



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Implicación de la calmodulina y del AMP cíclico en la activación proliferativa hepatocelular

María Jesús Pujol Sobrevía



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGIA

Implicación de la calmodulina y del AMP cíclico  
en la activación proliferativa hepatocelular

Tesis presentada por  
MARIA JESUS PUJOL SOBREVIA  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700183352

Esta tesis se ha realizado bajo la dirección de los Doctores Oriol Bachs Valldeneu y Jordi Domingo Feliubadaló, en el Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, enero de 1988.

A Carlos

y

a todos los miembros

del equipo de Biología Celular

## Agradecimientos

A los Doctores Oriol Bachs Valldeneu y Jordi Domingo Feliubadaló, directores de esta Tesis, por su ayuda, interés y confianza durante la realización de este trabajo.

A Jordi Marsal, Jefe del Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, por haberme permitido realizar en su Departamento el presente trabajo.

Al Doctor Marià Alemany, Catedrático del Departamento de Fisiología General de la Facultad de Biología, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis ante dicha Facultad.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio: Rosa Aligué, Oriol Bachs, Ricard Bastos, María Josep Coll, Jordi Domingo, Carlos Enrich, María Dolors Estadella, Eugènia Monrós, María Rosa Piñol, Cristina Pujades, Eulàlia Rius, Joan Serratosa y Montse Soriano.

A todos los compañeros del equipo de Neurobiología dirigidos por el Dr. Jordi Marsal, por su afecto.

Un agradecimiento muy especial a Oriol Bachs, María Josep Coll y Joan Serratosa por su colaboración, estímulo y, sobretodo, por poder contar con su amistad y confianza.

A María Dolors Estadella por su paciencia y apoyo durante mi iniciación en las técnicas de laboratorio.

Al Profesor Dr. Diego Ribas Mujal y a Carme Baldrich por su interés.

A Joan Gil por su ayuda prestada en algunos aspectos de este trabajo.

A Alfonso Romero de los laboratorios Ferrer S.A. por el suministro de ratas que han permitido realizar este trabajo.

A Roberto Mendez por su colaboración en la mecanografía de esta tesis.

Muy especialmente a mis padres y hermano por el estímulo que siempre me han prestado.

Y el más profundo agradecimiento a Carlos por su ayuda, comprensión y paciencia durante todos estos años.

## INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Características generales del hígado.....	2
1.1.1. Aspectos generales.....	2
1.1.2. Aspectos cinéticos.....	7
1.2. Métodos de inducción de la proliferación hepatocelular.....	9
1.3. Aspectos generales de la regeneración hepática poshepatectomía parcial.....	11
1.3.1. Parámetros cinéticos.....	12
1.3.2. Factores que alteran la respuesta regenerativa.....	16
1.3.3. Factores extracelulares implicados en el desencadenamiento de la regeneración hepática.....	20
1.3.4. Alteraciones de la membrana plasmática de los hepatocitos.....	23
1.3.5. Cambios intracelulares implicados en el desencadenamiento de la proliferación hepatocelular.....	28
2. OBJETIVOS.....	56
3. MATERIAL Y METODOS.....	60
3.1. Material.....	61
3.1.1. Animales.....	61
3.1.2. Técnicas quirúrgicas.....	61
3.1.3. Infusión endovenosa de la solución TAGH.....	63
3.1.4. Tratamiento de los animales con inhibidores de la síntesis proteica .....	65
3.1.5. Tratamiento de los animales con trifluoperacina (TFP).....	65
3.1.6. Tratamiento de los animales con un antagonista $\beta$ -adrenérgico.....	66

3.2. Métodos de subfraccionamiento celular.....	67
3.2.1. Obtención de citosol hepático para la determinación de la actividad protein quinasa dependiente de AMP cíclico.....	67
3.2.2. Obtención de citosol hepático para la determinación del contenido de calmodulina...	68
3.2.3. Obtención de citosol hepático para la determinación de AMP cíclico.....	70
3.2.4. Obtención de núcleos y fraccionamiento nuclear.....	70
3.3. Determinaciones enzimáticas y métodos bioquímicos generales.....	75
3.3.1. Métodos de cuantificación de proteínas.....	75
3.3.2. Determinación del contenido de adenosin monofosfato cíclico intracelular.....	78
3.3.3. Determinación de la actividad protein quinasa dependiente de AMP cíclico.....	81
3.3.4. Determinación de los niveles de calmodulina.....	85
3.3.5. Determinación de los niveles de fosfato.....	87
3.3.6. Técnicas de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.....	88
3.3.7. Determinación de la fosforilación de proteínas mediante técnicas de electroforesis.....	92
3.3.8. Purificación de calmodulina.....	94
3.3.9. Marcaje de calmodulina con <sup>125</sup> I.....	98
3.3.10. Método para la identificación de receptores de calmodulina.....	100
3.4. Cálculo del nivel de significación estadística.....	103
4. RESULTADOS.....	104
4.1. Estudio de la posible relación entre el AMP cíclico y la síntesis de calmodulina durante la regeneración hepática.....	105
4.1.1. Efecto del dl-propanolol sobre el contenido de AMP cíclico intracelular.....	105

4.1.2.	Efecto del dl-propanolol sobre el contenido de calmodulina en el citosol.....	108
4.2.	Deteminación de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc durante la proliferación hepatocelular.....	112
4.2.1.	Determinación de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol durante la regeneración hepática.....	112
4.2.2.	Determinación de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol después de la infusión endovenosa de la solución TAGH.....	115
4.3.	Estudio de la nueva síntesis de protein quinasa dependiente de AMPc después de una hepatectomía parcial.....	120
4.3.1.	Estudio cinético de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc.....	121
4.3.2.	Efecto de los inhibidores de la síntesis proteica sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc durante la regeneración hepática.....	124
4.4.	Estudio de la relación entre la calmodulina, el contenido de AMPc y la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol durante la regeneración hepática.....	127
4.4.1.	Efecto de la trifluoperacina sobre el contenido de AMPc intracelular después de una hepatectomía parcial.....	128
4.4.2.	Efecto de la trifluoperacina sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol durante la regeneración hepática.....	132
4.4.3.	Estudio cinético con las subunidades reguladora y catalítica de la protein quinasas dependiente de AMPc en presencia de TFP.....	135
4.4.4.	Estudio cinético de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en presencia de TFP.....	142
4.4.5.	Determinación de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc y del contenido de calmodulina en ratas tiroparatiroidectomizadas y sometidas a una hepatectomía parcial.....	144

4.5. Cuantificación de los niveles de calmodulina en el núcleo de hepatocitos durante la regeneración hepática.....	149
4.6. Identificación de los receptores de calmodulina en el núcleo de hepatocitos durante la regeneración hepática.....	155
4.7. Determinación del patrón de fosforilación en el citosol durante la regeneración hepática.....	157
4.7.1. Determinación del patrón de fosforilación dependiente de AMPc.....	157
4.7.2. Determinación del patrón de fosforilación dependiente de calcio y calmodulina....	164
5. DISCUSION.....	167
5.1. Relación entre el primer aumento de AMPc y la ola de calmodulina.....	169
5.2. Estudio de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc durante la activación de la proliferación hepatocelular.....	173
5.3. Relación de la calmodulina con el contenido de AMPc y con la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol después de una hepatectomía parcial.....	177
5.4. Estudio del patrón de fosfoproteínas en el citosol después de una hepatectomía parcial.....	183
5.5. Relación del aumento de calmodulina y el desencadenamiento de la duplicación del ADN.....	187
6. CONCLUSIONES.....	195
7. BIBLIOGRAFIA.....	201

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DEL HIGADO

### 1.1.1. ASPECTOS MORFOLOGICOS

El hígado es un órgano presente únicamente en vertebrados. Por su localización en el organismo, recibe sangre arterial a través de la rama abdominal de la aorta y sangre venosa de la vena porta. Está implicado en numerosas funciones fisiológicas como por ejemplo la síntesis y secreción de bilis, bilirrubina y proteínas séricas, también participa en procesos de detoxificación así como en la fabricación de urea.

El hígado está formado por un conjunto de células epiteliales que constituyen cerca del 85% del volumen total del órgano. Se pueden diferenciar 4 tipos celulares morfológica y funcionalmente diferentes:

1. Células del parénquima hepático o hepatocitos, ocupan el 78% del volumen total del hígado. (Evans, W.H., 1980).
2. Células endoteliales que ocupan el 2,8% del volumen total.
3. Células de Kupffer, pertenecen al sistema fagocitario mononuclear y ocupan el 2,1% del volumen total.
4. Células almacenadoras de grasa (fat-storing cells) ocupan el 1,4%.

El resto del volumen hepático, un 15% está ocupado por los espacios extracelulares: 10% por capilares sinusoides, 4,5% por espacios de Disse y el 0,5% por conductos biliares (Evans, W.H., 1980).

Los hepatocitos están organizados formando cordones celulares que se orientan radialmente alrededor de las venas centrales hepáticas. Entre los cordones celulares se abre un sistema de canales secretores o canaliculos biliares. Los cordones de hepatocitos están rodeados de células endoteliales que delimitan los capilares sinusoides. Entre las células endoteliales se localizan las células de Kupffer. El espacio entre las células endoteliales y los hepatocitos es el espacio de Disse y es donde se sitúan las células almacenadoras de grasa (Figura 1.1).

En el hígado de algunos mamíferos hay gran cantidad de tejido conectivo, que divide al órgano en lobulillos; en el centro de cada lobulillo se localiza la vena central hepática (Figura 1.2). Tradicionalmente se ha considerado al lobulillo hepático como la unidad estructural de hígado.

No obstante, se acepta como unidad funcional del hígado el acino hepático (Rappaport, A.M., 1975, 1980) (Figura 1.3). Cada acino hepático tiene su propio aporte sanguíneo: una rama terminal de la arteria hepática, una rama de la vena porta y además cuenta con un conducto biliar, estos 3 elementos forman el espacio Porta. El parénquima hepático del acino se sitúa alrededor del espacio Porta, formando ángulos más o menos rectos con los

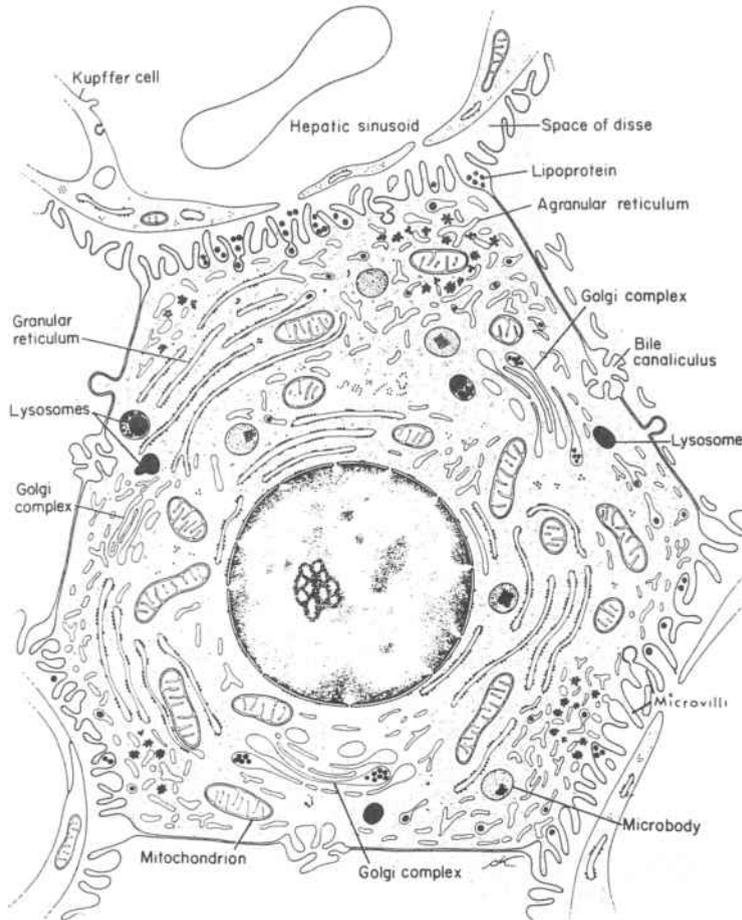


Figura 1.1.: Dibujo de un hepatocito observado al microscopio electrónico (tomado de Bloom, W. y Fawcett, D.W.).

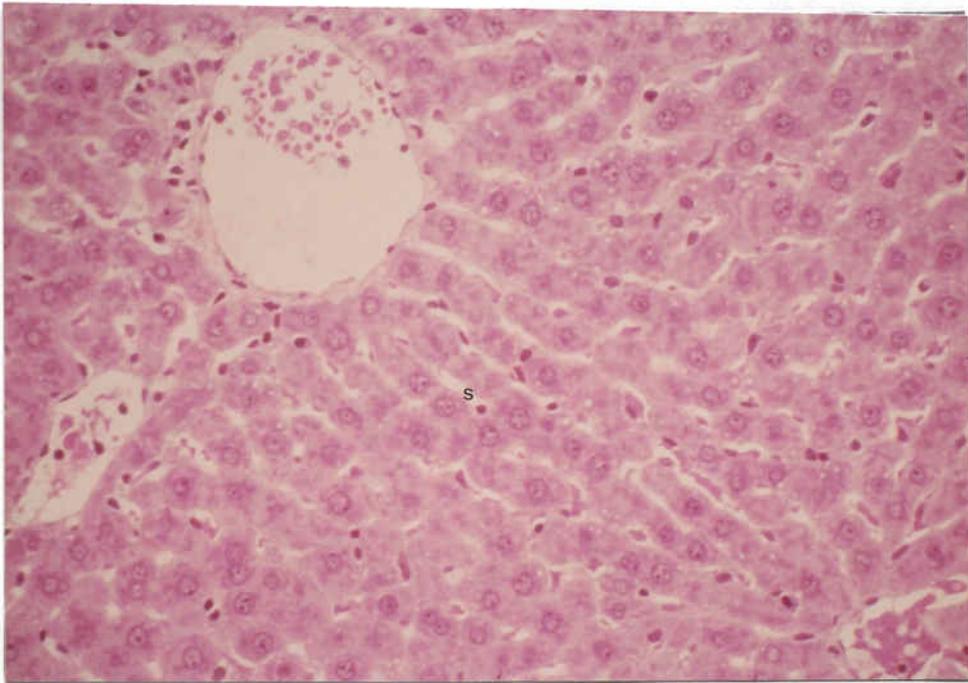


Figura 1.2.: Corte semifino de hígado de rata normal. Distingase la distribución de los hepatocitos en forma de cordones y los espacios sinusoidales (s). Tinción hematoxilina eosina. Los aumentos utilizados han sido 400x.

capilares sinusoides. El acino se puede dividir arbitrariamente en 3 zonas, de acuerdo a su proximidad con el aporte sanguíneo:

- Zona I o periportal recibe sangre rica en nutrientes oxígeno y hormonas. Es donde se localiza el catabolismo de aminoácidos, la fabricación de urea a partir de aminoácidos, la gluconeogénesis y la beta oxidación (Jungermahn, K. y Sasse, D., 1978).

- Zona II o intermedia.

- Zona III o perivenosa irrigada por sangre de mala calidad; pobre en  $O_2$ , nutrientes y hormonas. En esta zona es donde tiene lugar preferentemente la glicolisis, la liponeogénesis, la formación de urea a partir de  $NH_4$  y el proceso de detoxificación (Jungermann, K. y Sasse, D., 1978).

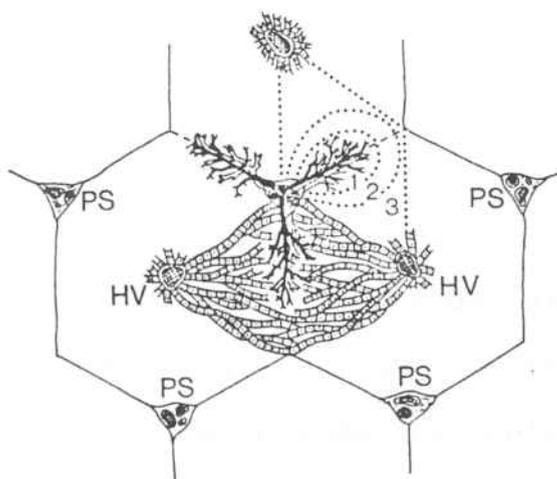


Figura 1.3.: Representación esquemática del acino hepático. Las zonas 1, 2 y 3 son zonas arbitrariamente definidas según su proximidad al aporte sanguíneo. (PS) Espacios Porta; (HV) Venas hepáticas centrolobulillares. (Alison, M.R., 1986).

El tamaño de cada una de estas zonas, no es estático sino que depende de la edad y del estado de nutrición del animal. Así pues, durante el desarrollo embrionario el acino es glicolítico, durante la primera semana después del nacimiento el acino se convierte totalmente en gluconeogénico, en ambos casos no se observa compartimentación del acino. Conforme el animal va creciendo se va produciendo la regionalización del acino hepático.

El resto de funciones hepáticas tales como la secreción de proteínas séricas, se realiza en momentos determinados por algunos hepatocitos distribuidos al azar. (Jungermann, K. y Sasse, D., 1978).

### 1.1.2. ASPECTOS CINETICOS

La actividad proliferativa del hígado de los mamíferos adultos es extraordinariamente baja. En la rata, el índice de síntesis de ADN (Is) de los hepatocitos es de 0,3%; el de las células que revisten los conductos biliares es inferior al 0,1% y el del resto de las células hepáticas del 1% (Fabrikant, J.I., 1968; Grisham, J.W. 1962). Es decir que, la gran mayoría de las células del hígado se encuentran estacionadas en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular (Lajtha, L.G., 1963).

Sin embargo durante el desarrollo embrionario y durante las primeras semanas después del nacimiento el Is

de las células parenquimáticas es más elevado. A las 3 semanas de edad el 15% de estas células es del 9%, a las 8 semanas tan solo el 1,5% de los hepatocitos se encuentran sintetizando ADN. Posteriormente el nivel de síntesis de ADN va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar los valores de las ratas adultas (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971).

A pesar de estas variaciones del índice de síntesis del ADN, la duración total de ciclo celular ( $T_c$ ) de los hepatocitos se mantiene relativamente constante durando aproximadamente unas 21,5 horas (Post, J.C. et al., 1963; Post, J.C. y Hoffman, 1965). El  $G_1$  ocupa entre 8,5 y 9 horas, la fase S unas 9 horas y la suma de las fases  $G_2$  + Mitosis es de 3-3,5 horas (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971).

Los hepatocitos, al igual que otras células como por ejemplo neuronas, células de las glándulas parótidas y pequeños linfocitos circulantes en sangre periférica, contienen los genes que llevan información para la síntesis de los componentes necesarios para disparar el proceso de proliferación celular en un estado de represión reversible (Whitfield, J.F. et al., 1979). Por tanto, desde el punto de vista proliferativo, los hepatocitos son células inactivas, pues les falta todo el conjunto de moléculas necesarias para llevar a cabo la duplicación del material genético. No obstante, estas células pueden ser activadas y por consiguiente entrar en el ciclo celular cuando se les somete a un estímulo proliferativo, como por ejemplo una

hepatectomía parcial, que permita la transición desde el G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub> y posteriormente completar el ciclo celular (Fabrikant, J.I., 1968; Grisham, J.W., 1962). El período de tiempo comprendido entre el estímulo proliferativo y el inicio de la fase S, se conoce como fase prerreplicativa y en el caso particular de la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial dura aproximadamente 16 horas.

## **1.2. METODOS DE INDUCCION DE LA PROLIFERACION HEPATOCELULAR**

Se utilizan fundamentalmente cuatro métodos para inducir la activación de la proliferación celular en el hígado de los animales adultos:

1. Un primer método consiste en la extirpación de los lóbulos izquierdo y medio del hígado, es decir la extirpación de las 2/3 partes del hígado (Higgins, G.M. y Anderson, R.M., 1931). Una hepatectomía parcial del 70% produce una respuesta proliferativa importante con un porcentaje de supervivencia prácticamente del 100%.
2. Un segundo sistema de activación de la proliferación hepatocelular es la administración via endovenosa de una solución que contiene triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina (solución T.A.G.H.) (Para más detalles ver apartado

3.1.3. de Material y Métodos). La administración de la solución TAGH produce una hiperplasia hepática temporal sin producir áreas de necrosis. Después de esta hiperplasia, el hígado recupera lentamente su masa habitual (Short, J. et al., 1972).

3. Un tercer método es el que se produce como respuesta a la administración de productos químicos necrogénicos tales como el tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ). Una inyección de  $CCl_4$  a una dosis de 0,1 ml/100 gr. de peso, produce en el hígado de un ratón la destrucción de un 50% de las zonas perivenosas de los acinos hepáticos. Al contrario de la hepatectomía parcial, las células proliferativas se localizan preferentemente en estas áreas perivenosas dañadas. Por otra parte el período prerreplicativo después de la administración de  $CCl_4$  es tanto en ratón (33 horas) como en rata (24-26 horas), más largo que el que se produce después de una hepatectomía parcial. Probablemente más que a un cambio en el mecanismo de regulación de la respuesta proliferativa, ello sea debido a cual sea el momento en que se produce la muerte celular (Alison, M.R., 1986).

4. Finalmente, el último método de activación consiste en un cambio de dieta. Si después de mantener durante 3 días a ratas adultas con una dieta

carente de proteínas, se cambia esta dieta por otra de alto contenido proteico, se produce una importante respuesta proliferativa.

### 1.3. ASPECTOS GENERALES DE LA REGENERACION HEPATICA

#### POSTHEPATECTOMIA PARCIAL

La regeneración hepática después de practicar una hepatectomía parcial constituye un excelente modelo para el estudio in vivo de los mecanismos responsables de la regulación de la proliferación celular.

La extirpación de los lóbulos medio e izquierdo del hígado produce una respuesta regenerativa, cuya finalidad es restablecer la totalidad de la masa hepática inicial a los pocos días de la operación. Este rápido crecimiento del tejido hepático remanente tiene lugar gracias a un aumento de la división celular (Brues et al., 1936; Wilson et al., 1953; Fabrikant, J.I., 1969). En primer lugar se observa un incremento del índice mitótico ( $I_m$ ) de los hepatocitos y posteriormente, y con un retraso de 24 horas, un incremento del  $I_m$  de los otros tipos celulares; es decir que la respuesta proliferativa afecta a todo el órgano. Sin embargo, los lóbulos extirpados no vuelven a formarse tal y como eran inicialmente sino que lo que realmente ocurre es un crecimiento hiperplásico de los lóbulos hepáticos remanentes.

Por último, es de destacar que la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial se produce sin llevarse a cabo ningún proceso de desdiferenciación celular. (Fausto, N. y Butcher, F.R., 1976).

### 1.3.1. PARAMETROS CINETICOS

Para el estudio de los parámetros cinéticos que caracterizan la respuesta regenerativa después de practicar una hepatectomía parcial, se utilizan usualmente: técnicas autorradiográficas, que permiten determinar el porcentaje de células marcadas con un precursor radiactivo del ADN y cuantificar la cantidad de radioactividad asociada al ADN, y técnicas para la determinación del porcentaje de células en mitosis.

Diversos autores indican que el inicio de la síntesis de ADN empieza a las 16 horas después de una hepatectomía parcial del 70% (Figura 1.4). El porcentaje de células marcadas alcanza el valor máximo (30-40%) a las 24 horas después de la operación (Fabrikant, J., 1968, Grisham, J.W.C., 1962, 1969; Whitfield, J. et al., 1980). La actividad mitótica comienza alrededor de las 22 horas de la extirpación y el  $I_m$  alcanza el valor máximo (3,6%-4,8%) a las 30-32 horas (Carter, D.B. et al., 1956; Fabrikant, J., 1968; Whitfield, J. et al., 1980) (Figura 1.4). Después de alcanzar los valores máximos ambos índices proliferativos disminuyen hasta igualar los valores control.

Si se administra [ $^3\text{H}$ ] timidina continuamente a una rata durante todo el proceso de la regeneración hepática, puede observarse como la mayoría de los hepatocitos se encuentran marcados radioactivamente (Alison, M.R., 1986). Ello sugeriría que para restituir la masa hepática extirpada es necesario que la totalidad de los hepatocitos se divida como mínimo una sola vez.

Sin embargo, diferentes autores indican que para la restauración total del hígado, al menos un grupo de células hepáticas tienen que volver a entrar en el ciclo celular para poder dividirse por segunda vez. Se ha observado un segundo incremento de la síntesis de ADN que alcanza el valor máximo a las 40 horas después de una hepatectomía parcial (Serratosa, J., 1985). Estudios realizados con un doble marcaje radioactivo confirman que al menos una pequeña parte de los hepatocitos se dividen 2 veces después de una hepatectomía parcial (Grisham, J.W., 1969). Rabes y colaboradores en 1976 demostraron mediante la utilización del método de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM) que tras un período de 50 horas después de un pulso de [ $^3\text{H}$ ] TdR aparecía una segunda pequeña ola de mitosis marcadas cuyo valor máximo se alcanza a las 40 horas después de la administración del marcador radiactivo (Figura 1.5). El Tc estimado por estos autores es de 33 horas; 7,6 horas para la fase S, 3 horas para la fase  $G_2$ , 2 horas para la mitosis y 21 horas aproximadamente para el  $G_1$ .

Durante las primeras 24 horas de la regeneración hepática, las células que han incorporado el trazador

radioactivo se encuentran distribuidas preferentemente por las zonas periportales de los acinos hepáticos (Fabrikant, J.I., 1967). El 90% del marcaje radioactivo se localiza en estas zonas, sin embargo se observa una distribución al azar de las células marcadas, a las 48 horas posthepatectomía.

Se sabe, además, que las células que vuelven a entrar en el ciclo celular para dividirse por segunda vez son las que están situadas en las zonas periportales, mientras que las células de la zona perivenosa únicamente se dividen una sola vez (Rabes, H.M., 1976).

Recientemente se ha detectado un inhibidor de la proliferación hepatocelular (HPI) en las células de la región perivenosa. Esta molécula se ha purificado a partir del citoplasma de hepatocitos quiescentes y se ha comprobado que es capaz de inhibir la división de hepatocitos estimulados in vitro (Mc Mahon, J.B. et al., 1984).

Es interesante destacar también que durante la regeneración hepática se produce un aumento del número de células poliploides que conlleva una disminución en la proporción de células binucleadas (Gerhard, H., 1975; Nadal, C. y Zajdela, 1966).

Como ya se ha mencionado anteriormente la respuesta proliferativa después de practicar una hepatectomía parcial, afecta a todos los tipos celulares del hígado. Se sabe que las células de los conductos biliares tienen un Is de un 20%, aproximadamente a las 48 horas después de una

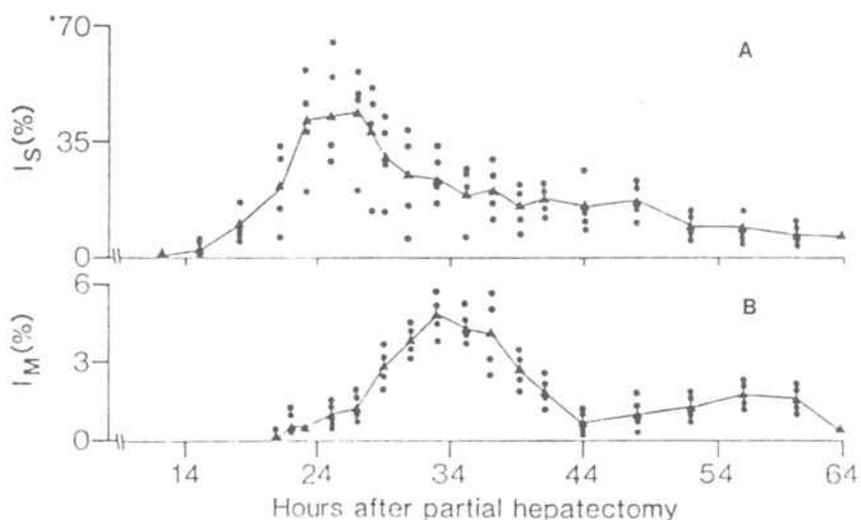


Figura 1.4.: Porcentaje de células marcadas con timidina tritiada a diferentes horas después de una hepatectomía parcial (A). Porcentaje de células en mitosis después de una hepatectomía parcial (B). (Fabrikant, 1968).

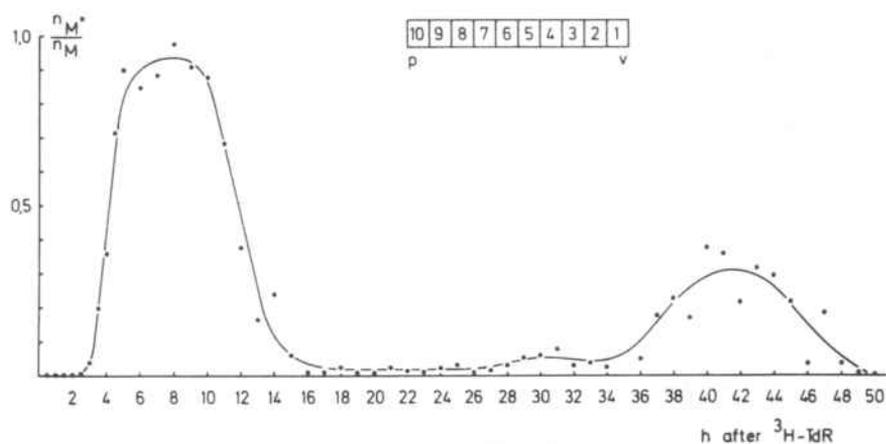


Figura 1.5.: Frecuencia de mitosis marcadas (FLM) (ordenadas) en función del tiempo transcurrido después de una inyección de  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  después de una hepatectomía parcial (abscisas). (Rabes et al., 1976).

hepatectomía parcial (Fabrikant, I.J., 1968; Grisham, J.W.A., 1962). La máxima actividad mitótica de las células de Kupffer y de las células endoteliales se observa a las 48 y 96 horas respectivamente (Widmann, J.J. y Fahimi, H.D., 1975).

### 1.3.2. FACTORES QUE ALTERAN LA RESPUESTA REGENERATIVA

La regeneración hepática puede estar influenciada por numerosos factores tanto exógenos como endógenos. Por tanto, un requisito básico para la reproducibilidad del modelo es su estandarización, es decir controlando rigurosamente las condiciones experimentales.

Los factores que pueden alterar las características de la respuesta proliferativa son: la edad, sexo y peso del animal, la cantidad de tejido hepático extirpado y la hora del día en que se practica la hepatectomía parcial.

En general, los animales más jóvenes regeneran más rápidamente el tejido hepático residual después de realizar una hepatectomía parcial. Por ejemplo, las ratas de 4 semanas regeneran totalmente la masa hepática entre el tercer y quinto día después de la operación. Las de 2-3 meses de edad lo regeneran en el doceavo día de la extirpación y las de 4-6 meses lo hacen a las 2 semanas de la hepatectomía parcial (Liozner, L.D., 1974).

Mientras que en las ratas adultas jóvenes el número de mitosis empieza a aumentar a las 24 horas

posthepatectomía, en las ratas de 5 días la actividad mitótica de los hepatocitos empieza a apreciarse a las 20 horas de la operación (Liozner, L.D., 1974). También se observa un retraso en el inicio de la síntesis de ADN así como una disminución de la respuesta proliferativa cuanto más edad tenga el animal (Bucher et al., 1964).

Es importante destacar que el número de células poliploides en las ratas también aumenta con la edad. Por otra parte la capacidad de morfogénesis durante la regeneración hepática es mayor cuanto más joven es el animal (Liozner, L.D., 1974).

Un segundo factor a tener en cuenta es la cantidad de tejido hepático extirpado. Cuando más tejido hepático es extraído más intensa es la respuesta proliferativa (Bucher y Swaffield, 1964; Bucher, 1967). Como se observa en la figura 1.6, la incorporación de [<sup>3</sup>H] TdR aumenta según la cantidad de masa hepática extirpada.

Sin embargo, después de una hepatectomía subtotal (80-90%) se observa un retraso de 10 horas en la aparición de las primeras mitosis, así como de la máxima actividad mitótica. Mientras que el  $I_m$  empieza a aumentar a las 24 horas después de una hepatectomía parcial del 70% y el valor máximo se alcanza a las 29-30 horas, cuando se realiza una hepatectomía subtotal, estos fenómenos se observan a las 34 horas y 39-40 horas respectivamente después de la operación. En este caso el número de mitosis

aberrantes aumenta considerablemente (Weinbren, K. y Taghizadeh, 1965).

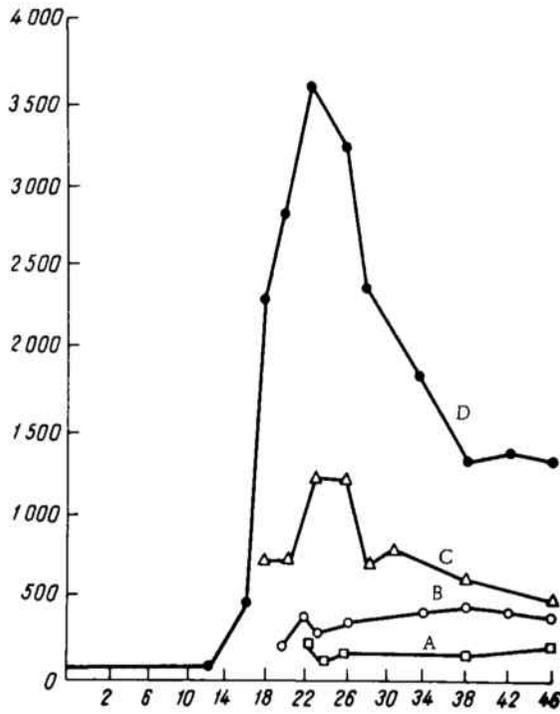


Figura 1.6.: Incorporación de  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  en el ADN de los hepatocitos de ratas después de extraer diferentes cantidades de tejido hepático. Abcisas: horas posthepatectomía parcial. Ordenadas: cpm/mg. de ADN. Las curvas representan el nivel de síntesis después de una extirpación del 9% (A); 34% (B); 43% (C) y 68% (D). (Liozner, 1974).

Se ha descrito además, que el proceso de la regeneración hepática es más largo cuanto mayor tejido hepático es extraído (Goss, R.J., 1965).

Finalmente el horario de la intervención quirúrgica es otro factor que puede alterar la respuesta proliferativa. Muchas de las funciones celulares como por ejemplo la actividad mitótica están influenciadas por el ritmo de iluminación al que están sometidos los animales. En ratas no operadas, el número de mitosis es máximo durante el día y mínimo durante la tarde. En ratas regenerantes después de una hepatectomía parcial, el n° de mitosis aumenta durante la mañana siguiente del día de la operación. En ratas sacrificadas a diferentes horas después de la operación (desde las 28 horas hasta las 56 horas) se observa que la primera ola de mitosis alcanza el valor máximo a las 30 horas y el segundo pico lo alcanza a las 44 horas posthepatectomía, independientemente si las ratas se han sacrificado a la mañana o a la tarde. Sin embargo, el  $I_m$  de los animales sacrificados a las 10 de la mañana es de 5%, mientras que el de los animales sacrificados a las 10 de la noche es de 1,5% (Liozner, L.D., 1974). Así pues, podríamos concluir que el principal factor responsable de la aparición de la ola de mitosis es el tiempo transcurrido desde el momento de la operación, y el ritmo circadiano de la división celular únicamente juega un papel secundario.

### 1.3.3. FACTORES EXTRACELULARES IMPLICADOS EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA REGENERACION HEPATICA

La mayoría de las células diferenciadas de un organismo se encuentran estacionadas en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular. La transición del estado quiescente a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular es esencial en cualquier proceso de activación celular. Dicha transición depende, en principio, de señales extracelulares que interaccionan con receptores específicos situados en la membrana plasmática, en el citoplasma y/o en el núcleo, y cuyo objetivo es "avisar" a la célula para que ponga en funcionamiento la maquinaria necesaria para llevar a cabo la duplicación celular.

Existen muchas evidencias que demuestran la existencia de "factores hepatotróficos", en la sangre de ratas hepatectomizadas, que están implicados en el desencadenamiento de la respuesta regenerativa.

Experimentos cruzando la circulación sanguínea de ratas hepatectomizadas y ratas no operadas, han demostrado que se produce un aumento significativo de la síntesis de ADN en el hígado de ambos animales (Moolten, F.L. y Bucher, N.L.R., 1967), indicando por tanto la existencia, en la sangre de ratas regenerantes, de factores circulantes que incrementan la síntesis de ADN en el hígado de ratas normales. Se han aislado 2 factores hepatotróficos a partir de suero de ratas hepatectomizadas: una fracción de las β-globulinas (constituida esencialmente por lipoproteínas) y

una proteína ácida de 150 kd. llamada Hepatotropina. Ambos factores son capaces de aumentar la síntesis de ADN en hepatocitos de ratas no operadas (Short, J. et al., 1969; Nakamura, T. et al., 1984).

Por otra parte existen evidencias experimentales que indican la presencia de algún factor estimulante de la proliferación hepática en el sobrenadante obtenido después de centrifugar a 27.000xg un homogenizado hepático. Una inyección de 5 ml. de este sobrenadante produce un aumento de la síntesis de ADN en el hígado de ratas a las que se les ha practicado una hepatectomía del 34% y en el de ratas y ratones no operados. Este mismo efecto se ha obtenido utilizando cultivos primarios de hepatocitos así como diferentes líneas de hepatomas, al parecer este factor únicamente es capaz de estimular la proliferación en líneas celulares de origen hepático (La Brecque, D.R. y Pesch, L.A., 1975; La Brecque, D.R. y Bachur, N.R., 1982; La Brecque et al., 1984).

La infusión de una mezcla de triyodotironina aminoácidos, glucagón y heparina (solución TAGH) produce un aumento de la síntesis de ADN en las células del parénquima hepático (Short, J. et al., 1972). La triyodotironina es el elemento clave de esta mezcla para desencadenar la activación de la proliferación hepatocelular (Coll et al., en prensa).

Experimentos realizados con cultivos primarios de hepatocitos han demostrado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la insulina son capaces de inducir la

síntesis de ADN en estas células y que el glucagón actuaría como agente potenciador, no obstante un exceso de glucagón bloquea este efecto mitógeno (Bucher, N.L.R. et al., 1983).

La vasopresina y la angiotensina (dos hormonas vasoconstrictoras) son capaces de inducir in vitro la división hepatocelular. Estas hormonas actuarían aumentando el "turnover" del fosfoinositol y elevando la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular, sin embargo el efecto de estas dos hormonas en la regeneración hepática, todavía se desconoce. Únicamente se ha demostrado que las ratas incapaces de sintetizar vasopresina presentan graves problemas después de practicarles una hepatectomía parcial (Bucher, N.L.R. et al., 1983).

Se sabe que ciertos iones están implicados en el desencadenamiento del proceso regenerativo. Las ratas hipocalcémicas sometidas a una hepatectomía parcial son incapaces de sintetizar ADN, pero si lo hacen después de inyectarles vía intraperitoneal una solución de  $Cl_2Ca$  entre las 12 y 15 horas después de la operación (Whitfield, J.F. et al., 1976).

Por último se ha demostrado que las catecolaminas desempeñan un papel importante en la proliferación hepatocelular. Se sabe que la noradrenalina inhibe la respuesta proliferativa después de practicar una hepatectomía parcial en una rata, mientras que la acetilcolina la activa (Kato, H. y Shimazn, T., 1983). Sin embargo se han obtenido resultados contradictorios utilizando cultivos primarios de hepatocitos, puesto que la

noradrenalina es capaz de inducir la síntesis de ADN (Cruise, J.L. et al., 1985).

Todos estos datos indicarían que la respuesta regenerativa esta regulada probablemente por más de un factor, y que los diferentes factores "hepatotróficos", hormonas, iones y neurotransmisores intervienen conjuntamente en el control de la respuesta proliferativa.

#### 1.3.4. ALTERACIONES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS HEPATOCITOS

Si consideramos que la transición del estado quiescente al ciclo de división celular es el resultado de la interacción de factores hepatotróficos y hormonas con los hepatocitos, es lógico pensar que los primeros cambios moleculares han de tener lugar en la membrana plasmática de estas células.

Se han descrito numerosas modificaciones en la composición proteica de la membrana plasmática así como en el número de receptores hormonales y de factores de crecimiento durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática. Se sabe que el número de receptores para el EGF disminuye entre las 8 y 24 horas del proceso regenerativo (Earp, H.S. y O'Keefe, E.J., 1981). Asimismo, el número de receptores para el glucagón también se encuentra disminuido después de realizar una hepatectomía

parcial (Leffert, H.L., 1977). Contrariamente, se ha observado un aumento en el número de receptores para la insulina, (cuyo valor máximo se alcanza a las 24 horas) y para la transferrina a las 48 horas postintervención quirúrgica (Pezzino, V. et al., 1981; Tei, I. et al., 1984). Sin embargo, el que el número de receptores de la transferrina este incrementado una vez pasada la fase prerreplicativa de la regeneración hepática, es un hecho difícil de relacionarlo con el inicio de la síntesis del ADN.

Por otra parte, el aumento de receptores para la insulina en la superficie del hepatocito está estrechamente relacionado con la activación del transporte de metabolitos (glucosa y aminoácidos) e iones a través de la membrana plasmática (Fehlmann, M. et al., 1979; King, G.L. y Kahn, Cr., 1985; Moore, R.D., 1983), hechos correlacionados con el desencadenamiento de la síntesis de proteínas y de ADN.

Se han descrito también cambios específicos de las glicoproteínas de la membrana plasmática a las 6 horas posthepatectomía parcial. Concretamente aparecen 4 nuevas glicoproteínas de la región sinusoidal de la membrana plasmática (Enrich, C. y Gahmber, C.G., 1985). Cabe destacar también una disminución de ácido siálico durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática. Esta desialización afecta preferentemente a ciertas glicoproteínas (Enrich et al., 1984). Recientemente se ha demostrado que la desialización es producida por una disminución de la actividad UDP-N-Acetil-D-glucosamina-

2'epimerasa, enzima regulador de la síntesis del ácido siálico (Coll et al., 1986).

Por otra parte, algunas de las actividades enzimáticas localizadas en la membrana plasmática se encuentran modificadas durante el período prerreplicativo de la regeneración hepática. Por ejemplo, la actividad  $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPasa}$  aumenta alrededor de un 60% a las 12 horas después de una hepatectomía parcial (Schenk, D.B. et al., 1984; Enrich, C. et al., 1986).

Uno de los primeros cambios detectados después de una hepatectomía parcial así como en otros procesos de activación de la proliferación celular es una entrada de sodio debido a un aumento del co-transporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que provoca un aumento del pH intracelular. El  $\text{Na}^+$  es expulsado posteriormente de la célula por un aumento de la actividad  $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPasa}$ .

La actividad específica de la fosfatasa alcalina se encuentra incrementada aproximadamente unas 10 veces a las 12 horas de la regeneración hepática (Bachs, O., 1983).

