

## Trabajos Originales

# VARIACIONES MITOCONDRIALES EN EL TRANSCURSO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DEL EPITELIO MAMARIO

*Ricardo Cornejo U.*

Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco.  
Biólogo Celular, PhD.

### RESUMEN

El proceso de diferenciación representa un complejo mecanismo mediante el cual las células, variando notablemente su morfología, adquieren una forma determinada, tamaño específico, cierta polaridad y constancia de constituyentes celulares, producto de la activación génica que permiten que dicha célula diferenciada cumpla con una función en forma óptima. Estas modificaciones pueden ser precisadas utilizando técnicas morfométricas que dan cuenta de las variaciones que caracterizan el mecanismo. Células normales de epitelio mamario de rata en cultivo, estimuladas a proliferar con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) origina la célula HC11 GM. Ellas son inducidas a diferenciarse con inducciones hormonales de dexametasona, insulina y prolactina, generándose la célula HC11 IM. Se estudió con microscopía electrónica de transmisión estos tipos celulares con énfasis en las mitocondrias, determinando variaciones del organelo generador de energía, en lo relacionado a variables tanto cuantitativas como morfológicas, precisando así su rol en la actividad metabólica de cada tipo celular.

**PALABRAS CLAVES:** *Diferenciación celular, mitocondrias, morfometría*

### SUMMARY

The cell differentiation process represents a complex mechanism through which, cells, change remarkably their morphology due to gene activation, acquire certain form, size, polarity and maintain their cellular components, which allows that this differentiated cell fulfils an optimal function. These changes can be measured by morphometric techniques that take account of variations that characterize this mechanism. Cultured normal rat epithelial cell, stimulated to proliferate by epidermic growth factor (EGF), give rise to HC11 GM cell group. These cells are induced to differentiate by hormonal inducers like dexamethasone, insulin and prolactine, originating HC11 IM cell. These cell types, emphasizing mitochondria, were studied by transmission electronic microscopy that showed variation in this energy generator organelle, about its morphologic as well as quantitative variables, demonstrating mitochondrial function in metabolic activity in each cell type.

**KEY WORDS:** *Cellular differentiation, mitochondria, morphometry*

### INTRODUCCIÓN

Las células HC11 constituyen una línea de epitelio mamario normal derivada del linaje COMMA

1D, obtenidas de glándula mamaria de ratas BALB/c en mitad de preñez, que se disponen en contacto estrecho y formando un epitelio cúbico en monocapa. Estas células retienen características de la dife-

renciación normal de la glándula y sintetizan  $\beta$  caseína, la principal proteína de la leche (1).

Estas células mamarias normales y en etapa de proliferación, reciben las estimulaciones del EGF, agente mitogénico que se une con un receptor tirosina quinasa a nivel de la membrana plasmática fosforilando proteínas citoplasmáticas, etapa fundamental en el desarrollo de la respuesta mitogénica (2).

La inducción al proceso de diferenciación es realizado por estimulaciones de prolactina, hormona que modula la transcripción de genes para  $\beta$  caseína (3). Del mismo modo, insulina y su funcionalidad anabólica estimula la síntesis proteica de estas células epiteliales (4). Finalmente, dexametasona, glicocorticoide que induce la diferenciación terminal de estas células mamarias actúa sinérgicamente con prolactina en la expresión del gen de  $\beta$  caseína (5).

A este respecto, ha sido descrito que en las células HC11 la activación de los receptores para EGF es un paso esencial tanto para el crecimiento celular como para adquirir competencia en la respuesta a los estímulos de hormonas lactogénicas (6).

En el transcurso de la diferenciación entre células que solo proliferan (HC11 GM) y aquellas que sintetizan y secretan  $\beta$  caseína (HC11 IM), la energía celular posee un rol fundamental, siendo responsable tanto de las actividades mitóticas como el gasto energético propio de la síntesis proteica. En este contexto, considerando que la mitocondria es el responsable del suministro del aporte energético de las células (7,8), pareció importante determinar desde el punto de vista cualitativo y morfológico, las variaciones que este organelo presenta durante el mecanismo de diferenciación celular.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Microscopía electrónica de transmisión.** Al pellet que contenía las células HC11 GM, y HC11 IM se le adicionó solución de glutaraldehído 2%, en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2, y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, fue sometido a un lavado en solución de 6 g de NaCl y 73 g de sacarosa, disueltos en 1 litro de agua destilada. La postfijación se realizó en solución de tetróxido de osmio, 1%, disuelto en la solución de lavado, antes descrita, durante una hora, a 40° C y acetato de uranilo 0,5%, por 18 horas. Luego de lavado el material fue deshidratado en concentraciones crecientes de acetona

(30 a 100%) e incluido en Araldita 6005. Se obtuvieron cortes ultrafinos de, aproximadamente, 70 nm de grosor, los que fueron tratados con acetato de uranilo 2%, durante 40 minutos y citrato de plomo 0,5%, por 10 minutos. Las muestras fueron estudiadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Phillips EM 400.

