

## CITOESQUELETO: FILAMENTOS INTERME- DIOS (Primera Parte).

Pedro Franco\*

Todas las células humanas están compuestas por proteínas fibrosas y no fibrosas que constituyen una armazón dinámica llamada citoesqueleto (1) termino acuñado por Needhan a mitad de siglo

El citoesqueleto está compuesto por microfilamentos, filamentos intermedios, microtúbulos, microtrabeculas, y proteínas no filamentosas asociadas a cada uno de estos componentes (2, 3). Los primeros trabajos sobre la estructura y las posibles funciones de los filamentos intermedios(FI) aparecen a finales de la

\* Instructor Asociado Unidad de Histología y Embriología

década de los sesenta (4), aunque se encuentran referencias bibliográficas previas (5) que pueden ser consideradas como las pioneras del estudio de los FI

### DEFINICION

Los FI se denominan así por presentar en las preparaciones de microscopía electrónica diámetros entre 7 y 15 nanómetros, intermedios entre los diámetros de los microfilamentos (5 nm) y los diámetros de los microtúbulos (20 nm)

La expresión de estas proteínas filamentosas está controlada por genes individuales (6) derivadas de un gen ancestral por duplicaciones repetidas que han llevado a cambios en la estructura de los FI lo cual a su vez afecta directamente importantes funciones de los organismos. Por ejemplo las citoqueratinas, componentes normales de los

tegumentos se expresan mediante cambios evolutivos como piel y pelos en especies superiores, o como cuernos y plumas en especies inferiores. La evolución de los FI sigue un patrón de diferenciación cuidadosamente regulada por factores genéticos y medioambientales (7).

Los FI se encuentran expresados filogenéticamente en forma constante desde los peces hasta el mamífero humano (8,9,10), pero también se han identificado en invertebrados tales como los anélidos, los nematelmintos y algunos moluscos en los cuales se han encontrados FI en células epiteliales (11), mesenquimales (12) y neurales (13).

Los estudios sobre el desarrollo ontogénico de los FI se han realizado en embriones de ratón y de pollo principalmente siendo muy pocos los estudios realizados

ABRIL 1991

**MORFOLIR**

en embriones humanos. Sin embargo, en los embriones de ratón los primeros FI localizados corresponden a citoqueratinas de bajo peso molecular de las células externas de las morulas tardías y los blastocitos tempranos. Estos FI se asocian a la aparición de desmosomas rudimentarios<sup>(8)</sup>. La aparición de otros FI se hace en etapas más tardías del desarrollo<sup>(8)</sup>.

agua y detergentes débiles, ensambladas dentro de las células con pesos moleculares variables hasta de 200 KD. Estas proteínas están constituidas por secuencias de más o menos 310 aminoácidos de disposición alfa helicoidal, que forman una región central en forma de barra con un diámetro de un nm y una longitud de 45 nm aproximadamente (figura 1).

nadas L12 (16 aminoácidos) que conecta los segmentos 1 y 2, L1; (8 A 14 aminoácidos) que conecta los subsegmentos 1A y 1B, L2 (8 aminoácidos) que conecta los subsegmentos 2A Y 2B. La presencia de estas secuencias cortas determina la existencia de subclases químicas en una clase química dada. Los residuos de aminoácidos 8 a 20 del segmento 1A y los últimos 30 aminoácidos del segmento 2B corresponden a las regiones más conservadas en todos los FI.<sup>(4,5,7)</sup>. Estos últimos residuos contienen el epitope para un anticuerpo que reacciona con todas las clases químicas de FI<sup>(4)</sup>.

