

Universitat de Barcelona

Estudio de la regulación del metabolismo hidrocarbonado  
durante la regeneración hepática



Tesis presentada por  
Jose Luis Rosa López  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Químicas



**UNIVERSITAT DE BARCELONA** Divisió de Ciències de la Salut

Pabelló de Govern 1ª planta  
c/ Feixa Llarga, s/n - Hospital de Bellvitge  
08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

**Facultat d'Odontologia**

**Esta tesis ha sido dirigida por el Dr. Ramon Bartrons i Bach  
en la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències  
Fisiològiques Humanes i de la Nutrició de la Universitat  
de Barcelona.**

**Barcelona, diciembre 1991.**

*A la memoria de mi madre.*

*Quan recordo la realització d'aquesta tesi molts moments em venen a la memòria i la veritat és que la majoria són agradables. Aquests moments han estat degut a vosaltres i per això voldria expressar-vos el meu agraïment:*

*Al Ramon per ser en primer lloc una bona persona. Em sento molt orgullós de haver estat el seu doctorant. Li agradeixo la formació que m'ha donat així com la dedicació, professionalitat, confiança i amistat que sempre ha tingut amb mi.*

*A l'Albert per ser un gran amic. Una part important d'aquesta tesi no hagués estat possible sense ell. Li agradeixo els seus consells, les seves crítiques, la desmesurada confiança que sempre ha depositat amb mi i els bons moments que hem passat junts.*

*Als meus companys d'equip de recerca: Joan, Montse, Dolors, Francesc, Jarbas, Santi, Ester, Carles, Mireia, Francesc Cobo, Marta, Toni, Cristina, Manel i Sofia pels moments passats. Especialment a en Joan i la Montse per iniciar-me en la investigació, i a en Francesc i en Jarbas per aguantar-me i ésser els millors companys i amics que una persona pot desitjar.*

*Als professors de la Unitat de Bioquímica de la Facultat de Medicina: Dr. Josep Carreras, Dr. Ferran Climent, Dra. Roser Cussó, Dra. Nicole Mahy i Dr. Gabriel Pons per permetre'm realitzar la tesi en aquesta Unitat.*

*Als meus companys de laboratori: Carme Gallego, Carme Espinet, Joan, Judit, Vicente, Matilde, Jesús, Xavier, Pilar, Luís, Pablo, Cristina, Gemma, Ester, Joan Parra, Judit Castellà, Montse Camps, Montse Ballarín, Julia, Lluïsa, Núria Casellas, Núria Brandí, Gradis, Blanca, Toni, Biel, Rosario, Mercè, Núria Graña, Daniel, Neus, Rosa, Ricard, Cristina Pujades, Xavier Major, Oriol, Carles Enric, Ramon, Josep, ... per la vostra amistat, els moments compartits i els vostres consells.*

*Als companys de la Unitat de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia sobretot a en Pablo, Montse Enjuto, i molt especialment a en Carlos Ciudad per la seva ajuda en els experiments de run-on, i pels seus consells i interès.*

*Als companys de treball de la Facultat d'Odontologia: Dr. Jordi Bermúdez, Teresa i Salud.*

*Al servei d'espectroscòpia de la Universitat de Barcelona, especialment al Dr. Isidre Casals, un gran professional i una excel·lentíssima persona.*

*Al Ministeri d'Educació i Ciència per concedir-me una beca de formació de personal d'investigació (FPI) que m'ha permet realitzar aquesta tesi. A la CIRIT per concedir-me una ajuda per la realització d'un projecte d'iniciació a la recerca.*

*A todos los miembros de mi familia porque siempre me han mostrado su apoyo y ánimo. Especialmente a mi padre, Paco, y a mi hermana, Inma, por su cariño, comprensión y amor.*

*A Dolores por estar siempre a mi lado, por aconsejarme y por quererme.*

*A todos aquellos que quedan en el pensamiento y en el corazón.*

## **Abreviaturas:**

En esta tesis se han utilizado, además de las abreviaturas usuales en la literatura bioquímica, las siguientes:

cAMP	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico.
EDTA	Etilen-diamino tetracético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
FBPasa-1	Fructosa 1,6-bisfosfatasa.
Fru-2,6-P <sub>2</sub>	Fructosa 2,6-bisfosfato.
GBPasa	Glucosa 6-fosfatasa.
GK	Glucoquinasa.
HBGF-1	Factor de crecimiento que une heparina del tipo 1.
HGF	Factor de crecimiento del hepatocito.
HPTB	Hepatopoyetina B.
HSS	Sustancia estimuladora hepática.
HK	Hexoquinasa.
L-PK	Piruvato quinasa isoenzima hepático.
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.
PFK-1	6-fosfofructo 1-quinasa.
PFK-2/FBPasa-2	6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa.
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante alfa.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta.

## **Contenidos:**

**Indice**

**Presentación y objetivos**

**Capítulo 1: El hígado regenerante**

**Capítulo 2: Estudio del metabolismo hidrocarbonado durante la regeneración hepática**

**Capítulo 3: Estudio de la regulación de la PFK-2/FBPase-2 durante la regeneración hepática**

**Capítulo 4: Estudio de la expresión génica de los enzimas reguladores de la glucólisis/gluconeogénesis durante la regeneración hepática**

**Capítulo 5: Estudio de la acción del glucagón sobre el sistema de la Fru-2,6-P<sub>2</sub>**

**Capítulo 6: Discusión y perspectivas**

**Conclusiones**

**Bibliografía**

**Publicaciones**

**Apéndice: Protocolos experimentales**

## Indice

<b>Presentación y objetivos</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 1: El hígado regenerante</b>	<b>7</b>
1. Anatomía y fisiología del hígado	9
2. La célula hepática	13
3. Las células no parenquimatosas	15
4. La regeneración hepática	16
4.1. Aspectos generales	16
4.2. Factores y mecanismos que controlan el crecimiento del hígado	19
4.2.1. Perspectiva histórica	19
4.2.2. Estimuladores del crecimiento del hepatocito	22
4.2.2.1. Mitógenos	22
4.2.2.2. Comitógenos	28
4.2.3. Inhibidores del crecimiento del hepatocito	31
4.3. Modelos propuestos	33
<b>Capítulo 2: Estudio del metabolismo hidrocarbonado durante la regeneración hepática</b>	<b>37</b>
1. Antecedentes	40
2. Estudio del papel de la Fru-2,6-P <sub>2</sub> durante la regeneración hepática	42
3. Estudio del contenido de glucógeno durante la regeneración hepática	45
<b>Capítulo 3: Estudio de la regulación de la PFK-2/FBPase-2 durante la regeneración hepática</b>	<b>49</b>
1. Actividad PFK-2 durante la regeneración hepática	52
2. Evidencias cinéticas de la aparición de una forma isoenzimática diferente	55
3. Semipurificación y caracterización de la PFK-2/FBPase-2	58
4. Estudio inmunológico de la PFK-2/FBPase-2	67
5. Expresión del gen de la PFK-2/FBPase-2	70
6. Regulación de la expresión del gen de la PFK-2/FBPase-2	76
6.1. Velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPase-2	76
6.2. Influencia de la hepatectomía parcial en la vida media del ARNm <sup>PFK-2/FBPase-2</sup>	79
<b>Capítulo 4: Estudio de la expresión génica de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis durante la regeneración hepática</b>	<b>81</b>
1. Análisis del contenido de ARNm de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis	84
2. Efecto del stress en los niveles de ARNm de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis	87



---

<b>Capítulo 5: Estudio de la acción del glucagón sobre el sistema de la Fru-2,6-P<sub>2</sub></b>	<b>91</b>
1. El glucagón mimetiza los efectos de las primeras horas post-hepatectomía	<b>93</b>
2. El glucagón modifica la expresión del gen de la PFK-2/FBPase-2	<b>95</b>
3. Regulación de la expresión del gen de la PFK-2/FBPase-2 por el glucagón	<b>96</b>
3.1. El glucagón inhibe la velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPase-2	<b>97</b>
3.2. El glucagón modificó la estabilidad del ARNm <sup>PFK-2/FBPase-2</sup> en suspensiones de hepatocitos	<b>98</b>
<b>Capítulo 6: Discusión y perspectivas</b>	<b>103</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>111</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>117</b>
<b>Publicaciones:</b>	<b>149</b>
- "Fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo 2-kinase during liver regeneration". J.L. Rosa, F. Ventura, J. Carreras and R. Bartrons. Biochem. J. (1990) 270:645-649.	<b>151</b>
- "Transcriptional and post-transcriptional regulation of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6 bisphosphatase during liver regeneration". J.L. Rosa, A. Tauler, A. Lange, S.J. Pilkis and R. Bartrons. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA ( <del>En prensa</del> ). ↳ (1992) 89: 3746-3750	<b>157</b>
- "Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver". J.L. Rosa, R. Bartrons and A. Tauler. (1991) ( <del>Sometido a publicación</del> ). (1992) 287: 113-116.	<b>177</b>
<b>Apéndice: Protocolos experimentales</b>	<b>191</b>

## Presentación y objetivos

Durante la regeneración hepática que sigue a una hepatectomía parcial, se han descrito multitud de fenómenos asociados a la recuperación de la masa hepática (revisiones recientes: Fausto y Mead, 1989; Michalopoulos, 1990). Uno de los fenómenos más interesantes y menos estudiados es que durante este proceso proliferativo el hígado se convierte en un órgano básicamente gluconeogénico con el fin de mantener la homeostasis de la glucosa (Katz, 1979). Antes de comenzar este estudio se proponían los ciclos de sustrato glucosa/glucosa 6-fosfato y fosfoenolpiruvato/piruvato como las etapas reguladoras del flujo glucolítico/gluconeogénico durante la regeneración hepática, debido a que las actividades de los enzimas glucoquinasa y fosfoenolpiruvatoquinasa correlacionaban bastante bien con la disminución del flujo glucolítico y el incremento del gluconeogénico, respectivamente (Katz, 1979). Es conocido el importante papel modulador de la fructosa 2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) sobre el ciclo de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato en el hígado y, por tanto, en la regulación de la glucolisis/gluconeogénesis hepática (revisiones: Van Schaftingen, 1987; Hue y Rider, 1987; Pilkis y El-Maghrabi, 1988; Pilkis *et al.*, 1990). Datos previos de Gil (1987) sugerían un papel regulador de este metabolito durante el proceso proliferativo post-hepatectomía.

A partir de todas estas consideraciones nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar el papel de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> y los mecanismos que regulan sus niveles durante la regeneración hepática.
- 2) Estudiar la expresión y regulación del enzima 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa, enzima que sintetiza y degrada a la Fru-2,6-P<sub>2</sub>, durante la regeneración hepática.
- 3) Estudiar la expresión génica de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis: glucoquinasa, L-piruvato quinasa, 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, durante la regeneración hepática.
- 4) Estudiar los posibles factores que podrían ser la causa de las variaciones en el sistema de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> (metabolito, enzima y ARNm) durante la regeneración hepática.

## Capítulo 1: El hígado regenerante

## 1. Anatomía y fisiología del hígado

El hígado es la glándula de mayor tamaño del organismo, representando aproximadamente el 2,5 % del peso corporal del individuo adulto. Ocupa una posición fisiológica fundamental, pues se halla interpuesto entre la corriente sanguínea que proviene del intestino y del resto del organismo.

El hígado se halla alojado debajo de la cúpula diafragmática derecha. Su cara anterior está protegida por las últimas costillas del hemitórax derecho y su borde anterior aflora por debajo del reborde costal del mismo lado. Separada por el diafragma, su cara superior está en relación con la pleura y el pulmón derecho; su cara inferior, en la cavidad abdominal, se relaciona con el colon derecho, el duodeno y el páncreas, y su cara posterior con el riñón derecho.

El hígado está constituido por una masa única, dividida en cuatro lóbulos. Dos de mayor tamaño, el mediano y el izquierdo. Y otros dos de menor tamaño, el lóbulo caudado y el lóbulo derecho. Toda su superficie está recubierta por una doble membrana fibrosa, el peritoneo visceral y la cápsula de Glisson.

La vascularización se realiza a través de la vena porta y la arteria hepática. La vena porta proporciona aproximadamente el 75 % de la sangre que llega al hígado, con una concentración de oxígeno algo inferior que la de la sangre arterial, pero muy superior a la de la sangre venosa. Por ello, la oxigenación de las células hepáticas depende en un 50 % del sistema portal. El 50 % restante depende de la arteria hepática, que proporciona el resto de la sangre que llega al hígado. La sangre portal procede del bazo y de los intestinos, y la sangre arterial del tronco celíaco. Estos grandes troncos sanguíneos penetran en el hígado por el hilio hepático, donde cada uno de ellos se divide en dos ramas, derecha e izquierda, destinadas a la irrigación de ambos lóbulos, en cuyo interior se realizan sucesivas divisiones en ramas cada vez más pequeñas que terminan en una red vascular común, el sinusoides hepático. El drenaje venoso del hígado se realiza a través de vénulas suprahepáticas, que desembocan en un tronco suprahepático común, el cual aboca en la vena cava inferior cerca del punto de entrada de ésta en la aurícula derecha.

En el hilio hepático, punto de división de la vena porta y la arteria hepática, se halla la confluencia de los conductos biliares hepáticos, que forman el conducto hepático común.

Los vasos linfáticos intrahepáticos terminan en ganglios del hilio y abocan luego al conducto torácico.

La unidad microscópica clásica del hígado es el lobulillo hepático (Kiernan, 1833). Cada lobulillo tiene un aspecto de prisma, en cuyo centro se dispone la vena central del lobulillo, rama terminal de las venas hepáticas, y en su periferia los espacios porta, que contienen las ramas portal y arterial y al conducto biliar. Entre ambos sistemas vasculares se

extienden las placas o láminas de células hepáticas y los sinusoides intercelulares. Las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática desde los espacio porta envían la sangre hacia los sinusoides y de ellos pasa a las venas centrolobulillares, debido al gradiente tensional entre ambas zonas sanguíneas. La masa hepática total está constituida por el conjunto de estas unidades estructurales.