Se ha descrito también un aumento puntual a las 13 horas postoperación de la actividad específica basal de la adenilato ciclasa (Bachs, O., 1983). Otros autores han observado un aumento de la sensibilidad de esta enzima por la tiroxina, entre las 2 y las 4 horas de la regeneración hepática, el cual provocaría un incremento de la actividad específica del enzima (Figura 1.7) (Leoni, S. et al., 1975). Estos 2 aumentos de la actividad adenilato ciclasa se pueden correlacionar con la aparición de los 2 aumentos

de AMPc intracelular, observados entre las 2-4 horas el primero y entre 12-14 horas el segundo, de la fase prerreplicativa de la regeneración hepática.

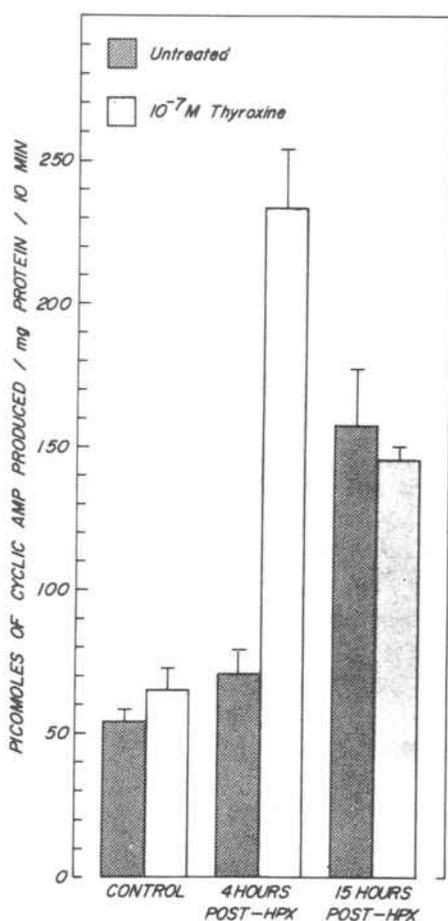


Figura 1.7.: Incremento de la actividad de la adenilato ciclasa después de una hepatectomía parcial del 70% y del aumento de la sensibilidad de esta enzima por la tiroxina. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de  $n \geq 4$  (Leoni et al., 1975).

La 5'Nucleotidasa, la  $Mg^{2+}$ ATPasa, la  $Ca^{2+}$ ATPasa y la gamma-glutamil transpeptidasa son otras enzimas de la membrana plasmática, cuyas actividades se hallan significativamente alteradas durante este proceso proliferativo (Bachs, O., 1983). Sin embargo tan sólo los incrementos de la actividad de la adenilato ciclasa y de la  $(Na^+-K^+)$  ATPasa están asociados al desencadenamiento de la duplicación del material genético.

Tiene especial interés la fosforilación de determinadas proteínas de la membrana plasmática durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática. La fosforilación de proteínas de membrana es uno de los mecanismos implicados en la transducción de señales externas y afectan directamente a la actividad de los receptores. Se ha observado que se autofosforilan 3 proteínas de membrana por protein quinasas independientes de AMPc, a las 8 horas posthepatectomía parcial (MacManus, J.P. y Whitfield, J., 1981).

Por último, un hecho importante a destacar y correlacionado con el aumento de la biosíntesis de proteínas, observada a partir de las 2 horas de la regeneración hepática (Mujandar, C. et al., 1967), es el incremento de la captación de aminoácidos por parte de las células hepáticas. Esta entrada de aminoácidos comienza a detectarse a las 2 horas y su valor máximo se alcanza a las 6-8 horas posthepatectomía parcial (Short et al., 1975). Concretamente, el sistema de transporte de aminoácidos más afectado es el sistema dependiente de  $Na^+$  (Guidotti, G.G.,

1978). El bloqueo de la entrada de  $\text{Na}^+$  produce una inhibición del transporte de aminoácidos y de la síntesis de proteínas y ADN.

Como ya se ha señalado anteriormente, el incremento de los receptores para la insulina sería responsable del incremento del transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática del hepatocito.

#### 1.3.5. CAMBIOS INTRACELULARES IMPLICADOS EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA PROLIFERACION HEPATOCELULAR

Se han llevado a cabo un gran número de estudios encaminados a describir los cambios intracelulares que tienen lugar en los hepatocitos, durante las fase prerreplicativa y replicativa de la regeneración hepática. Sin embargo es importante diferenciar que cambios representan una adecuación funcional del hígado, pues la función hepática, ha quedado completamente alterada después de la hepatectomía, y que cambios están implicados en el control de la multiplicación celular.

La extirpación del 70% de la masa hepática provoca una disminución importante del número de hepatocitos y consecuentemente una disminución de la producción de glucosa, por tanto para mantener los niveles adecuados de glucosa es necesario la modificación del metabolismo de este azúcar.

Inmediatamente después de la operación se movilizan los depósitos de glucógeno, observándose un aumento de la glucogenolisis durante las primeras 4 horas posthepatectomía parcial (Liozner, L.D., 1974).

Otro factor que contribuye a mantener los niveles de glucosa en los hepatocitos de las ratas regenerantes es la disminución de la glicolisis durante este proceso proliferativo (Katz, N., 1979).

Se ha descrito también una acumulación de lípidos, especialmente de triglicéridos, en el citosol durante la regeneración hepática (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971; Glende, E.A. y Morgan, W.S., 1968; Murray, A.B. et al., 1981; Stein, A.T. et al., 1985). El objetivo de esta acumulación de lípidos es servir de aporte energético durante el proceso de restauración de la masa hepática (Nakatani, T. et al., 1981). Este aumento de triglicéridos comienza a detectarse a partir de las 2 horas posthepatectomía parcial; la concentración es máxima a las 18 horas alcanzándose en este momento valores seis veces más elevados respecto a las ratas no operadas. A partir de las 30 horas después de la intervención quirúrgica los niveles de triglicéridos empiezan a disminuir. Esta acumulación de triglicéridos es producido por un aumento de la actividad *sn*-Glicerol 3-fosfato aciltransferasa microsomal (Stein, A.T. et al., 1985).

Los niveles de algunos ácidos grasos tales como los ácidos palmítico, palmitoleico, oleico y linoleico se encuentran incrementados entre 3 y 5 veces a las 12 y 18

horas posthepatectomía parcial, mientras que los niveles de los ácidos araquidónico y esteárico no se modifican (Gillian, J.M. et al., 1968). Tampoco se han detectado cambios cuantitativos en el contenido de fosfolípidos durante este proceso regenerativo (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971).

Posiblemente la acumulación citosólica de lípidos está relacionada con la gluconeogénesis a partir del glicerol resultante de la hidrólisis de los triglicéridos; pues se ha visto que la infusión continuada de glucosa durante las 21 primeras horas de la regeneración hepática produce una inhibición de la acumulación lipídica así como la movilización de glucógeno sin afectar la duplicación celular (Simek, J.F. et al., 1968).

En preparaciones histológicas se observa que la acumulación de lípidos se produce en forma de vacuolas lipídicas (Figura 1.8) o "liposomas" en los hepatocitos localizados preferentemente en las zonas periportales (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971; Serratos, J., 1985).

Por otra parte se sabe que la concentración de albúmina en sangre se reduce a la mitad después de practicar una hepatectomía parcial (Princen, H.M.G. et al., 1982), sin embargo y debido a que esta reducción de albúmina también se observa en los animales laparatomizados, queda descartado la implicación de este fenómeno en el desencadenamiento de la reproducción hepatocelular, indicando por tanto que este cambio se

produciría como respuesta al estrés quirúrgico (Sobzak, J. y Duguet, M., 1986).

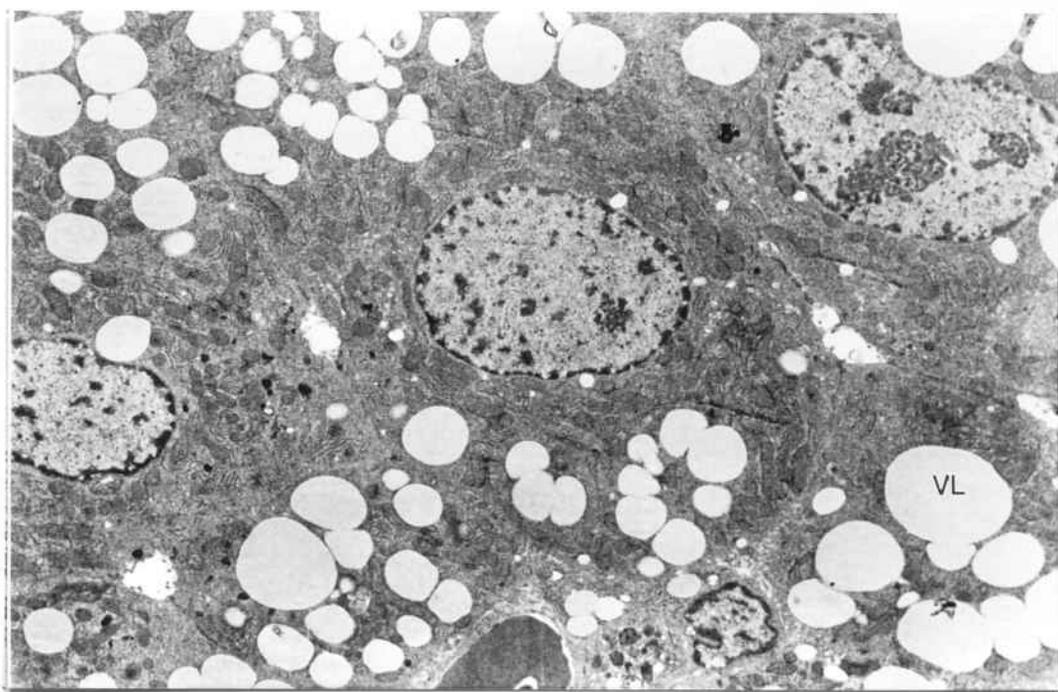


Figura 1.8.: Micrografía electrónica de hígado de rata a las 18 horas después de una hepatectomía parcial. El órgano se ha fijado por perfusión. (VL) Vacuolas lipídicas. (Prestada por J. Serratosa, 1985).

Los cambios intracelulares realmente implicados en el desencadenamiento de la duplicación hepatocelular se expondrán a continuación de acuerdo con el orden cronológico de su aparición:

## - Elevación del pH intracelular

Uno de los primeros y más críticos cambios implicados en el desencadenamiento de la duplicación del ADN, es la elevación del pH intracelular como consecuencia del incremento del sistema de co-transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a través de la membrana plasmática celular. Las primeras evidencias experimentales fueron descritas por Johnson, J.D. et al. en 1976, los cuales observaron un aumento del intercambio iónico  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a través de la superficie celular de huevos fertilizados de erizo de mar. Posteriormente este fenómeno se ha detectado también en otros procesos de activación de la proliferación celular así como después de practicar una hepatectomía parcial en la rata (Leffert, H.L. y Koch, K.S., 1985; Rozengurt, E., 1986).

Se cree que la elevación del pH intracelular está relacionada con la interacción previa del mitógeno u otra señal extracelular con la fosfolipasa C (PLC). Dicha interacción activaría la PLC la cual catalizaría la rotura del fosfatidilinositol 4,5 difosfato ( $\text{PIP}_2$ ) en inositol 4,5 difosfato ( $\text{IP}_2$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $\text{IP}_2$  se fosforilaría dando lugar al  $\text{IP}_3$ , que actuaría movilizando los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático. Por último el  $\text{Ca}^{2+}$  y el DAG activarían conjuntamente la protein quinasa C que a su vez provocaría un incremento del co-transporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a través de la membrana plasmática del hepatocito (Figura 1.9)

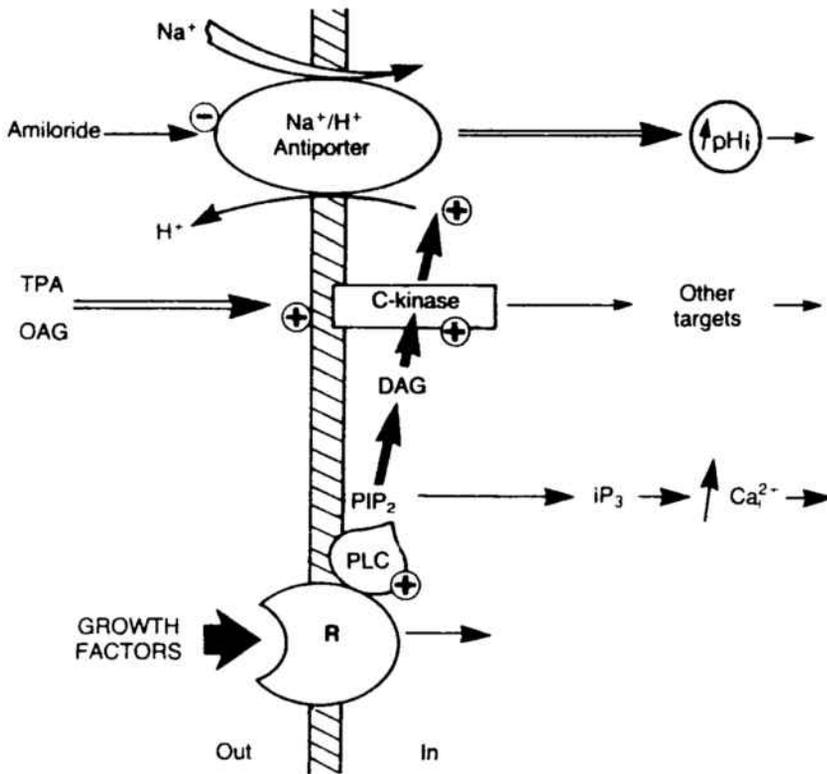


Figura 1.9.: Hipotética secuencia de acontecimientos que dan lugar al aumento de pH intracelular por la interacción de factores de crecimiento. TPA = 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetato. OAG = 1-oleoyl-2-acetil-glicerol. DAG = 1,2 diacilglicerol. PIP<sub>2</sub> = fosfatidil inositol 4,5 bifosfato. IP<sub>3</sub> = inositol 1, 4, 5, trifosfato. PLC = fosfolipasa C. R = Receptor factores de crecimiento. (Pouysségur, J., 1985).

#### - Cambios en la biosíntesis de Poliaminas.

Durante las primeras horas de la regeneración hepática se observa un incremento de la concentración de poliaminas, especialmente de putresceina, espermidina y espermina (Whitfield et al., 1976) (Figura 1.10). Los niveles de putresceina citosólicos empiezan a aumentar a

partir de las 3 horas de la regeneración hepática alcanzándose el valor máximo hacia las 8-9 horas después de la operación. Posteriormente la putresceina se convierte en espermidina. La concentración de espermidina comienza a incrementar a partir de las 4 horas y se mantiene elevada durante más de 30 horas después de la hepatectomía parcial. Por último se observa una ligera y gradual elevación de los niveles de espermina a partir de las 5 horas del proceso regenerativo (Figura 1.10).

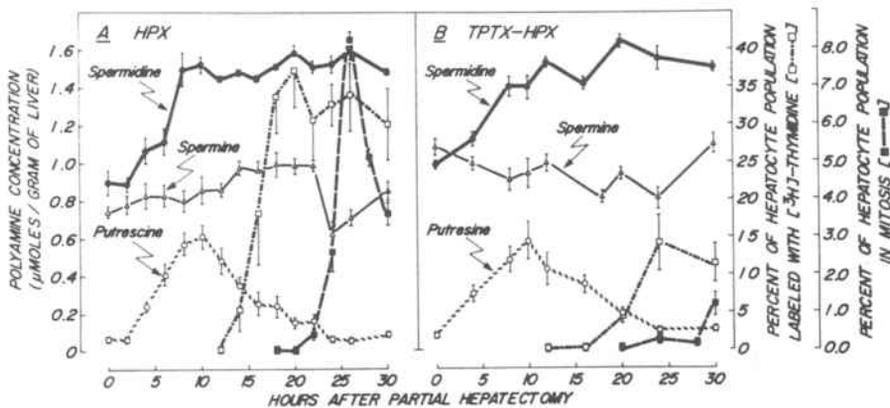


Figura 1.10: Efecto de la hepatectomía parcial (HPX) sobre los niveles de putresceina, espermina y espermidina en el hígado remanente de ratas normocalcémicas (A) e hipocalcémicas a las cuales se les ha practicado una tiroparatiroidectomía (TPTX) 72 horas antes de la hepatectomía parcial (B). Whitfield et al., 1976).

Se sabe que las poliaminas son compuestos que actúan como factores de crecimiento para muchos microorganismos y células en cultivo. Por ejemplo, las poliaminas son necesarias para la iniciación de la síntesis de ADN en dos

tipos celulares: células endoteliales BALB/3T3 de ratón y las WI-38 de pulmón humano (Whitfield, J.F. et al., 1976). Aunque la función de las poliaminas es desconocida por el momento, se cree que juegan un papel importante en la síntesis, estabilización y función de los ácidos nucleicos, especialmente del ARN (Bucher, N.L.R. et Malt, R.A., 1971), en la síntesis de proteínas y en la estabilización y permeabilización de las membranas (Tabor, C.W. y Tabor, H., 1976).

Por último existen evidencias experimentales que indican que el metabolismo de las poliaminas es independiente de la concentración de calcio, ya que las ratas hipocalcémicas y sometidas a una hepatectomía parcial presentan niveles de putresceína espermidina y espermina similares a los observados en las ratas regenerantes normocalcémicas (Walker, R.P. et al., 1978)(Figura 1.10).

Este aumento de poliaminas es producido por un incremento de la actividad L-Ornitin descarboxilasa (ODC), enzima regulador de la biosíntesis de estos compuestos. La ODC tiene un importante papel en la diferenciación y regulación del crecimiento. Se han detectado actividades altas de esta enzima en órganos tales como páncreas y próstata los cuales presentan una elevada tasa de síntesis de proteínas, así como en diversas células tumorales (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971; Bachrach, U., 1979).

Durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial la actividad ODC empieza a aumentar a

partir de la primera hora de este proceso. La máxima actividad se alcanza a las 4 horas y se mantiene elevada hasta las 16 horas después de la hepatectomía (Walker, P.R. et al., 1978).

Se ha sugerido que la actividad ODC durante este proceso regenerativo, al igual que en otros órganos y cultivos celulares, podría estar inducida en primer lugar, por la interacción de hormonas con la membrana plasmática del hepatocito y en segundo lugar por el incremento de la concentración de AMPc intracelular observado entre las 2-4 horas posthepatectomía parcial (ver más adelante). Probablemente la inducción de la ODC por este nucleótido cíclico se realiza a través de la activación de protein quinasas dependientes de AMPc (Buys, C.V. et al., 1977; Bachrach, U., 1979).

Por otra parte, la ODC esta involucrada en la regulación de la síntesis de ARN. Se conoce desde hace tiempo que la ODC se une a la ARN polimerasa I; esta unión produce un cambio conformacional en la RNA pol.I provocando la activación de esta enzima (Manen, C.A. y Russell, D.H., 1977). Es importante destacar que el aumento de actividad de la ODC, después de practicar una hepatectomía parcial, coincide en el tiempo con el incremento de la síntesis de ARN observado durante el período prerreplicativo de la regeneración hepática. Ello sugeriría que la ODC podría estar implicada en la estimulación de la síntesis de

proteínas observada después de la hepatectomía parcial (Whitfield, J.P. et al., 1987; Walker, P.R. et al., 1978).

- Cambios en la concentración de nucleótidos cíclicos

Durante el período prerreplicativo de la regeneración hepática, se produce un aumento bifásico de la concentración citosólica de AMPc. El primer incremento alcanza valores máximos entre las 2-4 horas y el segundo entre las 12-14 horas después de la intervención quirúrgica (Figura 1.11) (MacManus et al., 1972).

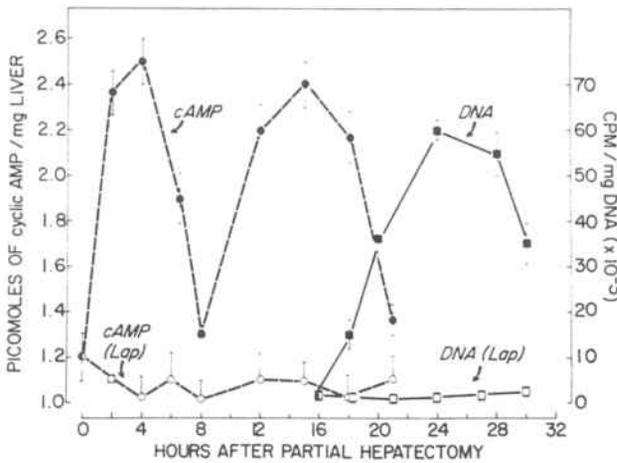


Figura 1.11.: Aumento de la concentración intracelular de AMPc durante la regeneración hepática (Mac Manus y Braceland, 1976).

Este aumento bifásico también se ha detectado en hepatocitos de ratas estimuladas a proliferar después de la

administración de la solución TAGH, (MacManus, J.P. et al., 1972), así como en cultivos de células hepáticas adultas activadas al añadir al medio de cultivo EGF, glucagón e insulina (Boynton, A.L. y Whitfield, U.F., 1983).

Se ha descrito que la inyección de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico una hora después de la hepatectomía parcial produce una inhibición de la primera ola de AMPc, sin afectar a la segunda ola ni al inicio de la síntesis del ADN (MacManus, J.P. et al., 1973; Thrower, S. y Ord, M., 1974), indicando por tanto que este primer aumento de AMPc no es necesario para la replicación del ADN. No obstante, si que parece estar relacionada con la entrada de los hepatocitos a la fase mitótica del ciclo celular, pues se ha demostrado que cuando se bloquea el primer incremento de AMPc mediante la inyección de dl propanolol, se produce una disminución del 50% aproximadamente de células en mitosis, entre las 28 y 32 horas posthepatectomía parcial (Figura 1.12). Este efecto puede ser revertido inyectando AMPc en las ratas tratadas con dl-propanolol, 90 minutos después de la extirpación (Rixon, R.H. y Whitfield, J.F., 1985).

La segunda ola de AMPc, al contrario de lo que sucede con la primera, está estrechamente relacionada con la replicación del ADN. La inhibición de esta 2ª ola por la inyección de un antagonista  $\alpha$  o  $\beta$  adrenérgico, a las 8 horas después de una hepatectomía parcial, produce una inhibición de la biosíntesis de ADN (MacManus et al., 1973).

Sin embargo el AMPc no es el factor indispensable que dispararía el inicio de la síntesis de ADN después de una hepatectomía parcial, pues se ha demostrado que las ratas hipocalcémicas no pueden sintetizar ADN después de extirparles el 70% de la masa hepática, a pesar de la presencia de las 2 olas de acumulación de AMPc en el citosol (Whitfield, J.F. et al., 1979).

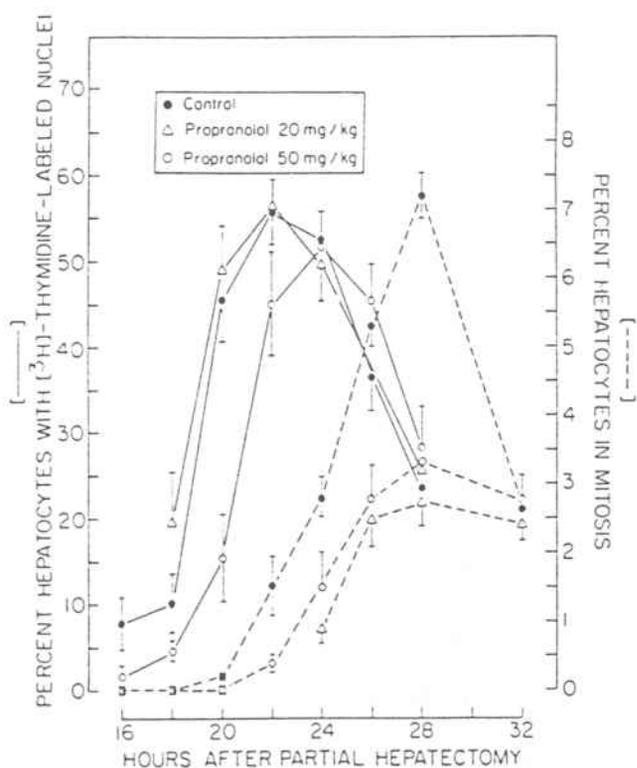


Figura 1.12.: Efecto del dl propranolol inyectado una hora después de la hepatectomía parcial sobre la síntesis de ADN y mitosis. La síntesis de ADN se ha medido por incorporación de  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  en los núcleos de hepatocitos. La actividad mitótica representa el porcentaje total de células que se encuentran en profase, metafase, anafase y telofase.

Se sabe que la segunda ola de acumulación de AMPc, está originada por un aumento de la actividad basal adenilato ciclasa conjuntamente con una disminución de la actividad fosfodiesterasa, mientras que la primera ola es el resultado de un aumento de la actividad adenilato ciclasa producida a su vez por un incremento de la sensibilidad de esta enzima por la tiroxina (Whitfield, J.F. et al., 1976).

La elevación bifásica de los niveles de AMPc sería responsable de la activación de protein quinasas dependientes de AMPc del tipo I y II durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática. Después de una hepatectomía parcial se observan dos incrementos de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, cuyos valores máximos se alcanzan a las 6 y 14 horas después de la intervención quirúrgica (Sikorska, M. et al., 1983).

Por último, desde que se conoce que el AMPc puede estimular la expresión génica, a través de la interacción del complejo AMPc-subunidad RII de las protein quinasas dependientes de AMPc con el genoma, (Severin, E.S. y Nesterova, M.V., 1982; Kondrashin, A.A., 1985), se ha sugerido que la segunda acumulación de AMPc producida durante la regeneración hepática podría estar implicada en la producción de los enzimas necesarios para la replicación del ADN (Cho-Chung, Y.S., 1980; Whitfield, J.F. et al., 1985).

Sin embargo esta hipótesis no es compartida por otros autores que piensan que la subunidad RII de la proteína quinasa dependiente de AMPc no penetra en el núcleo (Nigg, E.A. et al., 1985).

Por otra parte, se ha observado que el nivel "total" de GMPc intracelular se mantiene constante durante todo el proceso de la regeneración hepática (Whitfield, J.F. et al., 1976). No obstante, utilizando técnicas inmunocitoquímicas se ha demostrado que se produce una alteración de la distribución de GMPc a lo largo del período prerreplicativo. En hepatocitos quiescentes este nucleótido cíclico se localiza en las membranas plasmática y nuclear y en el interior del núcleo, mientras que después de una hepatectomía parcial, se observa un incremento en la membrana plasmática a las 8 horas y en la membrana nuclear e interior del núcleo a partir de las 12 horas después de la operación. Esta redistribución intracelular de GMPc está correlacionada con un similar incremento de la actividad guanilato ciclasa en la membrana plasmática y en el núcleo (Fausto, N. y Butcher, F.R., 1976, Koide, Y. et al., 1978).

Este fenómeno ha sugerido que el GMPc podría participar en la regulación de las funciones premitóticas de los microtúbulos o en la formación del huso mitótico, aunque su modo de acción se desconoce por ahora. (Snyder, J.A. y McIntosh, J.R., 1976).

### Cambios en la biosíntesis de prostaglandinas.

Durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática se ha detectado un aumento de la síntesis de prostaglandinas especialmente de prostaglandinas E (PGE), a partir del ácido araquidónico. La concentración de PGE empieza a aumentar a partir de la primera hora del proceso proliferativo. Los niveles máximos se alcanzan a las 2 horas y se mantienen elevados hasta las 6 horas después de la hepatectomía parcial (MacManus, J.P. y Braceland, B.M., 1976).

La inyección de Indometacina una hora antes de la hepatectomía produce una disminución importante de la síntesis de PGE y una inhibición de la duplicación del ADN. Estos resultados sugerirían que la acumulación de PGE estaría relacionada con la replicación del material genético (Whitfield, J.F. et al., 1976). No obstante, cuando se administra PGE exógena no se revierte la inhibición de la síntesis de ADN producida por la indometacina, indicando por tanto que las PGE NO están implicadas en el desencadenamiento de la replicación del ADN.

La indometacina debe afectar la síntesis del ADN por una vía independiente de las PGE. Parece ser que esta droga produce un bloqueo de la movilización de  $Ca^{2+}$  del hueso por la parathormona y de la movilización de calcio desde los depósitos intramitocondriales al citosol, provocando un estado de hipocalcemia que impediría el inicio de la duplicación del ADN.

Por otra parte, se conoce que la fosfolipasa A<sub>2</sub>, enzima responsable de la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas, es una enzima dependiente de Ca<sup>2+</sup>.

Se ha sugerido que uno o más productos de la casacada del ácido araquidónico podrían ser responsables de la activación de la adenilato ciclasa, pues se ha demostrado que la presencia de indometacina en el medio de cultivo produce un inhibición de la síntesis de PGE, AMPc y ADN en las células hepáticas T51B (Boynton, A.L. y Whitfield, J.F., 1980; Boynton, A.L. et al., 1985).

Finalmente existen evidencias que indicarían que las prostaglandinas podrían estar implicadas en algún proceso relacionado a su vez con la posterior entrada de los hepatocitos a la fase mitótica del ciclo celular (Rixon, R.H. y Whitfield, J.F., 1982).

#### Cambios de la concentración de calmodulina intracelular

Se conoce desde hace tiempo que las ratas hipocalcémicas después de someterlas a una hepatectomía parcial son incapaces de iniciar la replicación del ADN y consecuentemente la duplicación celular, a pesar de presentar las 2 olas citosólicas de AMPc y el incremento de poliaminas. Sin embargo si lo hacen cuando se les inyecta una solución de Cl<sub>2</sub>Ca o de hormona paratiroidea entre las 12-15 horas después de la hepatectomía parcial (Whitfield, J.F. et al., 1976; Rixon, R.H. y Whitfield, J.F., 1976).

Por otra parte existen numerosas evidencias experimentales in vitro que demuestran la importancia de los iones  $Ca^{2+}$  en el control de la proliferación celular. Así pues, se sabe que las células de origen hepático T51B son capaces de proliferar cuando en el medio de incubación se le añade altas concentraciones de calcio (Boynton, A.L. y Whitfield, J.F., 1980). Además, se ha observado en otras muchas células, como los fibroblastos 3T3, un aumento de la concentración de iones  $Ca^{2+}$  en el citosol después de estimular estas células con PDGF u otros mitógenos (Rozengurt, E., 1986).

La acción del calcio esta mediada por la formación de complejos  $Ca^{2+}$ -calmodulina, siendo la calmodulina el receptor de este ión más ampliamente distribuido en células eucariotas. Después de extirpar el 70% de la masa hepática se produce un aumento de la concentración citosólica de calmodulina. Los niveles de este receptor de  $Ca^{2+}$  empiezan a elevarse a partir de las 6 horas posthepatectomía parcial. Entre las 8 y 12 horas la concentración se mantiene elevada alcanzando además los valores máximos. Posteriormente se produce una gradual disminución de la concentración de calmodulina (MacManus, J.F. et al., 1981; Soriano, M. et al., 1985)(Figura 1.13).

Un similar incremento de calmodulina intracelular se ha observado en cultivos de células hepáticas T51B activadas a proliferar por la presencia de elevadas

concentraciones de  $Ca^{2+}$  en el medio de cultivo. Cuando se añade Trifluoperacina (TFP), inhibidor de la acción de los complejos  $Ca^{2+}$ -calmodulina, al medio de cultivo se produce una inhibición de la síntesis de ADN. No obstante, el efecto de la TFP es revertido al suministrar calmodulina ( $10^{-6}M$ ) en el medio de cultivo (Boynton, A.L. y Whitfield, J.F., 1980).

La inyección de TFP, 4 horas posthepatectomía parcial produce un retraso de 10 horas aproximadamente en la aparición de la ola de calmodulina así como en el inicio de la síntesis de ADN. (Soriano et al., 1985). Estos datos indicarían pues, que la calmodulina está estrechamente relacionada con la duplicación del ADN. (Figura 1.13.)

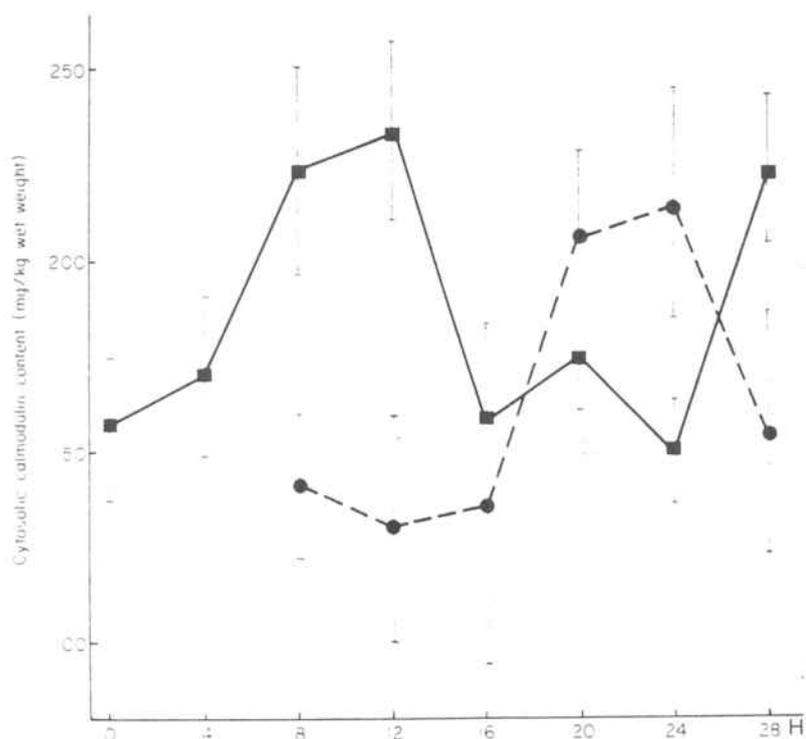


Figura 1.13.: Efecto de la TFP sobre el contenido de calmodulina citosólica. (■) Ratas regenerantes inyectadas con solución salina. (●) Ratas regenerantes inyectadas con TFP (60 mg./kg.) 4 horas después de la hepatectomía parcial. (Soriano et al., 1985).

Recientemente se ha demostrado un aumento de los ARN mensajeros para la calmodulina entre las 6 y las 12 horas posthepatectomía parcial, indicando por tanto que la ola de calmodulina citosólica está originada por un incremento de la biosíntesis de esta proteína (Piñol, M.R. et al., en prensa).

### Cambios en la síntesis de RNA

Durante las fases prerreplicativa y replicativa de la regeneración hepática se detecta un incremento del contenido total de RNA celular. Este aumento de RNA celular se debe principalmente a un aumento de la síntesis de RNA mensajeros y RNA ribosómicos (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971).

Cuando se inyecta Actinomicina D, se produce una inhibición de la respuesta proliferativa, indicando por tanto que el aumento de la síntesis de RNAm es necesaria para llevar a cabo la duplicación celular (Sobczak, J. y Duguet, M., 1986).

Se ha descrito que durante los periodos prerreplicativo y replicativo de la regeneración hepática se produce un incremento de la biosíntesis de proteínas estructurales tales como la actina, la  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina (Friedman, J.M. et al., 1984). Los RNAm para la actina aumentan aproximadamente 10 veces respecto a los de las ratas laparatomizadas, durante las primeras 24 horas de la regeneración hepática. Asimismo se detecta un aumento de

los RNAm para la  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina a partir de las 24 horas posthepatectomía parcial. Los niveles de estos 2 RNAm permanecen elevados hasta las 48 horas de la intervención quirúrgica.

El aumento de la transcripción del gen de la actina parece ser un fenómeno asociado a la proliferación celular, ya que se ha observado un incremento de los RNAm para la actina en células de ratón BALB/C-3T3 activadas a proliferar por la presencia, en el medio de cultivo, de factores de crecimiento (Lau, L.F. y Nathans, D., 1985).

Recientemente, R. Makino y colaboradores (1984), han descrito un rápido aumento de los RNAm para el oncogen c-myc, entre los 30 minutos y 8 horas después de una hepatectomía parcial. No obstante se desconoce si la inducción de este RNAm es una de las primeras señales necesarias para la transición  $G_0/G_1$ .

Se ha observado también un aumento considerable de los RNAm para los oncogenes Ha-Ras y myb, a partir de las 15 y 16 horas respectivamente de la regeneración hepática (Goyette, M. et al., 1983; Sobczak, J. y Duguet, M., 1986). Concretamente los niveles de los RNAm para el oncogen Ha-Ras se mantienen elevados hasta las 48 horas posthepatectomía parcial. Sin embargo no se conoce todavía si la inducción de los oncogenes c-myc, Ha-Ras y myb están relacionados con el inicio de la síntesis de ADN o si por el contrario con la entrada de los hepatocitos en la fase mitótica del ciclo celular.

Los RNAm para los oncogenes erb, abl, src, fes, c-mos y bas, no son detectables durante este proceso proliferativo, aunque podrían presentar pequeñas fluctuaciones que fuesen técnicamente imposibles de cuantificar (Friedman, J.M. et al., 1984).

Es de destacar también que los RNAm para la  $\alpha$ -fetoproteína (marcador del crecimiento hepático fetal) no se modifican después de realizar una hepatectomía parcial en la rata (Princen, H.M.G. et al., 1982; Friedman, J.M. et al., 1984). No obstante, se ha descrito que algunas clases de ratones presentan una concentración elevada de esta proteína, durante la regeneración hepática (Balayew, A. y Tilghman, S.M., 1982; Petropoulos, C. et al., 1983). Sin embargo, en estos animales los niveles de  $\alpha$ -fetoproteína son muy inferiores a los observados en el hígado fetal o en el neonato.

Es importante señalar que los RNAm para las proteínas específicas del hígado adulto (pLiv2-pLiv11 y albúmina) se mantienen constantes durante todo el proceso regenerativo.

Así pues podríamos concluir que durante el proceso de restauración de la masa hepática no se produciría una desdiferenciación de los hepatocitos con la consecuente reexpresión de los marcadores del crecimiento fetal.

Por último, tal y como ya se ha indicado anteriormente, se detecta un aumento de la síntesis de RNA ribosómico a partir de los primeros momentos de la regeneración hepática hasta las 12 horas, momento en que se

alcanzan los valores máximos. Coincidiendo con este periodo de tiempo, se observa un aumento del número de ribosomas en los hepatocitos de ratas regenerantes (Bucher, N.L.R. y Malt, R.A., 1971).

#### - Cambios en la actividad protein quinasa dependientes e independiente de AMPc

Se ha descrito un incremento bifásico de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol, durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática (Sikorska, M. et al., 1983; Buys, C.V. et al., 1977).

La actividad del isoenzima I de las protein quinasa dependientes de AMPc empieza a aumentar por primera vez, a partir de las 2 horas después de la hepatectomía parcial. La máxima actividad se alcanza a las 4 horas y a las 8 horas, esta actividad quinasa es similar a la observada en ratas control. Posteriormente se observa una segunda ola de actividad del isoenzima I cuyo valor máximo se alcanza a las 14 horas de la regeneración hepática. A partir de este momento esta actividad quinasa disminuye progresivamente hasta alcanzar los valores control.

La actividad del isoenzima II aumenta en 2 etapas a partir de las 2 primeras horas del proceso regenerativo. La actividad máxima se alcanza entre las 10-14 horas y a continuación esta disminuye rápidamente.

Simultáneamente a partir de las 14 horas de la hepatectomía, se detecta en el núcleo un aumento de la

actividad protein quinasa dependiente de AMPc que alcanza su valor máximo a las 16 horas de la operación (Laks, M.S. y Jungmann, R.A., 1980; Laks, M.S. et al., 1981; Sikorska, M. et al., 1983).

Se sabe que este aumento de la actividad protein quinasa nuclear es producida por una translocación de las subunidades catalíticas desde el citosol al núcleo, en donde fosforilarían diferentes subtipos de la histona H1 (Laks, M.S. et al., 1981; Ohba, Y. et al., 1984).

Diversas evidencias sugieren que el AMPc y el sistema microtubular estarían implicadas en la translocación de las subunidades catalíticas de estas protein quinasa al núcleo. Cuando se inyecta dl propanolol a las 8 horas de la hepatectomía parcial, se produce un retraso de igual duración en la aparición de la ola intracelualr de AMPc, en la de actividad quinasa dependiente de AMPc nuclear y en el inicio de la síntesis de ADN. Por otra parte, la administración de colchicina (desorganizador del sistema microtubular) inhibe el aumento de la actividad protein quinasa nuclear, a las 16 horas de la regeneración hepática, así como el desencadenamiento de la duplicación del ADN. (Laks, M.S. et al., 1981).

Se ha descrito también, que las ratas hipocalcémicas, las cuales son incapaces de iniciar la síntesis de ADN, no presentan el incremento de la actividad quinasa dependiente de AMPc en el citosol. Ello sugeriría que este aumento de actividad quinasa estaría relacionada con el inicio de la duplicación del ADN. Una inyección de Vitamina D<sub>3</sub> en el

momento de la extirpación hepática restablece la actividad protein quinasa, principalmente la del isoenzima I, a las 14 horas del proceso regenerativo. Estos datos sugerirían que la Vitamina D<sub>3</sub> estaría implicada en la regulación de la actividad de estas protein quinasas (Sikorska, M. et al., 1983). Posteriormente se ha confirmado que la Vitamina D<sub>3</sub> controlaría exclusivamente la síntesis de las subunidades catalíticas de estas enzimas (Sikorska, M. y Whitfield, J.F., 1985).

Recientemente se ha demostrado mediante la aplicación de técnicas de inmunofluorescencia que el isoenzima II de las protein quinasas dependientes de AMPc, se encuentra localizado en la zona perinuclear, concretamente asociado a las membranas del complejo de Golgi, y en los centrosomas de muchas células interfásicas de origen epitelial y fibroblástico. Además, estas observaciones han sido confirmadas utilizando métodos de subfraccionamiento celular (Nigg, E.A. et al., 1985). Estos mismos autores han observado que en las células que se encuentran en mitosis, la fluorescencia está localizada exclusivamente en los polos del huso mitótico y en los centriolos. Estos resultados indicarían que las protein quinasas dependientes de AMPc podrían estar implicadas en la regulación de importantes funciones celulares tales como la secreción, biogénesis de membranas, morfología y motilidad celular y separación de los cromosomas durante la división celular.

Se ha descrito en el núcleo un aumento de la actividad protein quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, a partir de las 2 horas después de una hepatectomía parcial. La máxima actividad se alcanza a las 6 horas y a continuación esta disminuye rápidamente. Las ratas hipocalcémicas sometidas a una hepatectomía parcial no presentan este aumento de la actividad protein quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina; detectándose una actividad muy similar a la observada en ratas normocalcémicas no hepatectomizadas. La administración de Vitamina  $\text{D}_3$  no revierte la inhibición de esta ola de actividad protein quinasa producida por la baja concentración de calcio en la sangre (Sikorska, M. et al., 1980; Sikorska, M. et al., 1983). La función de esta protein quinasa se desconoce por ahora, pero sin duda ha de ser esencial para el desencadenamiento de la síntesis de ADN.