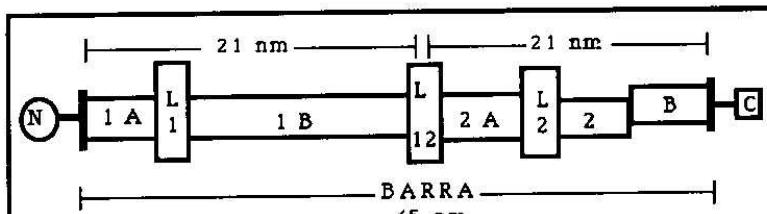


FIGURA 1

Esquema de las estructura básica de los Filamentos Intermedios. Aproximadamente 310 aminoácidos, organizados en dos cadenas de disposición alfa helicoidal, forman la región estable, en forma de barra, dividida en los segmentos 1 y 2. A su vez, cada segmento se divide en subsegmentos (1A y 1B, 2A y 2B), unidos por secuencias cortas de aminoácidos, denominadas L1, L2 y L12. De los extremos de la región central se desprenden dos regiones no helicoidales de composición variable denominadas cabeza amino (N) terminal y cola carboxi (C) terminal, específicas para cada clase química de Filamentos intermedios.

A pesar de la aparente especificidad de la expresión de los FI en las diferentes líneas celulares de acuerdo a la morfología y la función<sup>(5)</sup>, recientemente Owaribe<sup>(10)</sup> mediante estudios en células epiteliales pigmentarias de retinas de diferentes especies, encontró variaciones en la composición del citoesqueleto de estas células indicando que por lo menos en ciertos tejidos, un programa específico de expresión de FI no se relaciona con las funciones de las células estudiadas, las cuales son prácticamente idénticas en todas las especies.

**CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.**

Los FI están compuestos por proteínas fibrosas insolubles en

De esta porción central se desprenden en los extremos, cadenas variables de aminoácidos denominadas cabeza aminoterinal, y cola carboxiterinal. A diferencia de estas regiones terminales la región central es altamente estable y se mantiene con pocas variaciones en las cinco clases químicas de FI (cuadro 1).

La región en forma de barra está dividida en dos segmentos denominados 1 y 2<sup>(7)</sup>, cada uno con una longitud de 21 nm que explica la periodicidad de los FI observados en microscopía electrónica<sup>(14)</sup>, y en cuatro subsegmentos denominados 1A, 1B, 2A Y 2B. Los segmentos 1 y 2 están interrumpidos en varios sitios por secuencias cortas de aminoácidos no helicoidales denominadas L12 (16 aminoácidos) que conecta los segmentos 1 y 2, L1; (8 A 14 aminoácidos) que conecta los subsegmentos 1A y 1B, L2 (8 aminoácidos) que conecta los subsegmentos 2A Y 2B. La presencia de estas secuencias cortas determina la existencia de subclases químicas en una clase química dada. Los residuos de aminoácidos 8 a 20 del segmento 1A y los últimos 30 aminoácidos del segmento 2B corresponden a las regiones más conservadas en todos los FI.<sup>(4,5,7)</sup>. Estos últimos residuos contienen el epitope para un anticuerpo que reacciona con todas las clases químicas de FI<sup>(4)</sup>.

Las regiones terminales son hipervariables en su composición y están constituidas por subregiones específicas para cada clase química de FI, basadas en secuencias homologas de aminoácidos (H) secuencias variables (V), y secuencias terminales básicas (N o C)<sup>(5)</sup> (figura 2). Además, las regiones terminales dan la especificidad a las clases químicas de FI, y determinan en parte las variaciones en el tamaño y diámetro de los FI, explicando esto el por que se pueden hallar FI entre 7 y 15 nm en la preparaciones de ultraestructura.

En los extremos carboxiterminales de las proteínas no epiteliales hay una clara distinción entre los miembros neuronales y los no neuronales. Los neurofilamentos tienen una organización mucho más compleja con extremos carboxiterminales muy largos ricos en ácido glutámico a diferencia de la composición de la desmina, la vimentina y la proteína glial fibrilar.