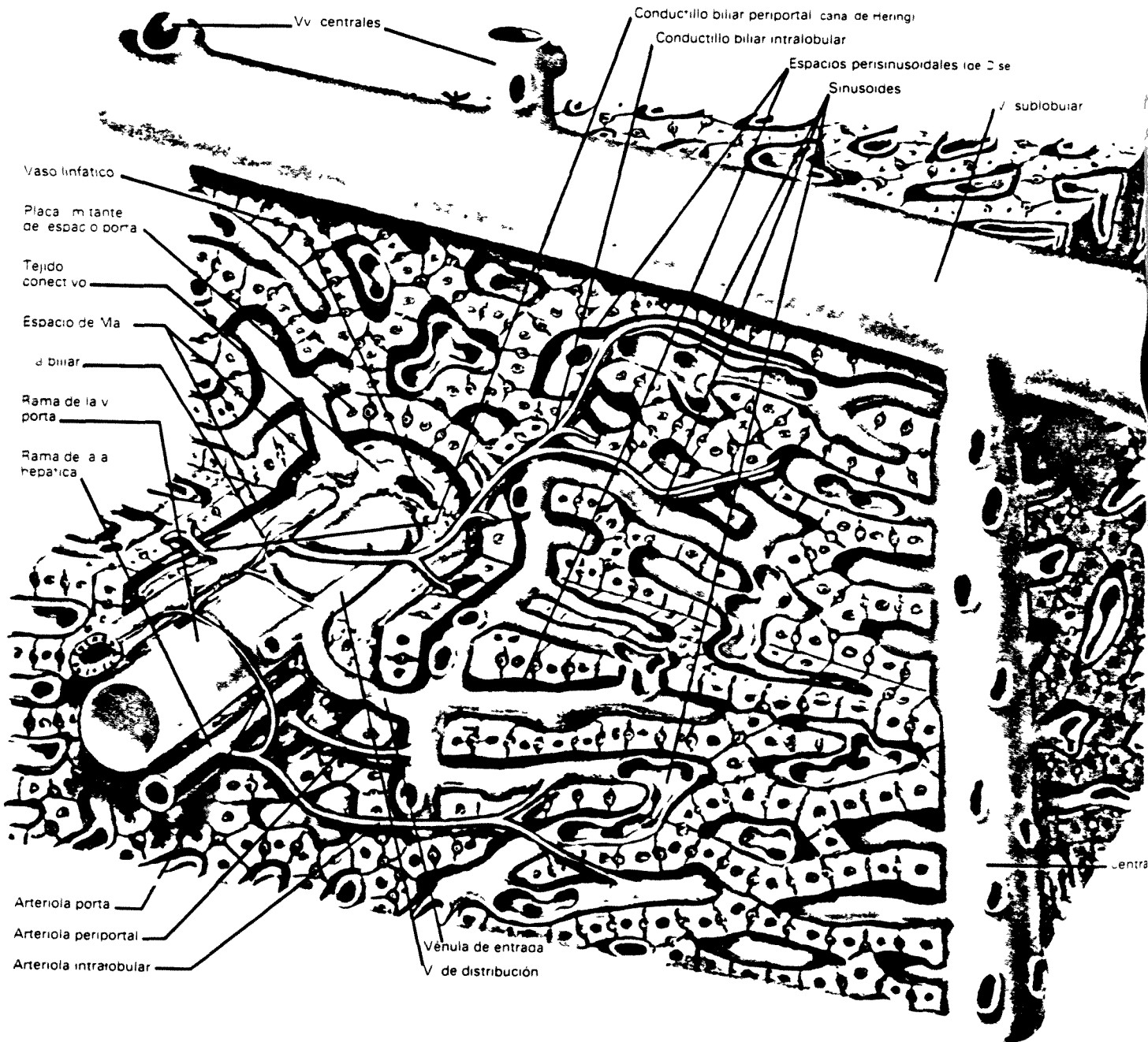
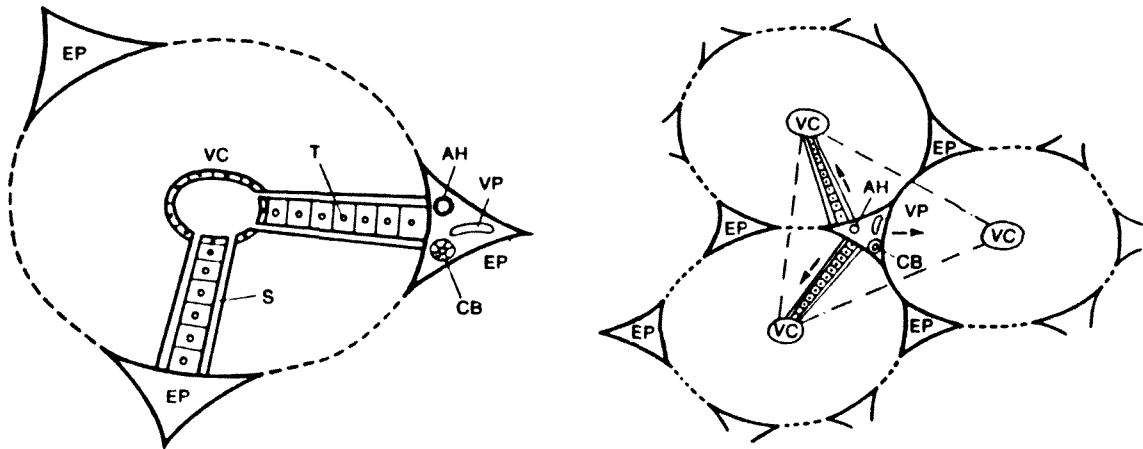


Fig. 1.1 Esquema tridimensional de la estructura hepática (Netter, 1990).

Los estudios de Rappaport *et al.* (1954 y 1958) sustituyeron al anterior concepto de lobulillo hepático como unidad estructural por el de acino, que sería una unidad estructural y funcional. Cada acino está centrado por un espacio porta, con una rama portal y arterial, que aportan sangre a los sinusoides de distintos lobulillos, con las venas centrolobulillares dispuestas en la periferia. Esta concepción explica que en situaciones de anoxia o ayuno, las células hepáticas periportales sean las menos afectadas, y donde se inician los fenómenos de regeneración (Kuo *et al.*, 1988).



**Fig. 1.2 Representación esquemática del lobulillo (izquierda) y el acino hepático (derecha). (Farreras y Rozman, 1988).**

EP, espacio porta; VC, venas centrales; T, hepatocito; S, sinusoides; AH, rama de la arteria hepática; VP, rama de la vena porta; CB, conducto biliar.

Utilizando el concepto de acinos, histológicamente podemos distinguir:

- *El espacio porta.* Es una estructura conjuntiva y representa la rama de sostén de los elementos vasculares. Contiene una rama de la vena porta, la arteriola hepática, el conducto biliar, elementos linfáticos y nerviosos, y algunas células del sistema reticulohistiocitario.

- *Las células hepáticas.* Las células hepáticas o hepatocitos tienen una forma poliédrica de unos 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se disponen en placas o láminas de una o dos células hepáticas de espesor entre los espacio porta y las venas centrales, de un modo radiado. Estas láminas se hallan sostenidas por una trama de fibras de reticulina y separadas unas de otras por los sinusoides.

- *Los sinusoides hepáticos.* Constituyen una red vascular cuyos límites están constituidos por las paredes de los hepatocitos. Unen el territorio sanguíneo portal y arterial con las venas centrales, poniendo en contacto con los hepatocitos la sangre venosa procedente del intestino y el bazo y la sangre arterial de la arteria hepática. El revestimiento

sinusoidal está constituido por tres tipos de células: células endoteliales, células de Kupffer y células de Ito; denominadas genéricamente células sinusoidales o células no parenquimatosas.

- *Las venas centrales o centrolobulillares.* Situadas en el centro de los lobulillos hepáticos, representan la raíces de las venas suprahepáticas. Están rodeadas por una capa de células hepáticas y abocan a ellas los sinusoides de cada lobulillo.

- *Las vías biliares intrahepáticas.* Se inician en los capilares biliares, cuyas paredes están constituidas por las mismas células hepáticas. Se continúan por los conductos biliares de los espacios porta, que conectan con conductos biliares cada vez mayores hasta constituir los conductos biliares hepáticos derecho e izquierdo.

El hígado interviene en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo. Recibe todos los productos finales de la absorción de las proteínas, hidratos de carbono y grasas, y los transforma en sustancias más complejas indispensables para el funcionamiento normal de los seres vivos. Además controla la producción y secreción de la bilis, regula la concentración plasmática de una gran cantidad de pequeñas moléculas imprescindibles para el metabolismo normal del organismo, fagocita innumerables sustancias del torrente circulatorio y es capaz de eliminar medicamentos, hormonas y otros productos metabólicos.

La mayoría de estas funciones metabólicas y fisiológicas están sometidas a un estricto control mediante hormonas y otros mecanismos reguladores (Arias *et al.*, 1982). La contribución de los diferentes tipos celulares (hepatocitos, células endoteliales, de Kupffer y de Ito) y la misma localización de las células parénquimales (periportales o perivenosas) son importantes factores a tener en cuenta a la hora de interpretar los efectos que se observen.



## 2. La célula hepática

Los hepatocitos son células poliédricas con seis o más caras que representan aproximadamente el 65 % del número de células del hígado y más del 90 % de su masa hepática. Son células polarizadas con diferentes funciones y estructuras asociadas a los tres dominios de la membrana plasmática: el sinusoidal, el lateral y el canalicular (Fig. 1.3).

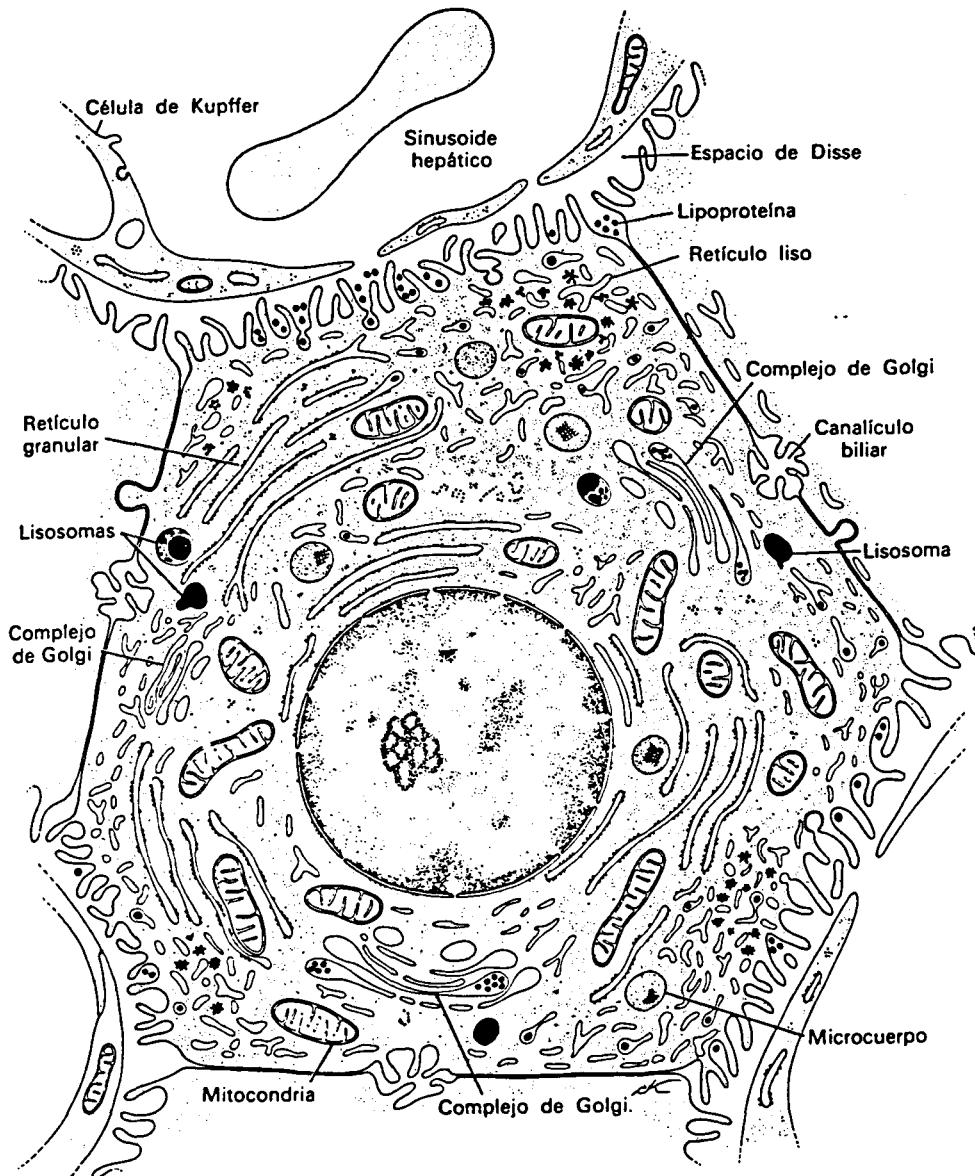


Fig. 1.3 Estructura del hepatocito y las relaciones con su entorno (Fawcett, 1987).

- *El dominio sinusoidal.* En esta zona la membrana plasmática se encuentra muy replegada en microvillis. Estas microvellosidades delimitan con las células endoteliales y las de Kupffer un espacio denominado espacio de Disse y comunica libremente con el sinusoides hepático, permitiendo el contacto directo de la sangre con la membrana plasmática a través de los poros que posee el citoplasma de las células endoteliales. Por el espacio de Disse transcurren fibras de reticulina de la trama de sostén de las láminas hepáticas. En este dominio se encuentran la mayoría de los receptores de hormonas y de factores de crecimiento, jugando también un importante papel en el reconocimiento, captación y degradación de metabolitos y toxinas.

- *El dominio lateral.* Contiene muchos contactos célula-célula como son los desmosomas y las uniones del tipo "gap", teniendo un papel muy importante en la adhesión y comunicación celular y en la permeabilidad tisular.

- *El dominio canalicular.* Constituido a su vez por microvellosidades, representa el inicio del capilar biliar y está implicado en la formación y secreción de la bilis.

La estructura y función de la membrana plasmática, y de los orgánulos y membranas intracelulares son en principio las mismas que en otras células. Caracterizándose los hepatocitos por poseer unos núcleos grandes y redondos, pero de tamaño variable de una célula a otra. Esta variación de tamaño es debido a la expresión de una poliploidía. El 70 % o más de los núcleos son tetraploides y del 1 al 2 % son octoploides. La mayoría de las células tienen un núcleo único, pero hasta el 25 % son binucleadas.

Las células parénquimales están involucradas en un amplio espectro de actividades metabólicas incluyendo el almacenaje y degradación de glucógeno, gluconeogénesis, metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos. Trabajos realizados durante los últimos diez años han demostrado que las células parenquimatosas del hígado son heterogéneas con respecto a la actividad de un número de enzimas celulares dependiendo si están situadas en regiones o zonas periportales o perivenosas (Jungermann y Katz, 1982; Sies, 1982 y 1987; Thurman, 1986). Sin embargo, parece que este tipo de especialización o heterogeneidad entre los hepatocitos es menos importante que el que ocurre entre los diferentes tipos celulares (ej. hepatocitos y células de Kupffer). Se ha demostrado que los hepatocitos son el principal lugar de almacenamiento de glucógeno; y que contienen más del 95 % de las mitocondrias del hígado, por consiguiente una gran proporción de la actividad respiratoria del hígado se realiza en los hepatocitos. Por comparación con las células de Kupffer y las endoteliales que son mucho más pequeñas, los hepatocitos contribuyen con una mayor superficie de retículo endoplasmático. Ambos tipos de orgánulos, mitocondrias y retículo endoplasmático, son los principales almacenes de calcio intracelular, por lo que es evidente que la mayoría del calcio intracelular del hígado está asociado a los hepatocitos y de aquí la

importancia de estos en todos los procesos fisiológicos dependientes de calcio (Altin y Bygrave, 1988).

### **3. Las células no parenquimatosas**

Las células no parenquimatosas representan aproximadamente el 35 % del número total de células del hígado aunque debido a su menor tamaño no llegan al 10 % de la masa hepática. Estas células están asociadas a los sinusoides hepáticos y por esto también se denominan células sinusoidales. Podemos distinguir tres tipos de poblaciones celulares mediante estudios de micrografía electrónica: células endoteliales, de Kupffer y de Ito. En hígado de rata, las células endoteliales constituyen el 48 %, las de Kupffer el 39 % y las de Ito aproximadamente el 13 % de las células no parenquimatosas (Altin y Bygrave, 1988).

#### **3.1. Células Endoteliales**

Son células aplanadas y alargadas que forman la mayor parte del revestimiento extremadamente fino de los sinusoides. Estas células se caracterizan por poseer aberturas (fenestraciones) transcelulares de gran tamaño y pequeñas discontinuidades entre las células vecinas permitiendo, de este modo, el contacto directo de la sangre con los hepatocitos.

La función precisa de estas células no es conocida; sin embargo, se sabe que participan en la eliminación (aclaramiento) del material extraño de la sangre incluyendo eritrocitos senescentes, microorganismos y macromoléculas (van Berkel, 1979). Son el principal tipo celular del hígado en la captación de LDL (Nagelkerke *et al.*, 1983). No son fagocitarias aunque poseen una limitada capacidad de endocitar materia particulada (Widmann *et al.*, 1972). Estas células constituyen una barrera mecánica y selectiva entre la sangre y el parénquima hepático. En aquellas especies con endotelio sinusoidal discontinuo y carente de lámina basal (la mayoría de los mamíferos), no hay ninguna barrera de filtración para las macromoléculas o partículas de hasta 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

#### **3.2. Células de Kupffer**

Descritas por Kupffer en 1876, al observar la aparición de células elevadamente pigmentadas en el hígado después de la administración de cloruro de oro. Tienen forma estrellada y están preferentemente distribuidas en los sinusoides de la región portal. Son

macrófagos que fagocitan con una gran eficiencia grandes partículas de la sangre. Constituyendo con las células endoteliales un sistema coordinado de defensa de los hepatocitos (Altin y Bygrave, 1988).

### 3.3. Células de Ito

Estas células también tienen forma estrellada y han recibido diversos nombres: lipocitos, células almacenadoras de grasa, células estrelladas, de Ito, perisinusoidales, ... . Nosotros hemos escogido el nombre de Ito porque fue el primero que las describió en 1973. Están localizadas en los espacios perisinusoidales. Contienen numerosas gotitas de grasa y parecen tener un importante papel en el metabolismo lipídico y en el almacenamiento de la vitamina A (Ikejeri *et al.*, 1977). Blomhoff *et al.* (1984) demostraron que son el lugar predominante de almacenamiento de vitamina A en el hígado y Friedman *et al.* (1985) que son las responsables de la mayor parte de la síntesis de colágeno en el hígado de rata normal.

