículas en células endoteliales de capilares sanguíneos. Estas vesículas son de 650 A de diámetro aproximadamente. Esto sugiere la posibilidad de transferencia de líquidos a través de las células endoteliales. Se han hecho suprimir experimentos inyectando ferritina, cuyo peso molecular es de 500.000 y fácilmente visible al microscopio electrónico y se han encontrado a nivel de la luz del capilar y dentro de las vesículas de las células endoteliales.

DISCUSION

Dr. Bemergui: ¿Cuál es la estructura al microscopio electrónico de los cromosomas y de los genes?

La microscopía electrónica ha introducido progresos importantes en el conocimiento de la estructura de los cromosomas. La alta resolución del microscopio electrónico permite visualizar nucleoproteínas dentro del cromosoma y en la actualidad se tiende a identificar los genes con macromoléculas de nucleoproteínas.

Los cromosomas tienen una estructura filamentosa. La unidad básica de estos filamentos está representada por componentes macromoleculares o microfibrillas. Las microfibrillas más finas son del orden de 30A y se postula que representan moléculas de nucleoproteínas.

Estudiante: ¿Cuál es la función de las partículas elementales demostradas por Fernández Morán?

El Dr. Fernández Morán ha demostrado, mediante técnicas de alta resolución en microscopía electrónica, la existencia de partículas de 80 a 100A de diámetro a nivel de las membranas mitocondriales. El Dr. Green y colaboradores de la Universidad de Wisconsin, han aislado bioquímicamente partículas submitocondriales que contienen los compuestos de las enzimas respiratorias y las cuales han sido correlacionadas con las partículas elementales.

Estudiante: ¿De dónde procede el ácido ribonucleico que se halla en los ribosomas?

Los ribosomas están formados por 50% de proteína y un 40% de ARN. Este ARN es el ARN mensajero, el cual se forma en el núcleo probablemente en contacto con los cromosomas. Este ARN migra entonces a los ribosomas llevando la información necesaria, por ejemplo, información sobre la secuencia de los aminoácidos para realizar la biosíntesis de proteínas.

Estudiante: ¿Qué relación existe entre el ácido ribonucleico y el ácido desoxiribonucleico?

El ácido desoxiribonucleico (ADN) tiene participación en la biosíntesis del ácido ribonucleico en el núcleo. La secuencia de las bases en el ácido ribonucleico es una copia negativa de la secuencia de las bases del ácido desoxiribonucleico, en contacto con el cual es formado.

Dr. Irragorri: ¿Cuáles son los mecanismos de transporte de los metabolitos al interior de la célula?

Además de los procesos de fagocitosis hay otro mecanismo llamado **pinocitosis** mediante el cual los materiales sólidos y líquidos pueden ser ingeridos y transportados dentro de la célula.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BRACHET, J.: The Biological Role of Ribonucleic Acids. Sixth Weizmann Memorial Lecture Series (1959).
- BRACHET, J.: The Biological Role of Nucleic Acids. Elsevier Publishing Comp. New York. 1960.
- DALTON, A. J. and FELIX M. D.: A comparative study of the Golgi complex. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2: 79 (1956).
- DAVSON, H., and DANIELLI, J. F.: The Permeability of Natural Membranes. Cambridge, Cambridge University Press, 1949.
- DE DUVE, C.: Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In: Subcellular Particles, pp. 128-159. Ed.: T. Hayas Ronald Press, New York. (1958).
- DE ROBERTIS, E. D. P., NOWINSKI, W. W. y SAEZ, F. A. A.: Citológia General. Ed. "El Ateneo". Buenos Aires (1967).

- ELFVIN, L. G.: Electron microscopic investigation of the plasma membrane and myelin sheath of autonomic nerve fibers in the cat. *J. Ultrastructure Research*: 5, 338 (1961).
- FAWCETT, D. W.: In histology and cytology. *Modern Developments in Electron Microscopy*. Academic Press. New York (1964).
- FERNANDEZ MORAN.: Cell-membrane ultrastructure. Low-temperature electron microscopy and X-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. Symposium on the plasma membrane. New York Heart Association (1961).
- FINEAN, J. B.: Structural features of lipid and lipoprotein complexes in nerve myelin. *Intern. Conf. Biochem. Problem Lipids*, 3dr. Conf., Brussels, 1953.
- FREEMAN, J. A.: Cellular Fine Structure. An introductory Text and Atlas. Mc Graw-Hill Book Company. New York. (1964).
- GEREN, B. B.: The formation form the Schwann cell surface of myelin in peripheral nerves of chick embryos. *Exper. Cell Res.*, 7: 558 (1954).
- ROBERTSON, J. D.: The ultrastructure of cell membrane and their derivatives. *Biochem. Soc. Symposium*. 16,3 (1959).
- SCHMITT, F. O., and PALMER, K. F.: X-ray diffraction studies of lipids and lipide-protein systems. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 8: 94 (1940).
- SJOSTRAND, F. S.: Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* 171: 30 (1953).
- SJOSTRAND, F. S., and HANSON, V.: Ultrastructure of Golgi apparatus of exocrine cells of mouse pancreas. *Exp. Cell Res.*, 7: 415 (1954).
- SJOSTRAND, S. F.: The molecular architecture of cell membrane and cytoplasmic membranes. *Proceedings of the First International Pharmacological Meeting*. vol. 4. Pergamon Press. London (1963).
- SJOSTRAND, S. F.: A new ultrastructural element of the membranes in mitochondria and of some cytoplasmic membrane. *J. Ultrastructure Res.* 9: 340 (1963).
- SJOSTRAND, S. F.: The endoplasmic reticulum. *Cytology and Cell Physiology*. Academic Press. New York. 1964.
- PALADE, G. E.: The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.*, 114: 427 (1952).
- PALADE, G. E. and PORTER, K R.: Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cell in situ. *J. Exp. Med.*, 100: 641 (1954).
- PORTER, K R.: Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. *J. Histochem. Cytochem.*, 2: 346 (1954).
- WATSON, M. L.: The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 257 (1955).
-