En los extremos carboxiterminales de las proteínas epiteliales (citoqueratinas) hay enormes concentraciones de cis-

## NUMERO 1

**MORFOLIA**

FILAMENTOS INTERMEDIOS	CLASE QUIMICA	LOCALIZACION PRINCIPAL	PESO MOLECULAR
Cito Q. A	I	Cel. Epiteliales	40-70 Kd
Cito Q. B - N	II	Cel. Epiteliales	40-70 Kd
Vimentina		Cel. Mesenquimales	57 Kd
Desmina	III	Cel. Musculares	53 Kd
PGFA		Cel. Gliales	54 Kd
			68 Kd (L)
Neuro Fil.	IV	Neuronas	160 Kd (M) 200 Kd (H)
			70 Kd (A)
Lámina	V	Carioesqueleto	67 Kd (B) 60 Kd (C)

CUADRO 1 Características Generales de los Filamentos Intermedios

teína que permiten la formación de puentes disulfuro y dar especial resistencia a estos FI.

Todos los extremos aminoterminales son abundantes en residuos de prolina y arginina, aminoácidos estructuralmente importantes en los procesos de

ensamblaje de los FI.

Las variaciones en los extremos terminales explican además la afinidad de los FI para determinadas coloraciones histoquímicas. Por ejemplo, los neurofilamentos poseen extremos carboxiterminales específicos que

permiten la tinción con colorante de Bodian.

La polimerización de dos unidades alfa helicoidales en una unidad tetramérica determina la formación de un protofilamento (4), mientras que la polimerización de 8 unidades tetraméricas determina la formación del FI de aproximadamente 7 nm de diámetro el cual puede aumentar a 15 nm de diámetro gracias a la presencia de las regiones variables (figuras 3 y 4). Este modelo de polimerización remplazó los modelos hipotéticos previos de protofilamentos diméricos y triméricos (15).

#### FACTORES QUE DETERMINAN LA POLIMERIZACION DE LOS FI.

Además de los factores filogenéticos y ontogenéticos que intervienen en la polimerización de los FI, existen factores

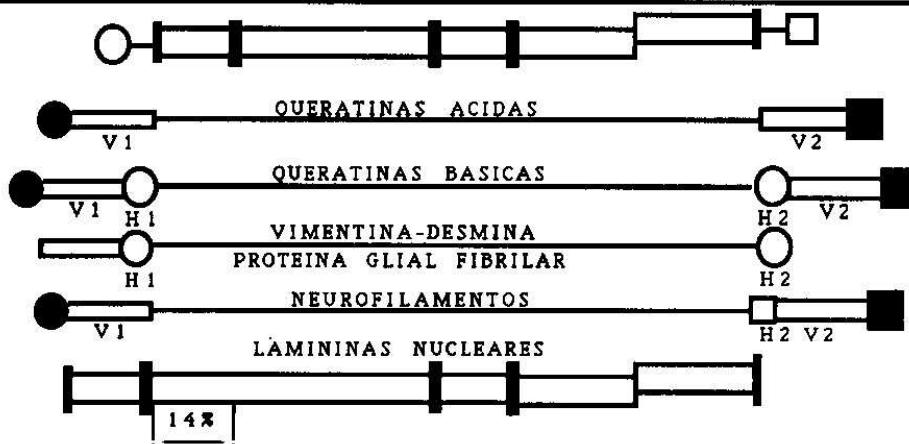
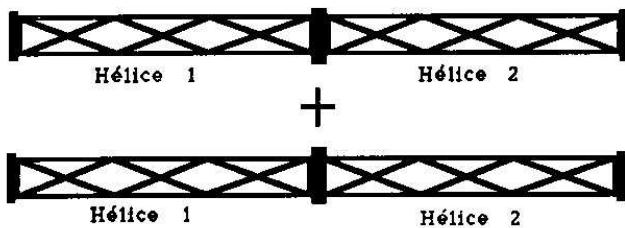


FIGURA 2

Esquema comparativo de la estructura de los diferentes Filamentos Intermedios. Las regiones variables N y C terminales de los FI determinan la existencia de clases químicas y están constituidas por subregiones basadas en secuencias homólogas (H), o variables (V) y terminales básicas (N o C) (en negrilla), específicas para cada clase química. En las lamininas nucleares, la región central, en forma de barra, es más larga y está compuesta por aproximadamente 360 aminoácidos, debido a la mayor longitud del subsegmento 1B. Sin embargo, la molécula presenta hasta un 70% de homología con la vimentina.