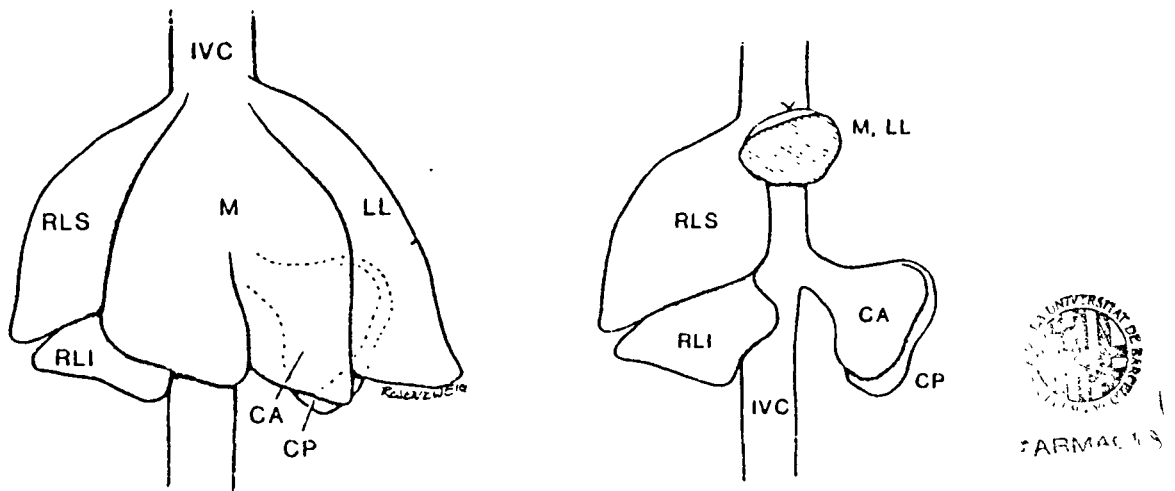
## 4. La regeneración hepática

### 4.1. Aspectos generales

En animales adultos, la proliferación celular se da para compensar las pérdidas celulares, de tal manera que la masa de los diferentes tejidos y órganos se mantenga constante. Así, los hepatocitos tienen una vida media de entre 200 y 400 días pudiendo estar replicándose en un instante dado 1 hepatocito de cada 20.000. Esta velocidad de recambio se incrementa drásticamente en respuesta a muerte celular o a la pérdida de tejido hepático. (Bucher y Malt, 1971). La proliferación hepática ocurre en la hepatitis viral, cirrosis, reacciones hepatotóxicas, necrosis hepática masiva,... . Se puede inducir en animales mediante un tratamiento agudo, quirúrgico o químico, que extirpe o lesione un porcentaje elevado del parénquima hepático. La pérdida del parénquima rápidamente induce una ola de proliferación celular hasta que la masa total del hígado es reestablecida. En todos los casos, el crecimiento hepático es una respuesta para compensar el descenso de la masa del hígado o la pérdida celular, pero también es posible inducir la síntesis de ADN y la replicación en hepatocitos de hígado normal (Fausto y Mead, 1989; Michalopoulos, 1990).

Mucha de la información sobre la regulación del crecimiento del hígado deriva de los estudios de regeneración hepática realizados en rata después de una hepatectomía parcial de

aproximadamente el 70 %, tal y como la describieron Higgins y Anderson (1931). Mediante este procedimiento quirúrgico, fácilmente realizable mediante anestesia con éter, aproximadamente un 70 % de la masa hepática (lóbulos izquierdo y mediano) es externalizada (Fig. 1.4) a través de una pequeña incisión abdominal. Esta porción del hígado es extirpada y la incisión rápidamente cosida, de manera que la rata vuelve a una actividad normal en cuestión de minutos. La regeneración del hígado ha sido demostrada en muchos organismos vertebrados, siendo extremadamente rápida (7-10 días en rata después de una hepatectomía del 70 %) en todas las especies examinadas, incluidos los humanos (Bucher, 1963; Zoli *et al.*, 1986).



**Fig. 1.4. Representación de un hígado de rata intacto (izquierda) y después de una hepatectomía parcial del 70 % (derecha).**

Adaptada de Emond *et al.* (1989). IVC, vena cava inferior; M, lóbulo mediano; LL, lóbulo lateral izquierdo; RLS, lóbulo derecho porción superior; RLI, lóbulo derecho porción inferior; CA, lóbulo caudado porción anterior; CP, lóbulo caudado porción posterior.

Las principales características de la regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial son bien conocidas y han sido el tema de detallados estudios desde que Higgins y Anderson describieran la técnica en 1931. Así, un mínimo de un 10-20 % de la masa hepática debe de ser extirpada para que se produzca respuesta proliferativa. La extensión de la síntesis de ADN en los hepatocitos es proporcional a la cantidad de tejido extirpado. Debido a que la hepatectomía parcial incluye la extirpación entera de lóbulos hepáticos, en el hígado remanente no hay heridas, ni fenómenos asociados a la cicatrización de heridas (inflamación, granulación del tejido,...). La respuesta proliferativa consiste en un incremento del tamaño de los lóbulos remanentes mediante hipertrofia e hiperplasia celular, pero los lóbulos que han sido extirpados no vuelven a crecer. Este curioso aspecto de la regeneración no ha sido muy estudiado. Después de una hepatectomía del 70 %, todos los

hepatocitos replican una vez y una fracción de las células realiza un segundo ciclo de replicación. La síntesis de ADN está bastante bien sincronizada, comenzando a las 12-16 h después de la operación y alcanzando un máximo a las 22-24 h. Un segundo máximo, menor que el anterior, ocurre a las 48 h reflejando la síntesis de ADN que ocurre en el tercio interno de los lóbulos hepáticos. La heterogeneidad del hígado también queda reflejada durante la proliferación, ya que la síntesis de ADN comienza en la región periportal (12-16 h). Después de 34-40 h de la hepatectomía se localiza en la región pericentral. Esta preferencia por la región periportal, también ocurre en el segundo pico de síntesis de ADN. Las células no parenquimatosas también replican después de una hepatectomía parcial, retrasando el comienzo de la síntesis de ADN de 1 a 3 días después de la síntesis de ADN de las células parenquimatosas. (Fausto y Mead, 1989; Michalopoulos, 1990; Grisham, 1962; Rabes *et al.*, 1975).

Un concepto central para comprender las cinéticas anteriores es que los hepatocitos son generados por mitosis que ocurren en los hepatocitos maduros remanentes. La génesis de hepatocitos no procede de un grupo de células progenitoras (stem-cell), como ocurre en la médula ósea por ejemplo. La continua administración de timidina tritjada durante la regeneración hepática etiquetó más del 95 % de los hepatocitos. Si las células progenitoras estuvieran incluidas en la generación de nuevos hepatocitos, entonces aproximadamente un 30 % de los hepatocitos que no fueron extirpados con la hepatectomía parcial del 70 %, deberían permanecer no etiquetados; pero esto no es lo que ocurre (Michalopoulos, 1990). Sin embargo, existen células progenitoras en el hígado y aparecen en algunas situaciones. Por ejemplo, cuando la síntesis de ADN en hepatocitos está totalmente inhibida o cuando los hepatocitos han sido destruidos, como ocurre en algunas formas de hepatitis fulminante. En estas situaciones las células progenitoras son funcionales y pueden generar hepatocitos (Gerber *et al.*, 1983) o participar en la formación de carcinomas hepatocelulares (Sell y Dunsford, 1989). A partir de los datos expuestos y otros conocidos (revisados recientemente por Fausto, 1990) se está llegando a la conclusión de que estas células progenitoras constituyen un compartimento celular de reserva que sólo se activa cuando la replicación de los hepatocitos está inhibida, no siendo este el caso después de una hepatectomía parcial donde los hepatocitos pueden replicarse activamente. Aunque no se ha identificado con absoluta certeza la localización de estas células en el hígado normal, parecen situarse alrededor de la zona porta o ser componentes de los conductos de Hering (conducto biliar) (Fausto y Mead, 1989; Fausto, 1990; Michalopoulos, 1990).

La sincronización de la respuesta y su predecible punto final hacen que la regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial sea un proceso de crecimiento estrictamente regulado, debiendo de estar controlado por los mismos factores que son los responsables del mantenimiento de la masa hepática en el organismo intacto. La ruptura de

estos mecanismos reguladores genera señales que inducen al hepatocito a entrar en el ciclo celular, sintetizando ADN y replicándose, pero sólo hasta que la masa del órgano se restablece. Como en la regeneración hepática está involucrado todo el hígado, tanto las células parenquimatosas como las no parenquimatosas participan en la respuesta proliferativa.

## 4.2. Factores y mecanismos que controlan el crecimiento hepático

### 4.2.1. Perspectiva histórica

Los mecanismos que controlan el crecimiento del hígado han sido extensamente investigados tanto en animales vivos como en cultivo de hepatocitos. Los experimentos *in vivo* de la década de los años 60 demostraron que después de una hepatectomía parcial aparecían en la sangre unos "factores", que denominaron hepatotróficos, capaces de inducir proliferación celular. Así, diversos experimentos demostraron que la circulación cruzada de la sangre entre un par de ratas causó un significativo aumento de la síntesis de ADN en el hígado de una rata normal cuando el compañero había sido hepatectomizado parcialmente (Moolten y Bucher, 1967; Fisher *et al.*, 1971). Para determinar el origen de estos factores se realizaron experimentos con ratas a las que se les había extirpado el páncreas, el tracto gastrointestinal y el bazo, y sometidas a una hepatectomía parcial. La actividad regenerativa persistió, aunque disminuyó mucho. Estos experimentos indicaban que aunque las hormonas pancreáticas podrían ser moduladores importantes, factores no pancreáticos podrían tener un papel importante en el proceso regenerativo (Bucher y Swaffield, 1973 y 1975).

Durante la fase prereplicativa de la regeneración hepática se detectó un gran aumento de los niveles de glucagón y una no modificación o suave descenso de los de insulina (Bucher y Weir, 1976; Bucher *et al.*, 1978a; Leffert *et al.*, 1979). Por lo que se pensó que, quizás, la disminución de la insulina podría favorecer el proceso regenerativo. Sin embargo resultó que la insulina era esencial. Como lo demuestran los experimentos realizados con animales parcialmente hepatectomizados a los que se les administró suero anti-insulínico. En estos animales la síntesis de ADN se inhibió (Bucher *et al.*, 1978b). Aunque los trabajos realizados en ratas hechas diabéticas con aloxano (Younger *et al.*, 1966) o con estreptozotocina (Nakata *et al.*, 1986) demuestran que bajos niveles de la hormona son suficientes para mantener elevadas velocidades de crecimiento.

En ratas desvisceradas (sin páncreas, intestino y bazo) la síntesis de ADN que seguía a la hepatectomía parcial prácticamente no se intensificó por el tratamiento con insulina o glucagón, pero cuando ambas hormonas fueron administradas conjuntamente la síntesis de ADN se restableció a una actividad normal (Bucher y Swaffield, 1975). Estos experimentos y otros (Farivar *et al.*, 1976) revelaron un concepto clave para entender la regeneración y es la influencia de la combinación de hormonas y factores actuando sinérgicamente. Otra idea muy importante, producto de estos experimentos, fue que factores no pancreáticos estaban involucrados en la regeneración; demostrado por el fracaso del glucagón y la insulina en estimular la síntesis de ADN en hígados normales de ratas intactas.

La importancia de factores nutricionales ha sido demostrada con estudios en los que se comparaban ratas sometidas a una dieta sin proteínas con ratas totalmente ayunadas. Después de 2 ó 3 días a ambos grupos se les permitió libre acceso a una comida aminoacídica. Una inducción de la síntesis de ADN hepático se produjo en las ratas que habían sido sometidas a una dieta sin proteínas, sin observarse en el grupo de animales ayunados. Sin embargo, sorprende la similar variación en los niveles de hormonas endógenas en ambos grupos, que, como después de una hepatectomía parcial, se caracterizó por elevadas concentraciones de glucagón en la vena porta y normal o baja de insulina (Bucher *et al.*, 1978a). En este interesante modelo nutricional, la síntesis de ADN podría ocurrir para corregir una alteración funcional. ¿Podría operar un mecanismo similar durante la regeneración hepática? No podemos responder a esta pregunta porque todavía no sabemos la naturaleza de los déficits funcionales (si los hay) producidos por la hepatectomía parcial. Quizá la secuencia replicativa que ocurre después de una hepatectomía parcial, se produzca no como consecuencia de una deficiencia sino por adaptaciones metabólicas cuyo objetivo es prevenir los déficits funcionales (Fausto y Mead, 1989).

Los estudios sobre la expresión de protooncogenes durante la regeneración del hígado realizados en la década de los años 80 han permitido asociar estos genes con los procesos de crecimiento no-neoplásico. Tres principales conclusiones fueron extraídas de la expresión de protooncogenes durante la regeneración hepática: a) es específica, ej: transcritos de *fos*, *myc*, *p53* y *ras* están elevados cuando *abl*, *mos* y *src* no lo están; b) es secuencial: los niveles de ARNm se incrementan en períodos bien definidos en el tiempo, siguiendo el orden *fos*, *myc*, *p53* y *ras*; c) es transitoria: el incremento de sus niveles se encuentra durante unas pocas horas (*fos*, *myc*, *p53*) o aproximadamente un día (*ras*) retornando después de estos tiempos a niveles basales (Thompson *et al.*, 1986; Fausto y Mead, 1989).

Los genes que se inducen primeramente durante un proceso proliferativo han recibido el nombre genérico de *immediate-early genes* y participan en la transición de las células desde el estado quiescente a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Lau y Nathans, 1985 y 1987; Nathans *et al.*, 1988). Muchos de los protooncogenes anteriormente descritos entrarían a



formar parte de este grupo de genes. Estos genes se caracterizan por su activación transcripcional y, muchos de ellos, por una superinducción en presencia de cicloheximida (Lau y Nathans, 1985; Almendral *et al.*, 1988). Podemos clasificarlos en tres categorías según la función de sus productos: a) factores de transcripción como *jun* (Bohmann *et al.*, 1987; Ryseck *et al.*, 1988) y *fos* (Lech *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988); b) proteínas de secreción que pueden actuar de un modo autocrino o paracrino, como JE (Kawahara y Deuel, 1989; Rollins *et al.*, 1988) y KC (Oquendo *et al.*, 1989; Ryseck *et al.*, 1989); y c) proteínas estructurales como la actina (Lau y Nathans, 1987; Almendral *et al.*, 1988). Aunque sus mecanismos de actuación no son conocidos, estas proteínas son importantes en la regulación de las fases que conducen a las células a entrar en el ciclo celular. Durante la regeneración hepática, la expresión de estos genes empieza rápidamente con una inducción de *fos* a los 15 min después de la hepatectomía (Kruijer *et al.*, 1986), seguida de otros genes como *myc* (Goyette *et al.*, 1984), LRF-1 (Hsu *et al.*, 1991), *ets-2* y *myb* (Bhat *et al.*, 1987). Con el avance de las técnicas de biología molecular, el número descrito de estos genes va en aumento. Recientemente, se han identificado más de 41 nuevos *immediate-early genes* durante la regeneración del hígado (Mhon *et al.*, 1991a y b). El incremento de la expresión de estos genes parece ser debido a señales mediadas por mitógenos que causan la modificación de proteínas celulares y factores de transcripción preexistentes (Lau y Nathans, 1987; Almendral *et al.*, 1988).

Dentro del animal, el tamaño del hígado está ajustado a las necesidades del cuerpo. ¿Cómo el cuerpo informa al hígado que es incapaz de realizar su trabajo y necesita más hepatocitos para realizarlo?. ¿Cuáles son las señales de crecimiento?. Las señales de crecimiento, por lo descrito anteriormente, son inicialmente hormonas, factores de crecimiento y nutrientes. Estas señales son específicas para el hígado puesto que la hepatectomía parcial estimula sólo el crecimiento del hígado, y no de otros órganos. Se han encontrado diversas sustancias que estimulan, modulan o inhiben la proliferación del hepatocito *in vivo* e *in vitro* aunque sólo unas pocas han resultado ser específicas para el hígado. Puede que la multiplicidad de funciones del hígado necesite una multiplicidad de señales interactuando en combinaciones sinérgicas, de tal forma que señales débiles puedan ser amplificadas, y que estas interacciones sinérgicas sean la clave que determine la especificidad para el hígado. La identidad precisa de las señales responsables del crecimiento sigue siendo una pregunta sin responder y posiblemente seguirá siéndolo hasta que los mecanismos por los que las señales operan sean aclarados. En este contexto los estudios de cultivos celulares se han convertido en una herramienta muy importante para el conocimiento de los mecanismos moleculares de acción de estas señales y han centrado los estudios del control del crecimiento hepático durante los últimos años (Bucher *et al.*, 1990). Tres requisitos son fundamentales para estos estudios en hepatocitos: a) la presencia de

insulina en el medio porque en su ausencia los hepatocitos rápidamente degeneran (24-48 h); b) la presencia de prolina en el medio, y c) plaqu coastos los hepatocitos a baja densidad (Michalopoulos, 1990). Un cuarto requisito podría introducirse después de que los últimos estudios de Bucher *et al.* (1990) demostrasen que la matriz extracelular preserva la capacidad de transcripción de los genes específicos del hígado en cultivo de hepatocitos. Las sustancias o factores que han sido estudiados en relación con la regeneración hepática pueden clasificarse en dos categorías: Estimuladores e Inhibidores (Fig. 1.5).

