

Aproximaciones metodológicas al estudio de la estructura y dinámica del citoesqueleto

David Bellido, Roser Buscà, Ricardo Casaroli, Susanna Castel, María del Mar Fernández-Borja, Ricardo Makiya, Roser Pagan, Miguel Angel Pujana, Manuel Reina y Senén Vilaró.

Unidad de Biología Celular. Universidad de Barcelona.

Resumen

El citoesqueleto comprende un conjunto de elementos intracelulares que establecen interacciones entre ellos y con otros componentes citoplasmáticos. Por medio de estas interacciones el citoesqueleto actúa como un centro integrador y organizador de la gran mayoría de las estructuras y funciones celulares: relaciona entre sí y de modo altamente dinámico los diferentes compartimientos citoplasmáticos y relaciona a la célula con su entorno. El estudio sobre la dinámica y organización del citoesqueleto celular esta condicionada por su complejidad molecular y su distribución espacial. Se han desarrollado una gran variedad de métodos microscópicos de gran utilidad para su conocimiento experimental. Entre la gran variedad de métodos existentes en la actualidad son de destacar los métodos fluorescentes como sistema de detección, los métodos de inmunocitoquímica mediada por hapteno y la microscopía confocal.

Experimentalmente, el conocimiento de la distribución del citoesqueleto con alta resolución puede abordarse mediante las técnicas de sublimación en profundidad ("deep etch") así como con los métodos de solubilización diferencial. Como ejemplo de las relaciones dinámicas y estructurales del citoesqueleto con otros elementos celulares, se presentan resultados en relación a 1) la dinámica del complejo de Golgi durante la mitosis y la función del citoesqueleto microtubular en su reordenación; 2) la relación de los proteoglicanos de la membrana plasmática y los filamentos corticales de actina; y 3) el intercambio entre los filamentos de citoqueratina y vimentina que se induce durante la desdiferenciación de los hepatocitos neonatales en cultivo.

1.-Introducción

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una gran variedad de formas y de realizar multitud de movimientos coordinados y especializados depende del citoesqueleto. El conjunto de elementos que forman el citoesqueleto permiten que sea el principal responsable de la relación que se establece entre las células y la matriz extracelular, de modo que gracias al citoesqueleto, las células se fijan y desplazan sobre un sustrato, y establecen relaciones morfogénicas célula-célula y célula-matriz en la formación y el mantenimiento del estado diferenciado tisular. Es por ello, que el citoesqueleto constituye un centro integrador y organizador de la gran mayoría de estructuras y funciones celulares: relaciona entre sí los diferentes compartimientos citoplasmáticos y relaciona a la célula con su entorno.

La gran diversidad de funciones del citoesqueleto depende tan solo de tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada tipo de filamento se forma a partir de diferentes monómeros proteicos que pueden construir una gran variedad de estructuras en función de las proteínas que se asocian a ellos. Algunas de estas proteínas asociadas unen filamentos entre sí o bien sirven de enlace entre los filamentos y componentes celulares específicos, como por ejemplo la membrana plasmática o la membrana de orgánulos celulares. Otras proteínas asociadas controlan el momento y lugar de la polimerización y ensamblaje. Otras proteínas se asocian a los filamentos para producir movimientos, como por ejemplo la contracción celular, el movimiento flagelar o ciliar y el movimiento de los sistemas membranosos intracelulares.

La investigación sobre el citoesqueleto es un campo apasionante precisamente por la función integradora que el citoesqueleto tiene sobre el comportamiento celular. Son muchos los grupos de investigación que trabajan sobre los múltiples aspectos de la dinámica y estructuración del citoesqueleto. A pesar de ello, aún queda mucho por conocer sobre las funciones que sus elementos (principales y asociados) desarrollan en la célula. En las páginas que siguen comentaremos algunas de las distintas aproximaciones experimentales que en la actualidad se utilizan dentro del área de estudio sobre el citoesqueleto y los resultados que nuestro grupo de investigación ha obtenido en tres aspectos distintos sobre la dinámica y distribución del citoesqueleto en células animales.

2.-Métodos en el estudio del citoesqueleto

Métodos fluorescentes.

Los métodos fluorescentes son de una gran utilidad en el estudio de la distribución y dinámica del citoesqueleto. Las dimensiones de los sistemas filamentosos son demasiado reducidas para ser resueltas mediante el uso de la microscopía convencional de campo claro. Los métodos que utilizan la fluorescencia como sistema de marcaje y visualización del citoesqueleto permiten dentro de los límites de la microscopía óptica, resolver la distribución espacial del citoesqueleto.

Son muchos y diversos los sistemas de marcaje fluorescente para la observación y estudio del citoesqueleto. De entre ellos son de destacar los métodos basados en el uso de la inmunofluorescencia, los métodos que se fundamentan en la detección de haptenos conjugados a moléculas del citoesqueleto y el uso de la microscopía de fluorescencia confocal.