ABRIL 1991

**MORFOLIA****PROTOFILAMENTO (Unidad Tetramérica)****FIGURA 3**

Esquema de la formación de un protofilamento. La unión de cuatro cadenas alfa helicoidales por medio de interacciones iónicas entre segmentos vecinos de polipéptidos, tiene su máxima expresión cuando los subsegmentos 1B y 2B, de moléculas adyacentes, están cerca

que podemos denominar intrínsecos y extrínsecos o medioambientales que determinan la polymerización de cada tipo específico de FI.

**Factores Intrínsecos**

Las citoqueratinas, las láminas y los neurofilamentos presentan características especiales en la forma de polymerización, dependientes de las propiedades moleculares y bioquímicas de cada proteína.

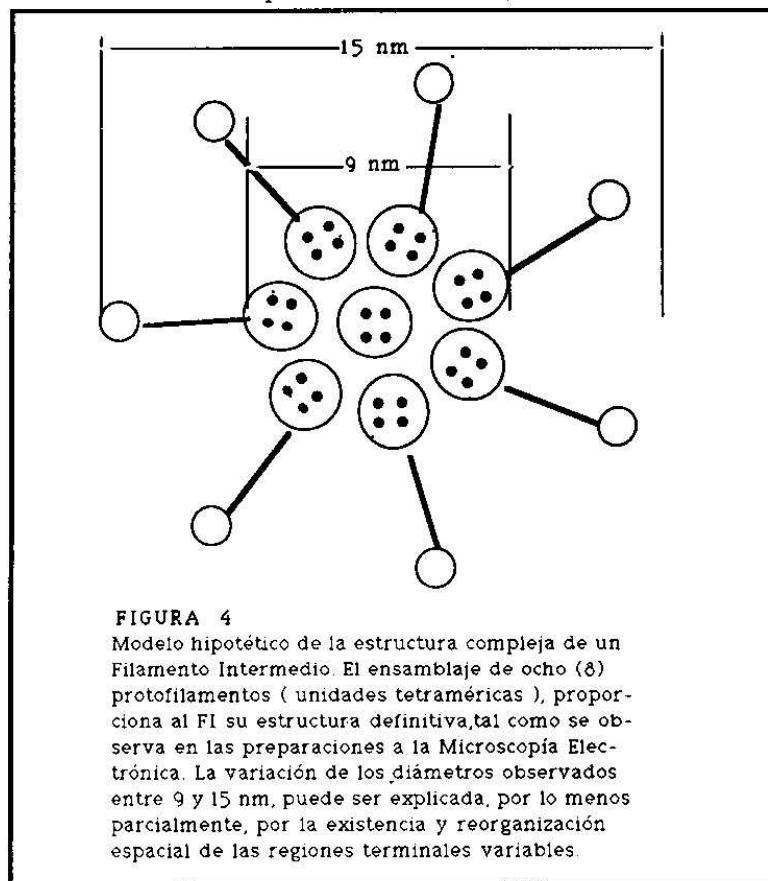
Las citoqueratinas son heterodímeros compuestos por dos polipéptidos de la clase química I (citoqueratinas ácidas), y dos polipéptidos de la clase química II (citoqueratinas básicas y neutras) que forman la unidad fundamental tetramérica o protofilamento (15,4,16). Aunque no se conocen las bases moleculares que determinan la formación de homodímeros o heterodímeros, se cree que existen péptidos de registro comparables a los telopeptídos del colágeno, que regulan la dimerización. Crewther (17) cree que esta polymerización puede regularse por interacciones iónicas entre segmentos de polipéptidos vecinos, la cual tendría su máxima expresión cuando los segmentos 1B y/o 2B están cerca, lo que deter-

minaría su disposición paralela o antiparalela (figura 5). Las evidencias favorecen la existencia de los modelos antiparalelos

expuestos en la figura 5.(5)