Por último, se ha detectado entre las 10 y 14 horas de la regeneración hepática un aumento de actividad protein quinasa nuclear, independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc. El peso molecular de esta enzima es de 105 Kd. (Sikorska, M. y Whitfield, J.F., 1982). La reducción de un 50% de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en sangre no afecta este incremento de actividad protein quinasa (Sikorska, M. et al., 1983).

#### - Modificaciones de las proteínas cromosómicas.

Diversas evidencias indican que durante la regeneración hepática se produce un aumento de la

fosforilación de las diferentes subespecies de la histona H1 (Sung, M.T. et al., 1971; Garrard, W.T. et al., 1976; Laks, M.S. et al., 1981).

La subespecie H1-3, la cual representa un 66% del total de las histonas H1, es la primera en fosforilarse a las 15 horas de la hepatectomía parcial. Además la H1-3 es la más susceptible de esta modificación. Las subespecies H1-2 y H1-4, que representan un 22% y un 7% respectivamente del total de las H1, también se fosforilan aunque en menor proporción (Ohba, Y. et al., 1984). Estos mismos resultados se han obtenido después de la infusión de una solución de glucagón a ratas normales.

El significado biológico que puede tener este aumento de la fosforilación de la subespecie H1-3 se desconoce por ahora aunque se ha sugerido que podría estar relacionada con la activación génica.

Por otra parte, la síntesis de las histonas H1 se incrementa de 4 a 5 veces después de una hepatectomía parcial. Concretamente el subtipo H1-4 sufre un aumento de unas 16 veces, sin embargo esta especie es rápidamente degradada (Ohba, Y. et al., 1984). No se conoce todavía el sentido de estas diferencias en el recambio y en la fosforilación de las diferentes subespecies de histonas H1. No obstante, dado a que estas modificaciones tienen lugar durante la duplicación del de los hepatocitos, se cree que podrían estar implicadas en el estado de condensación de la cromatina, en función de la expresión génica, duplicación del ADN y Mitosis.

Se conoce que las protein quinasas dependientes de AMPc son las enzimas responsables de la fosforilación de la histona H1, pues el aumento de fosforilación de estas proteínas coincide en el tiempo con el incremento de esta actividad quinasa nuclear (Laks, M.S. et al., 1981).

Por último, el resto de histonas (H1-1, H2A, H2B, H3 y H4) no se fosforilan o si lo hacen es indetectable (Laks, M.S. et al., 1981).

#### - Duplicación del ADN.

En la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial, el inicio de la duplicación del ADN está correlacionado con el aumento de actividad de las enzimas que participan en la síntesis o modificación del material genético.

Durante la fase replicativa se ha descrito un aumento de la actividad ADN metilasa. No obstante, el nivel de metilación del ADN permanece constante durante todo el proceso regenerativo. Ello sugeriría que la cromatina una vez sintetizada es metilada inmediatamente (Szyf, M. et al., 1985).

A partir de las 16 horas hay un aumento de la actividad ADN polimerasa  $\alpha$ , DNA primasa, 3'-5' exonucleasa y RNasa H. Todas estas enzimas replicativas se hallan asociadas a la matriz nuclear (Tubo, R.S. y Berezney, R., 1986) en donde forman los replisomas, lugar donde se lleva a cabo la duplicación del ADN (Nelson, W.G. et al. 1986).

Se cree que este aumento de actividad de las enzimas replicativas, durante la regeneración hepática, es producido por un incremento de la síntesis de nuevas moléculas (Sobczak, J. y Duguet, M., 1986).

Por otra parte se conoce que las ratas hipocalcémicas y hepatectomizadas no presentan esta ola de actividad de los enzimas replicativos, indicando por tanto que estos fenomenos son dependientes de la concentración de calcio.

## 2. OBJETIVOS

Con el objetivo de poder conocer los mecanismos por los que se desencadena la duplicación del ADN y posteriormente la duplicación celular en el hígado de ratas sometidas a una hepatectomía parcial, es necesario determinar que cambios iniciales son responsables de la aparición de cambios más tardíos, del inicio de la síntesis del ADN y de la entrada de los hepatocitos en la fase mitótica del ciclo celular.

Hasta el momento no se conoce todavía si existe únicamente una cadena de reacciones o si por el contrario existen más de una que transcurren simultáneamente y en paralelo durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática.

Después de practicar una hepatectomía del 70% en las ratas, pueden observarse tres importantes cambios en el citosol:

- \* Un incremento bifásico de la concentración intracelular de AMPc, el primero entre las 2-4 horas y el segundo entre las 12-14 horas de la operación.
- \* Un aumento de la concentración de calmodulina cuyo valor máximo se alcanza entre las 8-12 horas.
- \* Un aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc entre las 14-16 horas posthepatectomía parcial.

Tal y como hemos visto en la introducción existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que estos tres acontecimientos están relacionados con el inicio de la síntesis de ADN; sin embargo, se desconoce aún si forman parte de una misma secuencia de reacciones o si por el contrario pertenecen a tres vías distintas, todas ellas necesarias para llevar a cabo la duplicación celular.

En esta tesis se han planteado los siguientes objetivos:

A) Relación entre el primer incremento de AMPc intracelular y el aumento de calmodulina en el citosol. Para tal objetivo se ha estudiado el efecto de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico sobre el contenido de calmodulina en el citosol a las 8 horas de la regeneración hepática.

B) Relación entre aumento de calmodulina citosólica y la segunda ola de AMPc. Para ello se ha determinado la concentración de este nucleótido cíclico entre las 10-20 horas posthepatectomía parcial, en ratas regenerantes y tratadas con una droga anticalmodulina.

C) Relación entre el aumento de calmodulina citosólica y el incremento de actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol. Para la realización de este apartado se han utilizado 2 metodologías diferentes:

c<sub>1</sub>) Determinación de esta actividad quinasa en el citosol de ratas regenerantes y tratadas con una droga anticalmodulina.

c<sub>2</sub>) Determinación de la concentración de calmodulina y de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, en el citosol de ratas regenerantes e hipocalcémicas.

D) Relación entre el incremento de calmodulina en el citosol y el desencadenamiento de la duplicación del ADN. Para tal finalidad se ha determinado la concentración de calmodulina en el núcleo y en las diferentes subfracciones nucleares a las 0, 12, 20 y 24 horas después de una hepatectomía parcial. También se han estudiado las posibles modificaciones de los receptores de calmodulina en el núcleo de los hepatocitos durante la regeneración hepática.

E) Determinar si el aumento de actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol también se presenta cuando la activación proliferativa se induce mediante otros métodos diferentes a la hepatectomía parcial.

F) Determinar el origen de la ola de actividad citosólica de protein quinasas dependientes de AMPc.

G) Establecer el patrón de fosforilación dependiente de AMPc y de calmodulina de proteínas citosólicas durante la regeneración hepática.

### 3. MATERIAL Y METODOS

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1. ANIMALES

Para llevar a cabo este trabajo se han utilizado ratas macho Sprague-Dawley.

Las ratas utilizadas han sido adultos jóvenes con una edad comprendida entre 10-12 semanas y de un peso aproximado de unos 250 g .

Los animales han estado sometidos a periodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con la finalidad de mantener constantes los ritmos circadianos.

La comida suministrada ha sido una dieta de mantenimiento rata-ratón de la casa Panlab S.A. Tanto la comida como la bebida se ha suministrado ad libitum y únicamente se les ha retirado la comida 12 horas antes de cualquier intervención quirúrgica.

Los animales se han sacrificado por desnucación y exsanguinación.

#### 3.1.2 TECNICAS QUIRURGICAS.

##### 3.1.2.1 Horario de las intervenciones quirúrgicas.

Para evitar variaciones en la respuesta regenerativa, es importante estandarizar el horario de las intervenciones quirúrgicas (Barbason y Le Lievre, 1970). Por este motivo,

todas las operaciones se han realizado entre las 8-10 de la mañana.

### 3.1.2.2 Anestesia.

Como anestésico se ha utilizado Ketolar<sup>®</sup> (Parke Davis), compuesto principalmente por clorhidrato de ketamina, que no presenta ningún efecto hepatotóxico.

La dosis administrada de anestésico es de 120 mg/Kg de peso corporal, via intraperitoneal.

### 3.1.2.3. Hepatecomía parcial

La hepatecomía parcial consiste en la extirpación de aproximadamente un 70% de la masa hepática. La magnitud de la respuesta regenerativa es proporcional a la cantidad de masa hepática extirpada. La extirpación del 70% del hígado, asegura una respuesta proliferativa elevada con un índice de mortalidad mínimo (Bucher y Swaffiel ,1965).

La técnica utilizada es la descrita por Higgins y Anderson, 1931. Una vez anestesiada la rata, se limpia la superficie abdominal con alcohol etílico, se hace un corte longitudinal, siguiendo la línea central del abdomen, de unos 2-3 cm de longitud, a continuación se extrae el hígado y se pinza el lóbulo izquierdo y después de hacer un doble nudo, se extirpa. Mediante el mismo procedimiento se extirpa el lóbulo medio. Finalmente se sutura la herida con aguja del 3/0 y se limpia con alcohol etílico.

Después de la hepatecomía parcial y hasta la hora del

sacrificio, a las ratas se les administra exclusivamente agua.

#### 3.1.2.4 Tiroparatirodectomía

La tiroparatirodectomía consiste en la extirpación de las glándulas del tiroides y paratiroides con el fin de producir en la rata un estado de hipocalcemia en sangre. Para ello se ha utilizado el método descrito por Rixon y Whitfield, 1976.

Después de la intervención quirúrgica y durante un periodo de 72 horas, a las ratas se les mantiene con agua y comida ad libitum.

#### 3.1.3 INFUSION ENDOVENOSA DE LA SOLUCION T.A.G.H.

Aparte de la hepatecomía parcial existen otros sistemas de estimulación de la proliferación hepatocelular, como el sistema empleado por Short et al. 1972, basado en la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H. formada por:

- 3- 3- 5 Triyodotironina 100 µgr.
- Mezcla de L- Aminoácidos 130-150mg
- Glucagón 1mg
- Heparina 100 U.S.P

Estos 4 componentes se encuentran disueltos en una solución de NaCl 0.1 M a pH = 7.2

La solución T.A.G.H se prepara momentos antes de ser utilizada y previa a su administración se esteriliza por filtración al vacío con un filtro estéril Millipore de 0.45 $\mu$ m de tamaño de poro. La esterilización de la solución es importante, pues de no realizarla se puede provocar una infección generalizada que podría interferir en la activación de la proliferación hepatocelular.

Cada animal recibe 10 ml de dicha solución a un flujo constante 3.3 ml /hora, vía endovenosa por una de las venas de la cola.

Con el fin de poder diferenciar entre los efectos producidos por la administración de la solución T.A.G.H y los posibles efectos derivados de la técnica de inyección se ha utilizado como controles ratas administradas con una solución de NaCl 0,15 M pH = 7,2.

Al igual que en la hepatecomía parcial, para evitar variaciones en la respuesta proliferativa, es importante estandarizar el horario de la administración de la solución T.A.G.H, así pues la administración de dicha solución se ha realizado siempre entre las 9-12 horas de la mañana.

### 3.1.4 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES CON INHIBIDORES DE LA SINTESIS PROTEICA.

Con la finalidad de estudiar si el incremento de actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol, durante la regeneración hepática, es debido a un aumento de la síntesis de esta enzima, algunas ratas se han inyectado con Actinomicina D o Cicloheximida, inhibidores de la transcripción y traducción respectivamente.

Dichas sustancias se han inyectado via endovenosa, 4 horas antes del sacrificio de los animales. Las dosis utilizadas han sido:

- Actinomicina D: 1mg/Kg de peso.
- Cicloneximida: 0.66mg/Kg de peso.

### 3.1.5 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES CON TRIFLUOPERACINA (TFP)

La TFP es una droga antipsicótica perteneciente al grupo de las fenotiacinas que actúa bloqueando la unión de calmodulina con otras proteínas (receptores de calmodulina).

En 1977, Levin y Weis observaron que la unión de TFP a calmodulina es dependiente de  $Ca^{2+}$  en una relación de 2 moléculas de esta droga por una molécula de calmodulina. Se sabe además que esta unión se realiza en las regiones hidrofóbicas de la calmodulina, regiones que esta proteína pone de manifiesto cuando se une al calcio.

Para producir una inhibición del incremento citosólico de calmodulina durante la regeneración hepática, la TFP se ha inyectado intraperitonealmente a una dosis de 60mg/Kg, 4 horas después de la hepatecomía parcial.

### 3.1.6 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES CON UN ANTAGONISTA $\beta$ -ADRENERGICO.

El d-1- propanolol es un antagonista  $\beta$ -adrenérgico que actúa inhibiendo la adenil ciclasa, enzima responsable de la transformación de ATP en AMP cíclico, el cual actúa como mediador intracelular o segundo mensajero. (Stiles, G.L. et al., 1984; Pritchard, B.N.C. and Owens, C.W.I., 1984).

Este compuesto se inyecta via intraperitoneal, 1 hora después de la hepatecomía parcial a una dosis de 20 mg/Kg. de peso.

## 3.2 METODOS DE SUBFRACIONAMIENTO CELULAR.

### 3.2.1 OBTENCION DE CITOSOL HEPATICO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc.

El método utilizado es el descrito por Sikorska et al. en 1983.

Una vez sacrificado el animal se extraen 2 gr. de hígado y se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su utilización.

El hígado se coloca en un recipiente con el tampón de homogenización:

- 250 mM Sacarosa
- 50 mM Tris-HCl pH= 7.5 a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 25 mM KCl
- 5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 50  $\mu\text{M}$  Mercaptoetanol

Una vez descongelados los 2 gr. de hígado se fragmentan en pequeños trozos y se procede a la homogenización del tejido con 5 volúmenes del tampón descrito anteriormente. Para la homogenización se utiliza un homogenizador tipo Dounce de una capacidad de 7 ml provisto de un émbolo duro. La homogenización se realiza a  $4^{\circ}\text{C}$  con 15 "strokes". El homogenizado obtenido se filtra a través de 4 capas de gasa, para eliminar los restos de tejido que puedan quedar, y se enrasa hasta 10 ml con el tampón de homogenización.

\* El homogenizado se centrifuga a 700 xg durante 10 min. Se recoge el sobrenadante por aspiración y se diluye 10 veces con el siguiente tampón:

- 20 mM Tris-HCl pH = 7.5 a 4°C

- 3 mM MgCl<sub>2</sub>

- 50 μM Mercaptoetanol

\* El sobrenadante diluido se centrifuga con una ultracentrífuga, utilizando un rotor vasculante, a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C.

\* El sobrenadante de esta segunda centrifugación se utiliza para determinar la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. Las muestras se guardan a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3.2.2. OBTENCION DE CITOSOL HEPATICO PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CALMODULINA.

La obtención de citosol para determinar el contenido de calmodulina, se realiza según el método descrito por Chafouleas et al 1979 y modificado por Bachs y Carafoli en 1987.

Una vez sacrificado el animal, se extrae el hígado procurando no dañarlo y se perfunde con 40 ml aproximadamente de NaCl al 0.9% frío con la finalidad de eliminar los hematies de los sinusoides hepáticos y evitar posibles contaminaciones. Seguidamente se toman 0.5 g de

tejido y se homogenizan con un homogenizador tipo Dounce, con 5 ml del siguiente tampón de homogenización:

- 125 mM Ac. Bórico                      pH = 8.4 a 4°C.
- 1 mM EGTA
- 75 mM NaCl

\* El homogenizado se filtra con 4 capas de gasa y se enrasa hasta 5 ml con el tampón de homogenización. Se centrifuga a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C con un rotor SW-50 Beckman.

\* Del sobrenadante obtenido se aparta una alícuota para la determinación de proteínas, y el restante se destina para la determinación de calmodulina citosólica. Debido a que la calmodulina es una proteína termostable, este sobrenadante se somete al siguiente tratamiento con calor:

\* Para 1 volumen de sobrenadante se añaden 3 volúmenes del siguiente tampón:

- 80 mM Tris-HCl              pH = 7.8 a 20°C
- 80 mM Imidazol
- 6 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>

\* Se agita y se calientan las muestra hasta 95°C. durante 3 minutos, después de este tiempo estas se enfrían inmediatamente en un baño de hielo. Después de un período aproximado de 10 minutos las muestras se centrifugan a 7000 r.p.m durante 5 minutos con una microfuga. El sobrenadante se utiliza para la determinación de calmodulina y se guarda hasta el momento de su utilización a -80°C.

### 3.2.3. OBTENCION DE CITOSOL HEPATICO PARA LA DETERMINACION DE AMPc.

- \* Después de sacrificar el animal se extrae 1 gr. de hígado y se congela inmediatamente con  $N_2$  líquido.
- \* Se añaden 4 ml. de ácido tricloroacético 5% frío. Esta operación se ha de hacer lo más rápido posible.
- \* Seguidamente se homogeniza la muestra con un homogenizador de cuchillas Sorvall Omni-Mixer a máxima velocidad durante 2 minutos a 4°C.
- \* El homogenizado obtenido se centrifuga a 700 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utiliza para la determinación de la concentración de AMPc.

### 3.2.4. OBTENCION DE NUCLEOS Y FRACCIONAMIENTO NUCLEAR.

En este apartado se ha seguido el método descrito por S. H. Kaufman y J. H. Shaper, 1984.

- \* Se parte de 2-3 hígados (15 gr. aproximadamente) los cuales se han perfundido previamente con ClNa 0,9% frío.
- \* Seguidamente se homogeniza con un homogenizador Potter-Elvehjem teflón vidrio, 3-5 "strokes" en el siguiente tampón de homogenización (STM):
  - 250 mM Sacarosa
  - 50 Tris-HCl pH = 7,4 a 4°C
  - 5 mM  $MgSO_4$ ,

-1 mM PMSF

-100 Unidades trasylol/ml

El PMSF y el trasylol se añaden al tampón momentos antes de su utilización.

\* El homogenizado se filtra con 4 capas de gasa y se enrasan a un volumen final de 120 ml.

\* A continuación se centrifuga a 800 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se elimina por aspiración y el pellet se resuspende con tampón STM/PMSF + trasylol y se repite la misma operación.

\* El pellet obtenido de esta segunda centrifugación se resuspende con 10 ml del siguiente tampón, DS/PMSF:

- 2,1 M Sacarosa

- 50 mM Tris-HCl pH = 7,4 a 4°C.

- 5 mM MgSO<sub>4</sub>.

- 1 mM PMSF

y se coloca en un tubo de ultracentrifuga sobre un cojín de 28-29 ml de tampón DS/PMSF. A continuación se centrifuga a 72000xg durante 1 hora a 4°C. utilizando un rotor vasculante Beckman (SW-28).

La elevada densidad del cojín (DS/PMSF) asegura que sedimentan los núcleos exclusivamente.

\* El sobrenadante se elimina por aspiración, se limpia bien el tubo y el pellet obtenido se resuspende en 10 ml de tampón STM/PMSF. A continuación se procede a una segunda sedimentación a 72.000 xg durante 30 minutos a 4°C. a través de un gradiente de 28-29 ml DS/PMSF.

\* Después de esta centrifugación, el pellet obtenido, correspondiente a la fracción nuclear, se resuspende en 3,5 ml. de tampón STM/PMSF; 0,5 ml se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$ . y el resto (3 ml) se utiliza para el subfraccionamiento nuclear.

#### 3.2.4.2. Obtención de las subfracciones nucleares

Para cada 1000  $\mu\text{l}$  de suspensión nuclear se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una solución de 2,5 mg/ml de DNasa I (Sigma) y 100  $\mu\text{l}$  (2,5 mg/ml) de RNasa A disueltas en tampón 10 mM Tris-HCl pH = 7,4 a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de DNasa y RNasa en la suspensión nuclear es de 250  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Después de una hora de incubación a  $4^{\circ}\text{C}$ . los núcleos se sedimentan a 800 xg durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . (Figura 3.1).

\* El sobrenadante (S1), formado principalmente por RNA, DNA y proteínas no histonas asociadas al DNA, se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

\* Con el pellet se procede del siguiente modo:

Se añaden 800  $\mu\text{l}$  de tampón (LS): 10 mM Tris-HCl pH = 7,4 a  $4^{\circ}\text{C}$ ., 0,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , se agita y a continuación se le añaden lentamente 3,2 ml de tampón (HS): 10 mM Tris-HCl pH = 7,4 a  $4^{\circ}\text{C}$ ., 0,2 mM  $\text{MgSO}_4$  y 2 M NaCl. La concentración final de sal en la muestra es de 1,6 M.

Después de incubar 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . se centrifuga a 5.000 xg 20 minutos a la misma temperatura.

\* El sobrenadante (S 2) formado principalmente por histonas y otras proteínas se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y con el pellet se repite el mismo procedimiento descrito anteriormente.

\*El pellet de esta tercera centrifugación que corresponde a la matriz nuclear (MN), formada por la envoltura nuclear y proteínas no histonas, se resuspende en 1 ml de tampón STM y se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

\* Para la determinación de los niveles de Calmodulina en los núcleos y en la sufracciones nucleares ( $S_1$ ,  $S_2$  y MN), las muestras se someten al mismo tratamiento con calor descrito en el apartado 3.2.2. de esta tesis.

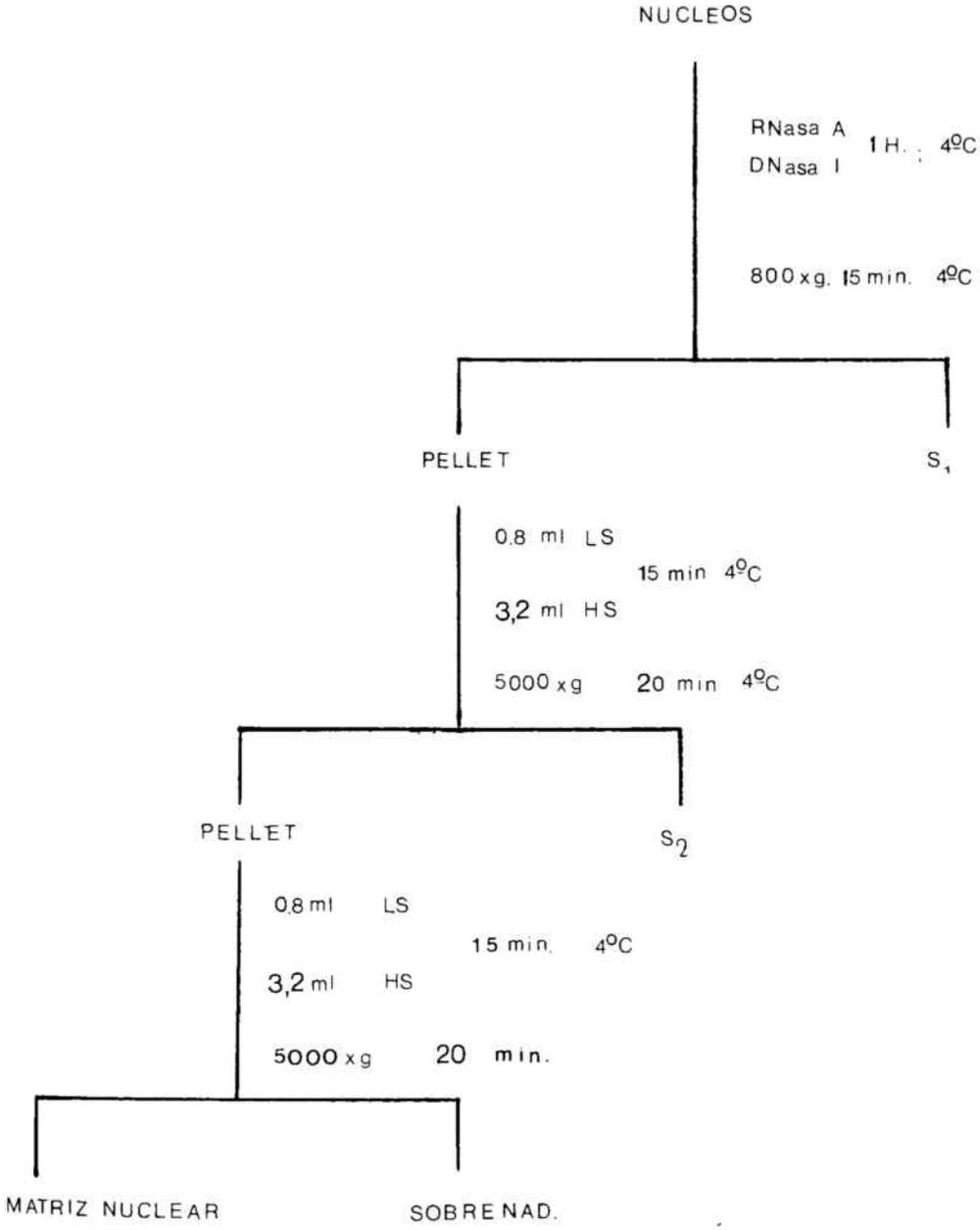


Figura 3.1.: Representación esquemática del subfraccionamiento nuclear.

### 3.3. DETERMINACIONES ENZIMATICAS Y METODOS BIOQUIMICOS GENERALES.

#### 3.3.1. METODOS DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Para determinar la cantidad de proteínas en las muestras se han empleado dos métodos.

1<sup>ER</sup> METODO: Método de Sedmak y Grossberg 1977 que es una modificación del método Bradford.

##### Reactivos:

- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Coomassie blue brilliant (G-250)
- Ac. Perclórico

##### Soluciones:

- Solución A: albúmina sérica bovina 0,1 mg/ml
- Solución B: Coomassie blue G-250 0,06% disuelto en ac. perclórico 1,9% (32 ml perclórico 60%) filtrado con papel Whatman nº 1.

##### Procedimiento:

\* Estandar: se preparan los tubos en los cuales se ponen 0; 1; 2,5; 5 y 10 µgr BSA/tubo. Se añade el agua bidestilada necesaria hasta tener un volumen final de 2 ml/tubo.



\* En los tubos correspondientes a las muestras se ponen 50  $\mu$ l de muestra diluida 1:10 y 1950  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada, para tener un volumen final 2 ml.

\* Se añaden a todos los tubos 2 ml. de la solución B, se agitan los tubos con un Vortex y se espera 10 minutos a temperatura ambiente antes de leer la densidad óptica con un espectrofotómetro a 620 nm.

\* Los  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína de cada muestra se calculan aplicando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{D.O.} \times \text{dilución}}{\text{pt} \times \mu\text{l muestra}} = \mu\text{g de proteína}/\mu\text{l.}$$

pt = pendiente de la recta estandar calculada gráficamente.

\* El segundo método utilizado es el descrito por Lowry et al. 1951.

#### Reactivos:

- Reactivo 1) CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> al 2% en NaOH 0,1 N
- Reactivo 2) SO<sub>4</sub>Cu al 0,5%
- Reactivo 3) tartrato sodio-potasio al 1,1%
- Reactivo 4) Reactivo Folin-Ciocalteu
- Reactivo 5) Albúmina sérica bovina (BSA) 0,1 mg/ml.

Antes del ensayo se preparan 2 soluciones:

- \* Solución A: 1 ml de reactivo 3  
48 ml de reactivo 1. Agitar.  
1 ml de reactivo 2

- \* Solución B: El reactivo 4 se diluye en una proporción 1:1 con agua bidestilada.

Procedimiento:

\*Estandar: Se preparan diferentes concentraciones de 0, 10, 20, 40 y 80 µgr/ml con el reactivo 5. A continuación se añaden el H<sub>2</sub>O bidestilada necesaria para llegar a un volumen final de 0,5 ml.

\* En el resto de los tubos se ponen 50 µl de muestra diluida 10 veces y 450 µl de agua bidestilada.

\* A cada tubo se añaden 2,5 ml de la solución A, se agitan los tubos y se espera 10 minutos a temperatura ambiente.

\* Seguidamente se ponen 250 µl de la solución B en cada tubo, se agitan los tubos y esperan 30 minutos a temperatura ambiente, antes de leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm.

\* Los µgr/µl de proteína de cada muestra se calculan aplicando la siguiente formula:

$$\frac{D.O \times \text{dilución}}{\text{pt} \times 2 \times \mu\text{l muestra}} = \mu\text{g de prot./}\mu\text{l}$$

Pt = pendiente de la curva estandar calculada graficamente.

### 3.3.2. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO INTRACELULAR.

El contenido de AMPc intracelular se determina según el método descrito por Gilman (1972) y modificado por Tovey y et al. 1974.

El ensayo se basa en la competencia entre AMPc exógeno (marcado con tritio) y al AMPc de la muestra, para unirse a una proteína que tiene una alta afinidad y especificidad por el AMPc.

La radiactividad incorporada en la proteína de unión permite calcular la cantidad de AMPc de la muestra. Dicha radiactividad será inversamente proporcional a la cantidad de AMPc presente en la muestra.

#### Procedimiento:

\* Del sobrenadante, obtenido de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.2.3., se toman aliquotas de 50  $\mu$ l para determinar el contenido de AMPc utilizando un "Kit" comercial de la casa Amersham. El Kit esta formado por los siguientes reactivos:

- Tampón: Tris-HCl 0,05 M pH = 7,5 a 4°C; EDTA 4mM
- Proteína de unión: subunidad reguladora de proteínas quinasas dependientes de AMPc, purificada de músculo esquelético bovino.  $K_a = 3,3- 5 \times 10^8 \text{ mols}^{-1}$ .
- Adenosin (8 - H<sup>3</sup>) 3'-5'- monofosfato cíclico en una disolución de 180 pmols que contienen 5  $\mu$ Ci

- Adenosin 3'-5' monofosfato para construir la curva estandar a partir de una solución de 1600 pmols
- Charcoal: formado por carbón activo y dextrano.

\* Se preparan 6 tubos para la estándar que contienen 50  $\mu$ l de diferentes diluciones de AMPc para tener una concentración de 0, 1, 2, 4, 8, 16 pmols AMPc/tubo.

\* Se preparan los tubos para las muestras y se ponen 50  $\mu$ l de muestra.

\* Se añaden a todos los tubos, muestra y estándar, 50  $\mu$ l del AMPc tritiado y 100  $\mu$ l de la proteína de unión. El "blanco" utilizado posee 50  $\mu$ l del AMPc tritiado y 150  $\mu$ l de tampón.

\* Se agita suavemente el contenido de los tubos y se incuban entre 2-4°C durante 2 horas. Durante este tiempo se establecen las raciones de competencia entre el AMPc tritiado y el AMPc la muestra, para unirse a la proteína de unión. Se necesitan como mínimo 2 horas de incubación para que la reacción llegue al equilibrio.

\* Transcurridas las 2 horas de incubación se añaden a cada tubo 100  $\mu$ l de la suspensión de charcoal frío, se agitan y se centrifugan a 3000 rpm durante 20' a 4°C. El tiempo que transcurre entre la adición del charcoal y la centrifugación no debe de exceder a los 6 minutos.

En este paso tiene lugar la separación del nucleótido libre del unido a la proteína. Todo el AMPc libre, tanto marcado como si no, que se encuentre en el medio de incubación se une al carbón precipitando conjuntamente.

\* Se recogen 200  $\mu$ l de sobrenadante, AMPc unido a la proteína, y colocan en viales a los que se añaden 4 ml de líquido de centelleo Supersolve X para determinar la radioactividad de la muestra en un contador de centelleo líquido.

Para calcular el contenido de AMPc de cada muestra, en primer lugar se construye la curva estándar. El tubo 0 standard da las c.p.m. en ausencia de AMPc no marcado, este parámetro corresponde al  $C_0$ . Las c.p.m. de cada una de las diferentes concentraciones de la estándar corresponde al  $C_x$ . Se calculan los cocientes  $C_0/C_x$  para cada valor de la estándar y se construye la recta patrón. En abscisa (x) se representan los cocientes  $C_0/C_x$  y en ordenadas (y) los pmoles de AMPc. El origen de la recta es el valor 1 de abscisas.

El AMP cíclico de las muestras se calcula a partir de los coeficientes a y b de la recta estándar cuya ecuación es:

$$y = ax + b$$

x =  $C_0/C_x$  de la muestra

y = pmoles AMPc/tubo

Se calcula el valor de y para cada valor de x.

El valor de y multiplicado por 4 y dividido por 0,05 (0,05 ml de muestra procedentes de 1 gramo de tejido en 4 ml de TCA 5%) representen los pmoles de cAMP/ gr de hígado. Dividido por  $10^3$ :

pmoles / mg. de hígado

Este mismo método se ha utilizado para la realización del estudio cinético con la subunidad reguladora de las protein quinasas dependientes de AMP cíclico en función de AMPc y en presencia o ausencia de 20  $\mu$ M de Trifluoperacina en el medio de incubación. En este caso los 50  $\mu$ l de muestra se han sustituido por una concentración conocida de AMPc sin marcar. Las concentraciones de AMPc estudiadas oscilan entre 2,5 y 1500 nM.

### 3.3.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO.

El método utilizado para determinar la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol hepático, es el descrito por Sikorska et al 1983.

Este ensayo esta basado en determinar la cantidad de  $^{32}$ P transferido a un sustrato (Histonas) a partir de ATP marcado radioactivamente ( $\gamma$   $^{32}$ P-ATP), por las protein quinasas dependientes de AMPc presentes en la muestra.

#### Soluciones stock:

1. 500 mM Tris-HCl pH = 7,5 a 25°C
2. 100 mM MgCl<sub>2</sub>
3. Disolución de 2  $\beta$ -Mercaptoetanol 1:10<sup>4</sup>
4. 100 mM Teofilina pH = 10,0
5. 10  $\mu$ M AMPc
6. Histonas (type II-AS Sigma) 1 mg/ml.

7. 500  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP
8. Acido tricloroacético (TCA) 25% 4°C.
9. Acido tricloroacético (TCA) 5% 4°C.

Medio de incubación: volumen final = 250  $\mu\text{l}$ .

- 20 mM Tris-HCl pH 7,5 25°C.
- 5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 50  $\mu\text{M}$  2- $\beta$ -Mercaptoetanol
- 10 mM Teofilina
- 1  $\mu\text{M}$  AMPc
- 100  $\mu\text{g}$ . Histonas
- 20  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP
- 20  $\mu\text{gr}$ . de muestra

Preparación del medio de incubación:

Antes del ensayo se prepara la siguiente solución:

- 4 ml Tris-HCl 500 mM pH = 7,5
- 5 ml  $\text{MgCl}_2$  100 mM
- 3,5 ml Mercaptoetanol 1:10<sup>4</sup>
- 10 ml Teofilina pH = 10,0
- 3,5 ml agua bidestilada

\* A continuación se preparan 4 tubos por muestra, en los cuales se colocan 65  $\mu\text{l}$ . del medio preparado previamente. En 2 de estos tubos se añaden 100  $\mu\text{gr}$ . de sustrato (Histonas) y 25  $\mu\text{l}$ . de AMPc Según como se indica en el siguiente esquema:

<u>Tubo 1</u>	<u>Tubo 2</u>	<u>Tubo 3</u>	<u>Tubo 4</u>
+ Histonas	+ Histonas	- Histonas	- Histonas
+ AMPc	- AMPc	+ AMPc	- AMPc

\* En todos los tubos se añaden 20  $\mu$ gr. de muestra y 10  $\mu$ l de la solución de ATP marcado. A partir de este momento se incuban los tubos durante 5 minutos a 25°C. Transcurrido este tiempo, la reacción se para añadiendo 1 ml de TCA 25% 4°C. Se toman aliquotas de 500  $\mu$ l y se filtran con un sistema de ultrafiltración Millipore usando filtros de 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro, los filtros se lavan con 2 ml de TCA 5% 4°C. y se introducen en viales con 4 ml de líquido de centelleo Supersolve X (Kochlight).

\* A partir de la radioactividad asociada al filtro, se determina la cantidad de fosfato incorporado al sustrato (Histonas).

En primer lugar se calcula la actividad específica de la solución de 500  $\mu$ M [ $^{32}$ P] ATP que se ha utilizado dividiendo las c.p.m. resultantes de 10  $\mu$ l de dicha solución por el número de n moles presentes en estos 10 $\mu$ l (5 nmols).

A continuación, para las diferentes muestras se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{c.p.m. (muestras)} \times 1000}{\text{Actividad específica}} = \text{pmoles } ^{32}\text{P ATP incorp.}$$

Dividiendo este resultado por los  $\mu\text{gr}$  de muestra (20  $\mu\text{gr}$ ) y por el tiempo de incubación (5 minutos) obtendremos:

$$\text{pmoles} / \mu\text{gr.} / \text{min.}$$

multiplicado por  $10^3$ :

$$\text{pmoles } ^{32}\text{P incorporado/mg/min}$$

En los estudios cinéticos realizados con la subunidad catalítica purificada de la proteína quinasa dependiente AMPc (Sigma), se ha seguido este mismo procedimiento descrito en este apartado. Sin embargo el medio de incubación utilizado es el siguiente:

- 20 mM Tris-HCl pH 7,5 25°C.
- 5 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$
- 50  $\mu\text{M}$  Mercaptoetanol
- 0,25 - 0,050  $\mu\text{gr.}$  de proteína purificada

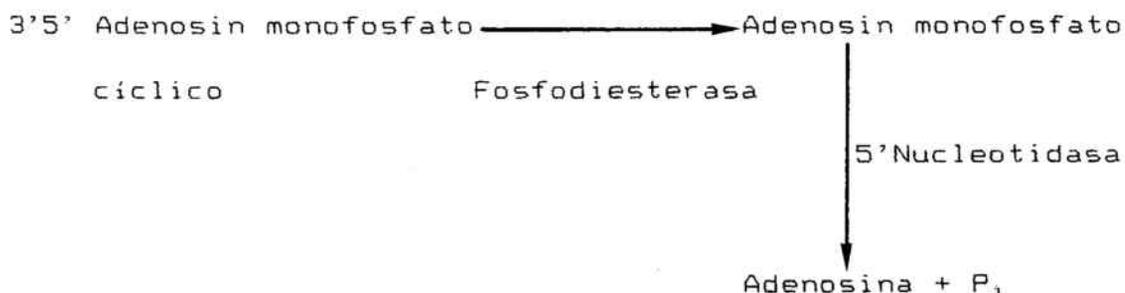
Las concentraciones de  $^{32}\text{P}$  ATP y de sustrato (Histonas) varían dependiendo del tipo de estudio realizado:

- $^{32}\text{P}$  ATP entre 1,25  $\mu\text{M}$  hasta 160  $\mu\text{M}$
- Histonas 1-200  $\mu\text{gr.}$

#### 3.3.4. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CALMODULINA..

Los niveles de calmodulina se han medido según el método descrito por Sharma y Wang 1978 y modificado por Bachs y Carafoli 1987.

El ensayo consiste en que la calmodulina en presencia de iones  $Ca^{++}$  es capaz de activar la fosfodiesterasa. En estas condiciones, la fosfodiesterasa hidroliza el enlace 3' de la adenosin monofosfato cíclico produciendo adenosina 5' monofosfato el cual en presencia de 5'Nucleótidasa dará lugar a adenosina más fosfato inorgánico. La cuantificación de fosfato inorgánico liberado permitirá calcular los niveles de calmodulina de la muestra.



El calcio, el AMPc y la 5'Nucleotidasa se hallan en exceso en el medio de incubación.

### Reactivos:

- Tampón: 360 mM Tris-HCl, 360 mM Imidazol,  
45 mM acetato magnésico pH = 7,8 a 25°C
- 4,5 mM  $Cl_2Ca$
- 10,8 mM AMPc
- 5'Nucleolidasa: 10 U/ml (disuelta en 10 mM Tris-HCl  
0,5 mM acetato magnésico pH = 7,0)
- Fosfodiesterasa: 0,014 U/30  $\mu$ l (disuelta en 0,1 M  
Tris-HCl pH = 7,5)
- Calmodulina purificada de cerebro bovino, según el  
apartado 3.3.8. de esta tesis, para la curva estándar.
- 100 mM EGTA

El ensayo se realiza poniendo en cada tubo:

- 100  $\mu$ l de tampón
- 20  $\mu$ l de  $CaCl_2$
- 30  $\mu$ l de 5'Nucleotidasa
- 30  $\mu$ l de Fosfodiesterasa

Para determinar la actividad basal de la fosfodiesterasa, se añaden 20  $\mu$ l de EGTA en lugar de los 20  $\mu$ l de  $Cl_2Ca$

\* En los tubos del estándar se añade calmodulina para tener una concentración final entre 0,1- 5 ng.

\* En el resto de tubos se le añaden entre 0,25 -2  $\mu$ gr. de muestra termostable.

\* Se añade a continuación el agua necesaria hasta un volumen final de 800  $\mu$ l.

\* Se preincuban los tubos a 37°C durante un minuto aproximadamente. Seguidamente se añaden 100 µl de AMPc y se incuban durante 5 minutos a 37°C.

\* Transcurrido este tiempo se toman 50 µl de cada tubo y se determina la cantidad de fosfato liberado en esta racción, de acuerdo con el método descrito a continuación.

### 3.3.5. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE FOSFATO.

Se ha utilizado el método del verde de malaquita descrito por Lanzetta et al 1979.

#### Reactivos:

- Verde de malaquita al 0,045% (p/v). Cuando se prepara esta solución se añaden 4 ml de HCl concentrado por cada 1000 ml de disolución.
- Molibdato amoníaco 4,2% en HCl 4N
- Tritón X-405 al 5% (v/v)
- Citrato sodico 34% (p/v)

Antes del ensayo se mezclan 300 ml de verde de malaquita al 0,045% y 100 ml de Molibdato amoníaco al 4,2% y se deja reposar como mínimo una hora. A continuación se filtra con papel Whatman nº 1 y se guarda presevándolo de la luz a temperatura ambiente. Esta solución es estable durante 3 semanas.

\* En el momento del ensayo, se añaden 40  $\mu$ l de tritón X-405 al 5% por cada 5 ml de la solución anterior.

\* Se colocan 800 $\mu$ l de verde de malaquita/molibdato amoniaco/tritón, en cada tubo. Se le añaden 50  $\mu$ l de muestra.

\* Después de un minuto se añaden 100  $\mu$ l de citrato sódico al 34% el cual estabiliza el color.

\* Esperar un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente y leer a 660 nm en un espectrofotómetro.

### 3.3.6. TECNICAS DE ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA.

Para el análisis electroforético de las proteínas citosólicas y nucleares se preparan geles de poliacrilamida de 1,5 mm de grosor de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli en 1970.

Las placas de geles están formadas por dos tipos de geles:

1. gel resolutivo o "resolving"
2. gel empaquetador o "stacking".

El gel empaquetador se coloca en la parte superior, tiene un tamaño de poro grande que permite que las proteínas corran juntas a una velocidad similar hasta el gel resolutivo. Este gel que se coloca en la parte inferior y tiene un tamaño de poro mucho más pequeño separando las proteínas de acuerdo con su peso molecular.