Estimuladores del crecimiento:

- Mitógenos completos: Factor de crecimiento epidérmico (EGF)  
Factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa)  
Factor de crecimiento del hepatocito (HGF)  
Factor de crecimiento que une heparina del tipo 1 (HBGF-1)  
Hepatopoyetina B (HPTB)  
Sustancia estimuladora hepática (HSS)  
Prostaglandinas
  
- Comitógenos: Noradrenalina  
Vasopresina, angiotensina II y III  
Estrógenos  
Insulina  
Glucagón

Inhibidores del crecimiento: Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)  
Interleuquina 1beta  
Inhibidor de la proliferación del hepatocito

Fig. 1.5. Estimuladores e inhibidores del crecimiento del hepatocito.

## 4.2.2. Estimuladores del crecimiento del hepatocito

Podemos diferenciar entre mitógenos completos y comitógenos o mitógenos incompletos.

### 4.2.2.1. Mitógenos completos

Son aquellas sustancias que por sí mismas, en un medio químico definido y en ausencia de suero, estimulan la síntesis de ADN y mitosis en hepatocitos quiescentes. En este grupo están incluidos el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) o

hepatopoyetina A, el factor de crecimiento que une heparina 1 (HBGF-1), la hepatopoyetina B (HPTB), la sustancia estimuladora hepática (HSS) y las prostaglandinas.

#### - Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Fue la primera sustancia descrita que estimulaba la síntesis de ADN en hepatocitos en cultivo (McGowan *et al.*, 1981). Suele aislarse de la glándula submaxilar de ratón, de donde se segrega al suero mediante estimulación  $\alpha$ -adrenérgica. Cuando es añadido a un cultivo de hepatocitos, la síntesis de ADN no comienza hasta 24 h más tarde, observándose el máximo de síntesis de ADN entre las 48 y las 72 h. En cambio, la síntesis de ADN durante la regeneración hepática comienza a las 12-14 h y tiene el máximo a las 24-28 h. Estas diferencias en el tiempo no han sido explicadas, aunque podría ser consecuencia de un proceso de reparación después de la perfusión con colagenasa y de la adaptación del hepatocito al medio *in vitro*. Ya que se ha observado que la adición del EGF 24 h después del aislamiento celular produce una respuesta más rápida (Vintermyr y Doskeland, 1987). Una explicación más simple sería que no es el único responsable de la síntesis de ADN durante la regeneración hepática. El número de receptores de EGF y la afinidad de estos por el EGF disminuyen en cultivo de hepatocitos en presencia de EGF. Después del aislamiento de los hepatocitos, los receptores de alta afinidad rápidamente desaparecen. Los receptores de baja afinidad, a pesar de la disminución inicial son mantenidos en un número suficiente de manera que cuando la respuesta mitogénica es estimulada sólo este tipo de receptor está presente. Esto ha conducido a la hipótesis de que los receptores de baja afinidad son los responsables del efecto mitogénico del EGF, mientras que los de alta afinidad prevendrían este efecto mitogénico impidiendo la unión del EGF con los receptores de baja afinidad (Wollenberg *et al.*, 1989). La estimulación de la síntesis de ADN por EGF usualmente conduce a dos o tres ciclos secuenciales, después de lo cual la síntesis se para por razones no muy bien comprendidas. Varios estudios *in vivo* han analizado el destino del complejo EGF-receptor, observando que una fracción de estos complejos es segregada en la bilis mientras que otra fracción va al núcleo. Esta última fracción está incrementada durante la regeneración hepática (Raper *et al.*, 1987). La estimulación de la síntesis de ADN en cultivo por el EGF también estuvo precedida por cambios en la expresión de genes asociados con el ciclo celular. Además de los efectos mitogénicos, el EGF también afecta a otras funciones de los hepatocitos como son el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas. El TGF- $\beta$  suprime la mitogénesis estimulada por el EGF pero no el incremento de la síntesis de proteínas producido por el EGF (Houck y Michalopoulos, 1989).

A pesar de considerarse al EGF como el prototipo de mitógeno para los hepatocitos, su papel durante la regeneración del hígado no está aclarado. A partir de las 8 h de una hepatectomía parcial, se ha observado una disminución del número de receptores del EGF,

alcanzando el nivel más bajo a las 40 h (Earp y O'Keefe, 1981; Gruppuso *et al.*, 1990). Se observa, también, una disminución paralela de la actividad tirosina quinasa (Rubin *et al.*, 1982) y del ARNm (Johansson *et al.*, 1990) del receptor. Estos cambios, sin embargo, podrían no ser debidos al EGF sinó a una regulación heteróloga por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico y/o a una secreción del TGF- $\alpha$ , ya que no se han descrito cambios sinificativos en la concentración de EGF durante la regeneración hepática (Olsen *et al.*, 1988). Sin embargo, los hepatocitos captan rápidamente el EGF inyectado, debido al gran número de receptores que poseen (300.000/célula). Una explicación para la disminución del número de receptores podría ser el incremento de la cantidad de EGF por hepatocito después de una hepatectomía parcial (aumenta  $\approx$  3 veces después de extirpar el 70 % de la masa hepática). También el aumento de la producción de TGF- $\alpha$  durante la regeneración hepática podría producir una disminución del número de receptores para el EGF, ya que el TGF- $\alpha$  y el EGF se unen al mismo receptor. Otra posible explicación para este fenómeno sería una regulación heteróloga mediante otro ligando, que se uniría a un diferente receptor e indirectamente podría inducir la disminución del número de receptores (down-regulation). La noradrenalina puede ejercer este efecto en cultivo, y es conocido el rápido aumento de esta hormona en plasma después de una hepatectomía parcial (Cruise *et al.*, 1987). El diferente procesamiento del complejo EGF-receptor podría estar también involucrado en la disminución del número de receptores, puesto que el porcentaje del complejo EGF-receptor que se traslada al núcleo se incrementa después de una hepatectomía parcial (Raper *et al.*, 1987). Además de los cambios descritos anteriormente, ocurre, también, una rápida disminución de los niveles de ARNm del receptor, que contribuirían a explicar los cambios observados (Johansson *et al.*, 1990). A pesar de cuestionarse si el EGF es el mitógeno natural capaz de inducir los cambios asociados con la regeneración hepática, ha sido comprobado que la inyección de EGF produce un aumento de la síntesis de ADN en el hígado (Bucher, 1982).

#### - Factor de crecimiento transformante $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )

Debido a que el TGF- $\alpha$  comparte el mismo receptor que el EGF no es de extrañar que sea mitógeno para los hepatocitos (Luetkeke *et al.*, 1988). Se ha descrito que es un mitógeno más potente que el EGF (Mead y Fausto, 1989; Brenner *et al.*, 1989) y sus efectos mitogénicos son inhibidos por el TGF- $\beta$  como en el caso del EGF. El TGF- $\alpha$  inicia la síntesis de ADN y división celular después de una rápida activación de la expresión de *c-jun* y *c-fos* (Brenner *et al.*, 1989; Leffert *et al.*, 1990). Al igual que el EGF (Kruijer *et al.*, 1986), algunos de los rápidos efectos genéticos producidos por el TGF- $\alpha$  podrían ser debidos a la activación de receptores de la superficie celular que medien en el influjo de iones sodio; ya que la deficiencia de iones sodio o la inhibición de este transporte atenuan la

activación de la expresión de *c-jun* y *c-fos* por el TGF- $\alpha$  (Kruijer *et al.*, 1986; Leffert *et al.*, 1990).

El papel del TGF- $\alpha$  en la regeneración hepática se ha convertido en un foco de atención y estudio desde que se demostró que los hepatocitos regenerantes sintetizaban activamente TGF- $\alpha$  (Mead y Fausto, 1989). Como el TGF- $\alpha$  es un mitógeno completo para los hepatocitos es razonable hipotetizar que la secreción del TGF- $\alpha$  por los hepatocitos regenerantes constituiría un mecanismo autocrino cuyo resultado sería el aumento de la síntesis de ADN. Desde este punto de vista, la producción del TGF- $\alpha$  por los hepatocitos podría ser la etapa crítica que conduciría a las células a sintetizar ADN, mientras que los cambios en la expresión génica observados antes de esta etapa constituirían un estado inicial en el que los hepatocitos se prepararían para la síntesis de ADN sin poder realizarla (Michalopoulos, 1990). Un aumento de los niveles de TGF- $\alpha$  fue observado a partir de las 8 h después de la hepatectomía parcial, con un pico de expresión a las 24 h y un segundo pico menor que el anterior a las 72 h. Estos cambios en la expresión del TGF- $\alpha$  fueron paralelos con la cinética de síntesis de ADN. El TGF- $\alpha$  podría también tener una función paracrina, estimulando la proliferación de la células no-parenquimatosas (Michalopoulos, 1990). Recientemente, Meyer *et al.* (1991) han demostrado la expresión de TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  en células de Kupffer sugiriendo un papel regulador de estas células en ambas direcciones (estimulación o inhibición) dependiendo de la proporción TGF- $\alpha$  /TGF- $\beta$  secretada.

#### - Factor de crecimiento del hepatocito (HGF)

Esta proteína lábil al calor ha sido aislada del suero de ratas, conejos y humanos. Fue originalmente identificada por Michalopoulos *et al.* en 1983 como una fracción de una cromatografía del suero de ratas hepatectomizadas, denominándola hepatopoyetina A. A partir de los estudios de Nakamura *et al.* (1984, 1986 y 1987), Gohda *et al.* (1986), y Zarnegar y Michalopoulos (1989), que purificaron y caracterizaron esta proteína, es conocida con el nombre de factor de crecimiento del hepatocito (HGF). Actualmente los HGFs humano y de rata han sido clonados y sus secuencias de aminoácidos es conocida (Nakamura *et al.*, 1989; Miyazawa *et al.*, 1989; Tashiro *et al.*, 1990). El HGF es un heterodímero que tiene un ARNm de 6 Kb cuyo producto de traducción sufre un procesamiento proteolítico que da lugar a la formación de dos cadenas: una cadena  $\alpha$  de 69 kDa y otra  $\beta$  de 34 kDa unidas por puentes disulfuro (Miyazawa *et al.*, 1989). Estudios inmunohistoquímicos (Zarnegar *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1991) localizan al HGF en numerosos tejidos y tipos celulares independientemente de su actividad regenerativa. La mayor parte del HGF se localiza en el páncreas (porción exocrina), cerebro (neuronas grandes del lóbulo occipital), células interfoliculares del tiroides y en menor cantidad se ha encontrado en las glándulas salivares y en las glándulas de Brunner del duodeno. Analisis

del ARNm del HGF revelaron que se expresa en diferentes tejidos de rata (riñón, corazón, pulmón, cerebro) incluyendo el hígado (Tashiro *et al.*, 1990). También se expresa en gran cantidad en el hígado fetal (Selden *et al.*, 1990). En el suero humano su concentración es de 0.24 ng/ml y aumenta en procesos en los que el hígado esté dañado, como en la cirrosis, la hepatitis crónica y la hepatitis aguda. En la hepatitis fulminante la concentración de HGF en suero aumenta hasta más de 30 veces (8.02 ng/ml) (Tsubouchi *et al.*, 1989 y 1991). Es la sustancia que requiere menos concentración para ser mitógeno para los hepatocitos: 1 ng/ml ( $\approx 30$  pM) es suficiente para estimular la síntesis de ADN en hepatocitos de rata adulta, siendo sus efectos aditivos con los del TGF- $\alpha$  y EGF. Aunque no estimula la síntesis de ADN más que el TGF- $\alpha$  (Gohda *et al.*, 1990). La actividad del HGF no es específica de tejido, ni de especie, aunque no estimula el crecimiento de líneas celulares establecidas como fibroblastos 3T3 de ratón suizo o células epiteliales de hígado de rata buffalo (BRL). Recientemente, Tajima *et al.* (1991) han observado una actividad anti-proliferativa del HGF en varias líneas celulares de tumores. El receptor del HGF es el producto del proto-oncogen c-met (Bottaro *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1991). Este receptor es una proteína de 190 kDa con actividad tirosina quinasa formada por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$  (50 kDa) es una proteína extracelular y la  $\beta$  (145 kDa) es una proteína transmembrana localizándose en su dominio intracelular la actividad tirosina quinasa (Giordano *et al.*, 1989 a y b). Análogamente al trk-B (Klein *et al.*, 1990), formas truncadas del receptor del HGF que afectan al dominio tirosina quinasa han sido descritas (Prat *et al.*, 1991). Recientemente, Di Renzo *et al.* (1991) han detectado niveles elevados de ARNm<sup>met</sup> y proteína en hígado, tracto gastrointestinal y riñón.

Durante la regeneración del hígado los niveles de ARNm del HGF se incrementan rápidamente (3-6 h) con un máximo a las 10-12 h y vuelven a niveles control hacia las 72-96 h (Selden *et al.*, 1990; Zarnegar *et al.*, 1991). La presencia del HGF en la porción exocrina del páncreas y en las glándulas de Brunner, los bajos niveles en hígado normal, el rápido incremento de su actividad en plasma después de una hepatectomía parcial (3 h) y la rápida disminución en la capacidad de unión del HGF a su receptor (3-6 h), sugieren que el HGF implicado en los procesos iniciales de la regeneración provendría de tejidos extrahepáticos más que del propio hígado (Kinoshita *et al.*, 1991; Higuchi y Nakamura, 1991).

#### **- Factor de crecimiento que une heparina del tipo 1 (HBGF-1)**

El HBGF-1, también denominado factor de crecimiento ácido del fibroblasto (acidic FGF), pertenece a una familia de HBGFs constituida por los productos de siete genes con un amplio espectro de efectos biológicos en el crecimiento y la función de una variedad de tipos celulares (Burgess y Maciag, 1989). Este factor de crecimiento de 16.000 kDa estimula la síntesis de ADN en hepatocitos, pareciendo actuar en subpoblaciones específicas de

hepatocitos, ya que sólo la mitad de las células responde al HBGF-1 (Michalopoulos, 1990). Requiere heparina para su actividad, siendo totalmente inactivo en su ausencia. Recientemente, han sido identificados los receptores del HBGF (Hou *et al.*, 1991). Durante la regeneración hepática este factor es segregado por el hígado con un pico de secreción coincidente con la síntesis de ADN. Es producido por los hepatocitos y las células no parenquimatosas, y su secreción persiste durante 7 días después de la hepatectomía parcial (Kan *et al.*, 1989).

#### **- Hepatopoyetina B (HPTB)**

Es un mitógeno completo para el hepatocito, pero es menos activo que el EGF o el HGF interactuando de una manera sinérgica con ambos. Su actividad fue encontrada en el suero de ratas hepatectomizadas (Michalopoulos *et al.*, 1984). Es más pequeño de 500 Da, no contiene aminoácidos en su molécula, y sus propiedades son las de un glicolípido (Michalopoulos, 1990).

#### **- Sustancia estimuladora hepática (HSS)**

La HSS ha sido descrita como mitogénica para hepatocitos in vivo (LaBrecque *et al.*, 1987; Francavilla *et al.*, 1987; Fleig y Hoss, 1989) y extraída de hígados de neonato y regenerantes. Su peso molecular es de aproximadamente 16.000 kDa y estimula la síntesis de ADN en hígados sometidos a una hepatectomía parcial. No es un mitógeno completo para los hepatocitos en cultivo. Parece que se une a heparina (Schwarz *et al.*, 1988) y aumenta la síntesis de ADN producida por el EGF en cultivo de hepatocitos. La similitud de propiedades y características entre el HBGF-1 y la HSS, peso molecular parecido, se unen a heparina, se generan en hígados regenerantes y necesitan heparina para estimular la síntesis de hepatocitos en cultivo, hacen pensar que ambas moléculas sean la misma.