Una de las grandes ventajas de la inmunofluorescencia en el estudio del citoesqueleto en relación con otros sistemas de marcaje inmunocitoquímico, es la resolución que se obtiene con los sistemas fluorescentes. En el estudio mediante inmunofluorescencia de las proteínas del citoesqueleto es crucial el disponer de anticuerpos o marcadores que sean capaces de reconocer específicamente sus distintos componentes. Se han desarrollado una gran variedad de anticuerpos mono y policlonales susceptibles de ser utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia (Methods in Enzymology, vol. 134). En la actualidad, muchos de ellos son comerciales y por consiguiente de fácil acceso. Para su aplicación inmunocitoquímica los anticuerpos deben ser completamente específicos y los epítomos reconocidos por los mismos deben ser resistentes a los métodos de fijación. No obstante, el hecho que los distintos elementos del citoesqueleto se hallen formando una red filamentosa, posibilita el uso de métodos suaves de fijación (metanol, acetona, etc.) sin que sus componentes sean solubilizados durante la aplicación del método inmunocitoquímico. Estos sistemas de fijación suave, además de garantizar la mínima alteración posible sobre los epítomos del citoesqueleto garantiza la máxima accesibilidad de los anticuerpos en el interior celular. Sin embargo, cuando se pretende estudiar la relación existente entre el citoesqueleto y otros componentes celulares (Complejo de Golgi, retículo endoplasmático, lisosomas, etc.) es aconsejable utilizar los métodos de fijación aldehídica para garantizar la no solubilización de los componentes de membrana. A parte de los métodos fluorescentes basados en el uso de los anticuerpos, otros sistemas de detección consisten en la utilización de moléculas que tienen afinidad por alguno de los componentes del citoesqueleto y que están acomplejadas a compuestos fluorescentes. Este es el caso de la faloidina, la cual posee una elevada afinidad por los filamentos de actina. El complejo faloidina-marcador fluorescente se utiliza de manera muy generalizada en los estudios de organización celular de la actina.

Los métodos de inmunocitoquímica mediada por hapteno (HMI) es una alternativa a la observación directa de los análogos fluorescentes en las células vivas. La HMI evolucionó a partir del uso de anticuerpos anti fluoresceína en la investigación de las interacciones hapteno-anticuerpo. Brevemente, el sistema consiste en la producción de un análogo producido por la derivatización de la macromolécula nativa con un grupo hapténico fluorescente o no. El análogo se incorpora en las células vivas y después de cierto tiempo las células se fijan. Para visualizar la distribución del análogo las células se marcan con anticuerpos contra el hapteno y a su vez, con anticuerpos secundarios conjugados a marcadores visualizables en microscopía óptica o electrónica (Gorbsky y Borisky, 1989). Los métodos de HMI pueden ser utilizados para dos grandes propósitos: para estudiar el equilibrio en la distribución de análogos introducidos en células vivas y para analizar su

dinámica. De hecho esta técnica es aplicable en el estudio de muchos componentes celulares, pero principalmente en el estudio del citoesqueleto.

El material biológico está organizado en cuatro dimensiones: tres espaciales y una temporal. El citoesqueleto constituye un ejemplo extremo de esta organización: se distribuye por todo el interior celular y es altamente dinámico. El sistema de microscopía ideal tendría que ser capaz de obtener esta información sobre la organización celular con la mayor resolución posible, y además dejar al organismo lo más intacto posible. La microscopía óptica es capaz de visualizar muestras biológicas en sus condiciones naturales y, en principio, durante su desarrollo temporal. En este aspecto tiene una gran ventaja sobre la microscopía electrónica donde, en la práctica, solo pueden ser observadas muestras en un estado deshidratado. Además, los pasos de preparación de la microscopía electrónica pueden afectar la morfología de las estructuras biológicas. La microscopía confocal tiene una posición intermedia entre ambas técnicas: permite optimizar al máximo la resolución de la microscopía óptica y además tiene la ventaja específica de su excelente capacidad para visualizar tridimensionalmente la estructura tridimensional de los objetos biológicos. Al margen de los principios de la microscopía confocal, los cuales se desarrollarán en detalle lecciones de este curso, este tipo de microscopía permite obtener unos resultados óptimos en el estudio del citoesqueleto. La microscopía de fluorescencia confocal, tanto por su resolución como por sus facilidades en la reconstrucción espacial de los elementos del citoesqueleto ha representado un gran avance en el conocimiento de la organización interna celular.

Métodos en microscopía electrónica

A pesar de la potencialidad de la microscopía confocal, el objetivo principal de los biólogos celulares es el de observar las estructuras del interior celular en condiciones lo más próximas posibles al de su estado natural y a la mayor resolución posible. En la actualidad, estos niveles de resolución sólo son posibles mediante la utilización de la microscopía electrónica (ME). Las técnicas convencionales de ME tanto de transmisión como de barrido, son de relativa utilidad en el estudio del citoesqueleto. La ME de barrido proporciona en principio información de superficie y a baja resolución, y la ME de transmisión tan solo proporciona información de una delgada sección de la preparación. El citoesqueleto es una estructura intracelular y además se distribuye por todo el conjunto celular. Es por ello que se han desarrollado técnicas que permiten la obtención de información en relación a la distribución del citoesqueleto y a nivel de la ME.