Para la preparación de los geles se utilizan las siguientes disoluciones:

- Solución 1: 0,75 M Tris-HCl (pH 8,8 a (20°C) /  
0,2% SDS
- Solución 2: Acrilamida 30%  
N,N' metilen-bis- acrilamida 0,8%
- Solución 3: 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8 a (20°C) /  
0,2% SDS
- Solución 4: Persulfato amónico 13 %

Para preparar una placa de electroforesis se hace de acuerdo al siguiente cuadro:

<u>conc.final</u>	<u>resolutivo</u>				<u>empaquetador</u>
	8%	10%	12%	15%	3,4%
<u>acrilamida</u>					
<u>Solución 1</u> (ml)	10	10	10	10	-
<u>Solución 2</u> (ml)	5,4	6,7	8	10	0,9
<u>Solución 3</u> (ml)	-	-	-	-	3,9
<u>H<sub>2</sub>O</u> (ml)	4,6	3,3	2	-	3,1
<u>TEMED</u> (μl)	25	25	25	25	20
<u>Solución 4</u> (μl)	100	100	100	100	78
<u>Total</u> (ml)	20	20	20	20	8

Después de mezclar los 4 primeros componentes se añaden el temed y el persulfato amónico e inmediatamente se carga la placa. Sobre la superficie del gel se depositan 1-2 cm de H<sub>2</sub>O y se esperan unos 20-30 minutos para que polimerize el gel.

Mientras tanto se prepara el gel empaquetador, que se coloca sobre el resolutivo cuando este ya está polimerizado, a continuación se pone el peine para la formación de los "pockets" que permitirán colocar las muestras.

Una vez polimerizado el gel empaquetador (10 min) se retira el peine y el gel ya está preparado. Este se coloca en un aparato de electroforesis de manera que entre en contacto, tanto por la parte inferior como por la parte superior, con el tampón electrolito formado por:

- 0,025 M Tris
- 0,192 M Glicina
- 0,1% SDS

El pH de la mezcla es de 8,3 a 20°C

#### Preparación de las muestras:

Las muestras diluyen en una proporción de 1:3 con tampón de muestra. Las muestras así diluidas se calientan a 100°C durante 3 minutos.

El tampón de muestra consta de los siguientes componentes:

- 0,125 M Tris-HCl pH = 6,8
- 4% SDS
- 20% glicerol
- 10% 2-B- Mercaptoetanol
- 0,006% Azul de Bromofenol (BPB)

Cuando las muestras están enfriadas, ya se puede entrar en la electroforesis, reservando siempre un "pocket" para una mezcla de proteínas de peso molecular conocido que será utilizado como estándar.

El voltaje que se aplica a la electroforesis dependerá del grosor del gel. En el caso particular de un gel de 1,5 mm de grosor se aplica:

- 25 mA para el gel empaquetador
- 35 mA para el gel resolutivo

La duración aproximada de la electroforesis es aproximadamente entre 3-4 horas, dependiendo de la longitud del gel.

#### Tinción de los geles con Coomassie Blue:

Antes de la tinción con coomasie blue se recomienda fijar las proteínas en un baño con ác. sulfosalicílico al 5% durante 20' seguido de otro, del mismo tiempo de duración, con la solución desteñidora. Sin embargo estos pasos son opcionales y se obtienen buenos resultados utilizando el siguiente método:

- Tinción durante 30' en una solución que contiene
  - 0,25% Coomassie blue G-250
  - 45% Metanol
  - 45% H<sub>2</sub>O bidestilada
  - 10% Ac. acético glacial
- Transcurridos los 30 minutos de tinción, y con el fin de extraer el exceso de colorante, se hacen sucesivos cambios con la siguiente solución desteñidora:
  - 5% metanol
  - 7,5% ácido acético glacial
  - 87,5% de H<sub>2</sub>O bidestilada

Una vez el gel está desteñado se seca entre papel de filtro y papel celofan con un secador de geles Bio-Rad durante 1-2 horas dependiendo del grosor y de la composición del gel.

### 3.3.7. DETERMINACION DE FOSFORILACION DE PROTEINAS MEDIANTE TECNICAS DE ELECTROFORESIS.

El método utilizado esta basado en el descrito por J. MacManus y J.F. Whitfield en 1981.

#### Soluciones stock:

- 1- 500 mM Tris, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA pH = 7,0 a 25°C
- 2- 10 mM ditioeritritol (dTT)
- 3- 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 4- 50 mM AMPc

5- 500  $\mu$ M Calmodulina purificada cerebro bovino

6- 120  $\mu$ M  $\gamma$  <sup>32</sup>P - ATP

A partir de estas soluciones stock se prepara el siguiente medio de incubación:

volumen final 100 $\mu$ l

- 50 mM Tris-HCl pH = 7,0 a 25°C.

- 10 mM MgCl<sub>2</sub>

- 0,2mM EGTA

- 1 mM ditioeritritol

- 12  $\mu$ M [ $\gamma$  <sup>32</sup>P]-ATP]

- 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> o

- 10  $\mu$ M Calmodulina + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> o

- 2,5  $\mu$ M AMPc

- 40  $\mu$ gr. de proteína

Una vez mezclados todos los componentes, a excepción del  $\gamma$  <sup>32</sup>P ATP, se preincuban durante 3 minutos a 30°C. Después de la preincubación se añade el ATP marcado y se incuban durante 5 minutos a la misma temperatura. La reacción se para añadiendo 25  $\mu$ l de una disolución que contiene:

250 mM Tris, 200 mM Glicina pH = 8,7

9% SDS

15% Glicerol

6% Mercaptoetanol

0,03% de Bromofenol blue (BPB)

Las muestras se dejan reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de cargarlas en una placa de electroforesis. El gel de SDS- poliacrilamida se ha preparado previamente.

Una vez finalizada la electroforesis se procede a la tinción del gel tal y como se ha descrito en el apartado anterior de esta tesis.

Una vez secado el gel, este se expone a una película Kodak X-Omat AR durante 3-6 días a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.8. PURIFICACION DE CALMODULINA

Para la purificación de calmodulina se parten de 1-2 cerebros y se procede del siguiente modo:

- Descongelar los cerebros de buey en una solución de 0,9% NaCl

- Cuando la superficie ya esta descongelada eliminar las meninges y restos de tejidos adicionales (tejido conjuntivo, sangre...).

\* Trocear los cerebros en pequeños trozos y esperar hasta que esten completamente descongelados, manteniéndolos en una solución NaCl 0,9% frio.

\* Los 2 cerebros se homogenizan con un litro de

50 mM tris-HCl pH = 7,4 a  $4^{\circ}\text{C}$

2,5 mM EGTA

0,5 mM PMSF (5 ml de una solución 100 mM de PMSF

añadidos antes de usar)

\* La homogenización se realiza en un homogenizador de cuchillas (Sorvall Omni-Mixer A106) durante 2-3 minutos hasta obtener un homogenizado perfecto.

\* Seguidamente el homogenizado se reparte en botellas de 250 ml y se centrifuga a 25.000 xg durante 30 minutos en una Sorvall RC-5 utilizando el rotor GSA.

\* El sobrenadante se filtra a través de 4 capas de gasa y se guarda a 4°C.

\* El sedimento se resuspende con el mismo tampón se vuelve a homogenizar, entre 1-2 minutos, y se sedimenta a 25.000 xg durante 30 minutos.

\* Después de esta centrifugación el sobrenadante se filtra y se mezcla con el sobrenadante obtenido de la primera centrifugación.

\* La DEAE- Celulosa, resuspendida en el tampón 50 mM tris-HCl pH = 7,4, 50 mM NaCl, se filtra en un Buchner de porcelana. La resina filtrada se añade al recipiente que contiene el sobrenadante. Se mide el pH y si se ha acidificado se vuelve a equilibrar a pH 7,4.

\* Esta mezcla se agita lentamente durante 30 minutos.

\* Transcurrido este tiempo se filtra la mezcla nuevamente en el Buchner y se lava varias veces con el tampón: Tris-HCl 50 mM pH = 7,4, 50 mM NaCl hasta que la hemoglobina haya desaparecido. Ha de quedar una solución transparente.

\* A continuación la resina, con la calmodulina retenida, se vuelve a lavar, 2 veces con un litro cada vez con 50 mM tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl.

\* Para extraer la calmodulina retenida a la resina, se coloca la resina a un recipiente con 700 ml. de 50 mM Tris-HCl pH = 7,4; 600 mM NaCl y se filtra con la ayuda del Buchner.

\* El filtrado se recoge, pues contiene la calmodulina y se guarda a 4°C.

\* Se vuelve a repetir la extracción con 700 ml. del tampón de elevada concentración en sal. Este filtrado también se recoge y se mezcla con el filtrado anterior, el volumen de esta mezcla es de 1400 ml aproximadamente.

\* Seguidamente se pesan 351 gr/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se van añadiendo al recipiente que contiene el filtrado en agitación, procurando no echar trozos grandes de sulfato amónico. Se deja 1 hora en agitación a 4°C.

\* A continuación esta solución se coloca en tubos de centrífuga y se centrifuga en una Sorvall RC-5 a 25.000 xg 30-35 minutos.

\* Se recogen los sobrenadantes en un mismo recipiente y se añaden 472 gr. de sulfato amónico para obtener una saturación del 95%. Se deja 2 horas en agitación a 4°C.

\* Transcurridas las 2 horas se vuelve a centrifugar a 25.000 xg durante 30 minutos.

\* Los pellets, que contienen la calmodulina, se resuspenden en un volumen inferior a 100 ml de 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  y se coloca en un saco de dialisis (1000 - 3500 peso molecular) y se dializa frente a 5 l. de 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  durante unas 10 horas aproximadamente.

\* Después de este tiempo se cambia la solución de diálisis por otra que contiene únicamente 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y se deja 4 horas a 4°C.

\* Se recoge el dializado y se liofiliza.

\* Mientras la muestra se esta liofilizando, se prepara una columna (2,5 x 15 cm) de phenyl-sepharosa que se equilibra con el siguiente tampón:

50 mM Hepes pH = 7,1 a 20°C.

0,1 mM  $\text{CaCl}_2$

1 mM Mercaptoetanol

\* El liofilizado se disuelve con el menor volumen posible (20 ml), en 50 mM Hepes pH = 7,1; 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$  y 1 mM Mercaptoetanol. Una vez disuelta la muestra, se le añaden 50  $\mu\text{l}$  de una solución 500 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  para neutralizar las proteínas pues estas están cargadas negativamente.

\* Seguidamente la muestra se coloca en la columna mediante una bomba peristáltica. Es muy importante que la carga de la columna se realice lentamente.

\* Se esperan aproximadamente 30 minutos antes de empezar a recoger las fracciones. Una vez ha salido el primer pico de proteínas se cambia el tampón por otro de mayor concentración de sal:

- 50 mM Hepes pH 7,1 a 20°C.

- 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$

- 500 mM NaCl

- 1 mM Mercaptoetanol

\* A continuación se recogen fracciones de muestra hasta la elución del segundo pico de proteínas extraído a elevadas de concentraciones de NaCl.

\* Cuando la concentración de proteínas eluidas es prácticamente nula, se cambia el tampón de la columna por otro que contiene 1 mM EGTA:

- 500 mM Hepes pH 7,1
- 1 mM EGTA
- 1 mM Mercaptoetanol

\* Como la interacción de la calmodulina con la phenyl-sepharosa es dependiente de calcio, el EGTA que lleva dicho tampón procederá a la liberación de calmodulina y consecuentemente a su elución.

\* Una vez eluido el pico de calmodulina, se toman muestras de cada una de las fracciones y se realiza una electroforesis en un gel de SDS poliamilamida al 12% como control.

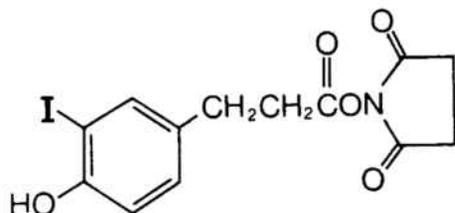
\* La calmodulina purificada se dializa frente al agua y se guarda liofilizada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La muestra es estable durante meses.

### 3.3.9. MARCAJE DE CALMODULINA CON $I^{125}$ .

Con la finalidad de identificar los receptores de calmodulina en las subfracciones del núcleo de los hepatocitos mediante técnicas de "overlay", en primer lugar se debe de marcar la calmodulina con  $I^{125}$ .

El método que se ha utilizado es el descrito por Bolton and Hunter en 1973.

Este método está basado en la transferencia de  $I^{125}$  conjugado con un derivado ester del ácido propiónico, altamente reactivo en medio acuoso, a los grupos amino de la proteína.



derivado ester del  
ácido propiónico

El procedimiento seguido para marcar la calmodulina es el siguiente:

\* Antes del proceso de iodación de la proteína, el solvente del ester marcado se evapora a 25°C mediante una suave corriente de  $N_2$ . Este proceso se realiza con bajo una campana extractora de gases.

\* A continuación 5 µg de proteína diluida en 10 µl de tampón 0,1 M Borato pH = 8,5, se añaden al vial que contiene el reactivo marcado una vez evaporado el solvente. La mezcla se incuba durante 15 minutos a 0°C.

\* El ester iodado se hidroliza rápidamente en medio acuoso. La vida media de este compuesto es de 9 minutos aproximadamente en 0,1 M Borato pH = 8,5. De 3-4 moles de dicho ester reaccionan por 1 mol de proteína.

\* La reacción se para añadiendo 500  $\mu$ l de tampón:

0,2 M Glicina

0.1 M Borato a pH = 8,5

Y se esperan 5 minutos a 0°C.

\* La separación de la proteína marcada con  $I^{125}$  del resto de productos de la reacción, conjugados de glicina y 3 (-4 hidroxifenil) propiónico, se realiza por cromatografía de gel filtración, utilizando un resina Sephadex G-25 (grano fino).

\* Para minimizar la pérdida de proteína marcada, la columna de Sephadex G-25 se equilibra y se eluye posteriormente con:

0,05 M Tampón fosfato pH = 7,5

0,25% (P/V) gelatina

\* La proteína marcada se guarda congelada en pequeñas aliquotas a -40°C.

### 3.3.10 METODO PARA LA IDENTIFICACION DE RECEPTORES DE LA CALMODULINA

La identificación de los receptores de calmodulina se ha realizado de acuerdo con el método descrito por O. Bachs y E. Carafoli (1987).

El procedimiento es el siguiente:

\* En primer lugar se prepara un gel en gradiente del 5% al 15% de SDS poliacrilamida y se hace una electroforesis de la muestra tal como se ha descrito en el apartado 3.3.6.

\* Una vez finalizada la electroforesis, se corta el gel en 2 partes, una parte destinada para hacer una incubación con  $^{125}\text{I}$ -Calmodulina +  $\text{Ca}^{++}$  y la otra para una incubación con  $^{125}\text{I}$  Calmodulina + EGTA.

\* A continuación se cortan 2 trozos de papel de filtro Whatman nº3 MM y 2 trozos de papel de nitrocelulosa de igual tamaño que el gel.

\* Tanto el papel de filtro como el papel de nitrocelulosa se mojan con el siguiente tampón de transferencia:

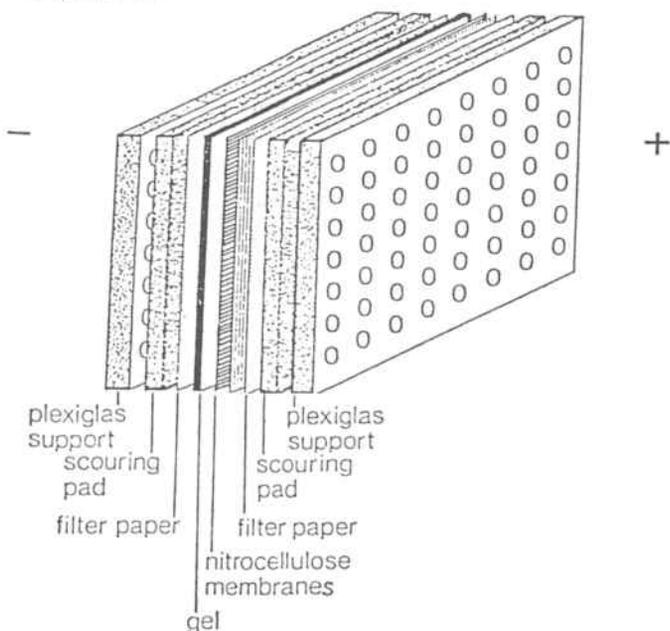
0,025 M Tris pH = 8,3

0,192 M Glicina

20% metanol (v/v)

0,02% SDS

\* Seguidamente se colocan los 2 geles sobre uno de los trozos de papel de filtro, encima de cada uno de los geles se ponen los 2 trozos de papel de nitrocelulosa, finalmente y encima de dicho papel se coloca el otro trozo de papel de filtro, quedando el gel empaquetado de acuerdo con el siguiente esquema:



\* Es muy importante que no queden burbujas de aire atrapadas entre el gel y el papel de nitrocelulosa.

\* Se introduce todo este conjunto en el interior de la cubeta de "electroblotting", de manera que el papel de nitrocelulosa está frente al ánodo (+) y el gel frente al cátodo (-).

\* El tiempo de transferencia adecuado es de 2 horas a 4°C a 60 V.

\* Finalizado el tiempo de transferencia los papeles de nitrocelulosa se dejan toda la noche incubándose a 37°C con leche en polvo al 2% en PBS (tampón fosfato 10 mM, ClNa 150 mM a pH = 7,4) con el fin de saturar todas las uniones inespecíficas de la Calmodulina- $I^{125}$  con las proteínas.

\* Paralelamente el gel se tiñe con una solución de Coomassie blue.

\* Después de la saturación se lavan los papeles de nitrocelulosa con PBS y a continuación se decanta el tampón. Seguidamente se añaden sobre uno de los papeles de nitrocelulosa 10 ml de:

0,1% BSA en PBS

0,5 mM  $Ca^{++}$

80  $\mu$ l  $I^{125}$  Calmodulina

Y sobre el otro papel de nitrocelulosa se añaden 10 ml de:

0,1% BSA en PBS

2 mM EGTA

80  $\mu$ l  $I^{125}$  Calmodulina

- \* Se dejan incubado durante 4 horas a temperatura ambiente.
- \* Los papeles de nitrocelulosa se lavan dos veces con PBS/Ca<sup>++</sup> o PBS/EGTA, durante 15 minutos a 25°C. cada vez.
- \* Una vez lavados los papeles de nitrocelulosa, estos se dejan secar y se exponen a una película Kodak X-Omat-AR.

### 3.4. CALCULO DEL NIVEL DE SIGNIFICACION ESTADISTICA

Con el objetivo de determinar el nivel de significación de las diferencias existentes entre los resultados obtenidos a diferentes horas de la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial respecto a los obtenidos en ratas control, se ha utilizado el test de la T de student.

#### 4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA POSIBLE RELACION ENTRE EL AMPc Y LA  
SINTESIS DE CALMODULINA DURANTE LA REGENERACION  
HEPATICA

4.1.1. EFECTO DE EL D-L PROPANLOL SOBRE EL CONTENIDO DE  
AMP CICLICO INTRACELULAR.

Tal y como se ha mencionado en la introducción, la reproducción celular es uno de los numerosos procesos regulados por el calcio y el AMP cíclico (Whitfield et al., 1985).

El mecanismo de acción del AMPc se realiza a través de la activación de protein quinasas dependientes de AMPc, mientras que, el del calcio es a través de su unión con proteínas receptoras, de entre las cuales la calmodulina es el receptor más ampliamente distribuido en las células eucariotas no musculares.

Durante las primeras horas de la regeneración hepática después de practicar una hepatectomía parcial, se observa un aumento de la concentración intracelular de AMPc (Rixon y Whitfield, 1985), así como un incremento de calmodulina citosólica a partir de las 6 horas postintervención quirúrgica. Este aumento de calmodulina es producido por un incremento de la síntesis de esta proteína (Pujol et al., 1987; Piñol et al., en prensa).

No obstante, se desconoce hasta el momento que factor o factores podrían estar implicados en el desencadenamiento de la síntesis de calmodulina durante las primeras horas de la regeneración hepática. Un posible factor podría ser el

incremento de AMP cíclico observado previamente al incremento de calmodulina.

Con este objetivo se ha estudiado el efecto de el d-1 propanolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico e inhibidor de la síntesis de AMP cíclico) sobre el contenido de calmodulina citosólica a las 8 horas después de la hepatectomía parcial.

En primer lugar se ha comprobado que la dosis de d-1 propanolol utilizada efectivamente es capaz de producir una disminución de los niveles intracelulares de AMP cíclico a las 4 horas después de la intervención quirúrgica, momento en que el contenido de AMPc es mas elevado.

Los resultados de la Tabla I y Figura 4.1. demuestran que una inyección de d-1 propanolol (20 mg/Kg) produce una disminución claramente significativa del contenido de AMP cíclico.

	<u>pmoles/AMPc/mg hígado</u>	<u>%</u>	<u>n</u>	<u>p</u>
control (no operadas)	0,47 $\pm$ 0,09	100	11	$\leq 0,001$
4 horas regeneración	1,17 $\pm$ 0,08	245	5	-
4 horas + d-1 prop.	0,59 $\pm$ 0,03	125	3	$\leq 0,001$

Tabla I: Efecto del d-1 propanolol sobre el contenido de AMP cíclico intracelular: El d-1 propanolol (20 mg/kg) se ha inyectado 1 hora después de la hepatectomía parcial. (n) nº de experimentos; (p) nivel de significación estadística respecto a los valores regenerantes 4 horas, calculado por el test de la "t" de Student. Cada valor representa la media  $\pm$  D.S.

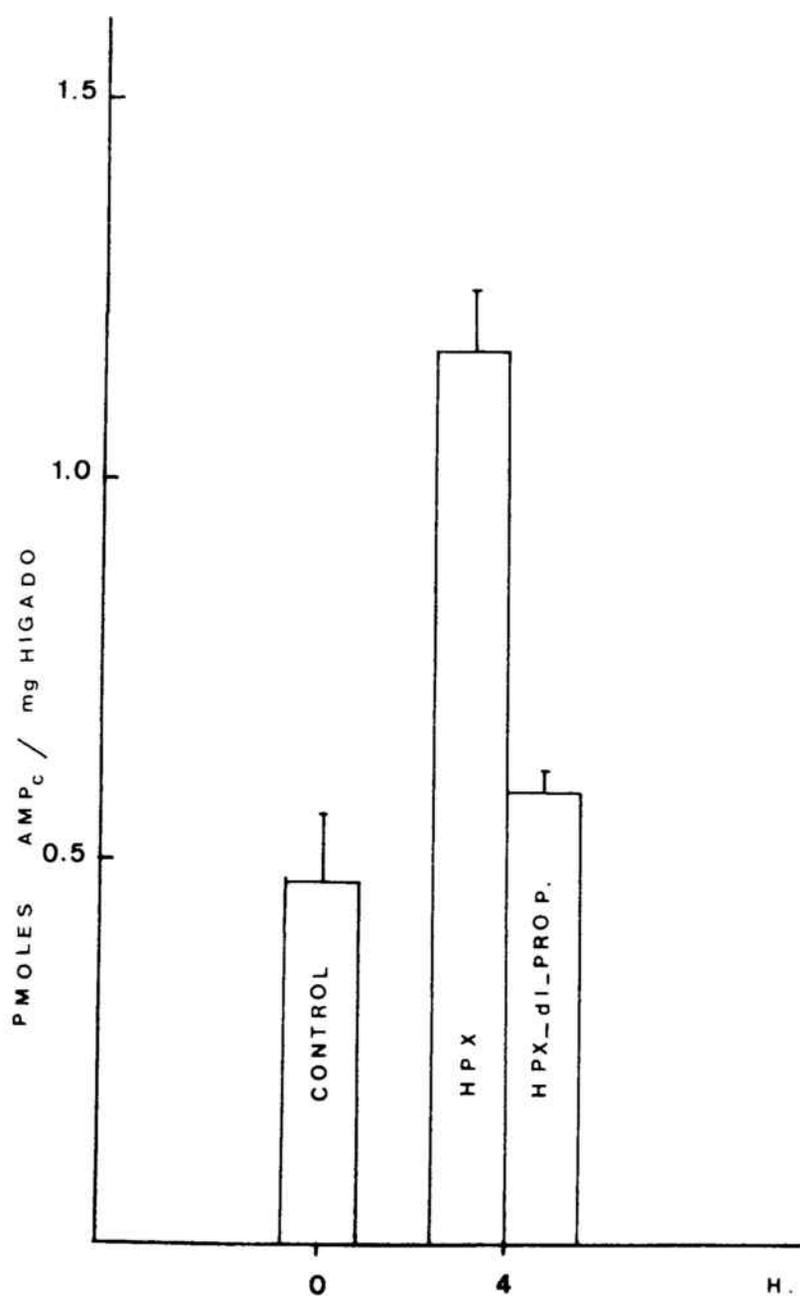


Figura 4.1.: Efecto del d-1 propanolol sobre el contenido de AMP<sub>c</sub> intracelular. Representación gráfica de los resultados mostrados en la Tabla I. (HPX = ratas regenerantes).

#### 4.1.2. EFECTO DEL D-L-PROPANOLOL SOBRE EL CONTENIDO DE CALMODULINA EN EL CITOSOL.

Una vez se ha visto que la dosis de d-l propanolol utilizada inhibe el primer incremento de AMPc observado entre las 2-4 horas después de una hepatectomía parcial, se ha determinado la concentración de calmodulina en ratas regenerantes de 8 horas y tratadas con d-l propanolol.

Tal y como se demuestra en la Tabla II y Fig. 4.2. el d-l propanolol también produce una disminución del contenido de calmodulina en las ratas regenerantes, siendo los niveles de calmodulina en este grupo de animales similares a los observados en ratas control.

---

	<u>µgr CaM/mg prot.</u>	<u>%</u>	<u>n</u>	<u>p</u>
control (no oper)	0,74 ± 0,1	100	3	≤ 0,02
8 h. regeneración	1,4 ± 0,2	189	3	-
8 h. " + d-l prop.	0,83 ± 0,1	112	3	≤ 0,02

---

Tabla II: Efecto del d-l propanolol sobre el contenido de calmodulina citosólica durante la regeneración hepática: El d-l propanolol (20 mg/kg) se ha inyectado vía intraperitoneal 1 hora después de la hepatectomía parcial. (n) nº de experimentos; (p) nivel de significación estadística respecto a los valores regenerantes. Cada valor representa la media ± D.S.

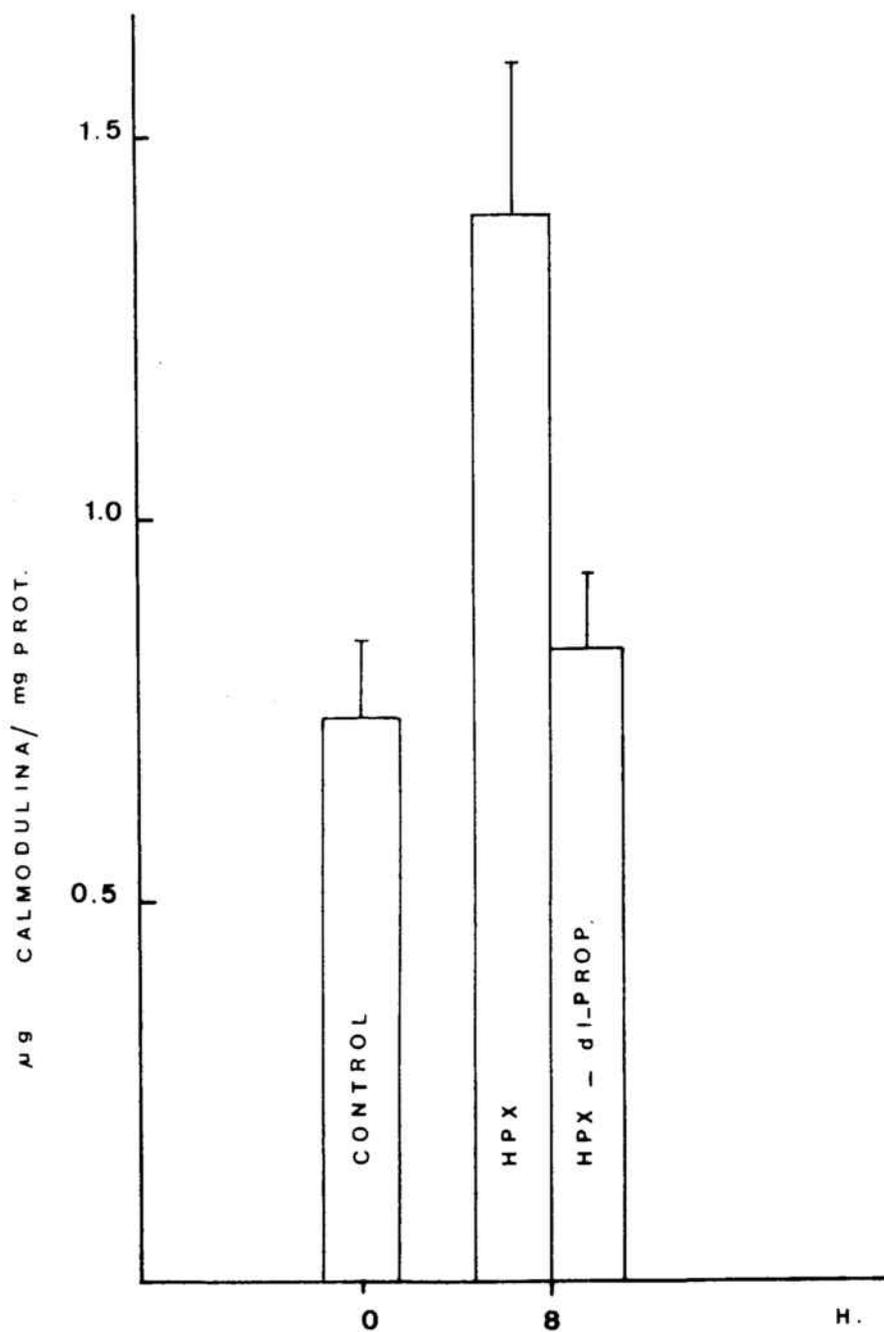


Figura 4.2.: Efecto de d-1 propanolol sobre el contenido citosólico de calmodulina. Representación gráfica de los resultados mostrados en la tabla II. (HPX = ratas regenerantes).

Con la finalidad de descartar si este inhibidor interfiere en el ensayo de la determinación de calmodulina, se han realizado experimentos adicionales con muestras de citosol de ratas control en presencia de diferentes concentraciones de d-l propanolol en el medio de incubación (Tabla III)

<u>d-l propanolol</u>		<u>µg CaM / mg prot</u>	<u>n</u>
0	µM	0,68 ± 0,2	3
0,5	µM	0,80 ± 0,3	3
5	µM	0,82 ± 0,3	3
100	µM	0,97 ± 0,3	3

Tabla III: Efecto del d-l propanolol sobre el ensayo para la determinación de la calmodulina. El ensayo se ha realizado añadiendo al medio de incubación diferentes concentraciones de d-l propanolol. Cada valor representa la media ± D.S. de 3 experimentos.

Tal y como puede observarse en la Tabla III el d-l propanolol interfiere el ensayo para la determinación de calmodulina ya que en presencia de esta droga se observan valores de calmodulina algo más altos de los que realmente se encuentran en la muestra.

Dado a que los resultados obtenidos en las ratas tratadas con esta droga, indican que se ha producido una disminución del contenido de calmodulina, esta interferencia observada no invalida los resultados, pues estos tendrían que ser probablemente más bajos que los realmente observados.

Los resultados descritos en este apartado sugieren que el primer incremento de AMPc observado después de practicar una hepatectomía parcial, podría ser el factor desencadenante de la síntesis de calmodulina en el citosol durante las primeras horas de la regeneración hepática.

Experimentos complementarios realizados en nuestro laboratorio indican que cuando se administra a ratas control una solución de AMPc (5  $\mu$ Moles / 10 ml), vía endovenosa, se produce también un incremento de la concentración citosólica de calmodulina similar al observado en ratas regenerantes. Además esta relación entre el aumento de AMPc y el de calmodulina es extensible a otro sistema de activación de la proliferación hepatocelular como el que se produce después de administrar endovenosamente una solución formada por triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina (Solución T.A.G.H.).

4.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA  
DEPENDIENTE DE AMPc DURANTE LA PROLIFERACION  
HEPATOCELULAR.

4.2.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA  
DEPENDIENTE DE AMP CICLICO EN EL CITOSOL DURANTE LA  
REGENERACION HEPATICA DESPUES DE UNA HEPATECTOMIA PARCIAL.

Las protein quinasas dependientes de AMPc están formadas por 2 tipos de holoenzimas, llamadas Tipo I y Tipo II según el orden de elución a través de una columna de DEAE-Celulosa (Corbin J.D. et al., 1975). Ambos holoenzimas son proteínas tetraméricas formadas por una subunidad reguladora dimerica (R) y dos subunidades catalíticas monoméricas (C) (Flockhart D.A. y Corbin J.D., 1982; Hope J. y Wagner, K.G. 1979). Cada subunidad reguladora presenta dos lugares de unión para el AMPc con diferentes afinidades para este nucleótido (Døskeland, S.O., 1978; Øgreid, D. y Døskeland S.O. 1980). Las subunidades reguladoras son diferentes para los dos tipos de holoenzimas, el peso molecular de cada monómero es de 49 kd la RI y de 54-56 kd la RII. Unicamente la subunidad RII de estas protein quinasas es autofosforilable (Flockhart D.A., y Corbin J.D. 1982; Hoppe, J. 1985). La activación para ambas protein quinasas por el AMPc se produce de acuerdo al siguiente esquema:



Las subunidades catalíticas libres transfieren el grupo fosfato terminal del ATP a proteínas aceptoras de fosfato, las cuales al fosforilarse modifican su función (Corbin, J.D. et al 1978). La subunidad catalítica tiene un peso molecular de 39-42 kd siendo idéntica para los 2 tipos de holoenzimas.

Entre las múltiples funciones que desempeñan las protein quinasas es la de participar en la regulación de la proliferación celular (Boynton, A.L. y Leffert, H.L., 1985) así como en el control de procesos de transformación neoplásica (Cooper y Hunter, 1983; Butley et al., 1985). Por ejemplo se sabe que la unión del EGF a su receptor induce la activación de tirosin quinasas (Hunter y Sefton, 1982). Durante la regeneración hepática, ciertas protein quinasas independientes de AMPc de la membrana plasmática, están incrementadas al final de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (MacManus y Whitfield, 1981). Además se conoce que durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática se produce un incremento de la actividad protein quinasa del tipo I y II dependiente de AMPc en el citosol. Este incremento de actividad quinasa coincide en tiempo con el aumento intracelular de AMPc observado entre 12-14 horas después de una parcial. (Sikoska et al, 1983).

Este aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol también ha sido detectado por nosotros después de practicar una hepatecomía parcial. Los resultados obtenidos muestran que la actividad protein quinasa dependiente de AMPc empieza a incrementar a partir

de las 14 horas después de realizar una hepatectomía parcial. Este incremento es máximo a las 16 horas de la regeneración hepática. Posteriormente la actividad empieza a disminuir hasta que a las 20 horas dicha actividad es similar a la observada en ratas control (Tabla IV).

<u>Tiempo post- hepatectomía parcial</u>	<u>Actividad específica</u>	<u>n</u>	<u>P</u>
control (no oper)	62,0 ± 3	10	-
8 horas	50,0 ± 5	3	n.s.
14 horas	92,2 ± 8	3	≤0,01
16 horas	134,5 ± 9	11	≤0,001
18 horas	80,0 ± 6	3	≤0,01
20 horas	52,4 ± 8	3	n.s.

Tabla IV- Actividad protein quinasa dependiente de AMPc durante la regeneración hepática: La actividad específica viene expresada en pmoles ( $\mu\text{mol}$ ) ATP incorporado / mg. prot. / min. Cada valor representa la media ± SEM. (n)= nº de experimentos; P = nivel de significación estadística calculado por el test de la "t" de Student.

Recientemente se ha descrito que la disminución de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc observado a partir de las 18 horas posthepatectomía parcial se debe a la translocación de la subunidad catalítica de estas protein quinasas al núcleo; en donde es responsable de la fosforilación de diferentes subespecies de la histona H1, fenómeno relacionado con la descondensación de la cromatina (Lacks et al, 1981; Ohba et al, 1984).

#### 4.2.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc EN EL CITOSOL DESPUES DE LA INFUSION ENDOVENOSA DE LA SOLUCION T.A.G.H.

Después de la administración endovenosa de la solución T.A.G.H. (formada por triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina) se produce en el hígado una serie de acontecimientos moleculares que culminan con el inicio de la síntesis del ADN y posterior duplicación celular. Sin embargo la respuesta proliferativa tras la administración de la solución T.A.G.H. es mucho más atenuada comparada con la que se produce después de una hepatectomía parcial (Short et al 1972).

Por otra parte estos mismos autores han descrito que muchos de los cambios moleculares y morfológicos producidos después de la administración de dicha solución son comunes a los observados durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática: Acumulación de lípidos



intracelulares, el aumento de ribosomas (Short et al., 1972). El aumento de la concentración de AMP cíclico en el citosol (MacManus, J.P. et al., 1972) así como la desialización de glicoproteínas y gangliosidos de la membrana plasmática (Coll et al., 1987).

En este sentido se ha estudiado si el incremento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol observado posthepatectomía parcial, es también un fenómeno común y asociado a la activación de la proliferación hepatocelular después de administrar la solución T.A.G.H.

Los resultados que se muestran en la figura 4.3. y Tabla V, indican que durante el período prerreplicativo tras la administración de la solución T.A.G.H., no se produce ningún incremento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, si no que por el contrario se observa una pequeña y gradual disminución de esta actividad quinasa a partir de las 16 horas después de la infusión de la solución T.A.G.H..

	<u>Actividad</u> <u>específica</u>	<u>n</u>	<u>p</u>
control	62,0 ± 9	10	-
salina	58,1 ± 9	8	-
8 horas	71,0 ± 11	3	n.s.
12 horas	51,5 ± 7	3	n.s.
16 horas	65,2 ± 7	3	n.s.
20 horas	36,8 ± 5	3	≤ 0,01
24 horas	42,74 ± 11	3	≤ 0,05

Tabla V: Actividad protein quinasa dependiente de AMPc después de la administración de la solución T.A.G.H. La actividad viene expresada en pmoles (τ <sup>32</sup>P) ATP incorporado/mg de proteína/min. Cada valor representa la media ± D.S. (n) = n° de experimentos. P = nivel de significación estadística calculado por el test de la "t" de Student.

Por tanto, ello sugiere que los niveles de estas enzimas en el citosol son probablemente suficientes para desencadenar la débil respuesta proliferativa.

Además, al contrario de lo que ocurre en la regeneración hepática, Short y colaboradores observaron que durante la fase prerreplicativa después de la administración de la solución T.A.G.H. no se produce un incremento de la síntesis de proteínas en el hígado de ratas. Ello concordaría con los resultados obtenidos en el apartado 4.3. en que se demuestra que el incremento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc después de una hepatectomía parcial se produce por un aumento de la síntesis de nuevas moléculas de esta enzima (Pujol et al., 1987).

Por otra parte, como se puede apreciar en la Figura 4.3. y Tabla V, a partir de las 16 horas se produce un ligero descenso de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. Ello sugeriría, al igual que en la regeneración hepática, la translocación de la subunidad catalítica al núcleo y allí desencadenar algún proceso relacionado con la activación de la síntesis de ADN.

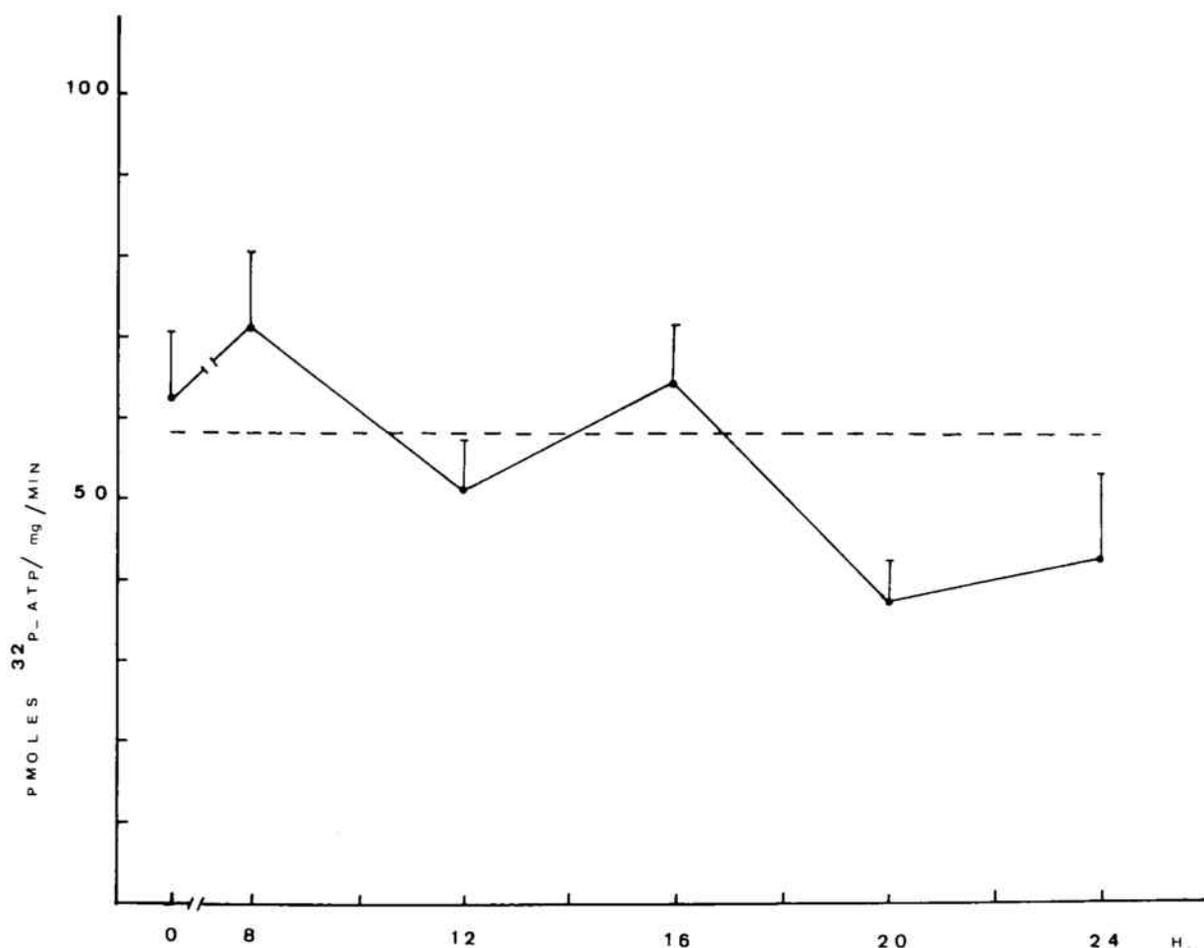


Figura 4.3.: Actividad protein quinasa dependiente de AMPc después de la administración de la solución TAGH. Representación gráfica de los resultados mostrados en la tabla V.

### 4.3. ESTUDIO DE LA NUEVA SINTESIS DE PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO DESPUES DE UNA HEPATECTOMIA PARCIAL.

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática se observa un incremento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc a las 14-16 horas después de una hepatectomía parcial (Tabla IV). Este aumento de actividad puede ser debido a 2 causas diferentes:

- Aumento de la afinidad del enzima por el sustrato.