**Método estereológico.** A partir de los bloques para microscopía electrónica, fueron obtenidos cortes ultrafinos, en los cuales se micrografieron cada uno de los tipos celulares, con un aumento de 23.000 X. Para la evaluación de las fracciones volumétricas mitocondriales, fue sobrepuesto un retículo de puntos, en las micrografías electrónicas y se procedió al conteo diferencial de los puntos que incidían sobre los perfiles de dichos organelos, calculándose la fracción volumétrica que ocupa, mediante la siguiente ecuación:

$$F_v = \frac{P_i}{P_t}$$

Donde:

$F_v$ = fracción volumétrica del componente específico

$P_i$ = puntos incidentes sobre el componente en estudio

$P_t$ = puntos totales incidentes en la estructura celular

Para el cálculo del área mitocondrial fue utilizado el software Sigma Scan Pro 5.0.

## RESULTADOS

**Análisis cuantitativo.** Las fracciones volumétricas correspondientes a las mitocondrias cuantificadas en los tipos celulares proliferativos y diferenciados se muestran en la Figura 1, evidencian-

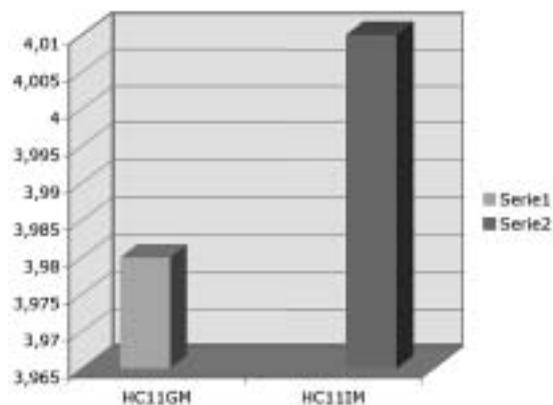


Figura 1. Fracciones volumétricas (%) correspondientes a mitocondrias cuantificadas en células mamarias proliferantes (HC11 GM) y diferenciadas (HC11 IM).

do que las cantidades de energía utilizada en los mecanismos específicos y característicos de cada célula es prácticamente semejante. Sin embargo, estudiadas y cuantificadas las áreas que poseen las mitocondrias (elegidas por azar) indican que existen marcadas diferencias, expresada en micrones cuadrados, entre las pertenecientes a células HC11 GM y HC11 IM, situación evidenciada claramente en la Tabla I.

**Análisis morfológico.** Las mitocondrias pertenecientes a la célula proliferante se caracterizan por distribirse al azar en todo su citoplasma, presentando una estructura básicamente fusiforme y/o elíptica con numerosas crestas aplanadas, incluidas en una matriz homogénea y translúcida (Figura 2). Por otro lado, los organelos encontrados en la célula ya diferenciada, por el contrario presenta forma exclusivamente circular con sinnúmero de crestas mitocondriales vesiculares y/o tubulares, características de aquellas involucradas en síntesis esteroidea, incluidas en una matriz particularmente densa y vacuolizada (Figura 3).

En las mitocondrias pertenecientes tanto a células proliferantes como a las diferenciadas no fue posible evidenciar granulaciones correspondientes a calcio, estroncio, bario u otro constituyente almacenable, característico de la matriz mitocondrial.

## DISCUSIÓN

Los cambios bioquímicos, estructurales y de integración funcional que caracterizan el proceso de diferenciación como resultado de las inducciones tanto del EGF como de las hormonas lactogénicas, se traducen fundamentalmente en la propiedad de sintetizar y secretar b caseína, proteína específica de esta célula diferenciada. Sin embargo, es interesante hacer notar que en la adquisición del fenotipo sintetizador el padrón de distribu-

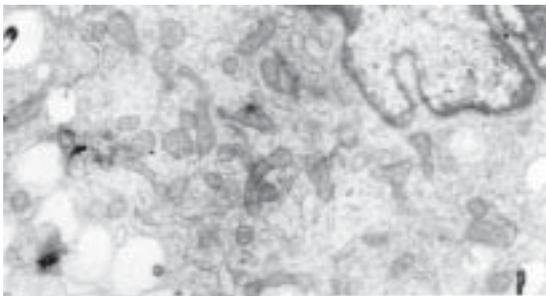


Figura 2. Sección de micrografía electrónica correspondiente a célula mamaria proliferante (HC11 GM), evidenciando variadas mitocondrias. 23.000 X.