De entre ellas son de destacar, las técnicas de sublimación en profundidad (deep etch). Estas técnicas se fundamentan en la congelación extremadamente rápida de las muestras biológicas (quick freeze) para evitar la formación de cristales intracelulares, en la criofractura y en la sublimación del agua intracelular. Con posterioridad el método consiste en la realización de una réplica de la superficie fracturada y sublimada (vease Hirokawa, 1986, para detalles sobre la metodología). Con todo ello se consigue una preparación de ME de transmisión

que permite obtener información sobre la estructuración tridimensional del citoesqueleto.

Otra de las técnicas en microscopía electrónica de transmisión que permite conocer la distribución espacial a alta resolución del citoesqueleto celular, la constituyen las técnicas de solubilización diferencial. Las distintas estrategias desarrolladas en este campo se fundamentan en el hecho que mediante el tratamiento de las células con distintos detergentes y enzimas se consigue una solubilización selectiva de los distintos componentes citoplasmáticos (véase Fey y Penman, 1985 para una revisión sobre el método y sus aplicaciones). Con ello es posible mantener intacto el citoesqueleto celular (principalmente la red de filamentos intermedios) y en ausencia de los otros constituyentes intracelulares los electrones pueden atravesar la célula (Figura 1). En este método se pueden también aplicar las técnicas de inmunomarcaje y en combinación con los métodos de pre-inclusión obtener información tridimensional de la organización del citoesqueleto a alta resolución (véase Vikstrom et al., 1991), como ejemplo de su utilización en el estudio de la dinámica de los filamentos intermedios.

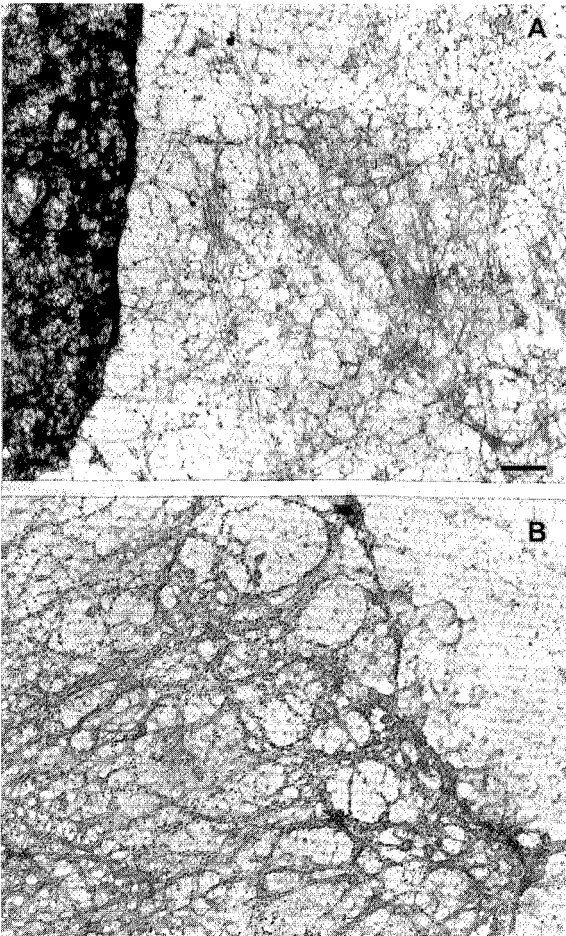


Figura 1. La red de filamentos intermedios de citoqueratina en hepatocitos en cultivo. Las células fueron crecidas sobre rejillas de microscopía electrónica, solubilizadas con triton X-100, fijadas e inmunomarcadas con anticuerpos de conejo anti-citoqueratina y proteína A-Oro coloidal (15 nm), contrastadas y visualizadas en microscopía electrónica de transmisión. Barra: 400 nm.

3.-La dinámica del complejo de Golgi y su relación con el sistema microtubular durante la mitosis

Antecedentes

En eucariotas superiores el complejo de Golgi consiste en un sistema de cisternas membranosas, dispuesto en sáculos aplanados cerca del centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Farquhar, 1985). El número de cisternas varía ampliamente en los diferentes tipos celulares. El tráfico proteico se desplaza vectorialmente a través del complejo de Golgi desde su entrada (o cara cis) a partir del retículo endoplasmático hasta la salida (o cara trans). El complejo de Golgi tiene un papel central en el procesamiento post-traducciona l y en la clasificación (“sorting”) del tráfico proteico y lipídico. La visión tradicional del complejo de Golgi se basa en la existencia de al menos cuatro compartimientos funcionales: cis, medio, trans y la red trans-de distribución (o trans Golgi network, TGN). El TGN, consiste en la última cisterna y en la red tubular asociada y es el lugar de clasificación para las proteínas lisosomales y las de secreción regulada (Griffiths y Simons, 1986). El compartimiento identificado más recientemente es el llamado compartimiento intermedio del retículo endoplasmático-Golgi o red de distribución cis-Golgi (CGN) (Hauri y col., 1992), que realiza funciones de clasificación en la cara cis del complejo de Golgi. A pesar del gran esfuerzo realizado hasta la fecha por muchos grupos distintos de investigación, el modelo de organización funcional del Complejo, dista mucho de ser definitivo. Recientemente, Mellman y Simons (1992) han sugerido la existencia de tres compartimientos funcionales, el CGN, las cisternas y el TGN.