- Aumento del nº de moléculas de enzima, que a su vez puede deberse bien a incremento de la síntesis de nuevas moléculas o bien a una translocación de esta enzima desde otros compartimentos celulares.

Con la finalidad de averiguar cual es el origen de este aumento de actividad quinasa, se han realizado dos clases de estudios:

- Estudios cinéticos en función de diferentes concentraciones de AMPc, en muestras de citosol de rata control y regenerante 16 horas.

- Estudiar el efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc.

#### 4.3.1. ESTUDIO CINETICO DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc.

Con el objetivo de estudiar si el aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol se debe a un aumento del n° de moléculas o a una variación de la afinidad del enzima por el sustrato se ha determinado la actividad protein quinasa en muestras de citosol de rata control y de rata regenerante 16 horas posthepatectomía parcial a diferentes concentraciones de AMPc.

En las 2 cinéticas se han mantenido constante la concentración de sustrato (100 µgr de Histonas), y la de ATP (20 µM (γ-<sup>32</sup>P) ATP) así como la cantidad de proteína citosólica (20 µgr), variando única y exclusivamente la concentración de AMPc. Se ha trabajado con 7 concentraciones diferentes de AMPc que oscilan entre 0,1 µM y 5 µM.

Los resultados obtenidos de la determinación de los parámetros cinéticos indican que a las 16 horas después de la hepatectomía parcial la velocidad máxima es de 111,1 pmoles de <sup>32</sup>P incorporado/mgr/min. mientras que la Vmax en las muestras de citosol control es de 53 pmoles <sup>32</sup>P incorporado/mg/min. El parámetro Vmax a las 16 horas representa un incremento del doble respecto al valor control. La constante aparente de afinidad (Km) para el AMPc se mantiene similar en ambos casos. La Km de muestras control de 0,14 µM y de 0,18 µM para las muestras regenerantes (Figuras 4.4. y 4.5.).

Debido a que el valor de las  $K_m$  es prácticamente idéntico en ambas cinéticas, estos resultados indican que el incremento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc es producido por un aumento del nº de moléculas, sugiriendo que puede ser debido a un incremento de la síntesis de nuevas enzimas o a una translocación de este enzima desde otros compartimentos celulares.

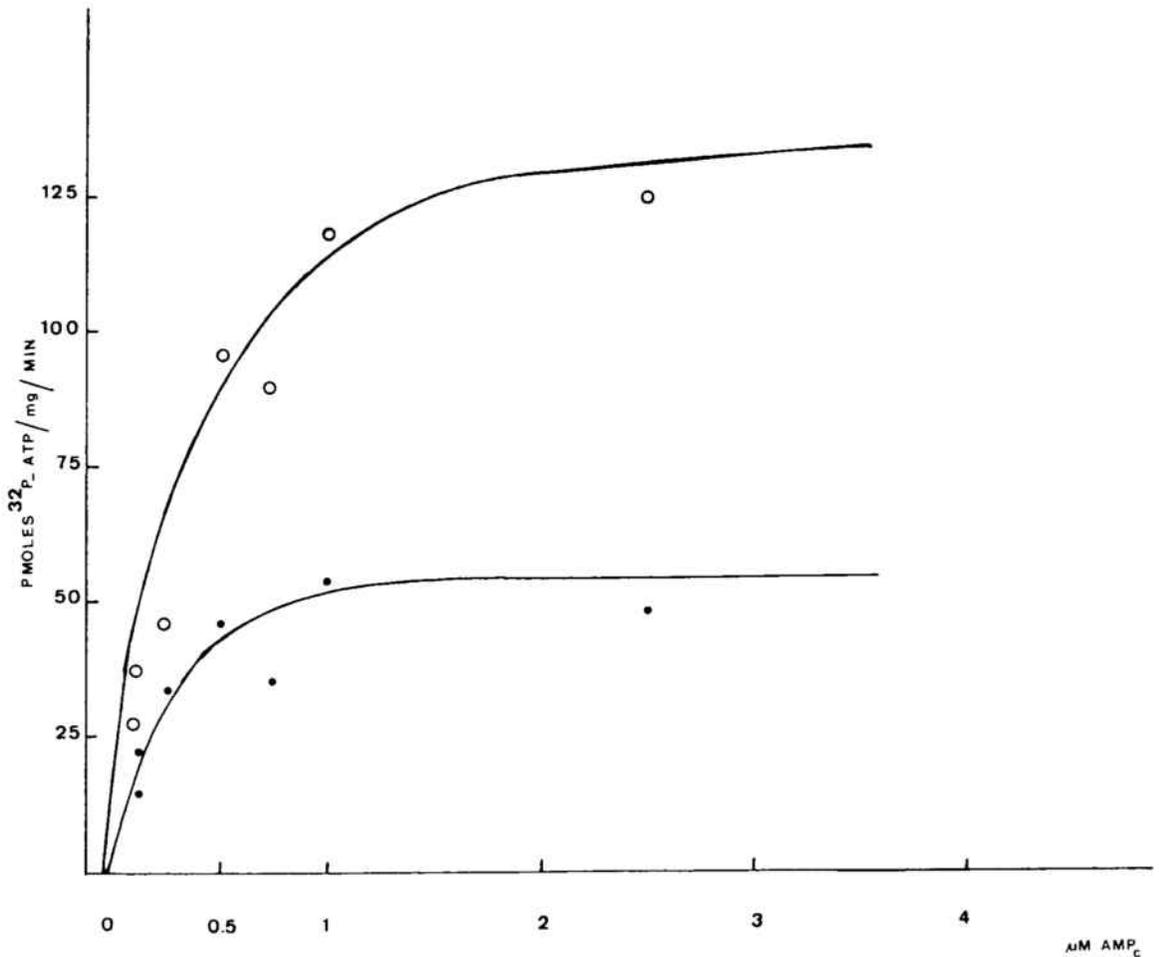


Figura 4.4.: Actividad protein quinasa dependiente de AMPc en ratas control y regenerantes de 16 horas, en función de diferentes concentraciones de AMPc. (●) ratas control, (○) ratas regenerantes de 16 horas. Cada valor representa la media de más de tres muestras.

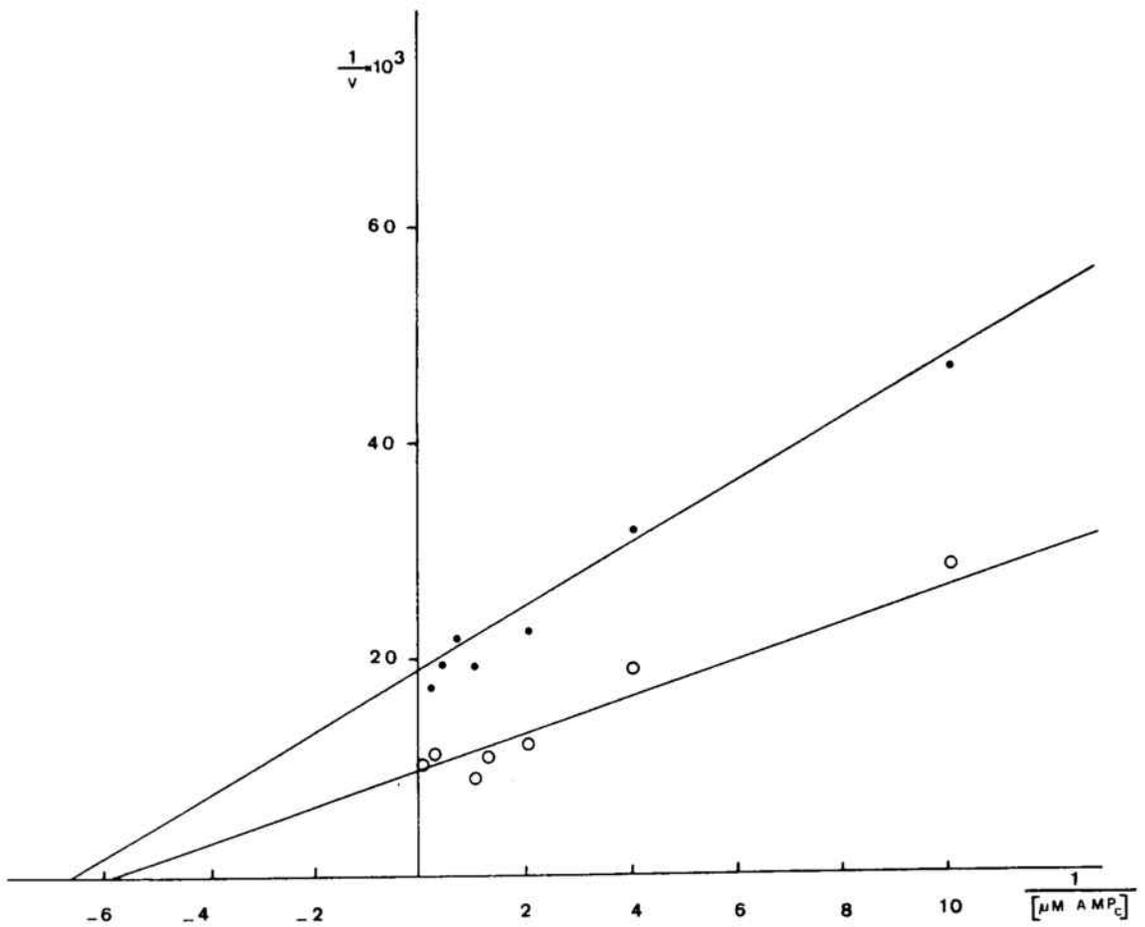


Figura 4.5: Representación de Lineweaver-Buck de los resultados mostrados en la Figura 4.4. (●) muestras control. (○) muestras de 16 horas regenerantes.

#### 4.3.2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS PROTEICA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc DURANTE LA REGENERACION HEPATICA.

Para demostrar definitivamente la posibilidad de que la causa del incremento de actividad protein quinasa a las 16 horas posthepatectomía parcial es debido a un aumento de la síntesis de nuevas moléculas se han llevado a cabo experimentos inyectando inhibidores de la transcripción y traducción en ratas control y hepatectomizadas.

Tanto la actinomicina D (1mg/kg) como la cicloheximida (0,66 mg/kg) se han inyectado 4 horas antes del sacrificio de los animales.

Como se demuestra en la Tabla VI y Figura 4.6, cuando se inyecta actinomicina D y cicloheximida en ratas control, la actividad protein quinasa dependiente de AMPc prácticamente no se altera. Sin embargo, cuando estas drogas se inyectan a ratas hepatectomizadas, esta actividad quinasa determinada a las 16 horas después de la intervención quirúrgica se encuentra muy disminuida respecto a los valores observados en ratas regenerantes 16 horas.

	<u>actividad específica</u>	<u>n</u>
Control (no operadas)	62 ± 7	7
control + Actinomicina D	53 ± 8	3
control + Cicloheximida	67 ± 10	3
16 H. regenerantes	133 ± 14	7
16 H. reg. + Actinomicina D	38 ± 18	4
16 H. reg. + Cicloheximida	35 ± 16	4

Tabla VI: Efecto de la Actinomicina D y Cicloheximida sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. La actinomicina D (1mg/Kg) y cicloheximida (0,66 mg/Kg) se han inyectado via endovenosa 4 horas antes del sacrificio del animal. La actividad específica viene expresada en pmoles de <sup>32</sup>P incorporado/mg prot/min. Cada valor representa la media ± SEM. (n) = nº de experimentos.

Así pues, estos resultados indican que las ratas regenerantes presentan una tasa de síntesis de estas enzimas mucho más elevada que en las ratas control. Concluyendo finalmente que la ola de actividad de protein

quinasas observada durante la regeneración hepática, es producida por un aumento de la síntesis de esta enzima y no por una translocación de moléculas desde otros compartimentos celulares ni por un cambio de afinidad del enzima.

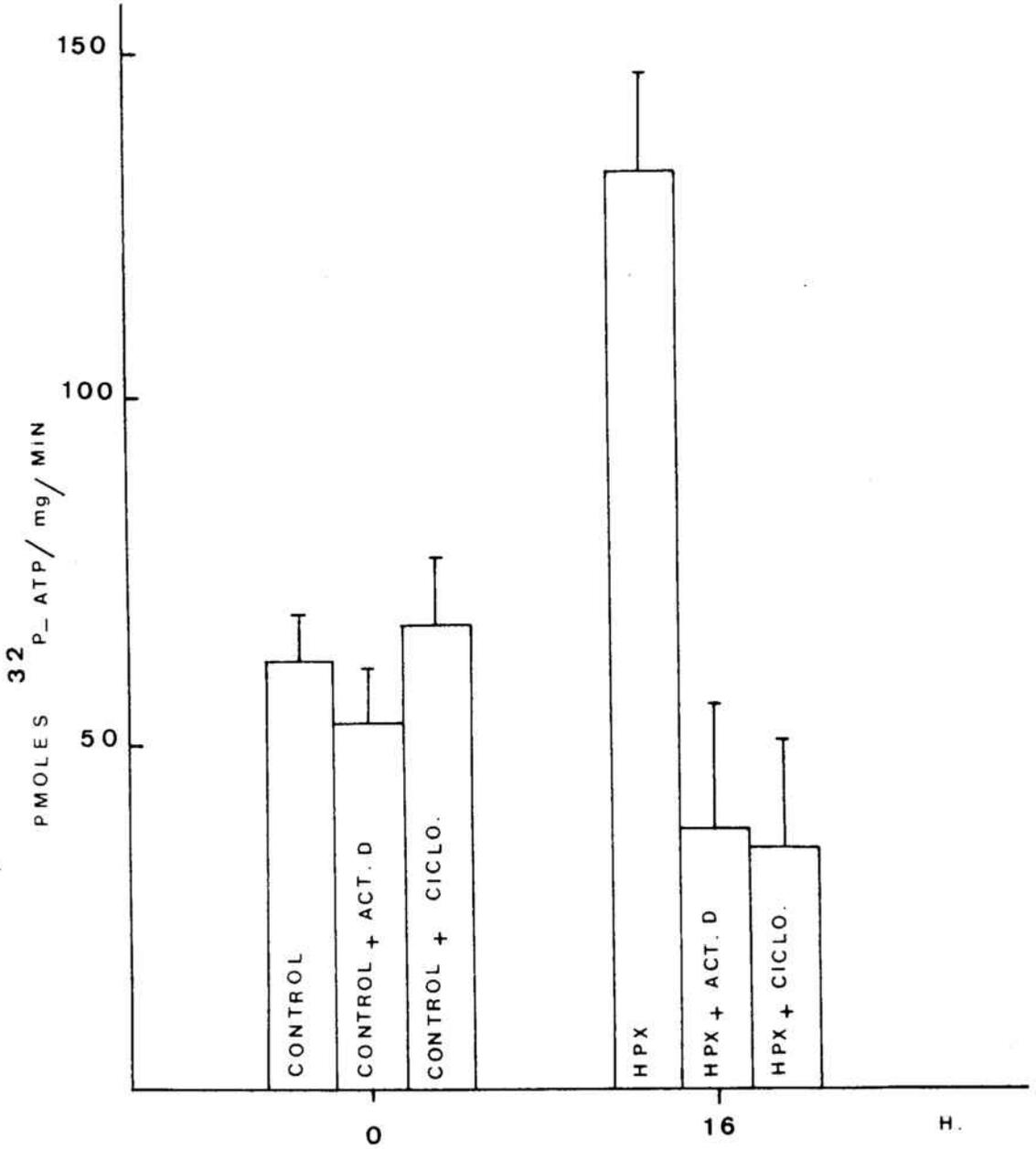


Figura 4.6: Efecto de los inhibidores de la síntesis proteica sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol. Representación gráfica de los resultados mostrados en la Tabla VI.

#### 4.4. ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LA CALMODULINA, EL CONTENIDO DE AMPc Y LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc EN EL CITOSOL DURANTE LA REGENERACION HEPATICA.

Con el objetivo de estudiar si el incremento de calmodulina observado entre las 6-12 horas después de la hepatectomía parcial, está implicado en la regulación de la concentración de AMPc, así como en la regulación de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc acontecimientos observados posteriormente durante la regeneración hepática, se han realizado una serie de experimentos en los cuales se han determinado: a) el contenido de AMPc citosólico y b) la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, en ratas regenerantes e inyectadas con Trifluoperacina (TFP).

Como ya se ha descrito en el apartado 3.1.5. la TFP es una droga que actúa inhibiendo la acción de los complejos  $Ca^{2+}$ -Calmodulina. Esta droga se ha inyectado a una dosis de 60 mg/Kg. vía intraperitoneal, 4 horas después de la hepatectomía parcial.

#### 4.4.1. EFECTO DE LA TRIFLUOPERACINA SOBRE EL CONTENIDO DE AMPc INTRACELULAR DESPUES DE UNA HEPATECTOMIA PARCIAL.

Como se puede observar en la tabla VII y figura 4.7, después de una hepatectomía parcial se produce un segundo incremento de la concentración citosólica de AMPc. Los niveles de AMPc empiezan a aumentar a partir de las 12 horas post parcial. Los valores máximos se alcanzan a las 14 horas después de dicha operación. En este momento los valores son aproximadamente 2 veces más altos que los observados en ratas control ( $P \leq 0,01$ ). Posteriormente la concentración de este nucleótido cíclico empieza a disminuir hasta que a las 20 horas después de la hepatectomía se alcanzan los valores control.

Cuando las ratas hepatectomizadas se las trata con TFP, los niveles de AMPc intracelular a las 14 horas de la regeneración disminuyen un 50% aproximadamente (Tabla VII, Figura 4.7). A pesar de ello, la concentración de este nucleótido cíclico en estos animales es significativamente más elevada respecto a la observada en ratas control ( $p \leq 0.01$ ).

	<u>pmoles AMPc/mg hígado</u>		<u>pmoles AMPc/mg hígado</u>	
	<u>-TFP</u>	<u>(n)</u>	<u>+TFP</u>	<u>(n)</u>
control	0.46±0.02	10	-	-
12 horas	0.66±0.09	4	0.51±0.07	4
14 horas	0.90±0.04	4	0.65±0.04	5
16 horas	0.68±0.09	4	0.62±0.07	5
20 horas	0.46±0.02	3	0.38±0.03	3

Tabla VII. Efecto de la trifluoperacina sobre la concentración de AMPc durante la regeneración hepática. La TFP (60 mg/Kg) se ha inyectado vía intraperitoneal 4 horas después de la hepatectomía parcial. Cada valor representa la media ± ESM. (n) = n<sub>o</sub> experimentos.

Estos resultados sugieren que el incremento de AMPc observado entre 12-16 horas después de la hepatectomía parcial podría estar originado por la activación de 2 tipos diferentes de adenil ciclasas, una independiente de los complejos Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina y otra dependiente de estos complejos. De hecho se sabe que los complejos Ca<sup>2+</sup>-

Calmodulina pueden estimular la actividad de algunas adenilato ciclasa en gran variedad de células y tejidos como, por ejemplo, en el cerebro, en el hígado (Brostrom et al., 1975; Cheung et al., 1975), en la médula adrenal (Le Donne y Coffee 1979), en los nódulos pancreáticos (Sharp et al., 1980) así como en cultivos primarios de células gliales (Ebersolt et al., 1981).

A la vista de estos resultados se puede postular que el aumento de calmodulina en el citosol durante las primeras horas de la regeneración hepática puede ser responsable, al menos parcialmente de la segunda ola de acumulación de AMPc intracelular observada entre las 12-16 horas después de la hepatectomía parcial.

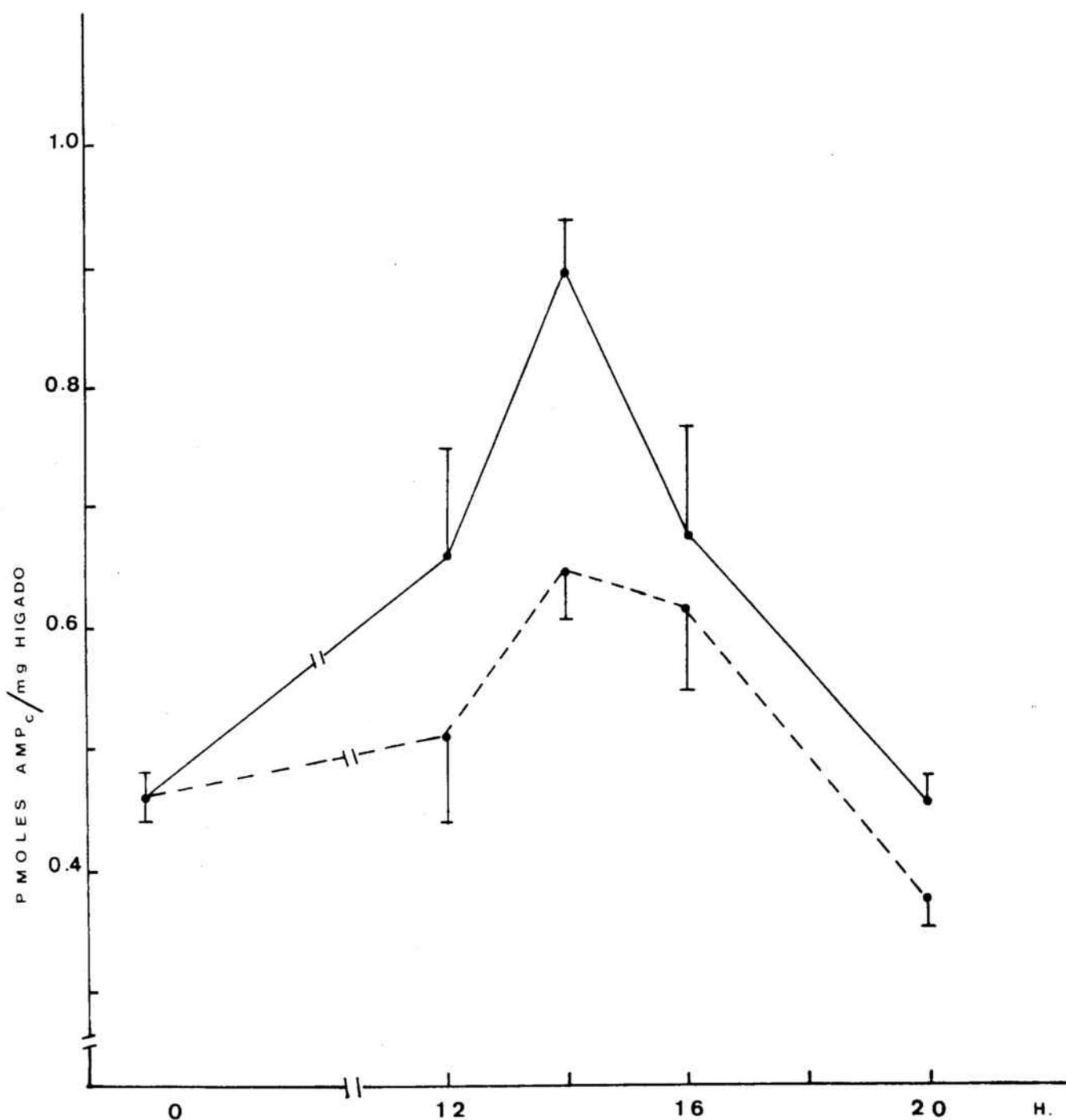


Figura 4.7: Efecto de la TFP sobre la concentración de AMPc intracelular durante la regeneración hepática. Representación gráfica de los resultados presentados en la Tabla VII. (—) ratas no tratadas con TFP. (----) ratas tratadas con TFP a las 4 horas posthepatectomía parcial.

#### 4.4.2. EFECTO DE LA TRIFLUOPERACINA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc EN EL CITOSOL DURANTE LA REGENERACION HEPATICA.

Tal y como indican los resultados obtenidos en la figura 4.8. las ratas hepatectomizadas y tratadas con TFP 4 horas después de la hepatecomía parcial muestran una inhibición claramente significativa de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc entre las 14-20 horas después de la operación.

Estos resultados sugieren en principio que la activación de protein quinasa dependiente de AMPc puede estar relacionada con el aumento previo de calmodulina en el citosol, puesto que la inhibición de la ola de calmodulina produce una inhibición de la actividad protein quinasa.

No obstante, con el objetivo de determinar si la TFP puede inhibir directamente la actividad protein quinasa se ha determinado esta actividad enzimática en muestras de citosol de ratas control (no operadas) en presencia de diferentes concentraciones de TFP en el medio de incubación. Como se observa en la tabla VIII concentraciones de 0.125, 1,25 y 12,5  $\mu$ M de TFP producen una inhibición de un 37%, 45% y 44% respectivamente de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. Los resultados obtenidos en la tabla VIII indicarían que la inhibición de la actividad quinasa observada en las ratas regenerantes y tratadas con TFP podría ser debida a una

acción directa de esta droga sobre el enzima. Por tanto la utilización de TFP no es un método adecuado para averiguar la posible implicación de la calmodulina en el desencadenamiento de la síntesis de protein quinasas dependiente de AMPc.

<u>trifluoperacina</u>	<u>actividad específica</u>	<u>% inhibición</u>
0 $\mu$ M	68 $\pm$ 8	-
0,125 $\mu$ M	43 $\pm$ 6	37
1,25 $\mu$ M	37 $\pm$ 3	45
12,5 $\mu$ M	38 $\pm$ 3	44

Tabla VIII. Efecto de la TFP sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. Esta actividad enzimática se ha determinado en muestras de citosol de ratas no operadas en presencia de diferentes concentraciones de TFP en el medio de incubación. La actividad específica viene expresada en pmoles de  $^{32}$ P ATP incorporado/mg/min. Cada valor representa la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos.

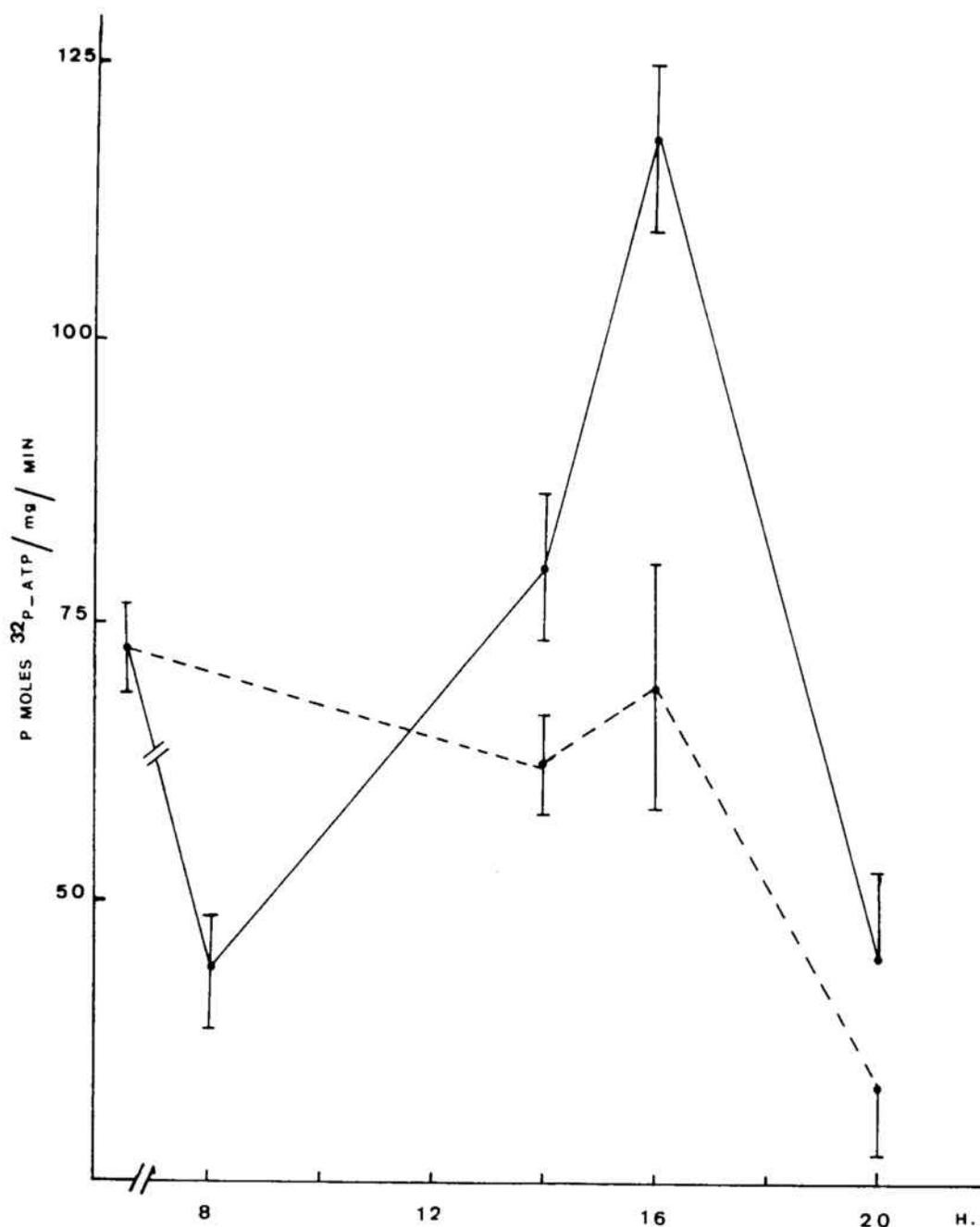


Figura 4.8: Efecto de la TFP sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol, durante la regeneración hepática. La actividad específica viene expresada en pmoles de <sup>32</sup>p incorporado a histonas/mg. de proteína/minuto. (—) ratas regenerantes. (---) ratas regenerantes y tratadas con TFP (60 mg/kg) 4 horas después de la hepatectomía parcial. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos.

4.4.3. ESTUDIO CINÉTICO CON LAS SUBUNIDADES REGULADORA Y CATALÍTICA DE LAS PROTEIN QUINASAS DEPENDIENTES DE AMPc EN PRESENCIA DE TFP.

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado 4.4.2. en que se demuestra que la TFP inhibe la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, se han llevado a cabo estudios cinéticos con las diferentes subunidades de estas protein quinasas con la finalidad de conocer el mecanismo por el cual la TFP inhibe estas enzimas.

Se han realizado tres tipos de estudios cinéticos en presencia y ausencia de TFP (20  $\mu$ M) en el medio de incubación:

a) Estudios cinéticos con la subunidad reguladora de las protein quinasas, purificada a partir de músculo bovino. Para la realización de esta cinética se ha utilizado el método descrito en el apartado 3.3.2.

b) Estudios cinéticos con la subunidad catalítica de las protein quinasas, purificada de corazón de buey. Este estudio se ha realizado de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.3.3. Se han llevado a cabo 2 tipos de estudios cinéticos con la subunidad catalítica:

-En función de diferentes concentraciones de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP

-En función de diferentes concentraciones de sustrato (Histonas).



Cada uno de las 3 cinéticas se ha hecho por triplicado y los valores que describen las curvas representan el valor medio de 3 experimentos.

#### **4.4.3.1. Estudio cinético de la unión de AMPc a la subunidad reguladora de los protein quinasas dependientes de AMPc en presencia de TFP.**

En este estudio cinético se ha trabajado con 10 concentraciones diferentes de AMPc que oscilan entre 2,5 nM y 1,5  $\mu$ M.

Los resultados de la figura 4.9. indican que la presencia de TFP en el medio de incubación produce una pequeña modificación de la unión de AMPc a la subunidad reguladora de las protein quinasas. Los parámetros cinéticos son: En presencia de TFP, la constante aparente de afinidad ( $K_m$ ) es 125 nM y la  $V_{max}$  de 14,0 Co/Cx que corresponde aproximadamente a 18 pmoles de AMPc. En ausencia de esta droga la  $K_m = 110$  nM y la  $V_{max}$  15,5 Co/Cx (20 pmoles).

Cabe destacar que cuando se trabaja a pequeñas concentraciones de AMPc (2,5 - 5nM) la unión de este nucleótido a la subunidad reguladora es muy similar tanto en presencia como en ausencia de TFP, además la unión de este nucleótido a la subunidad reguladora es relativamente baja en ambos casos. Conforme se va aumentando la concentración de AMPc hasta 200 nM la unión se eleva bruscamente. A partir de concentraciones superiores a 200 nM se alcanza la saturación.

Como puede observarse en la figura 4.9, la unión de AMPc a la subunidad reguladora presente una cinética sigmoidea característica de las enzimas que presentan múltiples sitios de fijación de ligandos, es decir, enzimas con fenómenos de cooperatividad positiva. Finalmente podríamos concluir que en presencia de TFP, se produce una disminución de la unión del AMPc a la subunidad reguladora de un 10% aproximadamente.

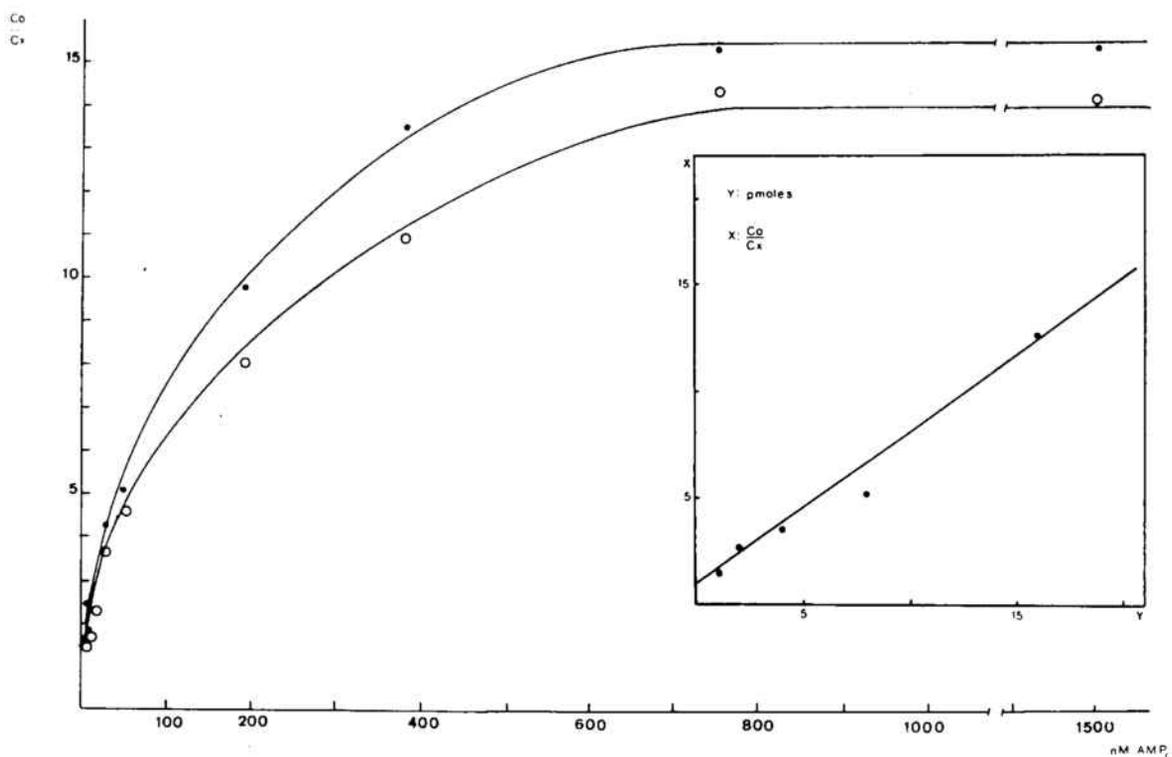


Figura 4.9.: Efecto de la TFP sobre la unión del  $AMP_c$  a la subunidad reguladora de las protein quinasa dependiente de  $AMP_c$ . (●) en ausencia de TFP. (○) en presencia de TFP. Cada valor representa el valor medio de al menos 4 experimentos.

#### 4.4.3.2. Estudio cinético de la subunidad catalítica de las proteínas quinasas dependientes de AMPc en presencia de TFP

Como ya se ha mencionado al principio de este apartado, este estudio cinético se ha realizado de dos modos diferentes: en función de la concentración de  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y en función de la concentración de histonas. En ambas cinéticas se ha trabajado con una concentración de proteína purificada conocida comprendida entre 0,025 - 0,5  $\mu\text{gr}$ .

En el primer caso, la concentración de histonas se ha mantenido constante (100  $\mu\text{gr}$ .) y únicamente se ha variado las concentraciones de  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP. Las concentraciones con las que se ha trabajado oscilan entre 1,25 - 160  $\mu\text{M}$ .

Como se observa en la figura 4.10, en presencia de TFP la  $V_{\text{max}}$  es de 525 p moles de  $^{32}\text{P}$  incorporado/ $\mu\text{gr}$ ./min., mientras que en ausencia de esta droga es de 600 p moles  $^{32}\text{P}$  incorporado/ $\mu\text{gr}$ ./min. En cuanto a la constante aparente de Michaelis en ambos casos es semejante, siendo el valor obtenido de 50  $\mu\text{M}$  aproximadamente.

El segundo tipo de estudio cinético se ha llevado a cabo manteniendo fija la concentración de  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (20 $\mu\text{M}$ ) y variando la concentración de sustrato. Concretamente se ha trabajado con 9 concentraciones diferentes de histonas comprendidas entre 1 y 200  $\mu\text{gr}$ .

A partir de los valores obtenidos, para cada concentración de sustratos se han calculado las rectas de regresión de estas cinéticas (figura 4.11). Los resultados de la determinación de los parámetros cinéticos indican que

la velocidad máxima en presencia de TFP es de 80 pmoles  $^{32}\text{p}$  incorp./ $\mu\text{gr.}/\text{min.}$ , que representa un 24% más baja que la obtenida en ausencia de TFP  $V_{\text{max}} = 105$  pmoles  $^{32}\text{p}/\mu\text{gr.}/\text{min.}$  La constante aparente de afinidad ( $K_m$ ) es en presencia de TFP es de 10  $\mu\text{gr}/250\mu\text{l.}$  mientras que en ausencia de esta droga es de 6  $\mu\text{gr}/250\mu\text{l.}$

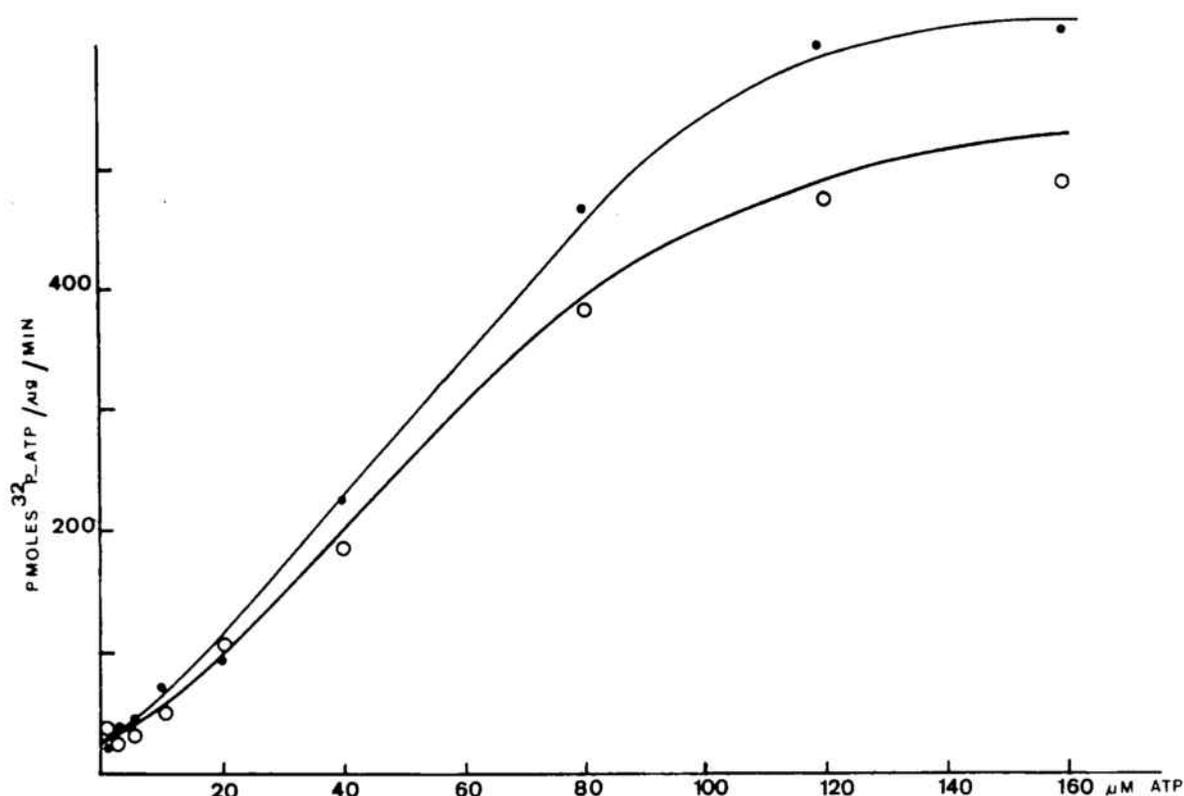


Figura 4.10.: Efecto de la TFP sobre la subunidad catalítica de las protein quinasas dependiente de AMPc en función de diferentes concentraciones de  $^{32}\text{p}$ -ATP. (●) en ausencia de TFP. (○) en presencia de TFP. La actividad específica viene expresada en pmoles de  $^{32}\text{p}$  incorporado/ $\mu\text{gr.}$  de proteína/min. Cada valor representa el valor medio de 3 experimentos.

Debido a que el valor de las  $K_m$  es diferente para cada cinética, estos resultados indicarían que la disminución del 24% de la actividad quinasa en presencia de TFP en el medio de incubación, se debe a una pérdida de afinidad de la subunidad catalítica por las histonas.