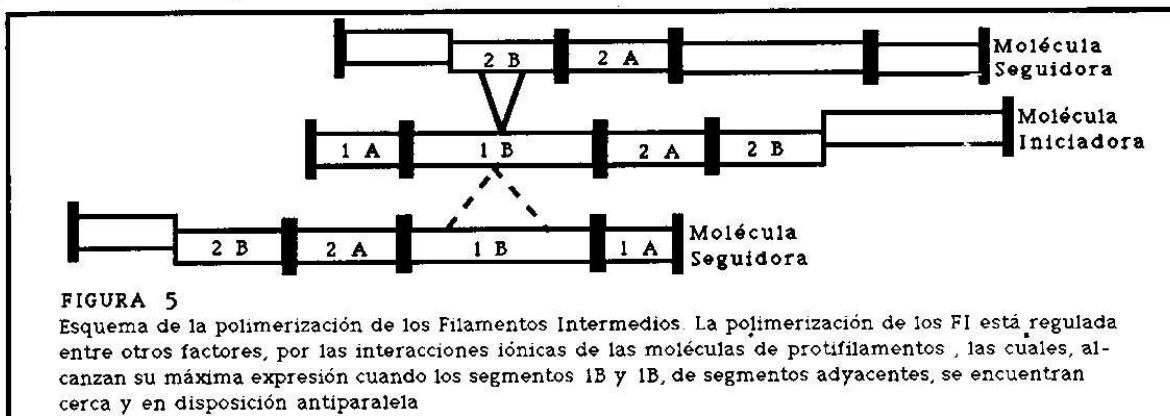
De otra parte, en los neurofilamentos y en las láminas existe la posibilidad de ensamblaje de homopolímeros o heteropolímeros facultativos debido a la presencia de moléculas de diferente peso molecular; para los neurofilamentos existen tres moléculas (H,L,M) con pesos entre 68 y 200 kd (5,8,7,18,4,6). Se han identificado tres variantes de las moléculas M de los neurofilamentos denominadas a,b y c, de acuerdo a la movilidad dentro de los axones (19).

Se han identificado tres moléculas de láminas denominadas A, B y C con pesos moleculares entre 60 y 70 kd (30,31,32,33,1).

**FIGURA 4**

Modelo hipotético de la estructura compleja de un Filamento Intermedio. El ensamblaje de ocho (8) protofilamentos (unidades tetraméricas), proporciona al FI su estructura definitiva, tal como se observa en las preparaciones a la Microscopía Electrónica. La variación de los diámetros observados entre 9 y 15 nm, puede ser explicada, por lo menos parcialmente, por la existencia y reorganización espacial de las regiones terminales variables.

NUMERO 1

**MORFOLIA****FIGURA 5**

Esquema de la polymerización de los Filamentos Intermedios. La polymerización de los FI está regulada entre otros factores, por las interacciones iónicas de las moléculas de protifilamentos, las cuales, alcanzan su máxima expresión cuando los segmentos 1B y 1B, de segmentos adyacentes, se encuentran cerca y en disposición antiparalela

La selectividad de la formación de homo o heteropolímeros así como el ensamblaje del FI (24) también se regula por los niveles de fosforilación de cada proteína como ocurre con los neurofilamentos (25), las citoqueratinas epidérmicas (26), y las láminas nucleares (23). Hay evidencia de que por lo menos algunas partes de las regiones variables ricas en arginina de la cabeza N-terminal son requeridas para el ensamblaje *in vitro* de los FI (27,28,4).