Una cuestión fundamental en la biología celular son los mecanismos que disponen las localizaciones específicas de los orgánulos. Una gran cantidad de datos indica que las proteínas del citoesqueleto juegan una función muy importante en estos procesos. Recientemente se han obtenido fuertes evidencias que todos los orgánulos de membrana citoplasmáticos mantienen una íntima y dinámica asociación con el sistema microtubular (Kelly, 1990). La naturaleza dinámica de las interacciones microtúbulos-orgánulos puede evidenciarse en la redistribución dependiente del ciclo celular del complejo de Golgi (Kreis, 1990). Las células interfásicas presentan un complejo de Golgi (Ramburg y Clermont, 1990), localizado en las proximidades del centro organizador de microtúbulos (MTOC) en una cara de la membrana plasmática. Durante la mitosis, el complejo de Golgi se desintegra formando multitud de vesículas dispersas en el citoplasma (Lucocq et al., 1987,1989). En la telofase, las vesículas se reagrupan en la región pericentriolar. El movimiento vesicular del Golgi se orienta en dirección al extremo menor de los microtúbulos, el cual está localizado en el centrosoma.

El objetivo de nuestro estudio ha sido el de conocer la dinámica de los distintos compartimientos del complejo de Golgi durante el ciclo celular y su relación con los cambios que se producen en el sistema microtubular durante la mitosis. Para ello hemos utilizado distintos anticuerpos específicos que reconocen proteí-

nas integrales presentes en el cis-Golgi, trans-Golgi y supuestamente en el compartimiento intermedio (Yuan et al., 1987), y anticuerpos específicos contra la subunidad α de la tubulina. Mediante el uso de células NRK (“normal rat kidney”) sincronizadas e inmunofluorescencia indirecta, hemos estudiado la distribución de los distintos compartimientos y su relación con el sistema microtubular durante las distintas fases de la mitosis.

Resultados y Discusión

La entrada de la célula en la mitosis es paralela a una desorganización de los distintos compartimientos del complejo de Golgi. En la profase se evidencia un inicio de desorganización de todos los distintos compartimientos reconocidos por los anticuerpos utilizados. El inicio de desorganización es paralelo a la duplicación centriolar y al principio de formación del huso polar.

En la prometafase I coincidiendo con la desorganización de la envoltura nuclear se completa la redistribución y en la metafase se detectan el Cis y Trans-Golgi, pero desaparece prácticamente todo el marcaje inmunofluorescente que identifica el compartimiento intermedio (Figura 2).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que todos los cambios detectados durante las redistribuciones del complejo de Golgi son paralelas a

la dinámica del sistema microtubular durante la mitosis. La disgregación del Complejo se inicia en el momento en que los centriolos se separan para formar los polos del huso. Estos resultados apoyan la existencia de un proceso

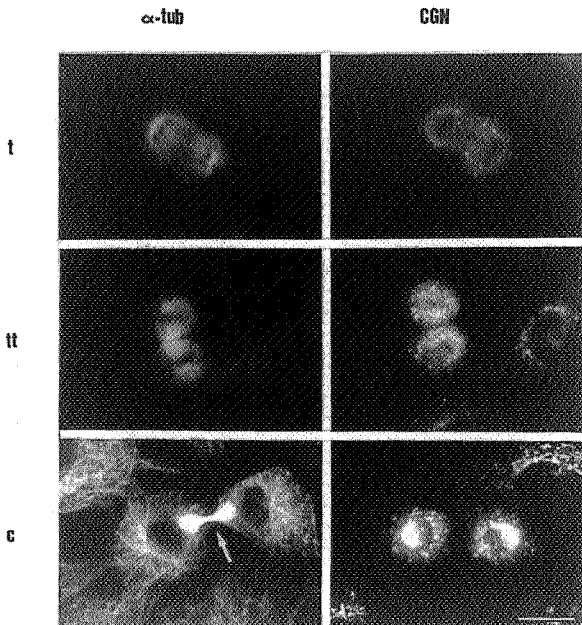


Figura 2. La redistribución del compartimiento CGN (Cis Golgi Network) durante la mitosis. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos contra alfa-tubulina (alfa-tub) para visualizar el sistema microtubular y anticuerpos contra el compartimiento CGN para visualizar su redistribución durante la telofase (t), telofase tardía (tt) y citocinesis (c) de la mitosis de células NRK. Barra: 20 μ m.

de cambio en los sistemas que mantienen la posición del complejo. Recientemente se ha descrito que la proteína motora dineína participa en la localización centrosomal del complejo (Corthésy-Theulaz et al., 1992). Además, es más que probable que los mecanismos de control posicional del complejo de Golgi sean regulados por los mecanismos propios del ciclo celular. El sistema microtubular parece también estar estrechamente relacionado con la dinámica de reagregación del complejo. Así, en el momento que finaliza la anafase y se inicia la telofase, las distintas cisternas del complejo se reagrupan primero en las regiones periféricas citoplasmáticas y posteriormente alrededor de las regiones centriolares, observándose una condensación vesicular directamente relacionada con los microtúbulos astrales. Es también probable que esta reagrupación esté inducida por proteínas motores capaces de orientar a las vesículas del complejo en dirección a los extremos menores de los microtúbulos. De nuevo la dineína citoplasmática es un buen candidato para esta función (Corthésy-Theulaz et al., 1992).