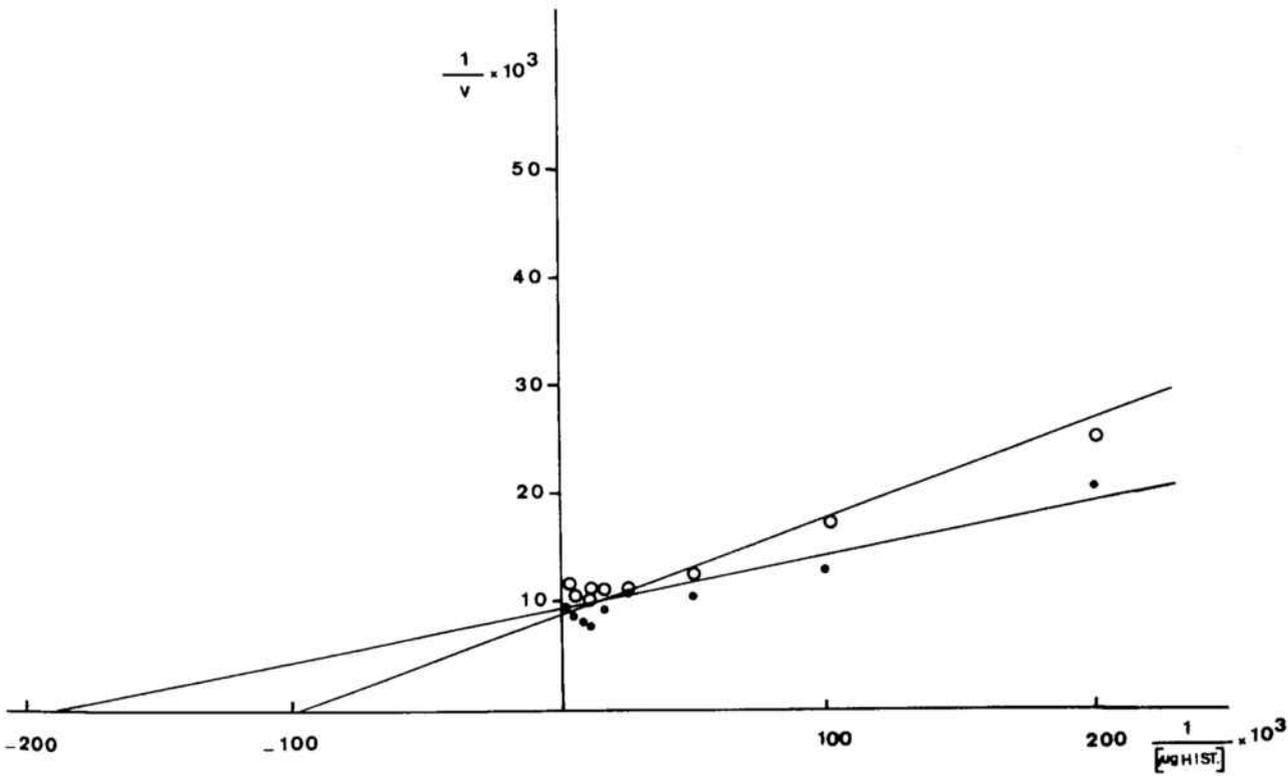


Figura 4.11.: Efecto de la TFP sobre la subunidad catalítica de las protein quinasa dependiente de AMPc en función de diferentes concentraciones de histona. Representación de Lineweaver-Buck. (●) en ausencia de TFP. (○) en presencia de TFP. La actividad específica viene expresada en pmoles de  $^{32}P$  incorporados/ $\mu$ gr. de proteína/min. Cada valor representa la media de 3 experimentos.

#### 4.4.4. ESTUDIO CINETICO DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA

##### DEPENDIENTE DE AMPc EN PRESENCIA DE TFP

Con la finalidad de averiguar si la TFP produce al igual que en apartado 4.4.3.2. una pérdida de la afinidad de las proteínas quinasas dependientes de AMPc por el sustrato se ha llevado a cabo el siguiente estudio cinético: Para la realización de estas cinéticas se ha trabajado con muestras de citosol (20 µgr.) de ratas control (no operadas). Se han mantenido fijas las concentraciones de AMPc (1 µM) y  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (20 µM) y se ha variado únicamente la concentración de histonas 1-150 µgrs. La concentración de TFP en el medio es de 20 µM.

A partir de los valores obtenidos para cada concentración de sustrato, se han construido las rectas de regresión las cuales muestran que la  $V_{max}$  en presencia de TFP es de 48,8 pmol/mg prot/min. y la  $K_m = 16 \mu\text{gr.}/250 \mu\text{l.}$  mientras que en ausencia de TFP la  $V_{max} = 74 \text{ pmoles/mgr. prot/min}$  y la constante aparente de afinidad de  $12 \mu\text{gr.}/250 \mu\text{l.}$  (Figura 4.12).

Como se puede observar en la figura 4.12, el 35% de inhibición de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en presencia en el medio de incubación de 20 µM de TFP es producido por una pérdida de afinidad de la enzima por el sustrato y en menor grado por la pérdida de afinidad por el AMPc.

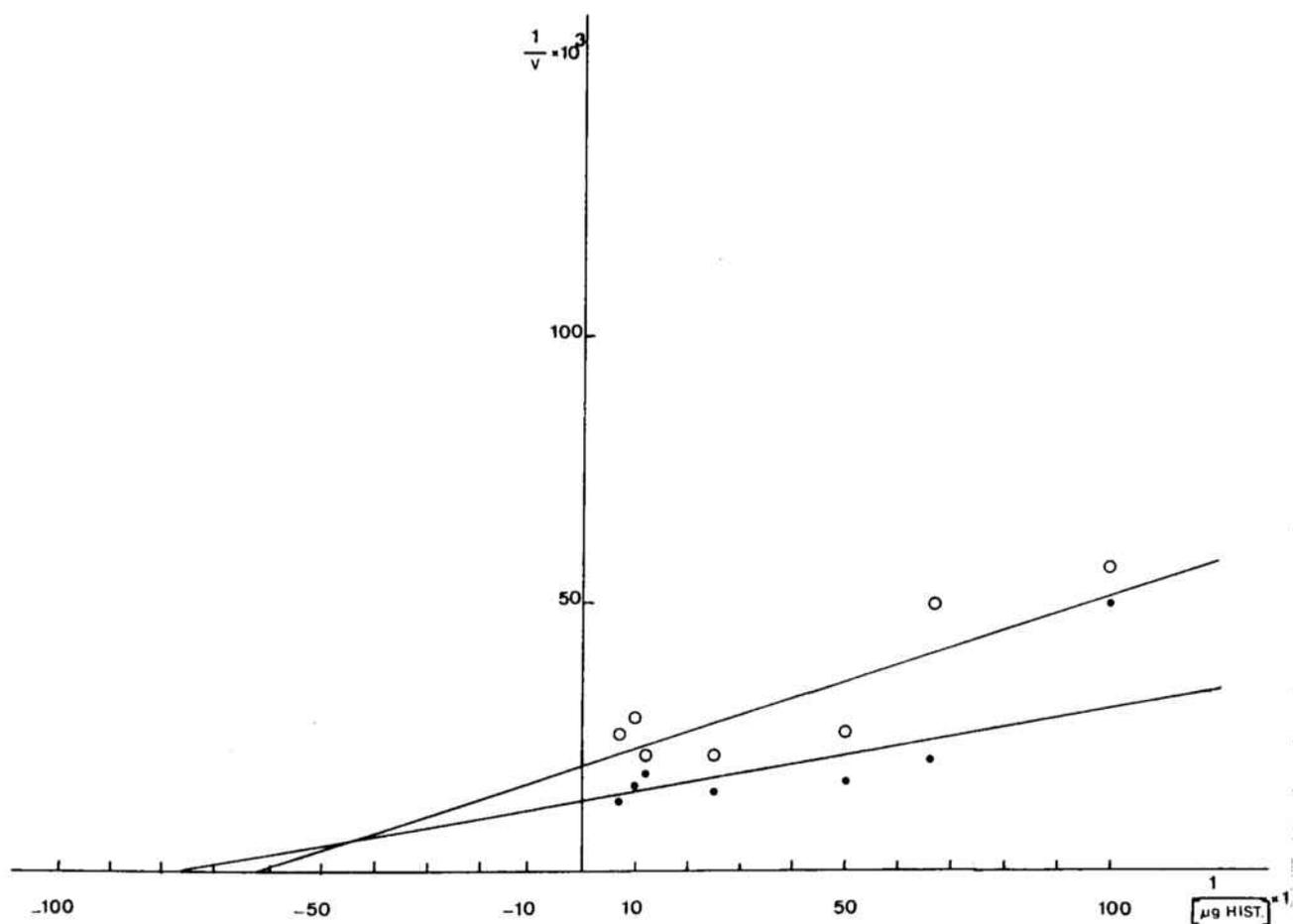


Figura 4.12.: Efecto de la TFP sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en muestras de citosol de rata control, en función de diferentes concentraciones de histonas. La actividad específica viene expresada en pmoles de  $^{32}\text{p}$  incorporados/mgr. de proteína/min. (●) en ausencia de TFP. (O) en presencia de TFP. Cada valor representa la media de 3 experimentos.

#### 4.4.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc Y DEL CONTENIDO DE CALMODULINA EN RATAS TIROPARATIROIDECTOMIZADAS Y SOMETIDAS A UNA HEPATECTOMIA PARCIAL.

Ya se ha comentado anteriormente que la TFP inhibe directamente las protein quinasas dependientes de AMPc, y por tanto no es útil para establecer relaciones entre la calmodulina y estas protein quinasas. Para establecer la posible relación entre el aumento de calmodulina y el de protein quinasas durante la regeneración hepática se ha realizado un experimento alternativo utilizando ratas tiroparatiroidectomizadas, las cuales presentan a los 3 días de la operación una disminución de los niveles de  $Ca^{2+}$  en sangre aproximadamente de un 50%.

Se sabe que las ratas hipocalcémicas son incapaces de iniciar la síntesis de ADN 18 horas después de una hepatectomía parcial (Rixon y Whitfield, 1979). Ello indica que en condiciones de hipocalcemia algún o algunos de los cambios moleculares implicados en el desencadenamiento de la síntesis de ADN estarían inhibidos. Existen evidencias que demuestran que después de realizar una hepatectomía en estos animales no se produce el incremento de actividad protein quinasa dependiente de AMPc, observado entre la 14-16 horas después de la operación (Sikorska et al., 1983, 1985), aunque se presenten igualmente las 2 olas de AMPc intracelular, la primera entre las 4-6 horas y la segunda entre las 14-16 horas posthepatectomía parcial (Whitfield et al., 1979).

Con el objetivo de establecer si existe alguna relación entre la calmodulina y la síntesis de protein quinasas, se ha determinado en ratas hipocalcémicas : en primer lugar la actividad protein quinasa dependiente de AMPc a las 16 horas de la regeneración hepática y a continuación la concentración de calmodulina en el citosol a diferentes horas después de la hepatectomía parcial.

Tal y como se muestra en la Tabla IX la extirpación del tiroides y paratiroides produce una disminución de un 50% aproximadamente de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en las ratas no hepatectomizadas. Cuando a estas ratas hipocalcémicas además se les practica una hepatectomía parcial, la actividad protein quinasa determinada a las 16 horas después de la operación es similar a la observada en ratas hipocalcémicas no hepatectomizadas.

	<u>Actividad específica</u>	<u>n</u>
Control	62±7	7
Control hipacalcémicas	31±3	3
Hipocalcémicas regenerantes 16 h.	38±10	5

Tabla IX. Efecto de la hipocalcémica sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. La tiroparairoidectomía se ha realizado 72 horas antes de la hepatectomía. La actividad específica viene expresada en pmoles <sup>32</sup>P incorporados/mg/min. Cada valor representa media ± ESM, (n) = nº de experimentos.

Por otro lado, como se observa en la figura 4.13, las ratas hipocalcémicas y sometidas a una hepatectomía parcial presentan un aumento de calmodulina citosólica entre las 4-10 horas después de la intervención quirúrgica. Este aumento de calmodulina es similar al observado en las ratas regenerantes normocalcémicas (Figura 4.13).

Los resultados presentados en este apartado indicarían que el incremento de calmodulina citosólica, observado durante las primeras horas de la regeneración hepática, no está relacionado con el aumento de la síntesis de protein quinasas dependientes de AMPc. Postulando que estos 2 cambios intracelulares son hechos independientes a pesar de que la calmodulina pueda regular los niveles de AMPc en el citosol.

¿Qué factor se encuentra realmente implicado en el desencadenamiento de la síntesis de las protein quinasas dependientes de AMPc? Se conoce que la tiroparetiroidectomía inhibe la síntesis de la Vitamina D<sub>3</sub> en las mitocondrias de las células renales y por consiguiente, causa su desaparición en la sangre durante un período de 48-72 horas después de la operación (De Luca H. F., 1978; Rasmussen, H., 1981). Además, se sabe que la deficiencia de vitamina D<sub>3</sub>, produce en células del riñón de pollo una disminución de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, atribuida al incremento de un inhibidor termostable de estas enzimas. (Rudack-Garcia y Henry, 1981). Sin embargo, el motivo por el que la actividad protein quinasa

dependiente de AMPc está disminuida en el hígado de ratas hipocalcémicas no es un aumento de inhibidores de estas enzimas. Por otra parte existen evidencias que demuestran que una inyección de 1,25-Dihidroxitamina  $D_3$  a ratas hipocalcémicas restaura, a las 16 horas después de una hepatectomía parcial, la actividad quinasa dependiente de AMPc del holoenzima I, mientras que la actividad del holoenzima II prácticamente no se modifica (Sikorska et al., 1983). Ello sugiere que la vitamina  $D_3$  controlaría la síntesis de al menos uno de los dos holoenzimas. Recientemente se ha demostrado que la deficiencia de la vitamina  $D_3$  produce un desequilibrio de la síntesis de las subunidades reguladoras y catalíticas de estas protein quinasas. En concreto la vitamina  $D_3$  controlaría selectivamente la síntesis de las subunidades catalíticas mientras que la de las subunidades reguladoras no se alteraría (Sikorska, M. y Whitfield, J.F., 1985).

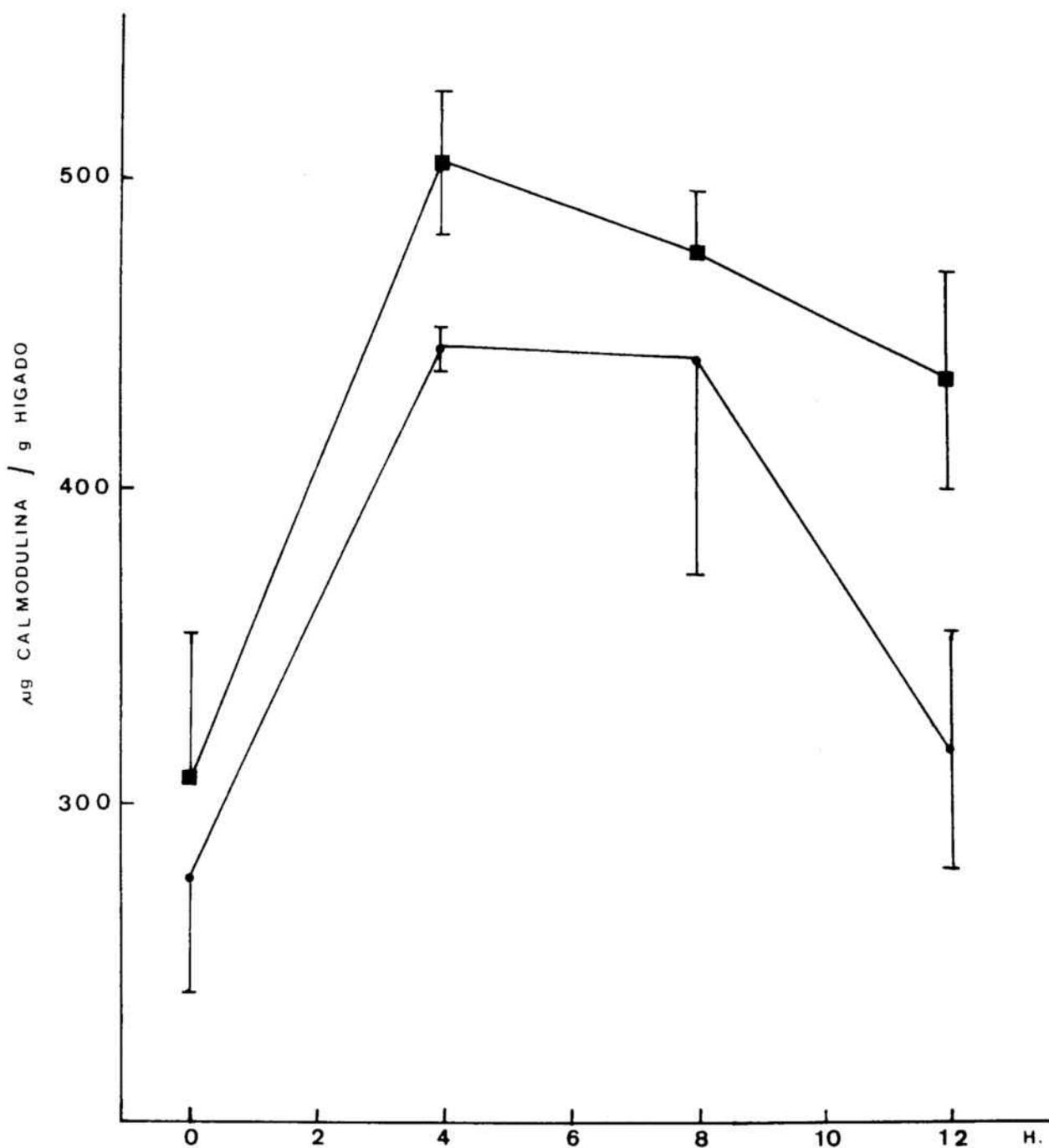


Figura 4.13.: Contenido de calmodulina en el citosol de ratas normo e hipocalcémicas durante la regeneración hepática. ( ● ) ratas normocalcémicas. ( ■ ) ratas hipocalcémicas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos.

#### 4.5. CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE CALMODULINA EN EL NUCLEO DE HEPATOCITOS DURANTE LA REGENERACION HEPATICA

Con el objetivo de determinar si la calmodulina acumulada entre las 6-12 horas posthepatectomía parcial se transloca al núcleo se ha estudiado el contenido de calmodulina en núcleos de hepatocitos de ratas no hepatectomizadas y 24 horas regenerantes así como en las diferentes subfracciones nucleares S1, S2 y Matriz nuclear (MN) se ha utilizado el método descrito en el apartado 3.3.4. basado en la activación de la fosfodiesterasa por la calmodulina.

La subfracción S1 corresponde al sobrenadante obtenido después de centrifugar los núcleos, previamente incubados con RNasa y DNasa durante 1 hora. La S1 está formada por RNA, DNA y proteínas no histonas. La S2 en la fracción soluble extraída a elevadas concentraciones de sal, está formado por Histonas y otras proteínas asociadas al DNA. La Matriz nuclear es la fracción insoluble formada esencialmente por la envoltura nuclear (para más detalles ver el apartado 3.2.4.2.).

Como se observa en la tabla X la concentración de calmodulina en el núcleo de ratas no hepatectomizadas (control) es de 0,85  $\mu\text{gr}/\text{mg}$  proteína. Esta calmodulina nuclear no se encuentra uniformemente repartida entre las tres subfracciones, sino que se localiza preferentemente en la fracción S1 y en la MN (1,69 y 1,42  $\mu\text{gr}/\text{mg}$  proteína respectivamente). A las 24 horas después de una

hepatectomía parcial se observa un incremento de la concentración de calmodulina en el núcleo. La concentración de calmodulina nuclear en este momento es de 2,02  $\mu\text{gr}/\text{mg}$  proteína y representa un aumento de unas 3 veces respecto al valor obtenido en núcleos control. La concentración de calmodulina en la fracción S1 de los núcleos regenerantes es prácticamente parecida a la observada en los núcleos control mientras que en la fracción S2 es 4 veces más baja (0,14  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) que en la S2 de las ratas control. Finalmente en la matriz nuclear de los animales hepatectomizados se observan niveles de calmodulina de unas 3,5 veces más altos respecto a los valores observados en la MN control.

En resumen estos resultados indican que durante la fase replicativa de la regeneración hepática se produce un aumento de la concentración de calmodulina en el núcleo. Además también se observa que se produce una redistribución de la calmodulina nuclear a las 24 horas después de una hepatectomía parcial. Como los resultados muestran, la calmodulina nuclear se desplazaría hacia la envoltura nuclear en el momento de máxima síntesis del ADN.

	<u>Control</u>	<u>n</u>	<u>24 h. Regen.</u>	<u>n</u>
<u>NUCLEOS</u>	0,85±0,30	3	2,02±0,2	3
<u>S1</u>	1,56±0,38	4	1,75±0,07	3
<u>S2</u>	0,56±0,14	4	0,14±0.07	3
<u>MN</u>	1,42±0,12	3	5,00±1,50	3

Tabla X. Concentración de calmodulina en los núcleos y en las subfracciones nucleares de hepatocitos de rata control y regenerantes. Los valores vienen expresados en  $\mu\text{gr}$  de calmodulina/mg de proteína. Cada valor representa la media  $\pm$  D.S. de  $n \geq 3$ .

Como ya se ha descrito en muchas ocasiones durante las primeras horas de la regeneración hepática se produce un incremento de la concentración de calmodulina citosólica que empieza a descender a valores control a partir de las 12 horas posthepatectomía parcial. Ello sugeriría que posiblemente el incremento de calmodulina nuclear durante la fase replicativa de la regeneración hepática sea debido a una translocación de esta proteína desde el citosol hacia el interior del núcleo.

Con el objetivo de poder aportar alguna evidencia experimental que pueda apoyar esta hipótesis se han cuantificado también los niveles de este receptor de  $\text{Ca}^{2+}$

asociados a la matriz nuclear a las 12 y 20 horas después de realizar una hepatectomía parcial. Los resultados expuestos en la tabla XI muestran que a partir de las 12 horas de la regeneración hepática la concentración de calmodulina en la matriz nuclear es 2,4 veces más elevada respecto a la observada en la matriz nuclear de ratas control. Estos resultados indicarían por tanto que conforme la calmodulina se va sintetizando, esta transloca al núcleo en donde se asociaría a la matriz nuclear.

	<u>0 h.</u>	<u>12 h.</u>	<u>20 h.</u>	<u>24h.</u>
<u>MN</u>	1.10 ± 0.2	2.55 ± 0,07	2,7 ± 0,3	3,6 ± 0,5

Tabla XI: Concentración de calmodulina asociada a la matriz nuclear a las 0, 12, 20, 24 horas de la regeneración hepática. Los valores vienen expresados en  $\mu$ gr. de calmodulina/mg. de proteína. Cada valor representa la media  $\pm$  D.S. de  $n \geq 3$ .

Por otra parte empleando técnicas inmunohistoquímicas se han obtenido resultados semejantes que confirmarían los aquí expuestos. Incubando núcleos de hepatocitos que se encuentran en la fase  $G_0$  del ciclo celular con anticuerpos anticalmodulina se observa un patrón difuso de la calmodulina en el interior del núcleo. Sin embargo cuando se incuban núcleos de hepatocitos que se encuentran en el momento de máxima síntesis de ADN (24 horas post-

hepatectomía parcial) se observa un ligero incremento de la tinción , pero sobre todo destaca el patrón de distribución de la calmodulina el cual es claramente diferente , ya que se observa una estrecha unión de la calmodulina a la envoltura nuclear. (Figura 4.14).

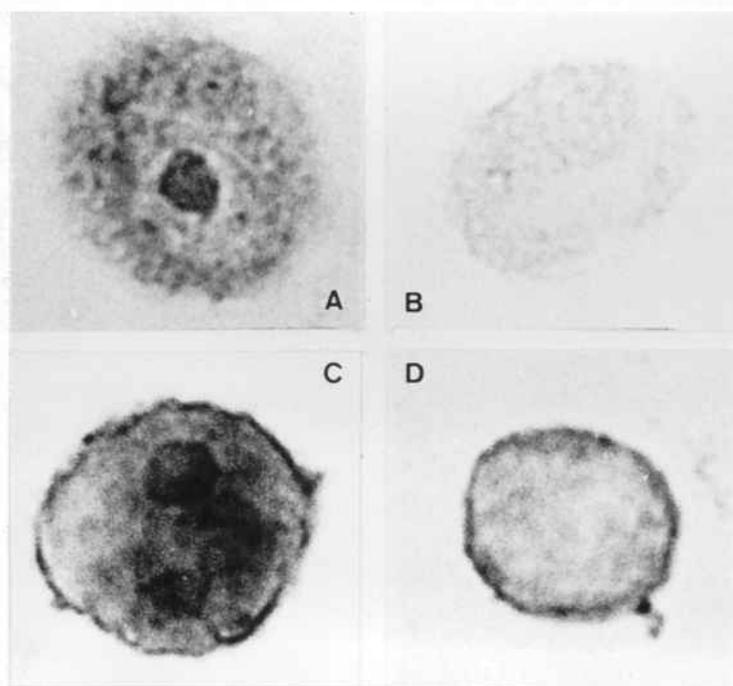


Figura 4.14.: Núcleos aislados de hepatocitos incubados con anticuerpos anticalmodulina. A) Núcleos control. B) Núcleos en presencia de calmodulina exógena. C) Núcleos regenerantes de 24 horas después de una hepatectomía parcial. D) Núcleos control incubados con 5 mM de  $CaCl_2$  antes de ser tratados con el anticuerpo. Aumento microscópico: 3000x. (Foto prestada por J. Serratosa).

Ademas existen evidencias que indican que una entrada de calcio en el núcleo podría ser causante de la redistribución de la calmodulina nuclear. Experimentos realizados en nuestro laboratorio empleando técnicas inmunohistoquímicas indican que cuando se incuban núcleos de hepatocitos ratas de no hepatectomizadas con concentraciones superiores o iguales a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  se produce una redistribución de la calmodulina en el núcleo similar a la que se produce in vivo a las 24 horas post-hepatectomía parcial.

Actualmente existen muchas evidencias que indican que la replicación del ADN en células eucariotas es proceso asociado a la matriz nuclear (Nelson W.C et al., 1986). Además se ha demostrado que muchas de las enzimas directamente implicadas en la síntesis de ADN, como la DNA polimerasa  $\alpha$  (Smith y Berezney 1980, 1982, 1983; Tubo et al., 1985), la DNA primasa, 3'5' exonucleasa, RNAsa H y la DNA metilasa se hallan, al igual que la calmodulina, fuertemente unidas a la matriz nuclear durante la fase replicativa de la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial (Tubo R.A y Berezney 1986). Esta asociación de la calmodulina a la matriz nuclear sugeriría que esta proteína podría estar implicada en algún mecanismo de regulación de la actividad de estas enzimas replicativas.

#### 4.6. IDENTIFICACION DE LOS RECEPTORES DE CALMODULINA EN EL NUCLEO DE HEPATOCITOS DURANTE LA REGENERACION HEPATICA

Para la identificación de los receptores de calmodulina en las diferentes subfracciones nucleares (S1, S2, MN) se han utilizado las técnicas de "overlay" descritas en el apartado 3.3.10.

Los resultados obtenidos a partir de ratas control muestran la presencia de 8 receptores de calmodulina en el núcleo. Dos en la fracción soluble S1 con un peso molecular de 120 Kd aproximadamente. Uno en la fracción S2 de un peso molecular aproximado de 120 Kd. Finalmente se observan cinco receptores de calmodulina en la fracción insoluble o matriz nuclear cuyos pesos moleculares son de 150, 130, 120, 65 y 60 Kd (Figura 4.15).

Cuando se utilizan ratas hepatectomizadas de 24 horas de regeneración, no se observan diferencias en los receptores de las fracciones S1 y S2. Sin embargo en la matriz nuclear los receptores de 120, 60 y 65 kd se encuentran claramente disminuidos, mientras que los de 150 y 130 kd están muy incrementados (Figura 4.16).

Como ya se ha indicado anteriormente la duplicación del ADN en los organismos eucariotas es un proceso asociado a la matriz nuclear (Foster, K.A. y Collins, J.M., 1985; Nelson W.G. et al., 1986). Por tanto estos resultados sugieren que la asociación y los cambios en la unión de calmodulina a sus receptores en la matriz nuclear, durante

el periodo replicativo de la regeneración hepática, podrían estar estrechamente relacionados a la síntesis de ADN.

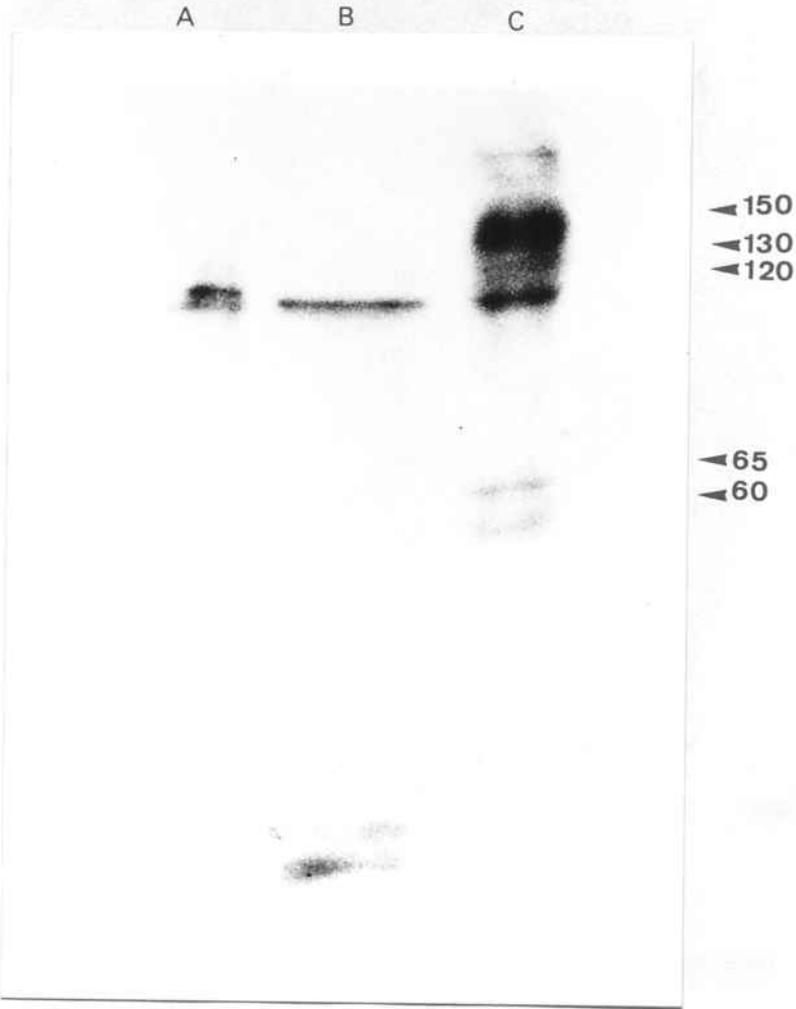


Figura 4.15.: Identificación de los receptores de calmodulina en las diferentes subfracciones nucleares en ratas control. A) Fracción S1. B) Fracción S2. C) Matriz nuclear.

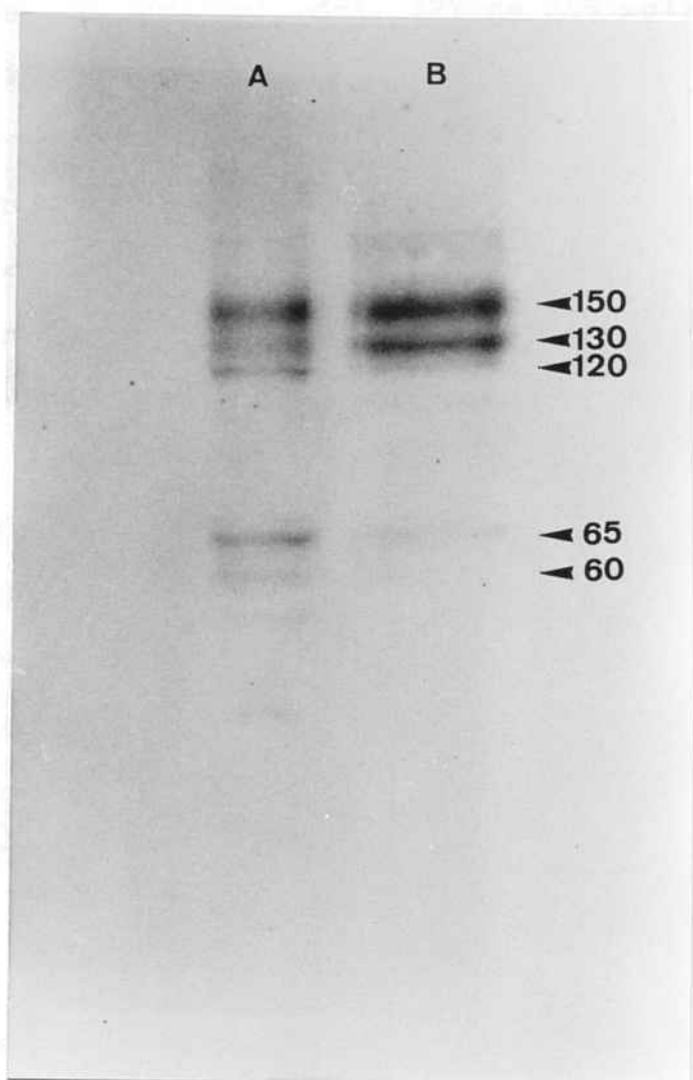


Figura 4.16.: Receptores de calmodulina de la matriz nuclear. A) Matriz nuclear control. B) Matriz nuclear de rata regenerante de 24 horas.

#### 4.7. DETERMINACION DEL PATRON DE FOSFORILACION EN EL CITOSOL DURANTE LA REGENERACION HEPATICA

##### 4.7.1. DETERMINACION DEL PATRON DE FOSFORILACION DEPENDIENTE DE AMPc

Cuando se incuban muestras de citosol de rata control (no operadas) en presencia de 0,2 mM de EGTA, pueden

distinguirse en un gel del 12% de SDS-poliacrilamida 3 proteínas ligeramente fosforiladas, cuyos pesos moleculares son de 60-65 Kd; 60 Kd y 50 Kd (Figura 4.17 A). En ocasiones aparece una fosfoproteína de 90 kd en alguna muestra de citosol, su aparición probablemente se deba a un mayor tiempo de exposición del gel. Estos resultados indicarían que la fosforilación de estas 4 proteínas la llevarían a cabo bien protein quinasas independientes de calcio, calmodulina y AMPc o bien alguna subunidad catalítica libre de las protein quinasas dependientes de AMPc presente en la muestra.

Si las muestras de citosol de ratas control se incuban con 0,2 mM de EGTA y 2,5  $\mu$ M de AMPc pueden observarse 8 proteínas fosforiladas, las cuales en principio serían sustratos de las protein quinasas dependientes de AMPc. Los pesos moleculares son aproximadamente de 120 Kd; 110-115 Kd; 85-90 Kd; 60-65 Kd; 60 Kd; 55 Kd; 50 Kd y 18-20 Kd. En algunas muestras de citosol, las bandas localizadas en la región de alto peso molecular así como la banda de 18-20 Kd presentan una intensidad muy débil y que en algún caso puede dificultar su observación. En la región de peso molecular medio es donde se encuentran las fosfoproteínas más claramente destacadas, concretamente la proteína de 60-65 Kd. El peso molecular de esta proteína coincide con el de la piruvato quinasa (Figuras 4.17 E y 4.18 A).

Van den Berg, G.B. et al., 1979, observaron que en presencia de 10  $\mu$ M de AMPc se fosforilaban en el citosol

hepático 11 proteínas. Sin embargo cuando añadían en el medio de incubación un inhibidor específico de las protein quinasas dependientes de AMPc, 7 de estas 11 fosfoproteínas desaparecían indicando por tanto que estas 7 proteínas son sustratos específicos de las protein quinasas dependientes de AMPc. Entre este grupo de proteínas se encuentra la piruvato quinasa de 65 Kd de peso molecular (Van den Berg et al 1980).

Por otra parte se sabe desde hace tiempo que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (118-145 Kd y 108-128 Kd respectivamente) de la fosforilasa quinasa son sustratos de la protein quinasas dependientes de AMPc (Krebs, E.G. et al., 1964; Cohen, P., 1973; Hayakawa, T. et al., 1973; Flockhart, D.A. y Corbin J.D., 1982). Probablemente las fosfoproteínas de 120 Kd y 115-110 Kd observadas en la figura 4.17 E correspondan a estas dos subunidades de la fosforilasa quinasa.

La subunidad R II (54-56 Kd) de las protein quinasas dependientes de AMPc, es otro de los sustratos conocidos de estas protein quinasas. Sin embargo, debido a que el tiempo de incubación en este ensayo es relativamente largo (5 minutos), es probable que esta proteína no se observe en nuestros geles, pues si bien la R II se fosforila a velocidades extraordinariamente altas (a los 10-20 segundos se alcanza el valor máximo) existen pruebas que demuestran que después de esta fosforilación se sigue una rápida defosforilación, el motivo de la cual se desconoce por ahora (Van den Berg et al., 1980).

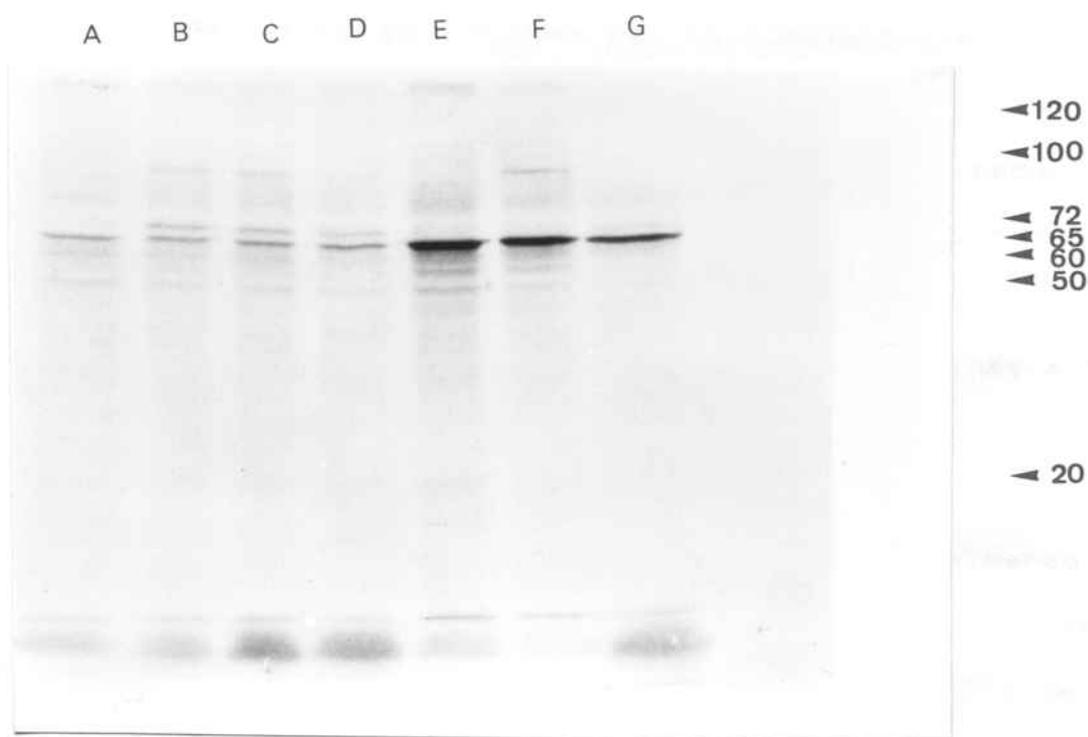


Figura 4.17.: Patrón de fosforilación de proteínas en el citosol de ratas control. A) Muestras incubadas con 0,2 mM EGTA. B) Muestras incubadas con 500  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$ . C) Muestras incubadas con 500  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$  y 10  $\mu$ M de calmodulina. D) Muestras incubadas con 500  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu$ M de calmodulina y 1,25  $\mu$ M de TFP. E) Muestras incubadas con 0,2 mM EGTA y 2,5  $\mu$ M AMPc. F) Muestras incubadas con 2,5  $\mu$ M AMPc, 500  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$  y 10  $\mu$ M de calmodulina. G) Muestras incubadas con 2,5  $\mu$ M AMPc, 500  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu$ M de calmodulina y 1,25  $\mu$ M de TFP.

El patrón de fosforilación de proteínas citosólicas en presencia de AMPc a diferentes horas de la regeneración hepática se muestra en la figura 4.18. Los resultados obtenidos indican que en las 6 y 12 horas después de la operación se produce una disminución generalizada de la incorporación de  $^{32}\text{P}$ . Así mismo hay que destacar la

aparición de una nueva fosfoproteína de 70 Kd aproximadamente (Figuras 4.18 B y C).

A las 16 horas después de la hepatectomía parcial, momento de máxima actividad de las protein quinasas dependientes de AMPc, se observa una reducción prácticamente total del patrón de fosfoproteínas, tan sólo la proteína de 65 Kd se encuentra ligeramente fosforilada (Figura 4.18 D). La incorporación de  $^{32}\text{P}$  a proteínas a las 20 horas postoperación muy similar a la observada a las 16 horas de la regeneración hepática (Figura 4.18 E).

Se han obtenido resultados similares empleando el método para la determinación de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. En este caso el estudio se ha realizado sin añadir, en el medio de incubación, histonas como sustrato, permitiendo de este modo cuantificar directamente la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a proteínas endógenas de la muestra. Tal y como indica la figura 4.19, durante el período prerreplicativo de la regeneración hepática se produce una disminución significativa de la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a las proteínas del citosol.

Dos hipótesis podrían explicar estos resultados: A) Debido a que entre las 14-16 horas después de una hepatectomía parcial es el momento de máxima actividad de las protein quinasas dependientes de AMPc, las proteínas citosólicas ya están fosforiladas y por tanto no incorporan el  $^{32}\text{P}$  exógeno. B) Como que la subunidad catalítica de las protein quinasas dependientes de AMPc se sabe que transloca al núcleo a partir de las 16 horas después de la operación,

es probable que en este momento queden pocas subunidades catalíticas en el citosol capaces de fosforilar las proteínas.