Para el ensamblaje de los protifilamentos de vimentina, desmina, proteína glial fibrilar se requieren cadenas de la clase química III para construir homopolímeros cuyo ensamblaje resulta relativamente fácil. De ahí que las células en cultivo muestren habilidad para la polymerización de FI cuando se combinan vimentina y proteína glial fibrilar o vimentina con desmina.

Cabe concluir que la secuencia de aminoácidos de las regiones en forma de barra son altamente homólogas para que estos eventos ocurran en los FI de la clase química III.

**Factores Extrínsecos**

Por lo menos para el ensamblaje de los FI de vimentina en los fibroblastos se requiere de la

cuando a los fibroblastos se les agrega colchicina una sustancia que disgrega los microtúbulos y altera la disposición normal de filamentos de vimentina los cuales son desplazados hacia la corteza celular eliminando las propiedades de motilidad del fibroblasto (3).

Un factor de mayor importancia para la formación de FI como elemento intracelular y de integración con otros elementos del citoesqueleto, es la presencia de las proteinas asociadas a los FI (29)

La agregación de filamentos individuales en fascículos es garantizada en las células epidérmicas por las filagrinas, proteinas asociadas a FI de citoqueratinas en el estrato corneo, epinemina asociada a los FI de vimentina en los fibroblastos, paranemina y sinemina asociadas a los FI de desmina en células musculares, y las proteinas de neurofilamentos H y L consideradas tambien como proteinas asociadas en las neuronas.

Una protein de 66 kd (protein tau) reacciona inmunológicamente con todas las clases de FI y tiene la función de integrar todas las redes de FI entre sí (29)

Algunas estructuras compuestas parcialmente por FI como los

desmosomas, requieren de la presencia de proteinas asociadas como la desmogleina (9) la desmoplaquina (32,33) y la placoglobina (34), esta última asociada tambien a zónulas ocluyentes para la integración con otras estructuras celulares.

Las proteinas titina (conectina) y nebulina (7,35) cumplen funciones similares en las sárcomeras, y las proteinas asociadas a microtúbulos (MAP) integran los FI a los microtúbulos (35).

La vitamina A aumenta la expresión de los genes de las citoqueratinas de 40 y 54 kd de peso molecular de los epitelios secretiores, pero deprime la expresión de los genes de las citoqueratinas de 56.5 y 67 kd de las células epidérmicas superficiales; en las células epiteliales vaginales de animales ovariectomizados, la administración de estrógenos exógenos induce la expresión de genes codificadores de citoqueratinas, proceso revertido por la administración de vitamina A.

**REFERENCIAS**

- Goldman, R. et al. Intermediate Filaments Possible functions as cytoskeletal connecting links between the nucleus and the cell surface. Ann N Y Acad Sci, 455:1-17, 1985