#### **- Prostaglandinas**

Las prostaglandinas (E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub>) estimulan la síntesis de ADN en cultivo primario de hepatocitos de rata adulta (Skouteris *et al.*, 1988) o de neonato (Andreis *et al.*, 1981). Después de una hepatectomía parcial, se detectan niveles elevados de prostaglandinas en el suero a partir de 1 h, permaneciendo elevados a las 24 h (Little *et al.*, 1988), probablemente debido al incremento de su producción en las células no parenquimatosas después de una hepatectomía parcial (Altin y Bygrave, 1988). El suero de estos animales hepatectomizados estimula la síntesis de ADN de hepatocitos en cultivo y aumenta la liberación de prostaglandinas al medio de cultivo (Little *et al.*, 1988). Recientemente, Hashimoto *et al.* (1991) han descrito una disminución del número de receptores de prostaglandinas E<sub>2</sub>

después de una hepatectomía parcial. Todos estos efectos fueron inhibidos por indometacina o por aspirina, inhibidores de la ciclo-oxigenasa de ácidos grasos, que bloquea la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos (Shen y Winter, 1977), impidiendo la síntesis de ADN (MacManus y Braceland, 1976; Hashimoto *et al.*, 1991). Besse *et al.* (1991) han demostrado que los tromboxanos no están implicados directamente en la estimulación de la síntesis de ADN. También se ha demostrado el bloqueo de la síntesis de ADN por la indometacina durante la regeneración hepática, sugiriendo un papel regulador de las prostaglandinas o algún producto(s) de la cascada del ácido araquidónico en el control de la regeneración del hígado (MacManus y Braceland, 1976; Rixon y Whitfield, 1982; Tsukamoto y Sojo, 1989). Las células de Kupffer después de una hepatectomía parcial estimulan la síntesis de ADN de hepatocitos en cultivo (Katsumoto *et al.*, 1989). Todos estos datos y el conocimiento de que las prostaglandinas son producidas en las células de Kupffer y en las células endoteliales, pero no en los hepatocitos (revisado por Altin y Bygrave, 1988), sugieren un papel modulador de ciertos factores que se liberan en estas células, posiblemente prostaglandinas, en la función hepática y durante la proliferación de los hepatocitos.

#### 4.2.2.2. Comitógenos o mitógenos incompletos

También denominados disparadores o iniciadores del crecimiento (growth triggers). Son sustancias que afectan al crecimiento del hepatocito en una dirección positiva pero de una manera indirecta. Se les puede atribuir tres propiedades: a) intensifican los efectos mitogénicos de los estimuladores del crecimiento (EGF, HGF,...), b) disminuyen el efecto inhibitorio de los inhibidores del crecimiento, y c) no producen efectos mitogénicos por sí mismos en cultivos sin suero. Debido a estas propiedades se les puede considerar como moduladores del proceso de crecimiento. Estas tres propiedades no se han demostrado en todas las sustancias y a menudo sólo se han estudiado la primera y la tercera. En esta categoría podemos incluir a las siguientes sustancias: noradrenalina (norepinefrina), vasopresina, angiotensina II y III, estrógenos, insulina y glucagón (Michalopoulos, 1990).

##### - Noradrenalina

Es el neurotransmisor mejor caracterizado del sistema nervioso simpático. En cultivo de hepatocitos se han demostrado las tres anteriores propiedades para la noradrenalina y que estos efectos están mediados por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Cruise *et al.*, 1985). El papel del sistema nervioso simpático y sus neurotransmisores durante la regeneración hepática ha sido demostrado en varios estudios (revisados por Cruise *et al.*, 1987). Parece claro que el



receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico tiene una función esencial durante las etapas iniciales de la regeneración hepática como lo demuestra el bloqueo del receptor por prazosin que impide el pico de síntesis de ADN visto a las 24 h de la regeneración hepática (Cruise *et al.*, 1987). Sin embargo, la síntesis de ADN alcanzó valores normales a las 72 h. Efectos similares han sido vistos con la denervación hepática.

La adición de noradrenalina a un cultivo de hepatocitos intensifica el efecto mitogénico del EGF y produce una disminución del número de receptores del EGF (Cruise *et al.*, 1986). Una disminución similar del número de receptores para el EGF ha sido demostrada en hepatocitos durante la regeneración hepática (Francavilla *et al.*, 1986b). La noradrenalina no es mitogénica para los hepatocitos (Cruise *et al.*, 1986) y disminuye el efecto inhibitor del TGF- $\beta$  (Houck *et al.*, 1988). Los hepatocitos de hígados regenerantes, 12-16 h después de la hepatectomía parcial, son muy sensibles al efecto de la noradrenalina sobre la acción del TGF- $\beta$  (Houck y Michalopoulos, 1989). La adición de noradrenalina a hepatocitos de hígados regenerantes, de los tiempos anteriores que están en presencia de EGF y TGF- $\beta$ , incrementa el índice de incorporación de timidina de un 4 % a más de un 70 %. Demostrando la capacidad de la noradrenalina de modular el balance entre inhibidores y estimuladores del crecimiento y de ser un iniciador de la mitogénesis del hepatocito. Ha sido demostrado que la inhibición por el TGF- $\beta$  de la mitogénesis estimulada por el EGF no está mediada por el receptor del EGF (Russell, 1988), lo que parece indicar que la noradrenalina está actuando independientemente de las rutas de señales mediadas por ambos factores de crecimiento (Michalopoulos, 1990).

Los efectos bioquímicos de la noradrenalina y del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico han sido extensamente estudiados en suspensión de hepatocitos y en hígados perfundidos. El receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico es la ruta principal de control de la regulación de la degradación de glucógeno. El receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico está unido a una proteína G y estimula la actividad fosfatidilinositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) fosfodiesterasa. La estimulación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico incrementa la degradación de PIP<sub>2</sub>, aumentando la concentración de diacilglicerol y de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>). Estos mediadores inician una cascada de sucesos intracelulares, incluyendo la activación de la proteína quinasa C y la movilización del calcio almacenado en el retículo endoplasmático (revisado por Exton, 1988). Estas etapas iniciales son comunes a muchos receptores que movilizan calcio, incluyendo la vasopresina y la angiotensina II. No está claro que los sucesos intracelulares anteriores sean cruciales para el efecto de la noradrenalina como comitógeno. Cuando un ionóforo del calcio o un éster de forbol (TPA) fueron añadidos separadamente o juntos para mimetizar los efectos de los mensajeros de las dos ramas de la ruta de degradación de los PIP<sub>2</sub>, ninguna combinación pudo mimetizar los efectos de la noradrenalina, sugiriendo que un mecanismo alternativo podría estar involucrado (Takai *et al.*, 1988). Estos sucesos encontrados en cultivo de

células son coincidentes con los encontrados *in vivo*. Se ha demostrado que en hepatocitos de hígados regenerantes de 10-20 h después de la hepatectomía parcial, que son muy sensibles a la noradrenalina, el receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico no está acoplado al sistema de la PIP<sub>2</sub> fosfodiesterasa (Cruise *et al.*, 1989).

Los fenómenos que ocurren durante las primeras horas después de una hepatectomía parcial claramente implican al receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico. Fenómenos como la hiperpolarización de la membrana, la glucogenolisis y el incremento de diacilglicerol han sido clásicamente asociados a receptores que movilizan calcio, como es el receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico. La concentración de catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) en sangre periférica aumenta rápidamente después de una hepatectomía parcial, presumiblemente debido a la disminución de la monoamino oxidasa hepática, enzima que degrada las catecolaminas en el plasma, debido a la extirpación del 70 % de la masa hepática. Estas catecolaminas circulantes podrían ser las causantes de la estimulación del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico (Cruise *et al.*, 1987).

El papel de los neurotransmisores como comitógenos está recibiendo mucha atención desde que se demostró que el receptor de la serotonina-1c actuaba como un oncogen para las células NIH 3T3. El receptor para la angiotensina III, un comitógeno tanto para los hepatocitos como para las células del epitelio renal, es idéntico al oncogen *mas*. La acetilcolina estimula el crecimiento de neuronas en cultivo primario (revisado por Hanley, 1989).

#### - Vasopresina, angiotensina II y III

Estas hormonas actúan a través de receptores que intensifican el turnover del PIP<sub>2</sub>, y, como la noradrenalina, estimulan la glucogenolisis. Sin embargo, la noradrenalina es mucho más potente que estas hormonas, tanto en la estimulación de la mitogénesis por EGF como en la disminución del efector inhibidor del TGF- $\beta$  (Houck y Michalopoulos, 1989). A pesar de la similaridad de las señales intracelulares, hay diferencias entre los receptores de la noradrenalina y los de las otras hormonas. Estas diferencias incluyen diferente sensibilidad a los bloqueadores del sistema de segundos mensajeros (como la toxina pertussis), a los ésteres de forbol y al glucagón, a la movilización del calcio, ... (revisado por Exton, 1988). La importancia de la vasopresina durante la regeneración hepática queda reflejada por los experimentos realizados con una cepa de ratas con una deficiencia congénita en la producción de vasopresina. En estas ratas la regeneración del hígado estuvo disminuida (Russell y Bucher, 1983). La vasopresina es segregada en las sinapsis de los nervios simpáticos del hígado junto con la noradrenalina. Por lo que ambas hormonas podrían estar involucradas en la mediación de los rápidos efectos del sistema simpático en la regeneración hepática.

### - Estrógenos

Hay evidencias importantes que indican un papel de los estrógenos durante la regeneración hepática (Fisher *et al.*, 1984; Francavilla *et al.*, 1984, 1986a y 1989). La concentración de estradiol en suero está aumentada después de una hepatectomía parcial, alcanzando un máximo a las 6 h y recuperando niveles control a las 72 h. Inversamente, los niveles de testosterona disminuyeron pero en la misma extensión que en los animales control (Liddle *et al.*, 1989). Los estrógenos añadidos a un cultivo primario con suero o EGF intensifican la mitogénesis (Shi y Yager, 1989). El número de receptores de estrógenos y su tiempo de retención en el núcleo se incrementa después de una hepatectomía parcial. Inversamente, el número de receptores de andrógenos en el núcleo disminuye (Francavilla *et al.*, 1984). Todos estos datos han llevado a sugerir un cierto papel de la "desmasculinización" hepática en la velocidad de regeneración hepática.

### - Insulina y glucagón

La insulina no estimula la proliferación de hepatocitos en cultivo, a pesar de sus efectos tróficos sobre la fisiología y viabilidad de los hepatocitos. Los hepatocitos en cultivo, en un medio químico definido, degeneran y mueren en ausencia de insulina. La pancreatectomía produce una disminución de la masa hepática y la administración de insulina y glucagón revierte parcialmente este efecto. La pancreatectomía también está asociada con un descenso de la síntesis de ADN durante la regeneración hepática, restableciéndose a una actividad normal con la administración conjunta de insulina y glucagón (Bucher y Swaffield, 1973 y 1975). A pesar de la clara evidencia que la insulina y glucagón tienen un papel permisivo para la síntesis óptima de ADN y la regeneración del hígado, no se ha podido demostrar que estas sustancias tengan algún efecto mitogénico en el hígado. La inyección de insulina y glucagón en ratas intactas no causó síntesis de ADN mientras que el EGF sí lo hizo (revisado por Bucher en 1982).

## 4.2.3. Inhibidores del crecimiento del hepatocito

El efecto de la mayoría de estas sustancias han sido demostrado en cultivo de hepatocitos, basándose en su capacidad para inhibir la mitogénesis producida por el EGF. En este grupo están incluidos: el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la interleuquina 1 $\beta$  y el inhibidor de la proliferación del hepatocito.

### - Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Se han identificado más de tres polipéptidos de la familia del TGF- $\beta$ . Sus pesos moleculares son de aproximadamente 26.000 kDa. Muchos de los estudios se han realizado con el TGF- $\beta$ 1. Se les ha asociado con una extensa variedad de funciones *in vivo* como la cicatrización de heridas y la proliferación de células derivadas del mesénquima. En cultivo de células epiteliales y bronquiales se ha encontrado que el TGF- $\beta$  es un inhibidor del crecimiento (Sporn y Roberts, 1988).

El TGF- $\beta$  inhibe la mitogénesis inducida por el EGF y el HGF en cultivo de hepatocitos (Carr *et al.*, 1986; Wollenberg *et al.*, 1987). La concentración necesaria varía según la concentración del mitógeno, así en presencia de 10 ng/ml de EGF necesitamos 0,1 ng/ml de TGF- $\beta$  para obtener una inhibición del 50 %.. El TGF- $\beta$  inhibe la síntesis de ADN tanto si es añadido antes como después de la estimulación por EGF. El TGF- $\beta$  no modificó la unión del EGF a su receptor o la autofosforilación del receptor mediada por el EGF (Russell, 1988).

Los estudios realizados *in vivo* parecen implicar al TGF- $\beta$  como un inhibidor de la síntesis de ADN durante la regeneración del hígado. La producción de ARNm del TGF- $\beta$  por las células no-parenquimatosas del hígado comienza a ser detectable a las 4 h después de la hepatectomía parcial, permaneciendo los niveles bajos hasta las 18-20 h y, entonces, comienzan a incrementarse alcanzando un máximo a las 72 h, manteniéndose elevados más allá de las 96 h (Braun *et al.*, 1988; Carr *et al.*, 1989). Los experimentos más evidentes fueron realizados por Russell *et al.* (1988). Estos autores inyectaron el TGF- $\beta$  a distintos tiempos antes y después de la hepatectomía parcial observando como se inhibía el pico de síntesis de ADN visto a las 24 h de la regeneración. Repetidas y más elevadas dosis de TGF- $\beta$ , sin embargo, no consiguieron inhibir completamente la síntesis de ADN y sólo retrasaron el pico de síntesis de ADN.

### - Interleuquina 1 $\beta$

Ha sido demostrado que la interleuquina 1 $\beta$ , una forma de interleuquina 1, inhibe la proliferación de los hepatocitos. La inhibición de la síntesis de ADN no fue completa, persistiendo un 20 % de actividad residual. También se ha descrito que la interleuquina 6 inhibe la proliferación, pero en una menor extensión (Nakamura *et al.*, 1988).

### - Inhibidor de la proliferación del hepatocito

Es una proteína de  $\approx$ 15.000 kDa, que inhibe la proliferación de los hepatocitos en cultivo. Otras células epiteliales derivadas del hígado también son inhibidas. La actividad de este inhibidor no es suprimida por anticuerpos anti-TGF- $\beta$  y su cinética de inhibición es diferente a la del TGF- $\beta$  (Hugget *et al.*, 1987).

### 4.3. Modelos propuestos

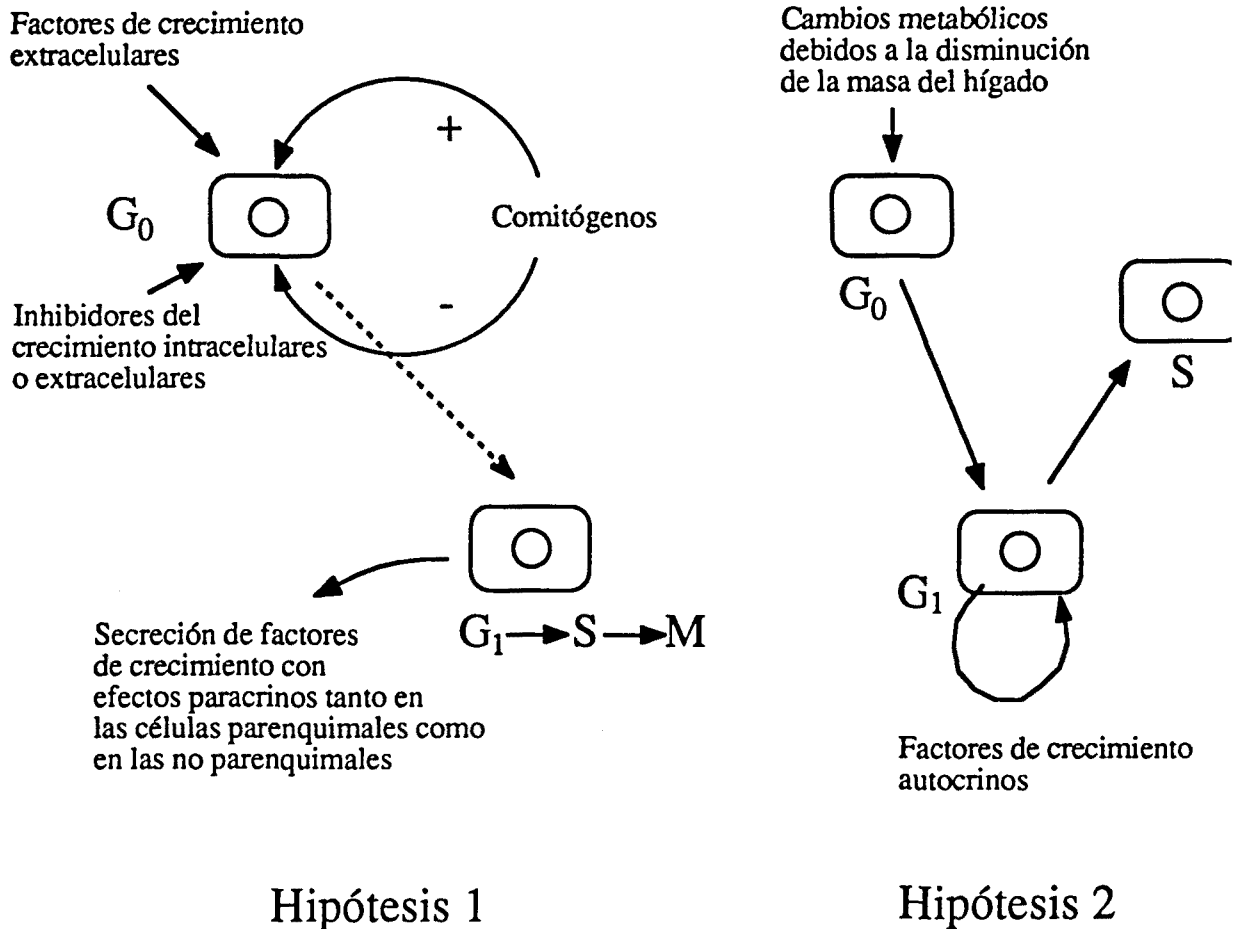
A pesar de los intensivos esfuerzos realizados por los investigadores, la identidad precisa de la señal o señales responsables de estimular el crecimiento del hígado después de una hepatectomía parcial permanecen cuestionadas. Parece evidente que una multiplicidad de factores están involucrados y que muchos de éstos interactúan en combinaciones sinérgicas, de tal manera que señales débiles pueden ser extensamente amplificadas, y que estas interacciones sinérgicas sean las que determinen una señal específica para el hígado (Bucher *et al.*, 1990). Actualmente se trabaja con dos hipótesis sobre el origen de la señales que inducen la proliferación del hígado (Fig. 1.6).