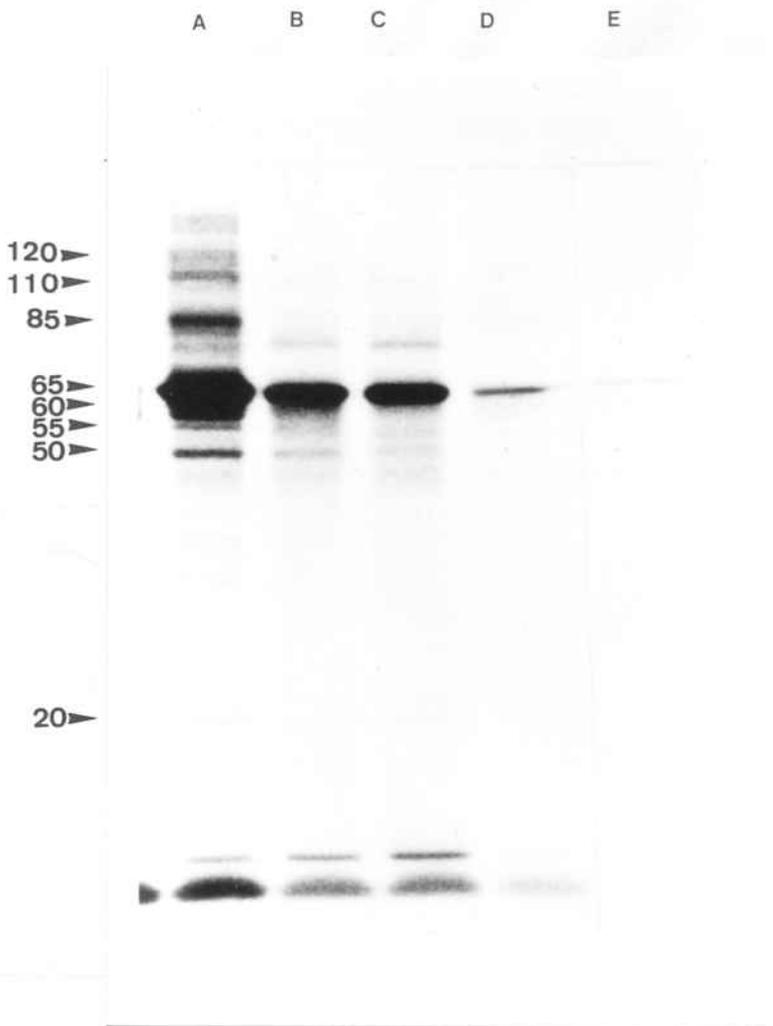


Figura 4.18.: Patrón de fosforilación de proteínas citosólicas dependiente de AMPc durante la regeneración hepática:

- A) Muestras de citosol de ratas control.
- B) " " " " " regenerantes 6 horas.
- C) " " " " " " " " 12 " " " "
- D) " " " " " " " " 16 " " " "
- E) " " " " " " " " 20 " " " "

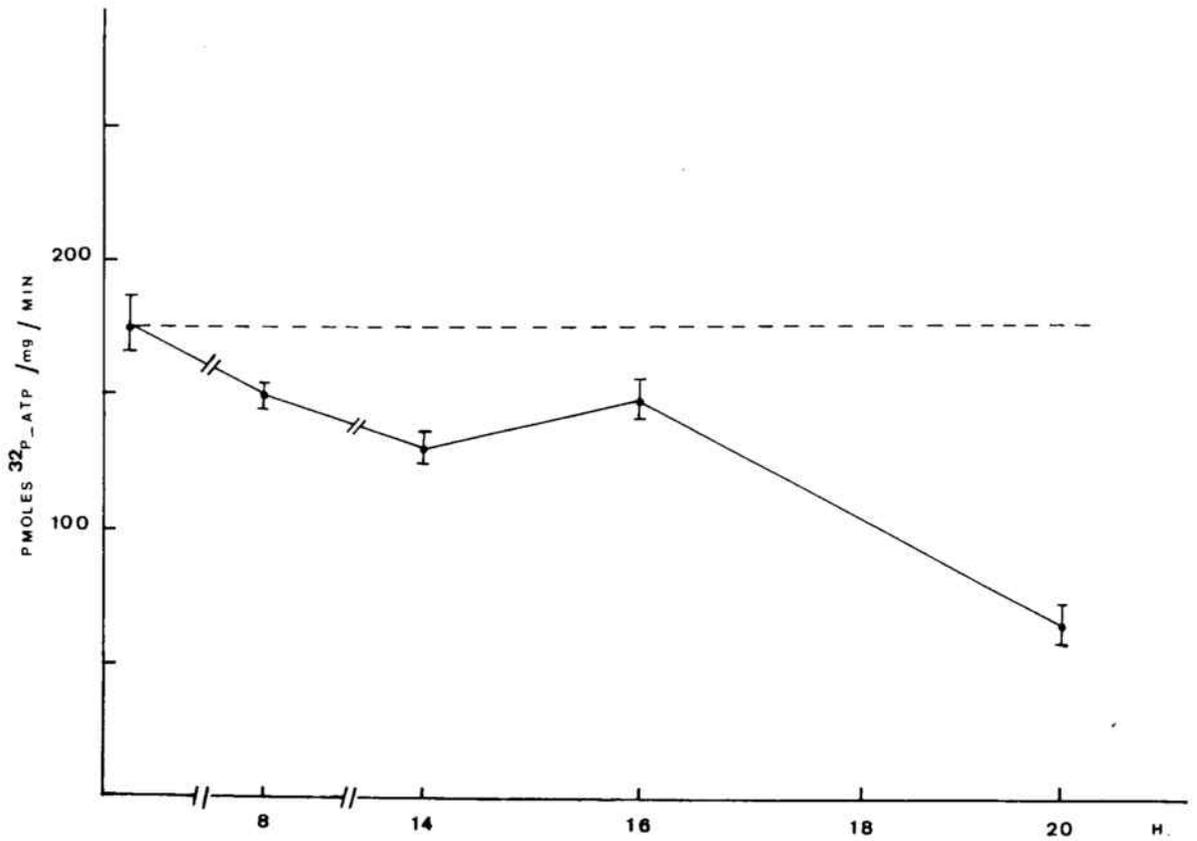


Figura 4.19.: Actividad protein quinasa dependiente de AMPc sin añadir en el medio de incubación histonas como sustrato. En este caso la actividad especifica viene expresada en pmoles de  $^{32}\text{P}$ -ATP incorporado a proteínas endógenas/mg. de proteína/min. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos cuatro muestras.

#### 4.7.2. DETERMINACION DEL PATRON DE FOSFORILACION DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$ Y CALMODULINA

Los resultados obtenidos a partir de ratas no operadas, indican que en ausencia de AMPc, concentraciones de 500  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$  estimulan la fosforilación de 2 proteínas cuyos pesos moleculares son aproximadamente de 100 Kd y 72 Kd. (Figura 4.17 B). Por otra parte el  $Ca^{2+}$  disminuye la fosforilación de una proteína de 62 Kd. (Figura 4.17 B).

Se sabe que en diversos tipos de tejidos la calmodulina potencia el efecto del  $Ca^{2+}$  sobre la fosforilación de proteínas de membrana (Schulman H. y Greengard, P., 1978). En nuestro estudio la adición de 10  $\mu$ M de calmodulina purificada no modifica sustancialmente el patrón de fosforilación de las proteínas citosólicas. Posiblemente ello sea debido a que el efecto de la calmodulina añadida se halle enmascarado por la calmodulina endógena (Figura 4.17 C). Cuando la muestra se incubaba con  $Ca^{2+}$ , calmodulina y 1,25 $\mu$ M de TFP, se observa la desaparición de la banda de 100 Kd, esto indicaría que la fosforilación de esta proteína es dependiente de calmodulina (Figura 4.17 D). Si aparte del  $Ca^{2+}$ , calmodulina y TFP añadimos AMPc, se observó, además de la desaparición de la banda de 100 Kd, una disminución general de la intensidad de las proteínas fosforiladas (Figura 4.17 G).

Recientemente se ha identificado en el corazón, hígado, pulmón, bazo y músculo esquelético (Palfrey H.C.,

1983) así como células GH<sub>3</sub> de adenoma pituitario (Drust, D.S. y Martin, T.F., 1982) una proteína citosólica cuyo peso molecular es de 100 Kd. A excepción del músculo esquelético, se cree que esta proteína es el principal sustrato de alguna protein quinasa dependiente de calmodulina. Por otra parte, existen muchas evidencias que indican que esta proteína de 100 Kd no es la glucógeno fosforilasa (97 Kd).

El patrón de fosforilación dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina a las 6, 12 y 16 horas después de una hepatectomía parcial, es muy similar a observado en ratas control (Figura 4.20). Sin embargo, es de destacar una disminución general de la incorporación de fósforo radioactivo entre las 6 y 12 horas después de la operación; la desaparición de la fosfoproteína de 100 Kd. a las 6, 12 y 16 horas del proceso proliferativo y finalmente la aparición de una nueva fosfoproteína de 85 Kd a estas mismas horas de la regeneración hepática.

Se sabe que entre las 6 y 12 horas de la regeneración hepática se produce un incremento de la concentración citosólica de calmodulina; este aumento de calmodulina activaría a protein quinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina, las cuales fosforilarían proteínas citosólicas. Probablemente durante este período de tiempo de la regeneración hepática estas proteínas ya se encuentran fosforiladas y por tanto no pueden incorporar el <sup>32</sup>P exógeno.

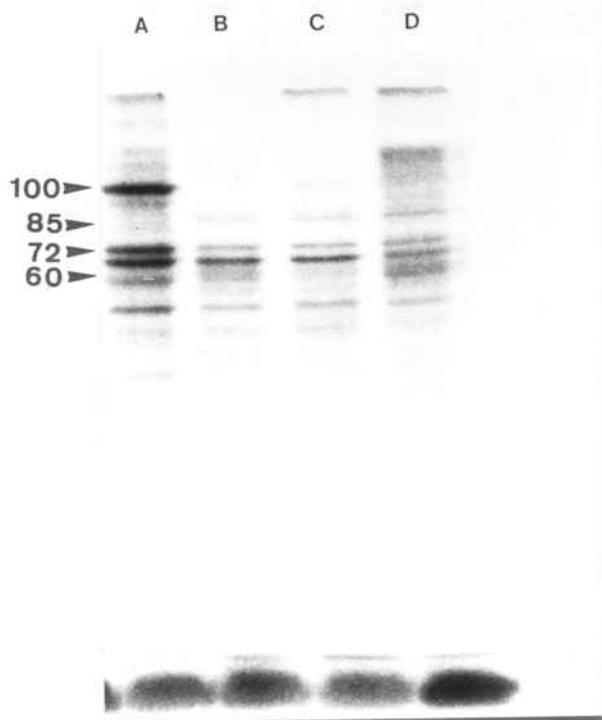


Figura 4.20.: Patrón de fosforilación de proteínas citosólicas dependiente de calcio y calmodulina durante la regeneración hepática:

- A) Muestras de citosol de ratas control.  
 B) " " " " " regenerantes 6 horas.  
 C) " " " " " " 12 " .  
 D) " " " " " " 16 " .

## 5. DISCUSSION

Con el objetivo de poder comprender los mecanismos por los cuales se desencadena, en los hepatocitos, la duplicación del ADN y posteriormente la entrada en la mitosis después de practicar una hepatectomía parcial, es necesario establecer una serie de secuencias de acontecimientos, es decir, que cambios iniciales son responsables de los que aparecen posteriormente y su relación con el inicio de la replicación del material genético.

Tal y como se ha mencionado en la introducción, se pueden observar durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática numerosos cambios moleculares y morfológicos. Entre los cambios moleculares cabe destacar el aumento bifásico de la concentración intracelular de AMPc y los incrementos de calmodulina y de actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol. Estos 3 cambios están estrechamente relacionados con el inicio de la síntesis de ADN. No obstante, se desconoce hasta el momento si entre estos tres factores clave existe alguna relación que permita establecer una única secuencia de acontecimientos o si por el contrario, son factores independientes entre si, que forman parte de diferentes secuencias relacionadas todas ellas con el inicio de la síntesis del ADN.

Con esta finalidad, en este trabajo se ha pretendido estudiar principalmente los siguientes aspectos:

- Relación entre el primer aumento de la concentración de AMPc intracelular y el de calmodulina.

- Relación entre el aumento de calmodulina con la segunda ola de AMPc y el incremento de actividad protein quinasas dependientes de AMPc.
- Por último, como el aumento de calmodulina citosólica puede estar implicado en el desencadenamiento de la duplicación del ADN.

### 5.1. RELACION ENTRE EL PRIMER AUMENTO DE AMPc Y LA OLA DE CALMODULINA.

Diversas evidencias experimentales han demostrado recientemente que el incremento de la concentración de calmodulina en el citosol, durante las primeras horas de la regeneración hepática, es producido por un aumento de la síntesis de esta proteína precedido por un incremento de la transcripción (Piñol, M.R. et al., en prensa; Pujol, M.J. et al., 1987). Sin embargo, no se conoce todavía que factor o factores podrían disparar el inicio de la biosíntesis de calmodulina. Un posible factor podría ser el AMPc, dado que el incremento de este nucleótido cíclico, entre las 2 y 4 horas después de una hepatectomía parcial, es uno de los primeros acontecimientos observados durante el proceso regenerativo.

Los resultados expuestos en el apartado 4.1. indican que cuando se inyecta dl propanolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico e inhibidor de la síntesis de AMPc) se produce una disminución del 77% aproximadamente de los niveles de

calmodulina a las 8 horas posthepatectomía parcial (Tabla II y figura 4.2.).

Estos resultados sugerirían que la primera ola de AMPc intracelular, observada después del estímulo proliferativo, podría ser el factor desencadenante de la síntesis de calmodulina a partir de las 6 horas de la regeneración hepática.

Posteriormente en nuestro laboratorio se han llevado a cabo una serie de experimentos que apoyarían esta hipótesis: a) Si se inyecta vía endovenosa una solución de 5  $\mu$ moles de AMPc y 10 mg. de teofilina, se produce en los hepatocitos un aumento de la concentración de calmodulina citosólica similar a la observada después de practicar una hepatectomía parcial. b) Si se administra dl propanolol en el momento de la infusión de la solución TAGH se reducen en un 80% los niveles de AMPc y los de calmodulina en el citosol (Soriano, M. et al., en prensa).

Algunas evidencias experimentales demuestran que la triyodotironina es el elemento clave de la solución TAGH para desencadenar la activación de la proliferación (Short et al., 1972; Coll et al., en prensa), ya que la omisión de la hormona tiroidea en la mezcla TAGH, provoca una disminución de la desialización de la membrana plasmática y de la síntesis de ADN (Short et al., 1972; Coll et al., en prensa).

Además, los niveles de AMPc y calmodulina observados, a las 4 y 8 horas respectivamente, después de la administración de una solución formada únicamente por

aminoácidos glucagón y heparina (solución AGH), son similares a los observados en los animales tratados con solución salina (datos no publicados). Estos resultados confirmarían una vez más, la importancia de la  $T_3$  en la activación de la respuesta proliferativa en el hígado.

Por otra parte se conoce desde hace tiempo que la primera ola de AMPc intracelular, al contrario de lo que ocurre con la segunda, se debe exclusivamente a un aumento de unas 3 veces aproximadamente de la actividad adenilato ciclasa estimulable por tiroxina (Leoni et al., 1975) (Ver figura 1.7. de la introducción). Ello sugeriría por tanto que la omisión de la hormona tiroidea de la mezcla TAGH no provocaría modificación alguna de la actividad de la adenilato ciclasa. Por consiguiente, al no aumentar los niveles de AMPc intracelulares, se bloquearía el desencadenamiento de la síntesis de calmodulina.

¿Qué factor sería responsable del cambio de afinidad de la adenilato ciclasa por la hormona tiroidea después de la estimulación de la proliferación hepatocelular?

Una posibilidad sería por acción de la proteína quinasa C, la cual después de ser activada por el  $Ca^{2+}$  y el diacilglicerol, fosforilaría e inactivaría la subunidad reguladora  $G_i$  de la adenilato ciclasa. (Whitfield et al., 1987). Ello provocaría un importante cambio de afinidad del enzima por la triyodotironina y que consecuentemente se traduciría en un aumento de la síntesis de AMPc. Esta hipótesis estaría apoyada por la siguiente evidencia experimental: se ha demostrado que las plaquetas humanas

tratadas con 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA), (potente promotor tumoral y estimulador de la protein quinasa C) presentan un aumento de la fosforilación de la subunidad reguladora  $G_i$  de la adenilato ciclasa como consecuencia de la activación de dicha protein quinasa (Katada et al., 1985; Jakobs et al., 1985).

Otra posibilidad sería cuando se inyecta la solución TAGH, podría ser que los aminoácidos, el glucagón y la heparina desempeñaran un importante papel en la alteración de la sensibilidad de la adenilato ciclasa por la hormona tiroidea, pues cuando se inyecta únicamente triyodotironina no se produce ni la síntesis de calmodulina (datos no publicados) ni tampoco la del ADN (Coll et al., en prensa).

Por último se ha descrito recientemente (Rixon y Whitfield, 1985) que la inhibición del primer incremento de AMPc (mediante una inyección de dl propanolol a las 1 o 2 horas posthepatectomía parcial) no afectaría el inicio de la síntesis del ADN, pero sí que reduciría en un 50% la entrada de los hepatocitos a la fase mitótica. Si el dl propanolol bloquea la síntesis de AMPc y calmodulina, pero no afecta a la del ADN, estos resultados parecen sugerir que el aumento de calmodulina citosólica a partir de las 6 horas de la regeneración hepática, podría estar involucrado en algún acontecimiento relacionado con la mitosis. Esta hipótesis es por tanto, contraria a la que indicaría que el incremento de calmodulina estaría relacionado con el desencadenamiento de la replicación del ADN.

No obstante, la administración de este antagonista  $\beta$ -

adrenérgico, una hora después de la hepatectomía parcial, no modifica significativamente los niveles de calmodulina asociada a la matriz nuclear a las 24 horas de la intervención quirúrgica (datos no publicados). Ello indica que esta droga tan sólo bloquearía temporalmente la síntesis de AMPc y calmodulina, que se sintetizarían posteriormente y por lo tanto apenas afectaría la translocación de la calmodulina desde el citosol al núcleo. Por lo tanto, no existen por ahora pruebas experimentales que apoyen de una manera convincente la implicación de la calmodulina en la regulación de la mitosis.

## **5.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc DURANTE LA ACTIVACION DE LA PROLIFERACION HEPATOCELULAR.**

Una de las funciones que se le atribuyen a las protein quinasas dependientes de AMPc es la de participar en el control de la proliferación celular así como en la regulación de diversos procesos de desdiferenciación celular (Boynton y Whitfield, 1979; 1980; 1981; Sikorska et al., 1983; Butley et al., 1985; Cho Chung, 1980; Buys et al., 1983).

Se ha descrito que la adición en el medio de cultivo de un inhibidor, de naturaleza polipeptídica, de las protein quinasas dependientes de AMPc, bloquea el inicio de la síntesis del ADN en cultivos de células hepáticas T51B

(Boyton, A.L. et al. 1981). Estos mismos autores han demostrado también que, en presencia de la isoenzima II de las protein quinasas dependientes de AMPc o de la subunidad catalítica de estas enzimas, se induce la duplicación del ADN en este mismo tipo celular. Estos resultados sugerirían por tanto que una o más fosfoproteínas, resultantes de la activación de estas quinasas, estarían implicadas en algún acontecimiento relacionado a su vez con el inicio de la replicación de ADN.

Dada la importancia del aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en muchos sistemas de proliferación celular, se ha determinado esta actividad enzimática en el citosol de células hepáticas activadas a proliferar después de practicar una hepatectomía parcial o de administrar endovenosamente la solución TAGH.

Después de la extirpación de un 70% de la masa hepática, se observa un aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, cuyo valor máximo se alcanza a las 16 horas de la intervención quirúrgica. A partir de este momento esta actividad quinasa empieza a disminuir hasta alcanzar valores similares a los observados en ratas control (Tabla IV). Simultáneamente a la disminución de la actividad quinasa en el citosol, se observa un aumento de esta actividad enzimática en el núcleo de los hepatocitos (Lacks, M.S. y Jungmann, 1980; Lacks, M.S. et al., 1981; Sikorska, M. et al., 1983). Diversas evidencias experimentales han demostrado que este aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc nuclear es

debido a una translocación de la subunidad catalítica de estas enzimas desde el citosol al núcleo, lugar en donde fosforilarían diferentes subespecies de la histona H1 fenómeno asociado a la descondensación de la cromatina, hecho necesario para que se lleve a cabo la duplicación del ADN.

Sin embargo, después de la administración de la infusión TAGH, no se observa ningún incremento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc. Si consideramos que la respuesta proliferativa, tras la administración de dicha solución, es mucho menor a la observada después de practicar una hepatectomía parcial, es lógico pensar que los niveles de estas enzimas sean probablemente suficientes para desencadenar la respuesta proliferativa (Figura 4.3. y tabla V). No obstante, es importante destacar la ligera disminución de la actividad quinasa dependiente de AMPc a partir de las 16 horas después de la infusión de la solución TAGH. Ello indicaría, al igual que en la regeneración hepática, la translocación de la subunidad catalítica al núcleo en donde desencadenaría algún proceso implicado en el inicio de la síntesis del ADN.

El origen del aumento de actividad citosólica protein quinasa dependiente de AMPc, durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática era desconocido hasta este momento, existiendo 2 hipótesis acerca de su origen: 1) Un incremento de la afinidad del enzima por el sustrato y



2) Un aumento del nº de moléculas enzimáticas.

Los resultados obtenidos a partir de estudios cinéticos, con muestras de citosol de ratas no operadas y regenerantes 16 horas, en función de diferentes concentraciones de AMPc, han demostrado que este aumento de actividad quinasa, observado entre las 14-16 horas posthepatectomía parcial es producido por un incremento del nº de moléculas; ya que la  $V_{max}$  es diferente para ambas cinéticas, mientras que la constante aparente de afinidad ( $K_m$ ) es semejante en los 2 casos (Figuras 4.4. y 4.5.).

Desde hace tiempo se conoce que después de practicar una hepatectomía parcial, se induce la síntesis de muchas enzimas y otras proteínas, todas ellas necesarias para llevar a cabo la respuesta regenerativa (Fausto, N., 1984). Con el objetivo de averiguar si el aumento de moléculas de protein quinasas dependientes de AMPc es causado en un incremento de su síntesis o si por el contrario a una translocación desde otros compartimentos celulares, se han llevado a cabo experimentos inyectando inhibidores de la transcripción y traducción a ratas regenerantes 4 horas antes de sacrificarlas. Los resultados obtenidos demuestran definitivamente que la ola de actividad de estas quinasas es producida por un aumento de la síntesis de dichas enzimas (Tabla VI y figura 4.6.).

En resumen podríamos concluir que el aumento de actividad citosólica protein quinasa dependiente de AMPc sería un factor importante, pero no esencial, para el desencadenamiento de la síntesis de ADN después de la

activación de la proliferación hepatocelular. La importancia de este acontecimiento respecto a la activación de la proliferación celular residiría básicamente en la translocación de las subunidades catalíticas de estas enzimas al núcleo en donde, como mínimo, fosforilarían la histona H1 hecho asociado con la descondensación de la cromatina. Por último y en el caso de la regeneración hepática posthepatectomía parcial, el aumento de actividad de estas enzimas en el citosol se debe a un incremento de la síntesis de estas proteínas y no por un cambio de afinidad de moléculas preexistentes.

### 5.3 RELACION DE LA CALMODULINA CON EL CONTENIDO DE AMPc Y CON LA ACTIVIDAD PROTEIN QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc EN EL CITOSOL DESPUES DE UNA HEPATECTOMIA PARCIAL.

Diversos trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio indican que la ola de calmodulina citosólica, iniciada a partir de las 6 horas de la regeneración hepática, está relacionada con el inicio de la biosíntesis del ADN así como con la desialización de glicoproteínas y gangliosidos de la membrana plasmática del hepatocito (Soriano, M. et al., 1985; Coll, M.J. et al., 1986). Cuando a las ratas hepatectomizadas se les inyecta una droga anticalmodulina, como por ejemplo la trifluoperacina, 4 horas después de la operación, se produce un retraso de unas 10 horas aproximadamente en el inicio de la síntesis de

ADN así como una notable pérdida de la sincronía en la entrada de los hepatocitos a la fase S de ciclo celular (Soriano, M. et al., 1984). Además esta droga causa igualmente un atraso de 10 horas en la aparición de la ola de calmodulina y en el inicio de la pérdida de ácido siálico en la región sinusoidal de la membrana plasmática. Posteriormente se ha demostrado que la calmodulina inhibe la actividad UDP-N-acetil 2'-epimerasa, enzima regulador de la vía biosintética del ácido siálico (Coll et al., enviado).

Así pues, dada la importancia de la ola de calmodulina en el control de algunos acontecimientos relacionados con el desencadenamiento de la respuesta proliferativa después de practicar una hepatectomía parcial, se ha intentado establecer una posible relación entre el segundo incremento de AMPc y la actividad protein quinasa dependiente de AMPc (observados a las 14 y 16 horas respectivamente después de la operación) con el aumento previo de calmodulina en el citosol.

Con este objetivo se ha estudiado el efecto de la trifluoperacina sobre ambos acontecimientos prerreplicativos.

Como se ha podido observar en el apartado 4.4.1., la inyección de trifluoperacina reduce en un 50% el contenido intracelular de AMPc a las 14 horas de la regeneración hepática. A pesar de ello los niveles de este nucleótido continúan significativamente más elevados que los

observados en ratas control. Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de AMPc tiene 2 componentes diferentes: uno sensible a la trifluoperacina y otro insensible. Sin embargo, al no conocer la concentración intracelular de trifluoperacina no podemos saber si el efecto de esta droga es específico sobre la calmodulina o si por el contrario afecta también a otros fenómenos celulares. En el caso de que el efecto sea específico, los resultados indicarían que parte de la síntesis de AMPc es debido a una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina y que la parte restante a una adenilato ciclasa no activable por calmodulina. De hecho se conoce desde hace tiempo la existencia de algunas adenilato ciclasas activables por calmodulina, concretamente estas enzimas se han encontrado en el cerebro, hígado, páncreas y médula adrenal (Brostrom et al., 1975; Cheung et al., 1975; Sharp et al., 1980; Le Donne y Coffee, 1979).

Así pues, podríamos postular que el incremento de la concentración de calmodulina en el citosol, entre las 6 y 12 horas de la regeneración hepática, es parcialmente responsable de la aparición de la segunda ola de acumulación de AMPc intracelular, observada posteriormente.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el apartado 4.4.2. indican que la trifluoperacina inhibe totalmente la aparición del aumento de actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol, a partir de las 14 horas posthepatectomía parcial. En el caso de que el

efecto de la trifluoperacina fuese específico sobre la calmodulina, estos resultados indicarían que probablemente la calmodulina estaría implicada en el desencadenamiento de la síntesis de estas enzimas, de manera semejante a lo que ocurre con la activación del gen de la prolactina (White, B.A., 1985).

Así, pues, en un principio estos resultados sugerirían que la calmodulina puede estar implicada en la activación de las protein quinasas dependientes de AMPc en el citosol.

Sin embargo, con la finalidad de estudiar si la trifluoperacina tiene algún efecto directo sobre la actividad protein quinasa dependiente de AMPc se han llevado a cabo una serie de experimentos con muestras de citosol de ratas no operadas en presencia, en el medio de incubación, de diferentes concentraciones de esta droga. Los resultados obtenidos demuestran que la trifluoperacina produce una inhibición de un 30% aproximadamente de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc, indicando por tanto que la inhibición de esta actividad enzimática en las ratas regenerantes y tratadas con esta droga puede ser también producida por una acción directa de la trifluoperacina sobre las protein quinasas. Así pues, la utilización de la TFP no permite averiguar la posible relación de la calmodulina con el desencadenamiento de la síntesis de protein quinasas dependientes de AMPc. Por tanto, es necesario buscar otro tipo de metodología que

permita clarificar el objetivo propuesto.

Posteriormente y con el objetivo de conocer el mecanismo por el cual la trifluoperacina inhibe la actividad protein quinasa dependiente de AMPc se han llevado a cabo estudios cinéticos con las diferentes subunidades de estas enzimas.

Los resultados descritos en el apartado 4.4.3. demuestran que la trifluoperacina causa una pérdida de afinidad de la subunidad catalítica por el sustrato, que en este caso es una mezcla de histonas preparadas comercialmente, y una ligera pérdida de afinidad de la subunidad reguladora por el AMPc.

Para establecer la presunta relación de la calmodulina con el aumento de actividad protein quinasa dependiente de AMPc durante el proceso regenerativo después de practicar una hepatectomía parcial, se han llevado a cabo experimentos alternativos con ratas tiroparatiroidectomizadas, las cuales presentan a las 72 horas de la operación una reducción de un 50% de la concentración de calcio en sangre. Como ya se había demostrado anteriormente las ratas hipocalcémicas y sometidas a una hepatectomía parcial no presentan el aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc ni pueden iniciar la duplicación del ADN (Sirkorska, M. et al., 1983; Sikorska, M. y Whitfield, J.F., 1985). La disminución de esta actividad quinasa es debida a que la hipocalcemia produce una deficiencia de la vitamina D<sub>3</sub> en

la sangre, la cual es un factor crítico en la regulación de la síntesis de la subunidad catalítica de las protein quinasas (Sikorska, M. y Whitfield, J.F., 1985). La inyección de 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> en el momento de la extirpación hepática restablece los niveles de estas quinasas en las ratas hipocalcémicas, aunque no se desencadena el inicio de la replicación del ADN.

Así pues, con estos precedentes se han cuantificado los niveles de calmodulina en el citosol de ratas hipocalcémicas y regenerantes a diferentes horas después de la hepatectomía parcial. Como se demuestra en la figura 4.13. las ratas tiroparatiroidectomizadas y sometidas a una hepatectomía parcial del 70%, presentan un aumento de calmodulina en el citosol similar al observado en los animales normocalcémicos, entre las 4-10 horas después de la intervención quirúrgica.

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos en el apartado 4.4.5. podemos postular que la ola citosólica de calmodulina no está relacionada con el aumento de la biosíntesis de protein quinasas dependientes de AMPc, a pesar de que la calmodulina pueda regular parcialmente los niveles de AMPc intracelulares.

#### 5.4. ESTUDIO DEL PATRON DE FOSFOPROTEINAS EN EL CITOSOL DESPUES DE UNA HEPATECTOMIA PARCIAL.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar, tanto en muestras de citosol de ratas no operadas como regenerantes, la fosforilación de proteínas dependiente de AMPc y la fosforilación dependiente de calcio y calmodulina.

Frecuentemente es difícil diferenciar entre las proteínas fosforiladas por quinasas dependientes de AMPc y las fosforiladas por las independientes de AMPc, pues entre estas últimas podrían aparecer proteínas fosforiladas por la subunidades catalíticas libres de las protein quinasas dependientes de AMPc o por quinasas estimuladas por el AMPc endógeno de la muestra.

Cuando las muestras de citosol de las ratas no operadas se incuban en presencia de EGTA y AMPc aparecen 8 fosfoproteínas cuyos pesos moleculares son 120 kd; 110-115 kd; 85-90 kd; 60-65 kd; 60 kd; 55 kd; 50 kd y 18-20 kd. (Figura 4.17). Probablemente éstas 8 proteínas sean sustratos específicos de las protein quinasas dependientes de AMPc.

Resultados semejantes han sido descritos por Van den Berg y colaboradores en 1980, los cuales encontraron que en presencia de AMPc se fosforilaban 11 proteínas citosólicas, no obstante al añadir al medio de incubación un inhibidor específico de las protein quinasas dependientes de AMPc, 7 de estas 11 fosfoproteínas desaparecían lo cual indica que

la fosforilación de estas 7 proteínas es dependiente de AMPc.

Las diferencias entre los resultados descritos por Van der Berg y los nuestros podrían explicarse si consideramos que el tiempo de incubación de la muestra es diferente en ambos estudios así como el tiempo de exposición de la película.

Entre los sustratos específicos de las proteínas quinasa dependientes de AMPc se han de destacar: las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la fosforilasa quinasa que corresponderían posiblemente a las fosfoproteínas de 120 kd. y 110-115 kd. y la subunidad reguladora del holoenzima II de las proteínas quinasa dependientes de AMPc cuyo peso molecular es de 56 kd. aproximadamente.

Sin embargo, ya que el tiempo de incubación del ensayo es relativamente largo probablemente no podamos detectar la subunidad R II, pues a pesar de fosforilarse a grandes velocidades, rápidamente y por un mecanismo desconocido, esta proteína se desfosforila.

Por otra parte se ha observado que las 6, 12, 16 y 20 horas después de practicar una hepatectomía parcial que el patrón de fosfoproteínas citosólicas se reduce considerablemente. A las 16 horas, momento de máxima actividad de las proteínas quinasa dependientes de AMPc únicamente la proteína de 65 Kd identificada como la piruvato quinasa se encuentra ligeramente fosforilada (Figura 4.18.).

Asimismo utilizando un segundo método alternativo para medir la cantidad de  $^{32}\text{P}$  incorporado a las proteínas endógenas de la muestra, el cual se basa en determinar la actividad protein quinasa dependiente de AMPc sin añadir en el medio de incubación las histonas como sustrato, se observa una gradual y significativa disminución de la incorporación del fósforo radiactivo (Figura 4.19.).

Estos resultados podrían explicarse de acuerdo a 2 hipótesis: 1) Diversos autores han demostrado que a partir de las 16 horas posthepatectomía parcial, la subunidad catalítica de las protein quinasas dependientes de AMPc transloca al núcleo donde fosforilaría diversas especies de la histona H1, así que en este momento probablemente queden pocas subunidades catalíticas capaces de fosforilar las proteínas citosólicas. 2) Como ya se ha descrito anteriormente entre las 14 y 16 horas después de una hepatectomía parcial es el momento de máxima actividad protein quinasa dependiente de AMPc y probablemente las proteínas citosólicas ya se encuentran fosforiladas no incorporando así, el fósforo radiactivo.

Si se incuban muestras de citosol de ratas no operadas en presencia de 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y en ausencia de AMPc, se observa la aparición de 2 nuevas fosfoproteínas de 100 y 72 kd., así como la desaparición de una proteína de 62 kd. (Figura 4.17.b). La adición al medio de incubación de 10  $\mu\text{M}$  de calmodulina purificada no modifica el patrón de fosforilación de las proteínas citosólicas (Figura 4.17.c).

Ello indicaría que el efecto de la calmodulina añadida queda enmascarado por la calmodulina presente en la muestra. No obstante, para poder diferenciar que proteínas se fosforilan exclusivamente dependientemente de calmodulina, la muestra se ha incubado en presencia de calcio, calmodulina y trifluoperacina. La adición de esta droga anticalmodulina produce la desaparición de la banda de 100 kd. Así, pues, estos resultados indicarían que la fosforilación de esta proteína es dependiente de calmodulina (Figura 4.17.d).

Se ha descrito en varios tejidos la existencia de una proteína citosólica de 100 kd. que al aparecer, a excepción del músculo esquelético, es el principal sustrato para alguna proteína quinasa dependiente de calmodulina (Drust, D.S. y Martin, T.F.J., 1982; Clive Palgrey, 1983). No se conoce por ahora ni las características ni la función que desempeña tal proteína pero se descarta que puede estar relacionada con la glucógeno fosforilasa cuyo peso molecular es de 97 kd.

Durante el proceso de la regeneración hepática, el patrón de fosfoproteínas dependiente de calcio y calmodulina es semejante al observado en ratas control, aunque puede detectarse: a) una disminución general de la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a las 6 y 12 horas después de la hepatectomía parcial, b) desaparición de la fosfoproteína de 100 kd. y c) la aparición de una nueva proteína cuyo peso molecular es de 85 kd. (Figura 4.20.).

Como ya se ha mencionado anteriormente entre las 6 y las 12 horas posthepatectomía parcial se produce un aumento de la concentración citosólica de calmodulina. Probablemente entre las diversas funciones que desempeñaría la calmodulina en el citosol, una sería la de activar protein quinasas dependientes de calcio y calmodulina, las cuales se encargarían de fosforilar las proteínas citosólicas y por tanto estas, una vez fosforiladas ya no podrían incorporar el fósforo radioactivo.

#### **5.5. RELACION DEL AUMENTO DE CALMODULINA Y EL DESENCADENAMIENTO DE LA DUPLICACION DEL ADN.**

Es importante recordar que después de realizar una hepatectomía parcial, se observa un aumento de la concentración citosólica de calmodulina, cuyo valor máximo se alcanza entre las 8 y 12 horas postintervención quirúrgica (Soriano, M. et al. 1985; Piñol, M.R., 1986). A partir de las 12 horas los niveles de calmodulina empiezan a disminuir hasta alcanzar los valores control a las 16 horas de la regeneración hepática. Esta disminución de calmodulina citosólica podría ser debida a 3 causas principalmente: a) Aumento de la degradación. b) A la unión de la proteína a membranas. c) A la translocación al núcleo.

Respecto a la primera posibilidad, hasta la actualidad no existen evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis. La segunda posibilidad queda descartada pues se ha demostrado que los niveles de calmodulina asociada a la fracción particulada no se modifican a lo largo del período prerreplicativo de la regeneración hepática (MacManus, 1981). Por último la tercera hipótesis ha sido propuesta por Boynton et al., 1980, y está apoyada por algunas evidencias experimentales: a) Por la existencia en el núcleo de las células hepáticas de un "pool" de calmodulina, que según parece podría estar regulado por diversas hormonas (Harper et al., 1980; Bachs y Carafoli, 1987). b) Si se inyecta trifluoperacina a las 16 horas posthepatectomía parcial se produce una importante disminución de la síntesis de ADN. Sugiriendo por tanto que esta droga afectaría selectivamente a la calmodulina que estuviese en estos momentos translocando al núcleo. Sin embargo, si se inyecta a las 20 horas de la operación, la síntesis de ADN apenas queda afectada ya que prácticamente toda la calmodulina citosólica ya habría translocado al núcleo (Piñol, M.R., 1986). Finalmente esta hipótesis quedaría confirmada por los resultados presentados en el apartado 4.5. de este trabajo, en el que se han cuantificado los niveles de calmodulina en el núcleo de hepatocitos, así como en las diferentes subfracciones nucleares, de ratas sometidas a una hepatectomía parcial. La concentración de calmodulina nuclear a las 24 horas de la regeneración hepática es 3 veces más elevada que la

observada en animales no operados. En las ratas control la calmodulina se encuentra localizada preferentemente en las fracciones  $S_1$  y matriz nuclear (MN). A las 24 horas después de la hepatectomía parcial la concentración de calmodulina asociada a la MN es una 3,5 veces más elevada que la observada en la MN de los animales no operados, mientras que la localizada en la fracción  $S_2$  es 4 veces más baja y la localizada en la fracción  $S_1$  prácticamente no se modifica (Tabla X). Resumiendo, estos resultados indicarían que durante la fase replicativa de la regeneración hepática se produce un aumento de la concentración de calmodulina en el núcleo, y más concretamente asociada a la envoltura nuclear.

Además tal y como se puede observar en la tabla XI, los niveles de calmodulina unida a la matriz nuclear empiezan a incrementar a partir de las 12 horas después de la hepatectomía parcial, coincidiendo con el momento en que la concentración de esta proteína comienza a disminuir en el citosol.

Mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas, empleando anticuerpos anticalmodulina, se han obtenido resultados similares que apoyarían esta hipótesis. Los núcleos estacionados en la fase  $G_0$  presentan un patrón de calmodulina difuso en forma de agregados intranucleares, mientras que en los núcleos que se encuentran en fase proliferativa se observa un ligero aumento de la tinción y una estrecha asociación de la calmodulina a la envoltura nuclear (Ver figura 4.14.).

Esta redistribución de la calmodulina no se ha de atribuir a ningún artefacto en el modo de obtención de núcleos, ya que se han realizado incubaciones sobre cortes de hígado procedente de ratas no operadas y regenerantes 24 horas, obteniéndose en cada caso, un patrón de distribución idéntico al observado en los núcleos aislados.

¿Qué factor o factores podrían ser responsables de la redistribución de la calmodulina intranuclear durante la fase replicativa de la regeneración hepática?

Una posible respuesta podría ser una variación de la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el núcleo. Se sabe desde hace tiempo que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son necesarios para la iniciación de la duplicación del material genético (Whitfield et al., 1985). Los experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio indican que cuando se incuban núcleos de hepatocitos, de ratas no operadas, con concentraciones superiores o iguales a  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , se observa el mismo tipo de distribución de la calmodulina que en los núcleos de ratas regenerantes 24 horas.

Actualmente existen muchas evidencias que indican que la duplicación del ADN en las células eucariotas es un proceso asociado a la matriz nuclear (Nelson, W.C., 1986). Además se ha descrito que las enzimas replicativas, como la DNA polimerasa  $\alpha$ , la DNA primasa, la 3'5' exonucleasa, RNA<sub>III</sub> H y la DNA metilasa, se asocian fuertemente a la matriz nuclear durante la regeneración hepática, al igual que la calmodulina, de manera que no pueden ser desprendidas a elevadas concentraciones de  $\text{ClNa}$  (Smith y

Berezney, 1980; 1982; 1983; Tubo et al. 1985; Tubo y Berezney, 1986). Esta asociación de la calmodulina y de las enzimas replicativas con la matriz nuclear, lugar donde se cree que se localizan los replisomas, sugeriría que ésta proteína podría estar implicada en algún mecanismo de regulación de la actividad de estas enzimas y por tanto sea un acontecimiento imprescindible para la iniciación de la duplicación del ADN.

El estudio de la modificación de los receptores de la calmodulina en el núcleo de hepatocitos, durante la regeneración hepática, indican que en la matriz nuclear hay una disminución de los receptores de 120, 60 y 65 kd., mientras que los de 150 y 130 kd. están muy incrementados. No obstante, no existen por el momento evidencias experimentales acerca de las posibles funciones de estos receptores en el núcleo, aunque se ha detectado que uno de los receptores es inhibidor de la fosforilación (Bachs y Carafoli, 1987).

Por último, y para acabar la discusión presentamos un esquema que recoge los resultados obtenidos y en el que se destaca el papel central que juegan la calmodulina y el AMP cíclico en el desencadenamiento de la replicación del ADN.

En primer lugar, hay que mencionar que la primera acumulación intracelular de AMP cíclico observada entre las 2 y las 4 horas posthepatectomía parcial (1) es debida a un incremento de la actividad Adenilato ciclasa, presente en

la membrana plasmática. El incremento de la actividad de esta enzima parece ser debida a una elevación de su sensibilidad por las hormonas tiroideas.

El incremento de la concentración de AMP cíclico dispararía la síntesis de calmodulina a partir de las seis horas de la regeneración hepática (2). Esta calmodulina realiza una gran variedad de funciones, por un lado interviene en la fosforilación de algunas proteínas (3), probablemente a través de la activación de alguna proteína quinasa dependiente de calmodulina. Por otro lado, la calmodulina activaría la adenilato ciclasa produciendo una segunda acumulación intracelular de AMP cíclico que presenta el valor máximo a las 14 horas después de la intervención quirúrgica (4). Finalmente, la calmodulina transloca al núcleo, probablemente a partir de las 8 horas (5). No hay que olvidar que además de estas funciones estudiadas en esta Tesis, la calmodulina también interviene en la desorganización del citoesqueleto y en la regulación de la desialización de la membrana plasmática (Coll et al., en prensa; Kakiuchi, S. y Sobue, K., 1983; Piazza, G.A. y Wallace, R.W., 1985).