Los distintos compartimientos del complejo de Golgi parecen tener un comportamiento diferencial durante la mitosis. Mediante doble marcaje inmunofluorescente, se observa que el proceso de desorganización desde la profase a la metafase mitótica, y el proceso de reconstitución de estas estructuras endomembranas desde la metafase hasta la citocinesis, no se producen de manera desorganizada sino que podrían realizarse de manera secuencial. Los resultados obtenidos indican que el primer compartimiento desorganizado se corresponde al CGN. El mismo compartimiento es el primero que se reconstituye en la telofase, la reorganización del CGN podría permitir la reorganización del cis y este a su vez la reconstitución del trans-Golgi, tal y como se detecta después del tratamiento con Brefeldina A (Alcalde et al., 1992). Este proceso secuencial tiene un origen desconocido pero constituido seguramente por señales químicas propias del proceso mitótico e íntimamente ligadas al comportamiento microtubular. En resumen, los resultados obtenidos apuntan a que las distintas fases de disgregación-reagregación del complejo de Golgi están directamente controladas por el comportamiento microtubular y que podrían darse de modo secuencial y altamente organizado para los distintos componentes del complejo.

4.-La distribución de los proteoglicanos de tipo heparina sulfato de la superficie celular depende del citoesqueleto de actina

Antecedentes

Los proteoglicanos (PGs) de la superficie celular se unen a una gran diversidad de proteínas estructurales de la matriz extracelular, receptores, factores de crecimiento, enzimas y otras proteínas y, por consiguiente influyen las interacciones de las células con su entorno (Wight et al., 1992). Las interacciones que tienen parte en estos procesos ocurren a través de las cadenas de los glucosaminoglicanos (GAG) o a través de las interacciones proteína-proteína de los dominios específicos de las proteínas centrales de los proteoglicanos.

A los PGs de heparina sulfato (HS) se los considera como los receptores in vivo de las proteínas de unión a heparina, las cuales incluyen algunas de las moléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, enzimas lipolíticos y degradativos, proteínas nucleares y proteínas virales (Kjellén y Lindhal, 1991). Dos de las proteínas de unión a heparina mejor conocidas son la lipoproteína lipasa (LPL) y el factor básico de crecimiento de los fibroblastos (FGF-2). La LPL se halla anclada a los PG(s) de la superficie luminal de las células endoteliales, donde ejerce su acción sobre las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (vease Olivecrona y Bengtsson-Olivecrona, 1993 para una revisión sobre el tema). Por otro lado, los PGs actúan como receptores de baja afinidad para el FGF-2, y son imprescindibles en la interacción del FGF-2 con el receptor de alta afinidad, que se trata de una proteína quinasa que desencadena una cascada de señalización intracelular (Yayón y col., 1991). El mecanismo de interacción PGs-factor de crecimiento-receptor de alta afinidad parece ser común para otros factores de crecimiento y sus receptores tirosina quinasa específicos.

Dada que la interacción entre PGs y receptores de la membrana plasmática parece ser crítica para la presentación e interacción celular de las proteínas de unión a heparina, en el trabajo que presentamos hemos estudiado la distribución de los PGs de heparina sulfato en la superficie celular de fibroblastos humanos en cultivo y su posible relación con el citoesqueleto cortical de actina.

Resultados y Discusión

La detección fluorescente de LPL y FGF-2 añadidos a fibroblastos humanos en cultivo pone de manifiesto que este tipo celular posee una elevada capacidad de unión de estas proteínas. Mediante estudios de competitividad entre ambas proteínas se detecta que ambas se unen a los mismos puntos de unión. Además mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido se observa que sólo la superficie superior de la célula es capaz de unir estas proteínas. Estos receptores superficiales son de tipo PGs de heparina sulfato ya que el tratamiento de las células con enzimas que degradan los HS imposibilita la unión de estas proteínas y además utilizando anticuerpos contra dichos HS se observa el mismo patrón de distribución celular. El conjunto de estos resultados indica que dichas proteínas se unen con facilidad a la superficie celular y que la amplia distribución y abundante presencia de PGs de HS podría incrementar la eficiencia de captación celular de proteínas de unión a heparina.

El aspecto más sorprendente de los resultados obtenidos, lo constituye el patrón de distribución de los proteoglicanos en la superficie celular: estos se encuentran en alineamientos paralelos que cruzan la superficie superior de los fibroblastos en cultivo. Mediante técnicas de doble inmunofluorescencia (Figura 3) y de microscopía confocal se detecta que este alineamiento coincide perfectamente con la distribución de los filamentos corticales de actina. Utilizando la droga citocalasina para provocar la despolimerización de actina se detecta que la desorganización de la actina es paralela a la de los PGs de HS de la superficie celular. La