ABRIL 1991

**MORFOLIA**

2. Fawcett, D. Bloom and Fawcet: A Textbook of Histology. 11 Edit, W.B. Saunders, 1986, p 28
3. Darnell, J., et al. Biología Celular y Molecular. 1a. Edit. Labor, 1988, p.841
4. Weber, K., Geisler, N. Intermediate Filaments: structural conservation and divergence. Ann N Y Acad Sci, 455: 126-43, 1985
5. Steiner, T. The molecular biology of the Intermediate Filaments. Cell, 42: 411-19, 1985
6. Lazarides, E. Intermediate Filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature, 283, 249 1980
7. Osborn, M. Summary: Intermediate Filaments 1984. Ann N Y Acad Sci 455: 669-81, 1985
8. Nagle, R. Intermediate Filaments: A review of basic biology. Am J Surg Pathol, 12 (Suppl 1): 4-16, 1987
9. Spitzer, R. Et al. The maturation magfish granthead cell. Cell Motil Cytoskeleton, 11: 31-45, 1988
10. Owaribe, K., et al. Cytoskeletons of retinal pigment epithelial cells: interspecies differences of expression patterns indicate independence of cell function form the specific complement of cytoskeletal proteins. Cell Tissue Res, 254: 301-315, 1988
11. Fush, E., Marchuk, D. Type I and Type II Keratins have evolved from lower eukaryotes to form the intermediate Filaments in mammalian skin. Proc Natl Acad Sci USA, 80: 58575-61, 1983
12. Fevilloley, P., et al. Involvement of the cytoskeleton in the steroidogenic response of frog adrenal glands to angiotensin II, acetylcholine and serotonin. J Endocr, 188, 365-74, 1988
13. Phillips, L., et al. Bodian's silver method reveals molecular variation in the evolution of neurofilaments proteins. Brain Res, 278: 219-23, 1983
14. Henderson, D., et al. Ultrastructure in Intermediate Filaments. J Mol Bio, 155: 173-6, 1982
15. Eichner, R., et al. Human epidermal keratin filaments. Studies of structure and assembly. An N Y Acad Sci, 455: 381-401, 1982
16. Hatzfeld, M., Weber, K. The coiled coil of in vitro assembly keratin filaments is a heterodimer of Type I and Type II keratins: use of site-specific Mutagenesis and recombinant proteins expression. J Cell Biol, 110: 1199-1210, 1990
17. Crewther, W., et al. The structure of Intermediate Filaments. Int J of Biol Macromol, 5: 267-74, 1983
18. Steven, A., et al. Conformity and diversity in the structures of Intermediate Filaments. Ann N Y Acad Sci, 455: 371-80, 1985
19. Black, M. Phosphorylation of NF Proteins in intact neurons: Demonstration of phosphorylation in cell bodies and axons. J Neurosci, 8: 3296-3305, 1988
20. Franke, W. Nuclear lamins and cytoplasmic Intermediate Filaments proteins: A Growing-multigene family. Cell, 48: 3-4, 1987
21. Kronhe, G., et al. The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. Exp Cell Res, 162: 1-10, 1986
22. Aebi, V., et al. The nuclear Lamins is a meshwork of Intermediate Type Filaments. Nature, 323: 560-4, 1986
23. Fisher, D., et al. cDNA sequencing of nuclear Lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to IF proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 83: 6450-4, 1986
24. Wang, E. Intermediate Filaments associated proteins. Ann N Y Acad Sci, 455: 32-55, 1985
25. Wible, B., et al. Resolution and Purification of a Neurofilament-specific Kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 720-4, 1989
26. Steinert, P. The dynamic phospho-ribilation of the human IF Keratin chain. J Biol Chem, 263: 13333-9, 1988
27. Steinert, P., et al. Intermediate Filaments of BHK 21 Cells and bovine epidermal keratinocytes have similar ultrastructure and subunit domain structures. Proc Natl Acad Sci USA, 77: 4534-8, 1980
28. Sauk, J., et al. Reconstitution of cytokeratin filaments in vitro: further evidents for the role of non helical peptides in filaments A assembly. J Cell Biol, 99: 1590-7, 1984
29. Wang, E. Intermediate Filaments associated proteins. Ann N Y Acad Sci, 455: 32-55, 1985
30. Ecker, T., et al. Cloning of cDNAs specifying vitamin A responsive human keratins. Proc Natl Acad Sci USA, 81: 4321-5, 1984
31. Fuchs, E., et al. Regulation of terminal differentiation of culture human keratinocytes by vitamin A. Cell, 25: 617-25, 1981
32. Franke, W., et al. Desmoplakins of epithelial and myocardial desmosomes are immunologically and biochemically related. Differentiation, 23: 115-27, 1982
33. Muller, M., et al. Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II. The major polypeptides of the desmosome plaque. J Mol Biol, 163: 647-71, 1983.
34. Cowin, P., et al. Plakoglobin a protein common different kinds of intercellular adhering junctions. Cell, 46: 1063-73, 1986
35. Cormack, D. Histología de Ham. 9a. Edit. Harla, México, 1988.
36. Scmerson, T., et al. Dynamic interactions of fluorescently labeled microtubule-associated proteins in living cells. J Cell Biol, 99: 425-534, 1988.