**Tabla I**  
**EVALUACIÓN DEL ÁREA (m<sup>2</sup>) DE 5 MITOCONDRIAS PERTENECIENTES TANTO A CÉLULAS MAMARIAS PROLIFERANTES (HC11 GM) COMO DIFERENCIADAS (HC11 IM)**

Células HC11 GM		Células HC11 IM	
Área evaluada		Área evaluada	
1	0,500	1	0,850
2	0,363	2	0,741
3	0,212	3	0,631
4	0,193	4	0,623
5	0,161	5	0,477

ción de organelos tales como el correspondiente al retículo endoplasmático rugoso y las mitocondrias (9) se mantienen constantes, haciendo suponer que en el caso de estas últimas, la cantidad de energía gastada en la actividad sintetizadora y secretora de la célula diferenciada, es similar a aquella necesaria para efectuar los procesos mitóticos propios de la célula normal en proliferación.

Es un hecho probado que dexametasona promueve la diferenciación celular, considerando que corresponde a una hormona de constitución química esteroidea característica de los estrógenos, los cuales inducen un gran número de actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de DNA como así mismo induciendo a la RNA polimerasa en el aumento de transcripción de genes y subsecuente síntesis de proteínas, desencadenando una serie de eventos específicos de la estimulación hormonal (10).

En este contexto, recientemente ha sido demostrado el accionar de los estrógenos que tienen

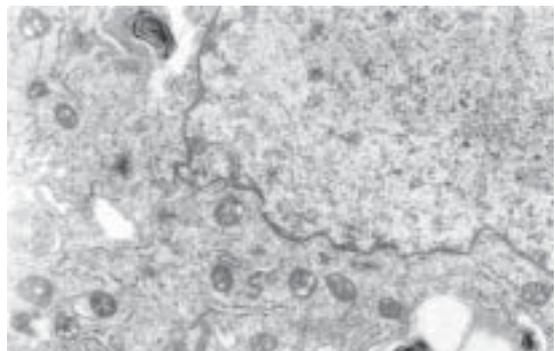


Figura 3. Sección de micrografía electrónica correspondiente a célula mamaria diferenciada (HC11 IM), evidenciando variadas mitocondrias. 23.000 X.

receptores mitocondriales, provocando en ellas tanto variaciones morfológicas del organelo como determinado desarrollo y crecimiento celular normal y alterado generando células neoplásicas (11).

Por tanto, nuestros resultados morfométricos son concordantes con los hallazgos de los investigadores anteriormente citados en la perspectiva que la notable diferencia evaluada correspondiente al área de las mitocondrias pertenecientes a la célula diferenciada son el resultado de las estimulaciones de dexametasona sobre el organelo. Del mismo modo, nuestros datos coinciden con los observados en células mamarias humanas en las cuales sus mitocondrias en la medida que son estimuladas con estrógenos aumentan drásticamente de volumen (12).

De esta manera, y en base a los resultados mostrados, se plantea que el considerable aumento en el área correspondiente a las mitocondrias pertenecientes a las células mamarias diferenciadas se constituye en una novedosa señal del proceso diferenciativo, sumándose a otros ya conocidos marcadores de diferenciación celular en este sistema biológico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Marte BM, Jeschke M, Graus-Porta D, Taverna D, Hofer P, Groner B, Yarden Y, Hynes, NE. Neu differentiation factor heregulin modulates growth and differentiation of HC11 mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1995;9:14-23.
- Normanno N, Ciardello F. EGF related peptides in the pathophysiology of the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997;2:143-51.
- Groner B, Ball RK, Taverna D, Schmitt-Ney M, Hynes NE. Epidermal growth factor, glucocorticoid hormone and prolactin act sequentially in the induction of milk protein gene expression. In: Sporn MB. Control of growth factor and prevention of cancer. Berlin, Springer Verlag 1992;26-36.
- Escaleara MT, Brentani MM. Vitamin D3 receptor (VDR) expression in HC11 mammary cells: regulation by growth modulatory agents, differentiation, and Ha-ras transformation. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54(2):123-33.
- Liang S, Shada A, Herman A, Schut J, Snyderwine EG. 2 Amino 1 methyl 6 phenylimidazo (4,5-b) pyridine (PhIP) modulates lactogenic hormone-mediated differentiation and gene expression in HC11 mouse mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ* 2001;12:649-56.
- Merlo GR, Graus-Porta D, Cella N, Marte BM, Taverna D, Hynes NE. Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects of receptor tyrosine kinase activating peptide growth factors. *Eur J Cell Biol* 1996;70:97-105.
- Tandler B, Hoppel C. *Mitochondria*; Academic Press, Londres; 1972;6-34.
- Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana, Madrid España, 2003;622-31.
- Cornejo R, Joazeiro P, Chammas R, Montes G, Caldini E. Morfometría de la diferenciación de células epiteliales mamarias en cultivo. *Rev Chil Anat* 1995;13(1):33-41.
- Chaudhuri PK, Walker MJ, Beattie CW, Das Gupta TK. Endocrine correlates of human malignant melanoma. *J Surg Res* 1979;26:214-9.
- Felty Q, Deodutta R. Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non-cancer cells. *J Carcinog* 2005;4:10-26.
- Vic P, Vignon F, Derocq D, Rochefort H. Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF7 human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 1982; 42(2):667-73.