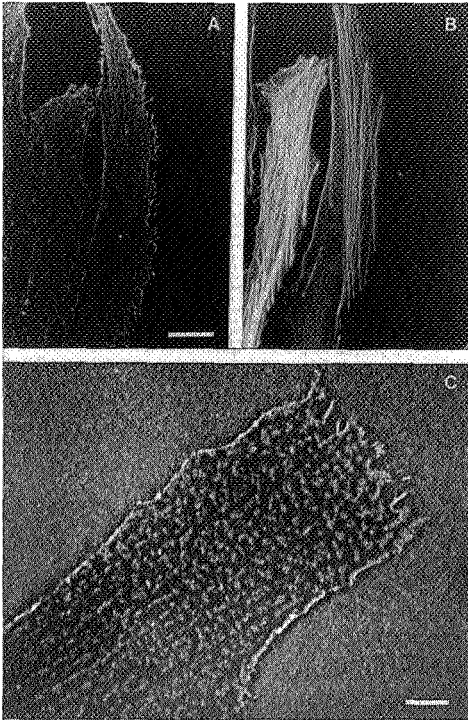


Figura 3. La distribución de los proteoglicanos en la superficie celular y su relación con el citoesqueleto de actina. A y B doble fluorescencia con FGF-2 acoplada con biotina y visualizada con streptavidina-FITC (A) y faloidina-TRITC (B) para visualizar la distribución de la actina en fibroblastos humanos en cultivo. Obsérvase la estrecha relación entre los lugares de unión en la superficie celular del FGF-2 (proteoglicanos) y la actina intracelular. En (C) imagen de electrones retrodispersados obtenida en microscopía electrónica de barrido, que muestra la distribución del FGF-2 (biotina)-revelado con estreptavidina-oro coloidal y amplificado con plata- en la superficie de fibroblastos humanos en cultivo. Barra para A y B: 20 μm , Barra en C: 4 μm .

función de la interacción de los PGs de la superficie celular con el citoesqueleto de actina podría ser fisiológicamente importante. Se ha demostrado que la fosforilización de tirosina del receptor del FGF-2 induce la unión del dominio SH2 de la fosfolipasa C gamma (PLC) con alta afinidad (Mayer y Baltimore, 1993). En respuesta a la estimulación con el factor, la PLC es a su vez fosforilada y activada (Nishibe et al., 1990). La PLC endógena y microinyectada se localiza con la actina (Bar-Sagi y col., 1993); actualmente está claro que el dominio SH3 de la PLC es la responsable de su localización intracelular (Bar-Sagi et al., 1993). Además, la vía de señalización iniciada con la PLC puede también ser responsable de la reorganización de los filamentos de actina también observados en nuestro estudio. Esta reorganización de la actina podría ser inducida por la activación de la PLC que dispara a su vez la liberación de la profilina (Goldschmith-Clermont et al., 1991) y la profilina libre puede formar un complejo con la actina, inhibiendo su polimerización.

Por consiguiente, tomando en consideración los precedentes a nuestro estudio y los resultados obtenidos, parece posible que los filamentos corticales de actina distribuyan y organicen un conjunto de diferentes proteínas

(receptores de alta y baja afinidad, moléculas de señalización y factores de regulación del citoesqueleto) cercanos uno al otro por medio de sus interacciones con la actina y localizados en lugares específicos a lo largo de los filamentos. Este complejo molecular podría regular la organización de los filamentos y también la cas-

cada de señalización intracelular inducida por los factores de crecimiento. Este sistema podría ser análogo a la maquinaria molecular de los contactos focales (Schaller y Parsons, 1993), pero distribuida a lo largo de los filamentos corticales de actina en vez de los extremos celulares.

5.-Durante la desdiferenciación de los hepatocitos neonatales en cultivo se produce un intercambio de filamentos de citoqueratina por vimentina

Antecedentes

La renovación celular en el hígado tiene lugar muy lentamente, y los compartimientos proliferativos y diferenciados terminalmente no están claramente delimitados, ni son identificables con facilidad. A pesar de que están altamente diferenciados, los hepatocitos adultos retienen un potencial replicativo y proliferan en respuesta a un déficit de masa hepática o a la muerte celular causada por agentes químicos y virales (Fausto, 1990). La identificación de los mecanismos de proliferación y diferenciación en el hígado tienen importantes implicaciones para entender los linajes celulares hepáticos, la expresión de genes específicos hepáticos y los mecanismos generales de la regulación del crecimiento durante el desarrollo, las lesiones hepáticas y la carcinogénesis.

A diferencia del hígado adulto, los hepatocitos obtenidos de ratas de una semana de vida son inmaduros y crecen en ausencia de hormonas añadidas al medio de cultivo. En cultivos de células hepáticas, se observa que además de la presencia de hepatocitos aparecen células de morfología fibroblástica que proliferan y se extienden por el cultivo. Hasta la fecha no se ha conseguido elucidar el origen de estas células (Yeoh et al., 1986). Además, cuando los hepatocitos neonatales se mantienen en monocapa por varias semanas, son reemplazados por células epiteliales que no tienen parecido fenotípico con los hepatocitos originales (Marceau et al., 1989).