*Hipótesis 1: Las señales para la proliferación hepática provienen del exterior de los hepatocitos.*

En esta hipótesis, las señales provendrían de lugares extrahepáticos y serían generadas después de una hepatectomía parcial, transmitiéndose luego al hígado como un estímulo mitogénico completo. En esta hipótesis las hormonas como el glucagón y la insulina, los neurotransmisores como la noradrenalina, y los factores de crecimiento como el HGF podrían desempeñar un papel fundamental. La evidencia del glucagón, la insulina y la noradrenalina podría ser sostenida porque: a) el glucagón y la noradrenalina se incrementan rápidamente en el plasma después de una hepatectomía parcial (Leffert *et al.* 1975 y 1979; Morley *et al.*, 1975; Bucher y Weir, 1976; Cruise *et al.*, 1987) ; b) muchos de los efectos que observamos después de una hepatectomía parcial (hiperpolarización de la membrana, glucogenolisis, incremento del diacilglicerol y del AMP cíclico, ...) han sido demostrados estar mediados por los receptores adrenérgicos (Cruise *et al.*, 1985; Bocckino *et al.*, 1989; Sandnes *et al.*, 1986); c) la noradrenalina reproduce en hepatocitos en cultivo, algunos de los cambios descritos para el EGF y su receptor durante la regeneración hepática (Cruise *et al.*, 1986; Francavilla *et al.*, 1986b; ; d) la noradrenalina intensifica la inhibición de los efectos del TGF- $\beta$  en hepatocitos regenerantes (Houck *et al.*, 1988; Houck y Michalopoulos, 1989); e) la administración de glucagón junto a insulina restablece la síntesis de ADN en ratas pancreatectomizadas y sometidas a una hepatectomía parcial (Bucher y Swaffield, 1975); f) la insulina es esencial para la regeneración hepática como lo demuestra la inhibición de la síntesis de ADN en ratas parcialmente hepatectomizadas a las que se les administró suero anti-insulínico (Bucher *et al.*, 1978b); ....

Noradrenalina, glucagón e insulina, sin embargo, no son mitógenos completos. Se ha encontrado gran cantidad de HGF, un mitógeno completo, en el páncreas, y su rápido aumento después de una hepatectomía parcial hace especular la posibilidad de que el HGF sea el mitógeno completo asequible a los hepatocitos. Sus efectos mitogénicos dependerían

del balance con los inhibidores del crecimiento (TGF- $\beta$ ,...). Una prolongada y sostenida estimulación por noradrenalina podría potenciar el efecto del HGF sobre los hepatocitos y conducir a una señal mitogénica completa (Michalopoulos, 1990). Sin olvidar que otros factores de crecimiento como el EGF y el HBGF-1, y otros comitógenos podrían estar involucrados.



**Fig. 1.6. Modelos propuestos para explicar la entrada del hepatocito en el ciclo celular. Estimulación por factores extracelulares (Hipótesis 1) o por señales autocrinas (Hipótesis 2). Adaptada de Michalopoulos (1990).**

*Hipótesis 2: Las señales mitogénicas decisivas para la proliferación de los hepatocitos provendrían de ellos mismos.*

Las últimas evidencias experimentales apoyan esta teoría. 6-8 h después de la hepatectomía parcial comienzan a incrementarse los niveles de ARNm para el TGF- $\alpha$  (Mead y Fausto, 1989), el HBGF-1 (Kan *et al.*, 1989) y el HGF (Selden *et al.*, 1990; Zarnegar *et*

*al.*, 1991). El pico de producción de estos factores coincide con la síntesis de ADN. Todas estas sustancias son mitogénicas para hepatocitos en cultivo y su producción continuada podría constituir una señal mitogénica completa. Según esta hipótesis, los cambios producidos en el plasma después de una hepatectomía parcial inducirían cambios nutricionales y bioquímicos en los hepatocitos que los llevarían a abandonar el estado G<sub>0</sub> y entrar en G<sub>1</sub>. La persistencia de estos cambios provocarían cambios en los hepatocitos, de tal forma, que iniciarían la producción de sus propias señales mitogénicas que actuando de una forma autocrina serían las causantes de la transición G<sub>1</sub> a S (Michalopoulos, 1990).

Estos factores de crecimiento producidos por los hepatocitos podrían tener también un papel paracrino. Es conocido el retraso en la síntesis de ADN de aproximadamente 24 h entre las células no parenquimatosas del hígado y los hepatocitos. La producción intensificada de estos factores (hay un máximo a las 24 h después de la hepatectomía parcial) podría ser la señal paracrina que conduciría a la proliferación de las células no parenquimatosas.

Ambas hipótesis (1 y 2) están basadas en los datos conocidos *in vivo* e *in vitro*. Uno de los aspectos más importantes de estas hipótesis es que no son mutuamente excluyentes. Es posible que la señal mitogénica esté compuesta de ambos procesos. Los hepatocitos, por ejemplo, serían capaces de producir factores de crecimiento autocrinos sólo después de que ellos recibieran una señal mitogénica completa del exterior. Los factores de crecimiento que producirían podrían tener un papel tanto autocrino como paracrino.

Uno de los aspectos más interesantes de la regeneración hepática es cómo el hígado cesa de proliferar cuando la masa hepática se ha restablecido. Este fantástico fenómeno ha sido menos estudiado y por esto se sabe menos sobre los mecanismos responsables de la terminación de la regeneración del hígado. Parece claro que el TGF- $\beta$  tiene un papel importante en esta parada. El TGF- $\beta$  es producido por las células no parenquimatosas. Su ARNm comienza a detectarse a las 4 h, manteniéndose hasta las 18-20 h, e incrementándose después de este tiempo considerablemente con un máximo a las 72 h (Braun *et al.*, 1988; Carr *et al.*, 1989). Dado que el TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de hepatocitos en cultivo (Carr *et al.*, 1986) e *in vivo* (Russell *et al.*, 1988), es razonable postular que el aumento de TGF- $\beta$  estará involucrado en la terminación de la regeneración hepática. Si observamos la expresión del TGF- $\beta$  durante la regeneración hepática una paradoja aparece: ¿cómo los hepatocitos pueden proliferar cuando el TGF- $\beta$  es producido en grandes cantidades por las células no parenquimatosas?. Como hemos descrito antes, entre las 24-72 h se encuentran niveles elevados de TGF- $\beta$ , que es cuando los hepatocitos están sintetizando ADN. Por lo que deben estar involucrados otros mecanismos que impidan la actuación del TGF- $\beta$  durante esta fase. La noradrenalina, probablemente a través del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico, podría ser la

responsable de la resistencia de los hepatocitos al TGF- $\beta$  durante las primeras 24 h de la regeneración (Houck y Michalopoulos, 1989; Cruise *et al.*, 1987). Entre las 24-48 h los hepatocitos adquieren una mayor resistencia a la inhibición por el TGF- $\beta$ , probablemente relacionada con la producción de los factores de crecimiento autocrinos (Houck y Michalopoulos, 1989). Recientemente, Meyer *et al.* (1991) han demostrado que las células de Kupffer tienen la capacidad de estimular o inhibir la síntesis de ADN en hepatocitos. Estos efectos dependen de la relación TGF- $\beta$ /TGF- $\alpha$  ya que ambos factores se sintetizan en estas células. La variación de esta relación durante la regeneración hepática podría también ser la explicación de los efectos anteriormente comentados.

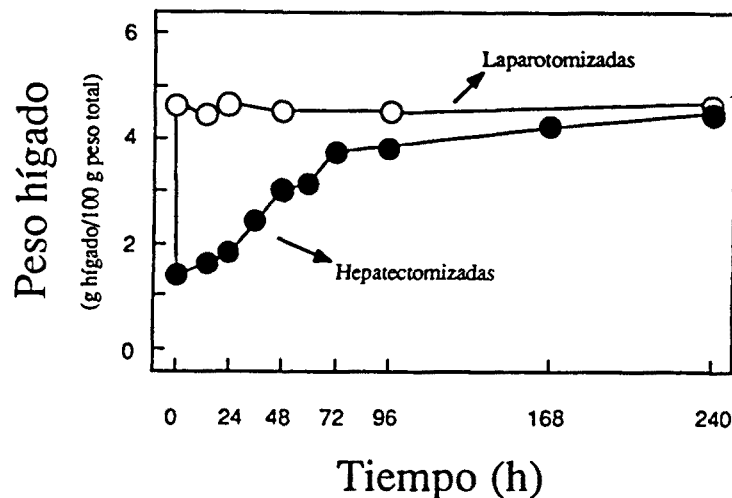
Aunque es posible que elevados niveles de TGF- $\beta$  inhiban la proliferación hepática al final de la regeneración del hígado, sorprende la gran resistencia que los hepatocitos desarrollan contra el TGF- $\beta$ . También hay que considerar la posibilidad de que los hepatocitos estén programados para parar después de 1 ó 2 ciclos de proliferación como ocurre en cultivo de hepatocitos en presencia de EGF y dimetilsulfóxido (DMSO). Cuando el DMSO es eliminado del medio de cultivo los hepatocitos sintetizan ADN y proliferan durante dos días, después de este tiempo se paran (Chan *et al.*, 1989). Estos datos sugieren la posibilidad de que la terminación de la proliferación hepática pueda ser debida a señales internas de los hepatocitos y no producida por señales externas como el TGF- $\beta$ . Aunque recientemente, Mitaka *et al.* (1991) han publicado que los hepatocitos de rata adulta en presencia de nicotinamida y EGF, y en un medio libre de suero, pueden realizar al menos tres ciclos celulares durante cuatro días de cultivo. Estudios adicionales son necesarios para elucidar si son estos u otros los mecanismos implicados en el cese de la regeneración hepática.



Capítulo 2: Estudio del metabolismo  
hidrocarbonado durante la  
regeneración hepática



El hígado es inducido a crecer por una sobrecarga funcional, que puede ser debida a una pérdida de t jido (hepatectomía parcial, hepatitis,...) o a una excesiva demanda metabólica (impuesta, por ejemplo, por manipulaciones de la dieta). La velocidad proliferativa es proporcional a la cantidad de trabajo que debe realizar. Así, si el déficit es pequeño, la pérdida es restablecida lentamente, aumentando la velocidad potencialmente a medida que la pérdida es más grande. Además, el estado metabólico del hígado y la edad del animal influyen en su capacidad regenerativa (Bucher, 1982). Por estos motivos nuestro modelo de estudio debía de tener una serie de parámetros fijados. Utilizamos ratas macho (variedad Sprague-Dawley) de 180-220 g (6-7 semanas), alimentadas previamente y posteriormente al proceso quirúrgico, y sometidas a un ciclo de luz y oscuridad de 12 h cada uno comenzando a las 8 h de la mañana. Las ratas fueron operadas entre las 8-10 h de la mañana para minimizar las variaciones circardianas y sincronizar la síntesis de ADN. La hepatectomía parcial consistió en una laparotomía y extirpación de los lóbulos izquierdo y mediano, aproximadamente un 70 % de la masa hepática. Los animales fueron anestesiados con éter etílico porque sus efectos anestésicos desaparecen rápidamente (aprox. a los 10 min post-intervención). Como controles del estrés quirúrgico y anestésico, y de las posibles variaciones debidas al ciclo circardiano se utilizan ratas laparotomizadas (sham). Todos los animales fueron sacrificados por decapitación y los hígados rápidamente congelados en n trgeno líquido (Higgins y Anderson, 1931; Barbiroli y Potter, 1971; Rosa *et al.*, 1990).



**Fig. 2.1. Perfil proliferativo durante la regeneración hepática.**

Cada punto representa el promedio de 4-12 animales. Las desviaciones s tandard han sido omitidas para una mejor visualización. Las diferencias fueron significativas ( $p < 0.001$ ) hasta 96 h inclusive.

Con los parámetros anteriores, los más utilizados por los investigadores que utilizan este modelo, puede observarse en la figura 2.1 el perfil proliferativo de nuestras ratas, expresado como el cociente de la masa hepática por la masa total del animal. Se puede apreciar como el hígado empieza a aumentar de peso a partir de las 24 h coincidiendo con la síntesis de ADN y las primeras mitosis (Fausto y Mead, 1989; Michalopoulos, 1990). Entre los 7-10 días se observa como la masa hepática se ha restablecido.

## 1. Antecedentes

Durante la regeneración del hígado, el metabolismo hepático cambia de una utilización predominante de carbohidratos, como fuente de energía, a un incremento en la utilización de lípidos. Como lo demostraban ya los experimentos realizados por Simek *et al.* en 1967, donde la administración de insulina impedía la movilización de los ácidos grasos desde el tejido adiposo al hígado disminuyendo por este motivo la velocidad proliferativa. En paralelo a la utilización de los lípidos, como fuente de energía, se observa un incremento de los ácidos grasos circulantes (Gove y Hems, 1978; Schofield *et al.*, 1985) y una acumulación de triacilglicéridos en el hígado remanente (Gove y Hems, 1978; Schofield *et al.*, 1985). Hasta los estudios de Katz (1979), muy poco se sabía sobre el metabolismo hidrocarbonado durante la regeneración hepática. Era conocido que durante este proceso la glucemia se mantenía (Leffert *et al.*, 1975; Bucher y Weir, 1976) y que el glucógeno se degradaba rápidamente, contribuyendo así a este mantenimiento (Harkness, 1952; Yokoyama *et al.*, 1953). Se había descrito, también, que después de una hepatectomía parcial las actividades de los enzimas glucolíticos glucoquinasa (GK) y L-piruvato quinasa (L-PK) disminuían, apareciendo algunas formas isoenzimáticas propias de un estado menos diferenciado (Bonney *et al.*, 1973).

Katz (1979) estudió el flujo glucolítico/gluconeogénico en hepatocitos de hígados regenerantes mediante técnicas radioisotópicas ( $^{14}\text{C}$ ), demostrando que la gluconeogénesis aumentaba y la glucolisis disminuía para mantener la homeostasis de la glucosa. Intentó correlacionar estas velocidades alteradas con las actividades de los enzimas, considerados reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis. Observando que las actividades glucosa 6-fosfatasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1), L-PK y 6-fosfofructo 1-quinasa (PFK-1) no se modificaban, y que la actividad GK disminuía mientras que la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) aumentaba. Por lo que concluyó que la actividad de los enzimas GK y PEPCK correlacionaban con la disminución de la glucolisis y del aumento de la gluconeogénesis después de una hepatectomía parcial.

Después de estos experimentos, los estudios de Shofield *et al.* (1986) confirmaron la poca importancia de la utilización de los carbohidratos como fuente de energía durante la regeneración del hígado. Demostrando, además, un aumento de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) cuando estaba disminuída la actividad L-PK.