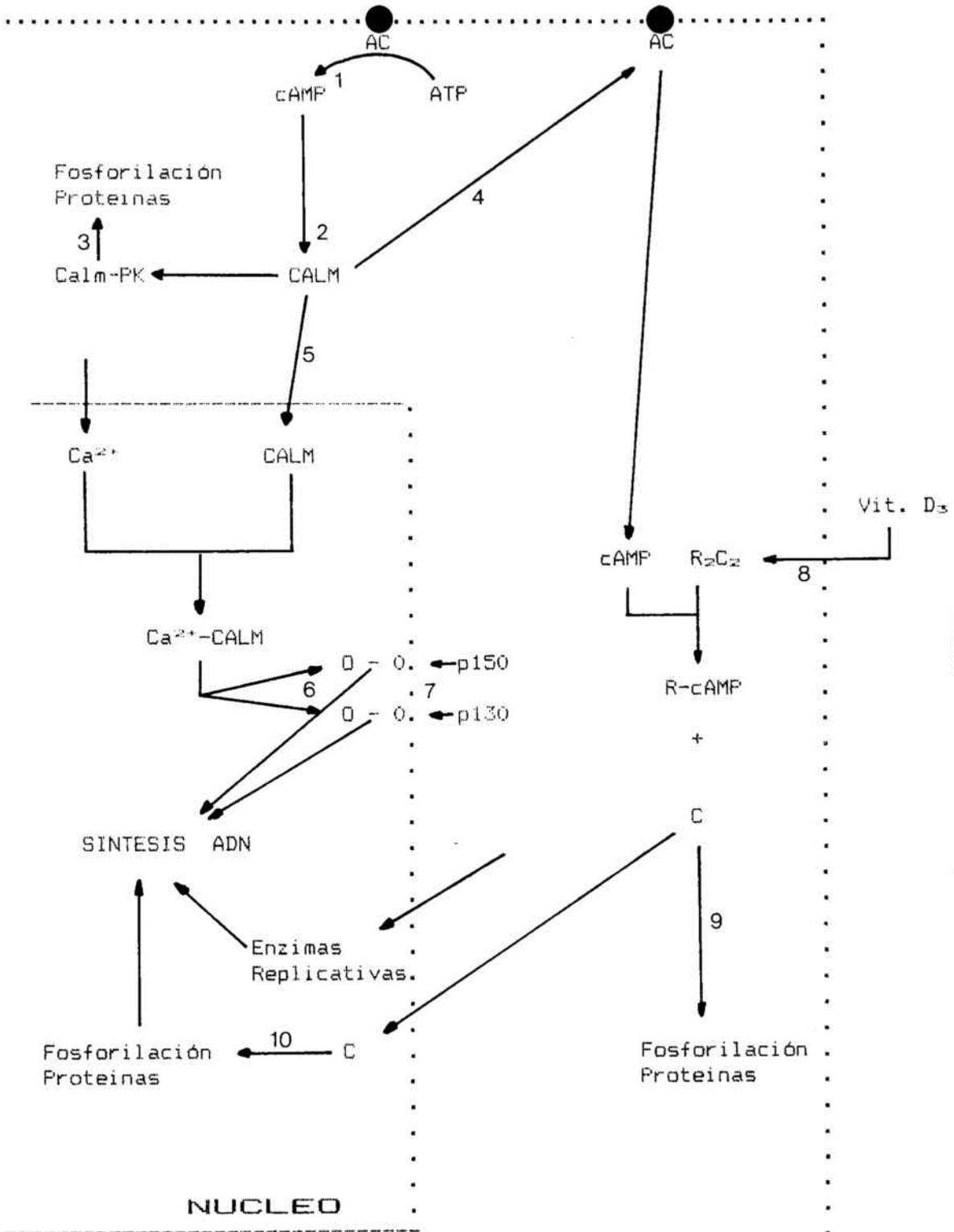
La calmodulina nuclear, probablemente debido al incremento de la concentración intranuclear de calcio se redistribuye asociándose mayoritariamente con la matriz nuclear, estructura en la que se encuentran las enzimas replicativas y en la que por consiguiente se realiza el proceso de replicación del ADN (6). en la matriz nuclear también se observa, además del incremento de calmodulina,

el incremento de dos de sus receptores, uno de 150 kDa y otro de 130 kDa (7).

La segunda acumulación intracelular de AMP cíclico que tal como hemos mencionado puede ser causada por la activación de la adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, coincide en el tiempo con una acumulación citosólica de protein quinasas dependientes de AMP cíclico que es producida por el aumento de su síntesis. Hay que destacar que este incremento de la síntesis de protein quinasas no está regulado por la ola citosólica de calmodulina sino que es dependiente de los niveles de vitamina D<sub>3</sub> (8). La unión del AMP cíclico con la subunidad reguladora de las protein quinasas produce la liberación de la subunidad catalítica que por un lado interviene fosforilando proteínas citosólicas (9) y por otro lado trnsloca al núcleo donde también fosforila proteínas entre las que hay que destacar algunas especies de la histona H1 (10).

Además de lo ya mencionado, hay que comentar que en el núcleo, concretamente en la matriz nuclear, previamente al inicio de la replicación del ADN se acumulan también las enzimas replicativas y los desoxirribonucleótidos precursores.

La conjunción de todos estos acontecimientos conduce a la iniciación de la síntesis del ADN.



## 6. CONCLUSIONES

1. La inyección de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico, como el dl propanolol, una hora después de realizar una hepatectomía parcial, produce una disminución de un 80% aproximadamente de los niveles de calmodulina en el citosol; indicando por tanto que el primer incremento de la concentración de AMPc intracelular es responsable del aumento de calmodulina citosólica durante la regeneración hepática.

2. Después de practicar una hepatectomía parcial en la rata puede observarse un incremento de la actividad citosólica protein quinasa dependiente de AMPc, cuyo valor máximo se alcanza a las 16 horas de la intervención quirúrgica.

3. Durante la fase prerreplicativa después de administrar la solución TAGH no se produce ningún aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol, sino que por el contrario se detecta una ligera disminución de esta actividad quinasa a partir de las 16 horas de la infusión.

4. Estudios cinéticos de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en función de diferentes concentraciones de AMPc, con muestras de citosol de ratas control y regenerantes de 16 horas, indican que el aumento de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc durante la regeneración hepática es debido a un incremento del nº de moléculas enzimáticas.

5. La administración de inhibidores de la transcripción y traducción (Actinomicina D y Cicloheximida) a las 12 horas después de una hepatectomía parcial provoca una disminución de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol, a las 16 horas de la regeneración hepática. Concluyendo por tanto, que la ola de actividad protein quinasa dependiente de AMPc es producido a un aumento de la síntesis de esta molécula.

6. La administración de trifluoperacina (droga anticalmodulina) 4 horas después de una hepatectomía parcial, produce una disminución de un 50% de la concentración de AMPc intracelular entre las 12-14 horas de la regeneración hepática. Estos resultados indicarían que el aumento de calmodulina en el citosol puede ser en parte responsable de la aparición de la segunda ola de acumulación de AMPc observada a partir de las 12 horas posthepatectomía parcial.

7. La administración de trifluoperacina 4 horas después de una hepatectomía parcial produce una total inhibición de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc entre las 14 y 20 horas de la regeneración hepática.

8. La actividad protein quinasa dependiente de AMPc determinada a partir de muestras de citosol de ratas control en presencia de diferentes concentraciones de TFP es aproximadamente un 40% más baja que la determinada en

muestras de citosol de ratas control en ausencia de dicha droga.

9. Los estudios cinéticos en función de diferentes concentraciones de AMPc, realizados con la subunidad reguladora de las protein quinasas dependientes de AMPc en presencia y en ausencia de 20  $\mu$ M de TFP indican que esta droga produce una ligera pérdida de afinidad de la subunidad reguladora por este nucleótido cíclico.

10. Los estudios cinéticos realizados con la subunidad catalítica de las protein quinasas dependientes de AMPc en función de diferentes concentraciones de histonas, tanto en presencia como en ausencia de 20  $\mu$ M de TFP, indican que esta droga produce una pérdida de afinidad de un 25% aproximadamente de la subunidad catalítica por el sustrato.

11. A partir de las conclusiones octava, novena y décima podríamos postular que la disminución de la actividad protein quinasa dependiente de AMPc en el citosol observada en las ratas regenerantes y tratadas con trifluoperacina es producida por una interacción directa de esta droga sobre el enzima. Concretamente la TFP provocaría una pérdida de afinidad de la subunidad catalítica por las histonas y de la subunidad reguladora por el AMPc.

12. Las ratas hipocalcémicas y sometidas a una hepatectomía parcial presentan un incremento de la concentración

citósica de calmodulina cuyos valores máximos se alcanzan entre las 8-12 horas después de una hepatectomía parcial. Sin embargo estas ratas carecen de la ola de actividad protein quinasa dependiente de AMPc después de someterlas a una hepatectomía parcial, sugieriendo por tanto, que estos 2 acontecimientos son independientes entre si.

13. La concentración de calmodulina en el núcleo de ratas regenerantes empieza a aumentar a partir de las 12 horas de la hepatectomía parcial y se hace máxima a las 24 horas. Preferentemente esta calmodulina se halla asociada a la matriz nuclear. Estos resultados confirman la translocación de la calmodulina desde el citosol hacia el núcleo de los hepatocitos durante la regeneración hepática.

14. Mediante la utilización de técnicas de "overlay" se pueden identificar 8 receptores de calmodulina en el núcleo de ratas no operadas. Dos en la fracción S1 uno en la fracción S2 y cinco en la matriz nuclear.

15. En las ratas regenerantes de 24 horas no se observan diferencias en los receptores de las fracciones S1 y S2. Sin embargo en la matriz nuclear, dos de los cinco receptores están muy incrementados y tres se encuentran claramente muy disminuidos.

16. En el patrón de fosforilación dependiente de AMPc en el citosol de ratas no operadas pueden observarse 8 proteínas

fosforiladas cuyos pesos moleculares oscilan entre los 120 y 18 Kd. Sin embargo el patrón de fosforilación de proteínas citosólicas en presencia de AMPc durante la regeneración hepática muestra una clara disminución de la incorporación de  $^{32}\text{P}$  destacándose únicamente una fosfoproteína de 65 Kd.

17. En las muestras de citosol procedentes de ratas no operadas e incubadas con concentraciones de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden observarse la aparición de 2 nuevas fosfoproteínas cuyos pesos moleculares son de 100 Kd. y 72 Kd, y la desaparición de una fosfoproteína de 62 Kd. La adición de calmodulina en el medio de incubación no modifica el patrón de fosforilación.

18. Si estas mismas muestras de citosol se incuban además de la calmodulina y el calcio con trifluoperacina, se observa la desaparición de la fosfoproteína de 100 Kd, indicando por tanto que su fosforilación es dependiente exclusivamente de calmodulina.

19. El patrón de fosforilación dependiente de calcio y calmodulina a las 6, 12 y 16 horas de la regeneración hepática es similar al observado en ratas control, no obstante cabe señalar una disminución general de la incorporación de  $^{32}\text{P}$ , la desaparición de la banda de 100 Kd y la aparición de una nueva fosfoproteína de 85 Kd.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Alison, M.R. Hepatic growth control. Physiological Reviews 66(3) 499-541, 1986.

Bachrach, U. The induction of ornithine decarboxylase in normal and neoplastic Cell. En: Polyamines in Biomedical Research, J.Gaugas Eds. J.Wiley and sons, London, New York, 81-107, 1979.

Bachs, O. Canvis a la membrana plasmatica de l'hepatocit durant la fase prerreplicativa de la regeneració hepatica després d'una hepatectomia parcial. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1983.

Bachs, O. y Carafoli, E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in liver cell nuclei. J. Biol. Chem. 262: 10786-10790, 1987.

Bachs, O.; Enrich, C.; Soriano, M.; Piñol, M.R. y Domingo J. Induction of plasma membrane alkaline phosphatase in rat liver. Cell Biochem. Funct. 3, 95-100, 1985.

Balayew, A. Y Tilghman, S.M. Mol. Cell Biol. 2, 1427-1435, 1982.

Barbason y Le lievre. Influence du rythme de l'activite circadienne sur les diferents phases du premier cycle cellulaire suivant une hepatectomie partielle. C.R. Acad. Sc. Paris 271, 1798-1801, 1970.

Bolton A.E. y Hunter, W.M. The labelling of proteins to high specific Radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$ -containing Acylating Agent. Biochem J. 133, 529-539, 1973.

Boynton, A.L.; Kleine, L.P. y Whitfield, J.F. Cyclic AMP elevators stimulate the initiation of DNA synthesis by calcium-deprived rat liver cells. En: Control of animal Cell proliferation. Vol I. Eds. Boynton, A.L., Leffert, H.L. Academic Press Inc. New York. 121-149, 1985.

Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. The cyclic AMP-dependent initiation of DNA synthesis by T51B rat liver epithelioid cells. J. Cell. Physiol. 101, 139-149, 1979.

Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. A possible involvement of type II cAMP-dependent protein Kinase in initiation of DNA synthesis by rat liver cells. Exp. Cell Research, 126, 477-481, 1980.

Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. Possible involvement of arachidonic acid in the initiation of DNA synthesis by rat liver cells. Exp. Cell Res. 126: 477-481, 1980.

Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. Stimulation of DNA synthesis in calcium deprived T51B liver cells by the tumor promoters phenobarbital saccharin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Res 40, 4541-4545, 1980.

Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. Calmodulin and cyclic AMP-dependent protein Kinases mediate calcium-induced stimulation of DNA synthesis by rat liver cells. Adv. Cyclic Nucleotid Res 14, 411-419, 1981.

Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. The role of cyclic AMP in cell proliferation. A critical assessment of the evidence. En: Advances in cyclic nucleotide Research. Eds. P. Greengard and G. A. Robison, Raven Press New York. Vol. 15, 193-294, 1983.

Boynton, A.L.; Whitfield, J.F. y MacManus, J.P. Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells. Biochem. Biophys. Res. Commun 95, 745-749, 1980.

Boynton, A.L.; Whitfield, J.F.; MacManus, J.P.; Armato, U.; Tsang, B.K. y Jones, A. Involvement of cAMP and cAMP dependent protein Kinase in the initiation of DNA synthesis by rat liver cells. Exp. Cell. Research 135, 199-211, 1981.

Broston, C.O.; Huang, Y.C.; Breckenridge, B.M. y Wolff, D.J. Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulation of brain adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 64-68, 1975.

Brues, A.M.; Drary, D.R. y Brues, M.C. A quantitative study of cell growth in regenerating liver. Arch. Path. 22 (5), 658, 1936.

Bucher, N.L.R. Experimental aspects of hepatic regeneration. New. Engl. J. Med. 277, 686, 1967.

Bucher, N.L.R. y Malt, R.A. Regeneration liver and kidney. New England Journal of Medicine. Medical progress series Edts. Little Brown and company, 1971.

Bucher, N.L.R., McGowan, J.A. y Russel, W.E. Nerve, organ and tissue regeneration. Research perspectives Academic Press, New York, 445-469, 1983.

Bucher, N.L.R. y Swaffield, M.N. Rate of incorporation of labelled thymidine into deoxyribonucleic acid of regeneration rat liver in relation to amount of liver excised. Cancer Res. 24, 1611-1625, 1965.

Bucher, N.L.R.; Swaffield, M.N. y Di Troia, J. F. The influence of age upon the incorporation of thymidine <sup>14</sup>C into the DNA of regenerating rat liver. Cancer Res 24 (3), 509, 1964.

Butley, S.M.; Stoner, G.D.; Beer, D.G.; Beer, D.S.; Mason, R.J. y Malkinson, A.M. Changes in cyclic adenosine 3'5'-Monophosphate dependent protein Kinases during de progresion of urethan-induced mouse lung tumors. Cancer Res 45, 3677-3685, 1985.

Byus, C.V.; Hedge, G.A. y Russell D.H. The involvement of cyclic AMP-dependent protein Kinase (s) in the induction of ornithine decarboxilase in the regenerating rat liver and in the adrenal gland after unilateral adrenalectomy. Biochem. Biophys. Acta 498, 39-45, 1977.

Byus, C.V.; Trevillyan, J.M.; Cavit, L.J. y Fletcher, W.H. Activation of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate dependent protein Kinase in H35 Hepatoma and Chinese Hamster Ovary cells by phorbol ester tumor promoter. Cancer Res. 43, 3321-3326, 1983.

Carter, D.B.; Holmes, B.E. y Mee, L.K. Cell division and nucleic and synthesis in the regenerating liver of the rat. Acta radiol. 46, 655-667, 1956.

Chafouleas, J.G.; Bolton, W.E.; Hidaka, H., Boyd III, A.E. y Means, A.R. Calmodulin and de cell cycle: involvement in regulation of cell-cycle progression. Cell 28, 41-50, 1982.

Chafouleas, J.G.; Dedman, J.R.; Munjall, R.P. y Means, A.R. Calmodulin: development and application of a sensitive radioimmunoassay. J.Biol. Chem. 254, 10262-10267, 1979.

Cheung, W.Y.; Bradham, L.S.; Lynch, T.J.; Lin Y.M. and Tallant, E.A. Biochem. Biophys Res Commun 66, 1055- 1062, 1975.

Cho-Chung, Y. S. Cyclic AMP and its receptor protein in tumor growth regulation in vivo. J. Cyclic Nucleotide Res. 6: 163-177, 1980.

Cho-Chung, Y.S. On the mechanism of cyclic AMP-mediated growth arrest of solid tumors. Adv. Cyclic nucleotide Res., 12, 111-121, 1980.

Clive Palfrey, H., Presence in many mammalian tissues of an identical major cytosolic substrate (Mr 100.000) for calmodulin-dependent protein kinase. FEBS Lett. 157 (1), 183-190, 1983.

Cohen, P. The subunit structure of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase, and the molecular bases of this activation reactions. Eur. J. Biochem. 34, 1, 1973.

Coll, M.J.; Bachs, O.; Domingo, J.; Serratosa, J. y Enrich, C. Modificación del contenido de ácido siálico de la membrana plasmática en la proliferación hepatocelular. Revista Española de fisiología 42, 435-440, 1986.

Coll, M.J.; Enrich, C.; Domingo, J.; Pujol, M.J. y Bachs, O. Reduced levels of sialic acid in the plasma membrane during hepatocellular proliferation. Biochim. Biophys. Acta (en prensa).

Coll, M.J.; Serratosa, J.; Bachs, O.; Gahmberg, O.G. y Enrich, C. Calmodulin may decrease cell surface sialic acid and be involved in the expression of fibronectin during liver regeneration. FEBS Lett. 208; 418-422 (1986).

Cooper, J.A. y Hunter, T. Regulation of cell growth and transformation by tyrosine-specific protein kinases: the search for important cellular substrate proteins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 107: 125-161, 1983.

Corbin, J.D.; Keely, S.L. y Park, C. R. The distribution and dissociation of cAMP dependent protein kinase in adipose, cardiac and other tissues. J. Biol. Chem. 250: 218-225, 1975.

Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; West, L.; Flockhart, D.A.; Lincoln, T.M. y McCarthy, D. Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart cAMP dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 253, 3997-4003, 1978.

Cruise, J.L.; Houck, K.A. y Michalopoulos, G.K. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of  $\alpha_1$ Adrenoreceptor by Norepinephrine. Science 227, 749-751, 1985.

Deluca, H.F. Vitamin D: metabolism and Function. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1979

Drust, D.S. y Martin, T.F.J. Thyrotropin-releasing hormone rapidly and transiently stimulates cytosolic calcium dependent protein phosphorylation in GH<sub>3</sub> pituitary cells. J. Biol. Chem. 257, 7566-7573, 1982.

Doskeland, S.O. Evidence that rabbit muscle protein kinase has two kinetically distinct binding sites for adenosine 3'5' - cyclic monophosphate. Biochem. Biophys Res Commun. 83, 542-549, 1978.

Earp, H.S. y O'Keefe, E.J. Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. J. Clin. Invest. 67, 1580-1583, 1981.

Ebersolt, C.; Perez, M. y Bockaert, J. Brain Res 213, 139-150, 1981.

Enrich, C.; Bachs, O.; Soriano, M. y Serratosa, J. Changes in sinusoidal plasma membrane enzyme activities during the pre-replicative phase of liver regeneration. Biochim. Biophys. Acta 861, 381-384, 1986.

Enrich, C. y Gahmberg, C.G. Prereplicative changes of the rat sinusoidal plasma membrane glycoproteins during hepatic regeneration. FEBS Lett. 181, 12-16, 1985.

Evans, W.H. A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. Biochim. Biophys. Acta 604, 27-64, 1980.

Fabrikant, J.I. The spatial distribution of parenchymal cell proliferation during regeneration of the liver. Johns Hopkins Med. Bull. 120, 137-147, 1967.

Fabrikant, J.I. Studies of cell population kinetics in the regenerating liver. Nat. Cancer Inst. Monogr. 30, 169, 1969.

Fabrikant, J.I. The Kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. J.Cell. Biol. 36, 551-565, 1968.

Fausto, N. Messenger RNA in regenerating liver: Implications for the understanding of regulated growth. Mol. Cell Biochem. 59, 131-147, 1984.

Fausto N. y Butcher F.R. Cyclic nucleotide levels in regenerating liver. Biochim. Biophys. Acta 428, 702-706, 1976.

Fehlmann, M.; Le Cam, A. y Freychet, P. Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 254: 10431-10437, 1979.

Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. Regulatory mechanisms in the control of protein kinases. Critical Reviews in Biochemistry, 133-186, 1982.

Foster, K.A. y Collins, J.M. The interrelation between DNA synthesis rats and DNA polimerases bound to the nuclear matrix in sychronized HeLa cells. J. Biol. Chem. 260, 4229-4235, 1985.

Friedman, J.M.; Chung, E. y Darnell, Jr. J.E. Gene expression during liver regeneration. J. Mol. Biol. 179, 37-53, 1984.

Garrard, W.T.; Kidd, G.H. y Bonner, J. Histone phosphrylation during liver regeneration. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1219-1224, 1976.

Gerhard, H.A. A quantitative model of cellular regeneration in rat liver after partial hepatectomy. En Liver regeneration after experimental injury. Eds. R. Lesch y W. Reutter, New York, Grune y Stratton, 340-346, 1975.

- Gilliam, J.M.; Johnson, E. y McCay, P.B. Rapid fluctuation of specific fatty acids in regenerating liver. Fed. Proc. 27, 549, 1968.
- Gilman, A.G. Protein Binding Assays for cyclic nucleotides. Advances in cyclic Nucleotide Research, Vol.2, 9-23, 1972.
- Glende, E.A. y Morgan, W.S. Alteration in liver lipid and lipid fatty acid composition after partial hepatectomy in the rat. Exp Mol. Pathol. 8: 190-200, 1968.
- Goss, R.S. Kinetics of compensatory growth. Quart. Rev. Biol. 40, 123-128, 1965.
- Goyette, M.; Petropoulos, C.J.; Shank, P.R. y Fausto, N. Expression of cellular oncogene during liver regeneration. Science 219: 510-512, 1983.
- Grisham, J.W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidina H-3. Cancer Res. 22: 842-849, 1962.
- Grisham, J.W. Hepatocytic proliferation in normal rats after multiple exchange transfusions with blood from partially hepatectomized rats. Cell Tissue kinetic. 2: 277-282, 1969.
- Guidotti, G.G. The regulation of aminoacid transport in animal cell. Biochim. Biophys. Acta 515, 329-366, 1978.
- Harper, J.F.; Cheung, W.Y.; Wallace, R.W.; Huang, H.L.; Levine, S.N. y Stainer, A.L. Localization of calmodulin in rat tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 366-371, 1980.
- Hayakawa, T.; Perkins, J.P.; Walsh, D.A. y Krebs, E.G. Physicochemical properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. Biochemistry 12, 567, 1973.
- Higgins, G.M. y Anderson, R.M. Experimental pathology of the liver. Arch. Pathol. 12, 186-202, 1931.
- Hoppe, J. cAMP-dependent protein kinases: conformational changes during activation. Trends in Biochem. Sci. Vol.10 (1), 29-31, 1985.
- Hoppe, J. y Wagner, K.G. Trends in Biochem. Sci. 4, 282-285, 1979.
- Johnson, J.D.; Epel, D. y Paul, M. Intracellular pH and activation of sea archin eggs after fertilization. Nature, 262, 661-664, 1976.

- Jungermann, K. y Sasse, D. Heterogeneity of liver parachymal cells. Trends in Biochem. Sci. 198-202, 1978.
- Kakiuchi, S. y Sobue, K. Control of cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding proteins. Trends in Biochem. Sci. 8, 59-62, 1983.
- Katada, T.; Gilman, A.G.; Watanabe, Y.; Bavers, S. y Jakobs, K.H. Protein Kinase C phosphorylate the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component and apparently supresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. Eur. J. Biochem. 151, 431-437, 1985.
- Kato, H. y Shimazu, T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. Eur. J. Biochem. 134, 473-478, 1983.
- Kaufman, S.H. y Shaper, J.H. A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl cross-linking reagent tetrathionate. Polipeptides of the internal nuclear matrix. Experimental Cell Research 155, 477-495, 1984.
- Katz, N. Correlation between rates and enzyme levels of increased gluconeogenesis in rat liver and kidney after partial hepatectomy. Eur. J. Biochem. 98, 535-542, 1979.
- King, A.L. y Kahm, Cr. Effect of insulin on growth in vivo and cells in culture. En: Control of animal cell proliferation, Vol.1 Boynton, A.L. y Leffert, H.L. (Eds.), 201-249, 1985.
- Koide, Y.; Earp, H.S., Ong, S. y Steiner, A.L. Alterations in intracellualr distribution of GMPc and guanylate ciclase activity during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 253, 4439-4445, 1978.
- Kondrashin, A.A. Cyclic AMP and regulation of gene expression. Trends in Biochem. Sci. 97-98, 1985.
- Krebs, E.G.; Love, D.S.; Bratvold, G.E.; Trayser, K.A.; Meyer, W.L. y Fischer, E.H. Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b kinase. Biochemistry 3, 1022, 1964.
- La Brecque, D.R. y Bachor, N.R. Hepatic stimulator substance physicochemical characteristics and specificity. Am. J. Physiol. 242 (gastroinles liver physiol.5) G 281-G288, 1982.
- La Brecque, D.R. y Pesch, L.A. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. J. Phisiol. Lond. 248: 273-284, 1975.

La Brecque, D.R.; Wilson, M. y Fogerty, S. Stimulation of HTC hepatoma cell growth in vitro by hepatic stimulator substance (HSS) Exp. Cell. Res. 150, 419-429, 1984.

Lacks, M.S.; Harrison, J.J.; Schwoch, G. y Jungmann, R.A. Modulation of nuclear protein kinase activity and phosphorylation of histone H1 subtypes during the prereplicative phase of rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 256 (26), 8775-8785, 1981.

Laks, M.S. y Jungmann, R.A. Prereplicative modulation of nuclear protein kinase in the regenerating rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 697-703, 1980.

Laemmly, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227, 680-685, 1970.

Lajtha, L.G. On concept of the cell cycle. J. Cell. Comp. Physiol. 62, Suppl. 1: 143-145, 1963.

Lanzetta, P.A.; Alvarez, L.J.; Reinach, P.S. y Candia, O.A. A improved assay for nanomole amount of inorganic phosphate. Anal. Biochem. 100, 95-97, 1979.

Lau, L.F. y Nathans, D. Identificating of a set of genes expressed during G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> transition of cultured mouse cells. EMBO J. 4, 3145-3151, 1985.

Le Donne, N.C. Jr. and Coffee. Inability of paralbumin to function as calcium dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. J. Biol. Chem. 254, 4317-4320, 1979.

Leffert, H.L. Glucagon its role in physiology and clinical medicine. Eds. Foa, P.O.; Bajaj, J.S. y Foa, N.L. Springer Verlag, Berlin, 305-319, 1977.

Leffert, H.L. y Koch, K.S. Growth regulation by sodium ion influxes. En: Control of animal cell proliferation, Vol. I Boynton, A.L. y Leffert, H.L. Eds. 367-413, 1985.

Leoni, S., Luly, P., Mangiantini, M.T.; Spagnudo, S.; Trentalance, A. y Verna, R. Hormone responsiveness of plasmic membrane-bound enzymes in normal and regeneration rat liver. Biochim. Biophys. Acta 394, 317-322, 1975.

Liozner, L.D. Age and Regenerative capacity. En: Organ regeneration. A study of developmental Biology in mammals. A Study in soviet science. Eds. Consultants Bureau, 1974.

Levin, R. M. y Weiss, B. Binding of trifluoperazine to the ca-dependent activator of cyclic nucleotides phosphodiesterase. Mol. Pharmacol. 13, 690-697, 1977.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.

MacMahon, J.B.; Malan-Shibley, L. y Iype, P.T. Distribution and subcellular localization of hepatic proliferation inhibitor in rat liver. J. Biol. Chem. 259, 1803-1806, 1984.

MacManus, J.P. y Braceland, B.M. A connection between the production of prostaglandins during liver regenerating and the DNA synthetic response. Prostaglandins 11: 609-620, 1976.

MacManus, J.P.; Braceland, B.M.; Rixon, R.H.; Whitfield, J.F. y Morris H.P. An increase in calmodulin during growth of normal and cancerous liver in vivo. FEBS Lett. 133, 99-102, 1981.

MacManus, J.P.; Braceland, B.M.; Youdale, T. y Whitfield, J.F. Adrenergic antagonists and a possible link between the increase in cyclic adenosine 3'5' monophosphate in DNA during liver regenerating. J. Cell. Physiol. 82, 157-164, 1973.

MacManus, J.P.; Franks, D.J., Youdale, T. y Braceland, B.M. Increase in rat liver cyclic AMP concentration prior to the initiation of DNA synthesis following partial hepatectomy of hormone infusion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1201-1207, 1972.

MacManus, J.P. y Whitfield, J.F. Stimulation of Autophosphorilation of liver cell membrane proteins by calcium and partial hepatectomy. J. Cell. Physiol. 106, 33-40, 1981.

Makino, R.; Hayashi, K. y Sugimura, T. C-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regenerating or by cycloheximide treatment. Nature 310, 697-698, 1984.

Manen, C.A. y Russell, D.H. Ornithine decarboxilase may function as an initiation factor for RNA polymerase. Science, 195, 505-506, 1977.

Moolten, F.L. y Bucher, N.L.R. Regeneration of rat liver. Transfer of humoral agent by cross-circulation. Science 158: 272-274, 1967.

Moore, R.D. Effects of insulin upon ion transport. Biochim. Biophys. Acta 737: 1-49, 1983.

Mujandar, C.; Tsukada, K. y Lieberman, I. Liver protein synthesis after partial hepatectomy and acute stress. J. Biol. Chem. 242, 700-704, 1967.

Murray, A.B.; Streckern, W. y Silz, S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy and comparison with biochemical results. J.Cell. Sci. 50, 433, 1981.

Nadal, C. y Zajadela, F. Polyploidie somatique dans le foie de rat. Le rôle des cellules binucléées dans le genèse des cellules polyploides. Exp. Cell. Res. 42, 99-116, 1966.

Nakamura, T.; Nawa, K. e Ichihara, A. Partial purification and characterization of hepatocytes growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450-1459, 1984.

Nakatani, T.; Ozawa, K.; Asano, M.; Ukinsa, M.; Kansiyansa, Y.; y Tobe, T. Changes in predominant energy substrate after hepatectomy. Life Sci. 28, 257, 1981.

Nelson, G.W.; Pienta, K.J.; Barrack, E.R. y Coffey, D.S. The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 457-475, 1986.

Nigg, E.A.; Schäfer, G.; Hilz, H. y Eppenberger, H.M. Cyclic-AMP dependent protein kinase type II is associated with the Golgi complex and with centrosomes. Cell, 41, 1039-1051, 1985.

Ohba, Y.; Higurashi, M. y Hayashi, Y. Phosphorylation of H1 subtypes in regenerating rat liver. J.Biol. Chem. 259 (5), 2942-2948, 1984.

Øgreid, D. y Døskeland, S.O. The kinetics of association of cyclic AMP to the two types of binding sites associated with protein kinase II from Bovine myocardium. FEBS Lett 129, 287-292, 1980.

Petropoulos, C.; Andrews, G.; Tamaoki, T. y Fausto, N.  $\alpha$ -Fetoprotein and albumin mRNA levels in liver regeneration and carcinogenesis. J. Biol. Chem. 258, 4901-4906, 1983.

Pezzino, V.; Vignesi, R.; Cohen, D. y Glodpine, D.I. Regenerating rat liver: Insulin and glucagon serum levels and recetpor binding. Endocrinoly 108, 2163-2169, 1981.

Piazza, G.A. y Wallace, R.W. Calmodulin accelerates the rate of polymerization of human platelet actin and alters the structural characteristics of actin filaments. Proc. Natl. Acas. Sci. USA 82, 1683-1687, 1985.

Piñol, M.R. Paper del calci a la regeneració hepatica. Tesi doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 1986.

Piñol, M.R.; Bertolch, M.; Bachs, O. y Heizmann. Increase in calmodulin synthesis during the prerreplicative phase of rat liver regeneration. (En prensa).

Post, J. y Hoffman, J. Hepatic cell replication during growth and regeneration. In: Progress in lineal diseases Editado por H. Popper y F. Schaffner. New York: Grune y Stratton, 155-165, 1965.

Post, J.; Huang, C.Y. y Hoffman, J. The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat. J. Cell. Biol. 18, 1-12, 1963.

Pouysségur, J. The growth factor activable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system: a genetic approach. Trends in Biochem. Sci. 453-455, 1985.

Princen, H.M.G.; Selten, G.C.M.; Selten-Versteegen, A.M.E.; Molbackx, G.P.B.M.; Nieuwenhuizen, W. y Hiem Yap, S. Distribution of mRNA of fibrinogen polypeptides and albumin in free and membrane-bound polyribosomes and induction of  $\alpha$ -fetoprotein mRNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. Biochem. Biophys. Acta 699, 121-130, 1982.

Pritchard, B.N.C. y Owens, C.W.I. Clinical pharmacology of beta-adrenoreceptors blocking drugs. En: Beta blockers in the treatment of cardiovascular disease. J.B. Kostis and E.A. Detelice eds. Raven Press, New York, 1-56, 1984.

Pujol, M.J.; Piñol, M.R. y Bachs, O. Nova síntesi de calmodulin durant la regeneració hepatica. Biologia del desenvolupament 5, 195-205, 1987.

Pujol, M.J.; Soriano, M.; Coll, M.J.; Domingo, J. y Bachs, O. New synthesis of cyclic AMP-dependent protein kinases during liver regeneration Cell. Biochem and Function. (en prensa).

Rabes, H.M.; Wirsching, R.; Tuczek, H.Z. e Iseler, G. Analisis of cell cycle compartments of hepatocytys after partial hepatectomy. Cell Tissue kinetic. 9: 517-532, 1976.

Rappaport, A.M. Diseases of the liver anatomic considerations. 1-50. Edts. Sehff. L. Philadelphia, 1975.

Rappaport, A.M. Hepatic blood flow morphologic aspects and physiologic regulation. Int. Rev. Physiol. 21, 1-63, 1980.

Rasmussen, H. Calcium and AMPc as synarchic messengers. John Wiley and sons. New York, 1981.

Rixon, R.H. y Whitfield, J.F. The control of liver regeneration by parathyroid hormone and calcium. J.Cell. Physiol. 87, 147-156, 1976.

Rixon, R.H. y Whitfield J.F. An early mitosis-determining event in regenerating rat liver and its possible mediation by prostaglandins or thromboxanes. J. Cell Physiol. 113, 281-288, 1982.

Rixon, R.H. y Whitfield, J.F. The possible cyclic AMP dependence of an early prereplicative event that determines mitosis in regenerating rat liver. J. Cell Physiol. 124, 397-402, 1985.

Rozengurt, E. Early signals in the mitogenic response. Science 234, 161-166, 1986.

Rudack-Garcia, D. y Henry, H.L. Effect of vitamin D<sub>3</sub> states on cyclic AMP dependent protein kinase activity and its heat-stable inhibitors in chick kidney. J. Biol. Chem. 256, 10781-10785, 1981.

Schenk, D.B.; Hubert, J.J. y Leffert, H.L. Use monoclonal antibody to quantify (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase activity and sites in normal and regenerating rat liver. J. Biol. Chem. 259, 14941-14951, 1984.

Schulman, H. y Greengard, P. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues and its activation by "Calcium-dependent regulator". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5432-5436, 1978.

Sedmak, J.J. y Grosberg, S.S. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue. Anal. Biochem. 79, 544-552, 1976.

Serratosa, J. Caracterización estructural y ultraestructural de la regeneración hepática en la rata. Estudio morfológico. Universidad de Barcelona. Tesis Doctoral, 1985.

Saverin, E.S. y Nesterova, M.V. Effect of cyclic AMP dependent kinases on gene expresion. Adv. Enzyme. Regul. 20, 167-193, 1981.

Sharma, R.H. y Wang, J.H. Preparation and assay of the Ca<sup>2+</sup>-dependent modulator protein. Adv. Cyclic nucleotide Res. 10, 187-198, 1978.

Sharp, G.W.G.; Wiedernkeller, D.E.; Kaelin, D.; Siegel, E.G. y Wollheim, C.B. Diabetes 29, 74-77, 1980.

Short, J.; Armstrong, N.B.; Gaza, D.J. y Lieberman, I. Liver regeneration after experimental injury. Lesch R. y Reuter, W. (Eds.) 269-305, Stratton. Intercom. Med. Book Corp., 1975.

Short, J.; Brown, R.J.; Husakova, A.; Gilbertson, J.R.; Zemel, R. y Lieberman, I. Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. J.Biol. Chem. 274, 1757-1766, 1972.

Short, J.; Zemel, R.; Kanta, J. y Liebermean, I. Stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in liver parenchymal cells of the intact rat. Nature 223, 956-957, 1969.

Sikorska, M.; MacManus, J.P.; Walker, P.R. y Whitfield, J.F. The protein kinases of rat liver nuclei. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 1196-1203, 1980.

Sikorska, M. y Whitfield, J.F. Isolation and purification of a new 105 KDa protein kinase from rat liver nuclei. Biochem. Biophys. Acta 703, 171-179, 1982.

Sikorska, M. y Whitfield, J.F. The regulatory and catalitic subunits of rat liver cyclic AMP dependent protein kinases respond differently to thyroparathyroidectomy and  $1\alpha, 25$  dihydroxyvitamin  $D_3$ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 129 (3), 766-772, 1985.

Sikorska, M.; Whitfield, J.F. y Rixon, R.H. The effects of thyroparathyroidectomy and  $1,25$  dihydroxyvitamin  $D_3$  on changes in activities of some cytoplasmatic and nuclear protein kinases during liver regeneration. J. Cell. Physiol. 115, 297-304, 1983.

Simek, J.F.; Rubin, F. y Lieberman, I. Synthesis of DNA after partial hepatectomy without changes in lipid and glicogen contents of liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 571-575, 1968.

Smith, H.C. y Berezney, R. DNA polimerasa  $\alpha$  is tightly bound to the nuclear matrix of actively replicating liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97 (4), 1541-1547, 1980.

Smith, H.C. y Berezney, R. Nuclear matrix bound deoxyribonucleic acid synthesis: An in vitro system. Biochemistry 21, 6751-6761, 1982.

Smith, H.C. y Berezney, R. Dynamic domains of DNA polimerase  $\alpha$  in Regenerating rat liver. Biochemistry 22, 3042-3046, 1983.

Snyder, J.A. y McIntosch, J.R. Biochemistry and physiology of microtubules. Annu. Rev. Biochem. 45, 699-720, 1976.

Sobczak, J. y Duguet, M. Molecular biology of liver regeneration. Biochimie 68, 957-967, 1986.

Soriano, M.; Piñol, M.R.; Enrich, C. y Bachs, O. Effect of trifluoperazine on DNA synthesis during liver regeneration. Cell and tissue Kinetics. 18, 475-481, 1985.

Soriano, M.; Pujol, M.J.; Bachs, O. The possible cyclic AMP-dependence of prereplicative surge of cytosolic calmodulin in proliferatively activated rat liver cells. J. Cell Physiol. (En prensa).

Stein, T.A.; Burns, G.P.; Tropp, B.E. y Wise, M.D. Hepatic fat accumulation during liver regeneration. J. Surgical Res. 39, 338-343, 1985.

Stiles, G.L.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J.  $\beta$ -adrenergic receptors: Biochemical mechanisms of physiological regulation. Physiol. Rev. 64, 661-743, 1984.

Sung, M.T.; Dixon, G.H. y Smithies, O. Phosphorylation and synthesis of histones in regenerating rat liver. J. Biol. Chem. 246, 1358-1364, 1971.

Szyf, M.; Kaplan, F.; Mann, V.; Giloh, H.; Kedar, E. y Razin, A. Cell cycle-dependent regulation of eukaryotic DNA methylase level. J. Biol. Chem. 260, 8653-8656, 1985.

Tabor, C.W. y Tabor, H. 1,4 diaminobutane (putrescine) spermidine and spermine. Ann. Rev. Biochem. 45, 285-306, 1976.

Tei, I.; Makino, Y.; Kadofuku, T.; Kanamaru, I. y Konno, K. Increase of transferrin receptors in regenerating rat liver cells after partial hepatectomy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 717-721, 1984.

Thrower, S. y Ord, M. Hormonal control of liver regeneration. Biochem. J. 144, 361-369, 1974.

Tovey, K.C.; Oldham, K.G. y Whelan, J.A.M. A simple direct assay for cyclic AMPc in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. Clinica Chimica, Acta 56, 221-234, 1974.

Tube, R.A. y Berezney, R. Pre-replicative Association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 262 (3), 1148-1154, 1986.

Tube, R.A.; Smith, H.C. y Berezney, R. The nuclear matrix continues DNA Synthesis at in vivo replicational forks. Biochem. Biophys. Acta 825, 326-334, 1985.

Van der Berg, G.B.; Van Berkel, T.J.C. y Koster, J.F. Identification of L-Type pirurate kinase as a major phosphorylation site of endogenous cyclic AMP dependent protein kinases in rat liver soluble fraction. FEBS Lett 101, 289-294, 1979.



Van der Berg, G.B.; Van Berkel, T.J.C. y Koster, J.F. The role of  $Ca^{2+}$  and cyclic AMP in phosphorylation of rat-liver soluble proteins by endogenous protein kinases. Eur. J. Biochem. 113, 131-140, 1980.

Veigl, M.L.; Vanaman, T.C. y Sedwick, D. Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. Biochim. et Biophys. Acta 738, 21-48, 1984.

Walker, R.P.; Sikorska, M. y Whitfield, J.F. Polyamine metabolism in regenerating livers from normal and hypocalcemic rats. J. Cell. Physiol. 94, 87-92, 1978.

Weinbren, K. y Taghizadeh. The mitotic response after subtotal hepatectomy in the rat. Brit. J. Exp. Path. 46, 413, 1965.

Widmann, J.J. y Fahini, H.D. Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. Am. J. Pathol. 80, 349-366, 1975.

Wilson, M.E.; Stowell, R.E.; Yokoyama, H.O. y Tsuboi, K.K. Cytological changes in regenerating mouse liver. Cancer. Res. 13 (1), 86, 1953.

White, B.A. Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression. J. Biol. Chem. 260, 1213-1217, 1985.

Whitfield, J.F.; Boynton, A.L.; McManus, J.P.; Rixon, R.A.; Sikorska, M.; Tsang, B. y Walker, P.R. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. Ann. NY acad. Sci. 339, 216-240, 1980.

Whitfield, J.F.; Boynton, A.L.; McManus, J.P.; Sikorska, M. y Tsang, B.K. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Mol. Cell. Biochem. 27 (3), 155-179, 1979.

Whitfield, J.F.; Boynton, A.L.; McManus, J.P.; Rixon, R.A.; Walker, P.R. y Armato, U. The positive regulation of cell proliferation by calcium-cyclic AMP control couplet. En: Cyclic nucleotides and the regulation of cell growth. M. Abou-Sabe (Eds.). Dowden, Hutchinson and Ross, Inc.: Stroudsburg, Pennsylvania, 97-130, 1976.

Whitfield, J.F.; Boynton, A.L.; Rixon, R.A. y Youdale, T. The control of cell proliferation by calcium,  $Ca^{2+}$ -Calmodulin and cyclic AMP. En: Control of animal cell proliferation, Vol. I, Boynton, A.L. y Leffert, H.L. (Eds.), Academic Press, Inc., 332-365, 1985.

Whitfield, J.F.; Durkin, J.P.; Franks, D.J.; Kleine, L.P.; Raptis, L.; Rixon, R.H.; Sikorska, M. y Walker, P.R. Calcium, cyclic AMP and protein kinase C-partners in mitogenesis. Cancer and Metastasis Reviews 5, 205-250, 1987.