Entre los principales marcadores bioquímicos de diferenciación se hallan los filamentos intermedios (IF) que se expresan en prácticamente todas las células de mamífero. En base de su expresión específica de tejido, pueden ser subdivididos en cinco grupos: vimentina (células de origen mesenquimal), proteína glial ácida fibrilar (células gliales), desmina (células musculares), proteínas de los neurofilamentos (neuronas), y queratinas (células epiteliales) (Albers y Fuchs, 1992). Tanto in vivo como in vitro, todos los filamentos intermedios tienen la capacidad de ensamblarse en filamentos de 8 a 10 nm en ausencia de proteínas auxiliares y otros factores. La red citoplasmática formada por los IFs parece formar estrechas asociaciones con el núcleo y la membrana plasmática.

El objetivo de nuestro estudio ha sido el de caracterizar el comportamiento de las células neonatales en cultivo con el objetivo de aproximarnos al origen de las células fibroblásticas. Para ello hemos estudiado la expresión de diferentes marcadores de diferenciación de los hepatocitos y muy especialmente la distribución de los filamentos intermedios de citoqueratina y de vimentina.

Resultados y Discusión

Cuando se cultivan hepatocitos de neonato en ausencia de factores de crecimiento aparece una población de células de fenotipo fibroblástico altamente proliferante y con capacidad migratoria. Estas células se convierten en la población celular más abundante a la semana de cultivo, mientras que la población de hepatocitos decrece y las restantes muestran cambios degenerativos. Mediante inmunofluorescencia se detecta que poco tiempo después del inicio del cultivo un 95% de las células expresan albúmina. Sin embargo a la semana del cultivo sólo un 10% de las células presentan albúmina en su citoplasma. Por medio de experimentos de doble localización con anticuerpos contra citoqueratina y albúmina muestran que las células que presentan ambos marcadores son de fenotipo epitelial. También se observan muchas células que presentan una morfología epitelial extendida pero sin presentar albúmina en su citoplasma. La vimentina está presente con una intensidad variable en las células fibroblásticas. Las células vimentina positivas no presentan albúmina, aunque unas pocas células con morfología epitelial extendida presentan un ligero marcaje tanto para vimentina como para albúmina. Mediante inmunofluorescencia doble y microscopía confocal con anticuerpos contra citoqueratina y vimentina realizada a distintos tiempos de cultivo se observa una reducción progresiva en el número de células citoqueratina positivas y un incremento paralelo en las células vimentina positivas. Muchas células con morfología epitelial extendida coexpresan ambos tipos de filamentos intermedios. La aparición de las células de tipo fibroblástico está regulada durante la ontogenia ya que el mayor incremento en el porcentaje de células vimentina positiva se corresponde a los cultivos procedentes de células hepáticas obtenidas de animales de 7 y 15 días de vida.

Los cambios en la distribución de los marcadores de diferenciación utilizados en el presente trabajo sugieren que los hepatocitos neonatales sufren cambios transicionales que reflejan el estado de su programa de diferenciación:

A) La expresión de albúmina es el primer marcador de diferenciación que se pierde en el cultivo de las células hepáticas. La distribución de las células epiteliales que no presentan albúmina sugiere que la pérdida de contacto celular podría ser un paso crítico en el proceso. Muchas funciones específicas de los hepatocitos están reguladas por contactos celulares (Nakamura et al., 1983).

B) La pérdida de contacto celular induce una reorganización del citoesqueleto y un cambio en la morfología de tipo epitelial. El cambio en la expresión de citoqueratina es uno de los primeros que se induce en las transiciones de tipo epitelial-mesenquimal (Reichmann et al., 1992).

C) La expresión de los filamentos de vimentina es un fenómeno temprano relacionado con el estado fibroblástico. La rápida inducción de vimentina se ha observado en muchos fenómenos de transición epitelial-mesenquimal, y parece estar influenciada por la pérdida de contacto celular (Hay, 1990). Por último, nuestros resultados sugieren que la proliferación y la capacidad de transición epitelial-mesenquimal de las células neonatales hepáticas está regulada ontogénica-

mente. Este hecho podría ser un reflejo de que in vivo el crecimiento y diferenciación del hígado se produce durante el período de lactación (Marceau y col., 1989).

Por otro lado, mediante el estudio de las células que presentan coexpresión de los filamentos citoqueratina y vimentina, se observa que el inicio de la formación de los filamentos de vimentina se da en los extremos celulares que no mantienen contacto con otras células. Además en todos los casos en los que se detecta coexpresión e independientemente de la extensión de los filamentos de vimentina, se observa que las redes de ambos tipos de filamentos se superponen. Este resultado sugiere que tanto los puntos de iniciación como el crecimiento de los filamentos de vimentina utiliza de algún modo la red preexistente de citoqueratina para su formación y extensión en el citoplasma celular. Es posible que otros elementos del citoesqueleto, o bien proteínas asociadas a los filamentos intermedios puedan dirigir el crecimiento de los filamentos de vimentina de nueva formación así como la organización de la red de citoqueratina pre-existente.