Durante la década de los años 80 se describió a la fructosa 2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) como un importante modulador del flujo glucolítico/gluconeogénico asociando el aumento de su concentración con un incremento de la glucolisis y una disminución de la gluconeogénesis, sucediendo al contrario si disminuía su concentración (Hers y Hue, 1983; Hue y Bartrons, 1985; Van Schaftingen, 1987; Hue y Rider, 1987; Pilkis y El-Maghrabi, 1988, Pilkis *et al.*, 1990). Teniendo en cuenta toda esta información, pensamos que la Fru-2,6-P<sub>2</sub> podría tener una función importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa durante la regeneración hepática. Así pues, considerando los resultados previos de Gil (1987), decidimos estudiar el posible papel de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en este modelo de proliferación celular *in vivo*.

## 2. Estudio del papel de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> durante la regeneración hepática

Habíamos comprobado que nuestras ratas regeneraban (Fig. 2.1) tal y como estaba descrito en la bibliografía. Ahora queríamos saber si también estas ratas mantenían la homeostasis de la glucosa. Como se puede observar en la figura 2.2 las variaciones en la concentración de glucosa son mínimas entre los animales hepatectomizados y los laparotomizados, lo que demostraba que nuestros animales se comportaban tal y como estaba descrito (Leffert *et al.*, 1975; Bucher y Weir, 1976) y, por lo tanto, los resultados que obtuviéramos podrían ser comparados con los ya conocidos.

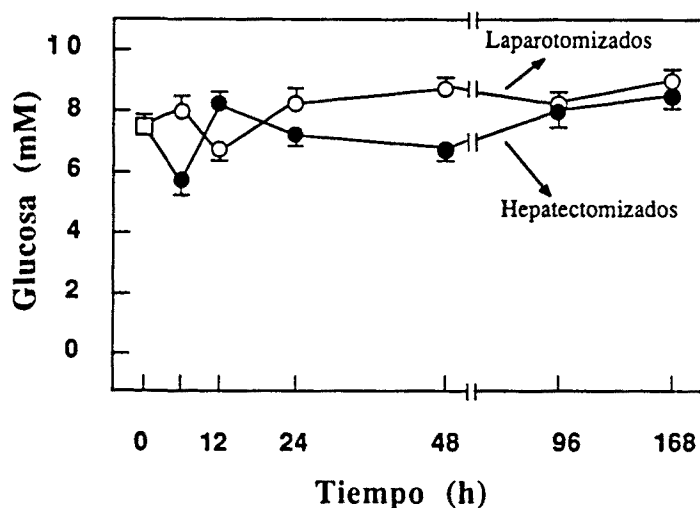
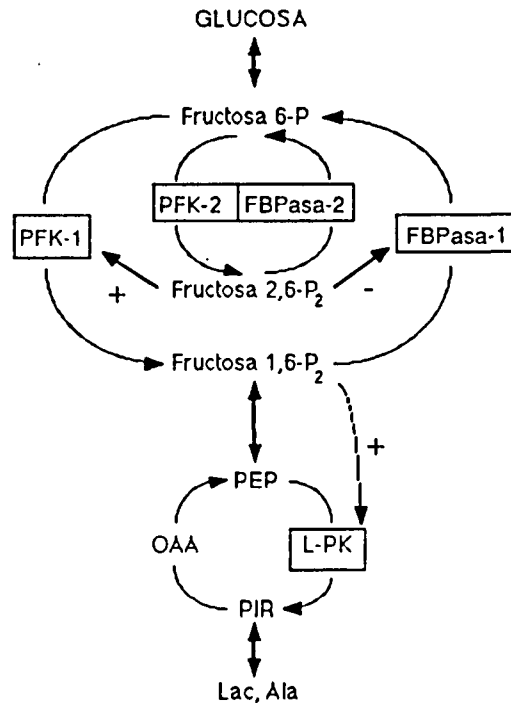


Fig. 2.2. Niveles de glucosa en plasma durante la regeneración hepática.

Las muestras fueron medidas en un autoanalizador Hitachi 727. Cada punto representa el promedio  $\pm$  s.e.m. de 3-7 animales. Diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los animales laparotomizados y hepatectomizados fueron encontradas a 6 y 48 h.

La Fru-2,6-P<sub>2</sub> está considerada como un importante regulador del flujo glucolítico/gluconeogénico en hígado ya que es el más importante activador alostérico PFK-1 e inhibidor FBPasa-1. Esta molécula actúa incrementando la afinidad de la PFK-1 por la fructosa 6-fosfato sin modificar la velocidad máxima del enzima. También contrarresta la inhibición de la PFK-1 por elevadas concentraciones de ATP o citrato, y potencia la activación del enzima por AMP actuando ambos sinérgicamente. Sobre la FBPasa-1

parece que actúa como un inhibidor competitivo y potenciando la inhibición del enzima por AMP. La concentración de Fru-2,6-P<sub>2</sub> está regulada por el enzima bifuncional 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) que cataliza tanto su síntesis como su degradación, formando un subciclo que regula al ciclo de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato (Fig. 2.3) (Hue y Bartrons, 1985; Van Schaftingen, 1987; Hue y Rider, 1987; Pilkis y El-Maghrabi, 1988, Pilkis *et al.*, 1990).



**Fig. 2.3. Regulación de los ciclos de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato y piruvato/fosfoenolpiruvato por la fructosa 2,6-P<sub>2</sub>.**

Figura adaptada de Pilkis *et al.*, 1990. Los enzimas han sido encerrados en cajas. ALA, alanina; Lac, lactato; Pir, piruvato; OAA, oxalacetato; PEP, fosfoenolpiruvato.

En la figura 2.4 podemos observar el contenido de Fru-2,6-P<sub>2</sub> durante la regeneración hepática. Después de la hepatectomía parcial, los niveles Fru-2,6-P<sub>2</sub> disminuyen rápidamente a valores muy bajos (1 h), manteniéndose así hasta las 24 h cuando comienzan a incrementarse lentamente, permaneciendo aún bastante bajos (40 %) a los 7 días (168 h), cuando la masa hepática ya está prácticamente recuperada (Fig. 2.1). Los animales solamente laparotomizados mostraron una disminución inicial mucho menos pronunciada, que rápidamente se restableció a valores control (a las 6 h). La disminución de la concentración de Fru-2,6-P<sub>2</sub> después de la hepatectomía parcial correlaciona con el aumento

de la gluconeogénesis y la disminución de la glucólisis (Katz, 1979), permitiendo el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Fig. 2.2; Leffert *et al.*, 1975; Bucher y Weir, 1976) y sugiriendo que el ciclo de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato también está involucrado en la regulación de la glucólisis/gluconeogénesis durante la regeneración del hígado.

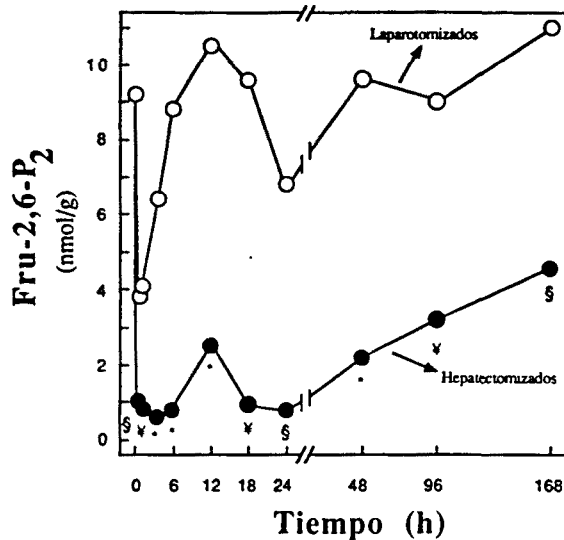


Fig. 2.4. Contenido de Fru-2,6-P<sub>2</sub> durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa *et al.* (1990). Cada punto representa el promedio de 4-9 animales. Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. \*  $p < 0.001$ ; †  $p < 0.01$  y §  $p < 0.05$ .

Los bajos niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> después de la hepatectomía parcial conducirán a una disminución del contenido de fructosa 1,6-bisfosfato debido a una inhibición de la actividad PFK-1 y a una activación de la FBPasa-1. El descenso de los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato inactiva a la L-PK, tanto alostéricamente como por el aumento de la fosforilación del enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP, debido al incremento de la afinidad de este enzima por la L-PK en ausencia de fructosa 1,6-bisfosfato (Pilkis *et al.*, 1990). Estas acciones producen la disminución de la actividad L-PK (Bonney *et al.*, 1973; Shofield *et al.*, 1986), favoreciendo la gluconeogénesis. Por consiguiente, se observa una regulación coordinada de los ciclos de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato y piruvato/fosfoenolpiruvato por la Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Fig. 2.3) (Pilkis *et al.*, 1990).



### 3. Estudio del contenido de glucógeno durante la regeneración hepática.

Es importante conocer el contenido de glucógeno durante la regeneración del hígado puesto que es obvia su importancia en el metabolismo hepático de la glucosa. En la figura 2.5 podemos observar como el contenido de glucógeno disminuyó rápidamente después de la hepatectomía parcial, alcanzando el valor mínimo a las 4 h y manteniéndose así hasta las 18 h. A partir de este tiempo hay un lento pero progresivo incremento que se acelera después de 4 días (96 h), normalizándose el contenido a los 7 días. Los animales solamente laparotomizados mostraron también una disminución, pero menos pronunciada, del contenido de glucógeno. Los niveles se restablecieron a las 24 h, coincidiendo con el periodo de realimentación de los animales (ciclo de oscuridad).

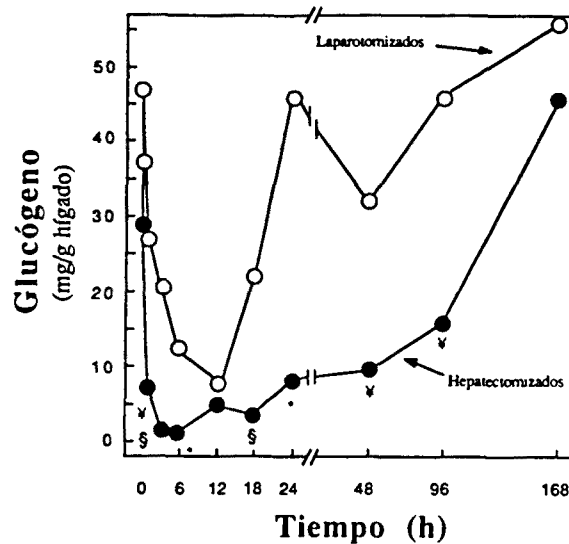


Fig. 2.5. Contenido de Glucógeno durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa et al. (1990). Cada punto representa el promedio de 4-9 animales. Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. \*  $p < 0.001$ ; †  $p < 0.01$  y §  $p < 0.05$ .

La disminución del contenido de glucógeno después de una hepatectomía parcial había sido descrita por diversos autores (Harkness, 1952; Yokoyama *et al.*, 1953). Verity *et al.* (1972) demostraron que era debida principalmente a una activación de la glucógeno fosforilasa, probablemente como consecuencia del aumento de los niveles de cAMP (Fig. 2.6; Koide *et al.*, 1978) debidos al aumento de la relación de concentraciones glucagón/insulina (Bucher y Weir, 1976; Bucher *et al.*, 1978a; Leffert *et al.*, 1979) y de los

niveles de catecolaminas (Cruise *et al.*, 1987) que suceden después de una hepatectomía parcial. La glucogenolisis también estaría estimulada por los elevados niveles de prostaglandinas (Casteleijn *et al.*, 1988a y b) detectados en el suero de los animales hepatectomizados (MacManus *et al.*, 1973; MacManus y Braceland, 1976; Miura y Fukui, 1979).

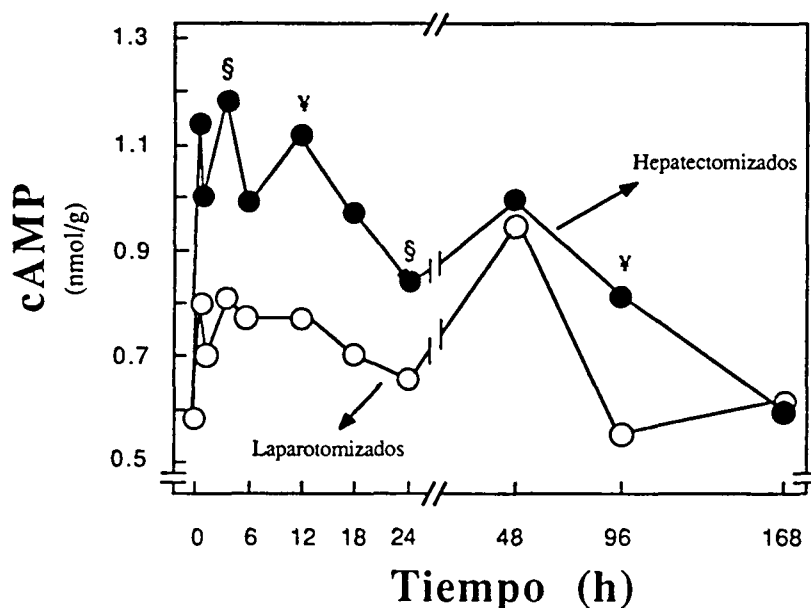


Fig. 2.6. Niveles de cAMP durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa *et al.* (1990). Cada punto representa el promedio de 4-10 animales.

Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. ¶  $p < 0.01$  y §  $p < 0.05$ .

Si comparamos las gráficas de Fru-2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno después de una hepatectomía parcial (fig. 2.7) podemos observar que el contenido de glucógeno se restablece a valores control antes que los niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (ver los niveles a 168 h en la fig. 2.7). Estos datos sugieren que la glucogenogénesis podría estar sostenida mediante sustratos gluconeogénicos, siendo la mayor parte del glucógeno formado de origen gluconeogénico (ruta indirecta) (Rosa *et al.*, 1990). Esta hipótesis está apoyada por las elevadas actividades descritas para los enzimas PEPCK (Katz, 1979) y LDH (Schofield *et al.*, 1986), mientras que permanecen bajas las de los enzimas glucolíticos L-PK (Bonney *et al.*, 1973; Schofield *et al.*, 1986) y GK (Bonney *et al.*, 1973; Katz, 1979). Esta situación de bajos niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> mientras se recupera el contenido de glucógeno también ha sido descrita durante la realimentación (Katz y McGarry, 1984; Kurland y Pilkis, 1989). Curiosamente, en otro

modelo de regeneración hepática como es el inducido por la administración de galactosamina donde el contenido de glucógeno y los niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> también disminuyen rápidamente, se recuperan antes los niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> que el contenido de glucógeno (De Oliveira *et al.*, 1991). La administración de galactosamina inhibe la síntesis de glucógeno por formación de UDP-galactosamina, favoreciendo así la degradación de glucógeno (Kepler y Decker, 1969). Este efecto podría perdurar más que la activación de la glucógeno fosforilasa (Verity *et al.*, 1972) y explicar las diferentes cinéticas de recuperación en ambos modelos.