Agradecimientos

Agradecemos la inestimable colaboración técnica de David García en el mantenimiento de los cultivos celulares utilizados en el presente trabajo. Asimismo agradecemos a Ana Ribera y Almudena García su ayuda en los estudios de microscopía electrónica realizados en el curso de nuestros estudios. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio han sido financiados por medio de ayudas a la investigación de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D) y del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Albers, K., and E. Fuchs. (1987). The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J. Cell Biol.* 105:791-806.
- 2.-Alcalde, J., P. Bonay, A. Roa, S. Vilaró and I. Sandoval. (1992). Assembly and disassembly of the Golgi Complex: two processes arranged in a cis to trans direction. *J. Cell Biol.* 116:69-83.
- 3.-Bar-Sagi, D., D. Rotin, A. Batzer, V. Mandiyan, and J. Schlessinger. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74:83-91.
- 4.-Corthésy-Theulaz, I., A. Paulion, and S. R. Pfeffer. (1992). Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 118:1333-1345.
- 5.-Farquhar, M.G. (1985). Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:447-486
- 6.-Fausto, N. (1990) Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:1036-1042.
- 7.-Fey, E. G and S. Penman. (1985). New views of cell and tissue cytoarchitecture: embedment-free electron microscopy and biochemical analysis. *Hepatology* 1: 152-158.
- 8.-Goldschidt-Clermont, P.J., J. W. Jim, L.M. Machesky, S.G. Rhee, and T. D. Pollard. (1991). Regulation of phospholipase Cy1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231-1233.
- 9.-Gorbsky, G.J. and G. G. Borisy, (1989). Hapten-mediated Immunocytochemistry: The use of fluorescent and nonfluorescent haptens for the study of cytoskeletal dynamics in living cells. *Meth. Cell Biol.* 29:175-194.
- 10.-Gritths, G. and K. Simons, (1986). The trans Golgi Network: sorting at the exit site of the Golgi Complex. *Science*, 234:438-443.
- 11.-Hauri, H-P. and A. Schweizer, (1992). The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin. Cel. Biol.* 4:600-608.
- 12.-Hay, E.D. (1990). Epithelial-mesenchymal transitions. *Sem. Dev. Biol.* 1:347-356
- 13.-Hirokawa, N. (1986). Quick-Freeze, Deep Etch of the cytoskeleton. *Meth. Enzymol.* 134: 598-611.
- 14.-Kelly, R.B. (1990). Microtubules, membrane traffic and cell organization. *Cell.* 61: 5-7.
- 15.-Kjellén, L. and U. Lindahl (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60,443-473.
- 16.-Kreis, T. (1990). Role of microtubules in the organization of the Golgi apparatus. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 15:67-70.

- 17.-Lucocq, J.M., J. G. Pryde, E.G. Berger, and W. Warren, (1987). A mitotic form of the Golgi apparatus in HeLa cells. *J.Cell Biol.* 104:865-874.
- 18.-Lucocq, J.M., E.G. Berger, and G. Warren, (1989). Mitotic Golgi fragments in Hela cells and their role in the reassembly pathway. *J. Cell Biol.* 109: 463-474.
- 19.-Marceau, N., M. J. Blouin, L. Germain, and M. Noel. (1989). Role of different epithelial cell types in liver ontogenesis, regeneration and neoplasia. In *Vitro Cell Dev. B.* 25:336-341.
- 20.-Mayer, B.J., and D. Baltimore, (1993). Signaling through SH2 and SH3 domains. *Trends in Cell Biol.* 3, 8-13.
- 21.-Mellman, I. and K. Simons, (1992). The Golgi Complex: In vitro veritas? *Cell*, 68:829-840.
- 22.-Nakamura, T., K., T. Yoshimoto, Y. Nakayama, M. Tomita, and A. Ichihara. (1983). Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7229-7233.
- 23.-Nishibe, S., M.I. Wahl, S.M.T. Hernandez-Sotomayer, N. Tonks, S.G. Rhee, and G. Carpenter (1990). Increase of the catalytic activity of phospholipase C- γ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* 250, 1253-1255.
- 24.-Olivecrona, T. and G. Begtsson-Olivecrona, (1993). Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr. Opin. Lipidol.* 4, 187-196.
- 25.-Rambourg, A. and Y. Clermont, (1990). Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.* 51:189-200.
- 26.-Reichmann, E., H. Schwarz, M. Deiner, I. Leitner, M. Eilers, J. Berger, M. Busslinge, and H. Beug. (1992). Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell.* 71:1103-1116.
- 27.-Schaller, M.D. and J.T. Parsons, (1993). Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 3, 258-261.
- 28.-Vikstrom, K. L., R.K. Miller, and R.D. Goldman, R.D. Analyzing dynamic properties of intermediate filaments. *Meth. Enzymol.*, 196: 506-525.
- 29.-Wight T.N., M.G. Kinsella, E.E. and Qwarnström, (1992). The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4,793-801.
- 30.-Yayon, A., M. Klagsbrun, J.D. Esko, O. Leder, and D.M. Ornitz, (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64, 841-848.
- 31.-Yeoh, G. C. T., A. Douglas, and V. Brightoon. (1986). Long-term culture of fetal rat hepatocytes in media supplemented with fetal calf serum, Ultrosor SF or Ultrosor G. *Biol. Cell.* 58:53-64.
- 32.-Yuan, L., J.G. Barriocanal, J.S., Bonifacino, and I.V., Sandoval, (1987). Two integral membrane proteins located in the cis-middle and trans-part of the Golgi system acquire sialylated N-linked carbohydrates and display different turnovers and sensitivity to cAMP-Dependent phosphorylation. *J. Cell Biol.* 105:215-227.