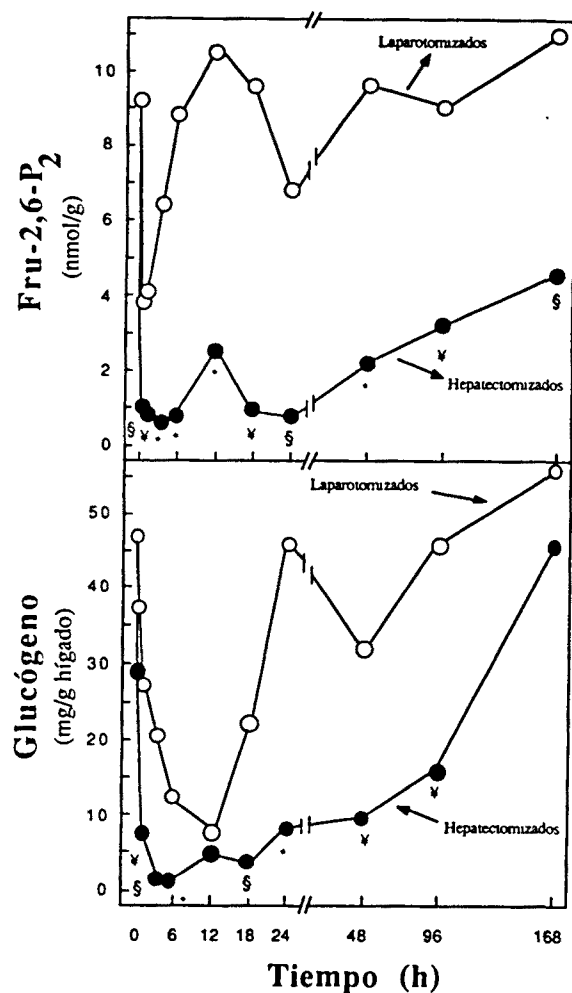


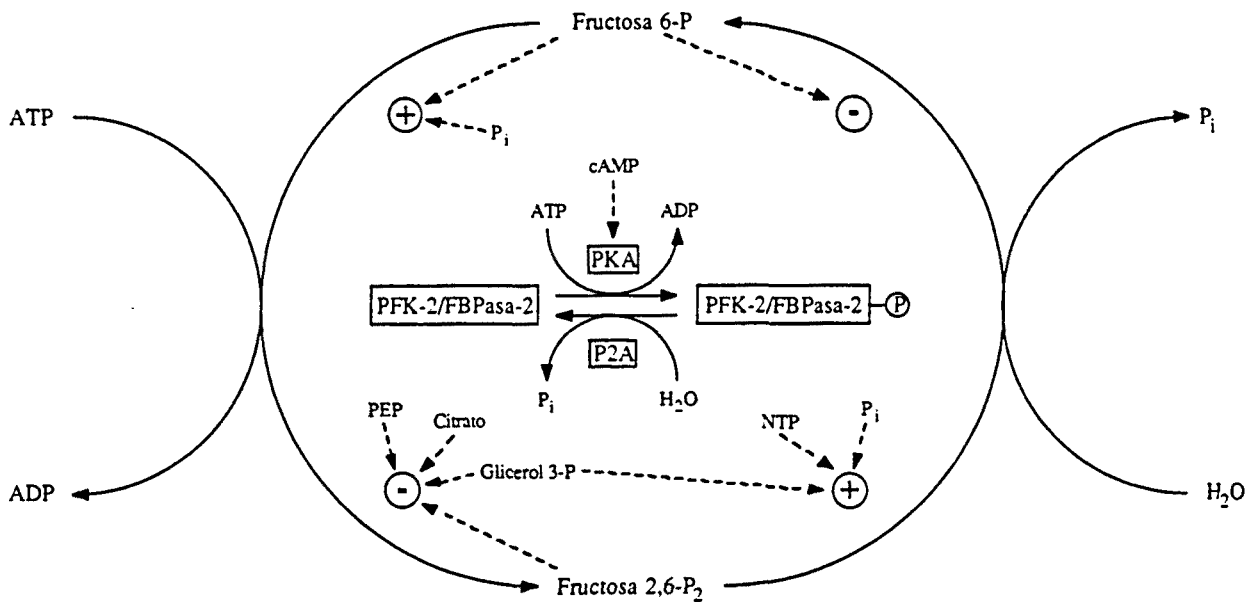
Fig. 2.7. Contenido de Fru-2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno durante la regeneración hepática. Adaptada de Rosa *et al.* (1990). Cada punto representa el promedio de 4-9 animales. Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. \* p<0.001; † p<0.01 y § p<0.05.

Si ahora comparamos las mismas gráficas (Fru-2,6-P<sub>2</sub> y contenido de glucógeno), pero de los animales laparotomizados, observaremos que la Fru-2,6-P<sub>2</sub> se recupera antes que el glucógeno (fig. 2.7). Estos datos sugieren que durante las primeras horas del estrés quirúrgico la degradación de glucógeno podría producir la recuperación de los niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, al suministrar el sustrato para su síntesis (fructosa 6-fosfato). El contenido de glucógeno parece recuperarse durante el periodo de realimentación (después de 12 h) y en presencia de niveles elevados de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Esto podría indicar que, en estas condiciones experimentales, la vía directa está prevaleciendo y que otros factores están influyendo en la recuperación del contenido de glucógeno (Rosa *et al.*, 1990). Una situación similar ha sido descrita después de la realimentación con sacarosa (Kuwajima *et al.*, 1986; McGarry *et al.*, 1987).

Capítulo 3: Estudio de la PFK-2/FBPasa-2  
durante la regeneración hepática



La síntesis y degradación de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> está catalizada por el enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2. La actividad quinasa (PFK-2) cataliza la síntesis de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a partir de fructosa 6-fosfato y ATP-Mg<sup>2+</sup>. El enzima de hígado está saturado por ATP-Mg<sup>2+</sup>, estimulado por fosfato (P<sub>i</sub>) e inhibido por la Fru-2,6-P<sub>2</sub> (K<sub>i</sub> ≈ 50 μM), el citrato (K<sub>i</sub> ≈ 0.5 mM), el fosfoenolpiruvato (K<sub>i</sub> ≈ 0.5 mM) y el glicerol 3-fosfato a concentraciones fisiológicas. La K<sub>m</sub> de la PFK-2 por la fructosa 6-fosfato ha sido descrita entre 50-140 μM. La actividad bisfosfatasa (FBPasa-2) cataliza la hidrólisis de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> a fructosa 6-fosfato y P<sub>i</sub>, estimulándose por P<sub>i</sub>, sn-glicerol 3-fosfato y nucleósidos trifosfatos. La K<sub>m</sub> de la FBPasa-2 por la Fru-2,6-P<sub>2</sub> es menor de 0.1 μM (100 veces menor que la concentración de metabolito en los hígados de ratas alimentadas). La fructosa 6-fosfato, uno de los productos de esta reacción, inhibe al enzima con una K<sub>i</sub> aparente de cerca de 30 μM. Desde que tanto la K<sub>m</sub> de la PFK-2 como la K<sub>i</sub> de la FBPasa-2 tienen similares concentraciones por la fructosa 6-fosfato, y estas son de un orden fisiológico, cualquier variación en los niveles de fructosa 6-fosfato causaría inversos cambios en las dos actividades (Fig. 3.1) (Van Schaftingen, 1987; Hue y Rider, 1987, Pilkis y El-Maghrabi, 1988).



**Fig. 3.1. Regulación de la PFK-2/FBPasa-2.**

Los enzimas han sido encerrados en cajas. PKA, proteína quinasa dependiente de cAMP; P2A, fosfatasa 2A; P<sub>i</sub>, fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; NTP, nucleósidos trifosfato.

El enzima bifuncional de hígado está regulado por fosforilación/desfosforilación. La fosforilación del enzima, catalizada por la proteína quinasa dependiente de cAMP, produce una inhibición de la actividad quinasa y una activación de la bisfosfatasa, mientras que la desfosforilación, catalizada principalmente por la fosfatasa 2A, produce cambios opuestos en las dos actividades. Los efectos de la fosforilación del enzima sobre la actividad PFK-2, a pH fisiológicos, producen una disminución de la  $V_{m\acute{a}x}$  y un incremento de la  $K_m$  por la fructosa 6-fosfato y una disminución de la sensibilidad a la inhibición por citrato y fosfoenolpiruvato. Sobre la actividad FBPasa-2 se produce un incremento de la  $V_{m\acute{a}x}$  (3-4 veces) sin afectar a la  $K_m$  ni a la sensibilidad por la inhibición por fructosa 6-fosfato (Fig. 3.1) (Van Schaftingen, 1987; Hue y Rider, 1987, Pilkis y El-Maghrabi, 1988).

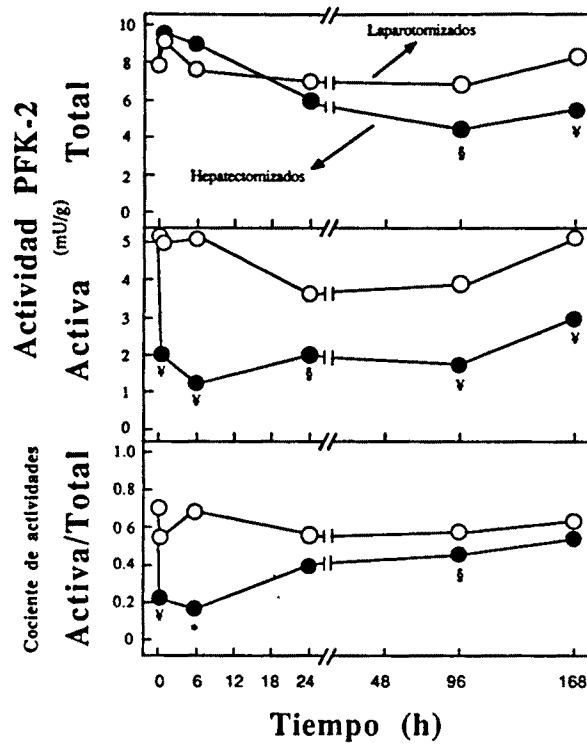
## 1. Actividad PFK-2 durante la regeneración hepática

Para intentar explicar la disminución de la concentración de Fru-2,6-P<sub>2</sub> observada después de la hepatectomía parcial (Fig. 2.4), hemos determinado la actividad PFK-2 *total* y *activa*. La actividad *total* está medida en condiciones de  $V_{m\acute{a}x}$  (pH 8.5), reflejando la cantidad total de enzima que hay. El término *activa* se utiliza para expresar la actividad de la forma no fosforilada del enzima determinada a pH 6.6 (Bartrons *et al.*, 1983). En la figura 3.2 se observa como la actividad PFK-2 *total* decrece alrededor de las 24 h después de la hepatectomía parcial, observándose un mínimo a las 96 h y no recuperándose a las 168 h. En los animales laparotomizados la actividad no se modificó respecto a los animales control. La actividad PFK-2 *activa* rápidamente decreció en los animales hepatectomizados (1 h) con un mínimo a las 6 h (23 % de actividad), recuperándose moderadamente a los 7 días (56 %). En los animales laparotomizados se observa una disminución de la actividad entre las 24-96 h.

El cociente de actividades (*activa/total*) nos indica el estado de fosforilación del enzima (Bartrons *et al.*, 1983). En la figura 3.2 podemos observar una rápida disminución (1 h), con un mínimo a las 6 h y recuperándose a las 24 h. El rápido aumento de los niveles de cAMP después de la hepatectomía parcial (Fig. 2.6 y Koide *et al.*, 1978) sugiere que el descenso de actividad de la forma *activa* podría ser debido principalmente a la fosforilación del enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP.

La rápida disminución de la actividad PFK-2 *activa* (1 h) es coincidente con el agudo descenso de los niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Fig. 2.4), lo que sugiere que la rápida disminución de la concentración de Fru-2,6-P<sub>2</sub> es probablemente debida a la fosforilación e inactivación del enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Rosa *et al.*, 1990).





**Fig. 3.2. Actividad PFK-2 durante la regeneración hepática.**

Adaptada de Rosa et al. (1990). Cada punto representa el promedio de 3-8 animales. Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. \*  $p < 0.001$ ; †  $p < 0.01$  y §  $p < 0.05$ .

Otros factores implicados en la inactivación de la PFK-2 podrían ser las variaciones de las concentraciones de los metabolitos que modulan al enzima bifuncional (Fig. 3.1). En la figura 3.3 se pueden apreciar los niveles de hexosas 6-fosfato (glucosa 6-fosfato + fructosa 6-fosfato) durante la regeneración hepática, observándose un transitorio descenso a las 6 h y no observándose posterior variación con respecto a los animales laparotomizados, que no mostraron ninguna variación comparados con los animales control. Esta disminución a las 6 h podría contribuir a la disminución y/o al mantenimiento de los bajos niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> descritos anteriormente.



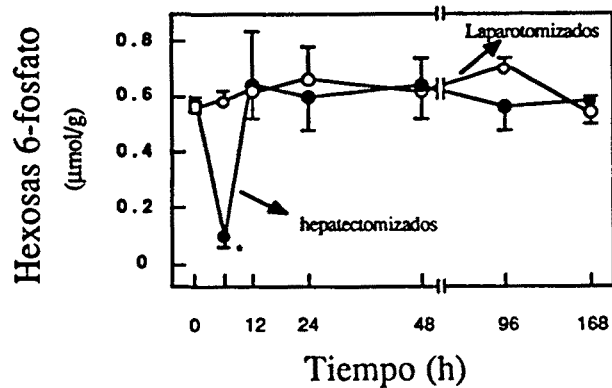


Fig. 3.3. Niveles de hexosas 6-fosfato durante la regeneración hepática. Los niveles fueron determinados como está descrito en Rosa et al. (1990). Cada punto representa el promedio  $\pm$  s.e.m. de 3-5 animales. \*  $p < 0.001$ .

Los niveles de ATP, el otro sustrato de la actividad PFK-2, y la carga energética total, expresada como  $(ATP + 1/2ADP)/(AMP + ADP + ATP)$  (Atkinson y Fall, 1967), fueron también analizados durante la regeneración hepática. En la figura 3.4 se puede apreciar un descenso de los niveles de ATP durante las primeras 24 h después de la hepatectomía parcial que resultó no ser significativo con respecto a los animales laparotomizados, incrementándose posteriormente. La carga energética mostró un perfil similar.

El contenido de glicerol 3-fosfato, inhibidor alostérico del enzima bifuncional, no se modificó significativamente a las 24 h de la hepatectomía parcial ( $0.9 \pm 0.1 \mu\text{mol/g}$  frente a  $1.2 \pm 0.5 \mu\text{mol/g}$  en animales laparotomizados). El contenido de fosfoenolpiruvato y citrato aumentaron después de 24 h de la hepatectomía parcial (Schofield *et al.*, 1986 y 1987). Estos cambios podrían ser especialmente importantes en el mantenimiento de los bajos niveles de Fru-2,6-P<sub>2</sub> a partir de las 24 h, debido al conocido efecto inhibitor de estos metabolitos sobre la actividad PFK-2 (Van Schaftingen, 1987; Hue y Rider, 1987; Hue *et al.*, 1988).

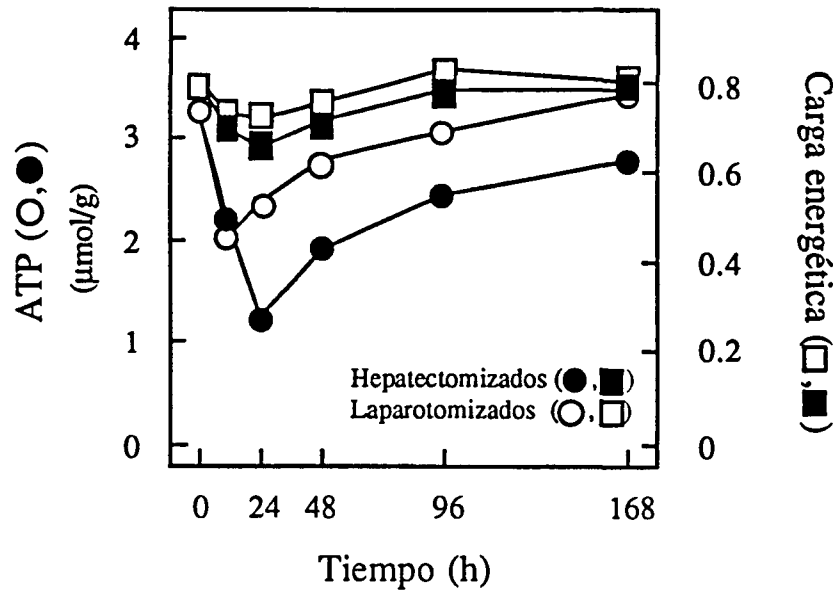


Fig. 3.4. Niveles de ATP y carga energética durante la regeneración hepática. Cada punto representa el promedio de 5-6 animales. Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. Para más detalles ver Rosa et al. (1990).

## 2. Evidencias cinéticas de la aparición de una forma isoenzimática diferente durante la regeneración hepática

Durante la regeneración hepática se han descrito algunas transiciones de isoenzimas característicos del hígado adulto a otros isoenzimas correspondientes a un estado menos diferenciado. Este es el caso para los enzimas glucolíticos GK (Sato *et al.*, 1969) y L-PK (Bonney *et al.*, 1973; Garnett *et al.*, 1974) que sufren transiciones a formas isoenzimáticas similares a las de los enzimas fetales. Nosotros nos planteamos conocer si la PFK-2/FBPasa-2 sufría una transición isoenzimática durante la regeneración hepática similar a la detectada en células de hepatoma de rata (Loiseau *et al.*, 1988). Para esto lo primero que comprobamos fue si nuestras ratas regenerantes habían expresado alguna de las formas isoenzimáticas descritas. Por este motivo estudiamos los cambios de actividad de la GK, un enzima específico del hígado, y de las hexoquinas (HK), enzimas que se expresan muy poco en hígado adulto, durante la regeneración hepática. En la figura 3.5 podemos observar como la actividad GK disminuyó después de 12 h de la hepatectomía parcial, alcanzando el valor mínimo a las 48 h (25 % de la actividad de los animales laparotomizados cuyos niveles

no se modificaron durante el período estudiado) y no recuperándose totalmente después de 7 días. Por lo contrario, la actividad HK aumentó después de 12 h de la hepatectomía parcial, alcanzando un máximo a las 96 h (>10 veces la actividad de los animales laparotomizados) y disminuyendo posteriormente. Estos datos cinéticos confirmaban el aumento de HK durante la regeneración hepática descritas por Sato *et al.* (1969) utilizando técnicas electroforéticas y atribuyen a las 96 h el pico de expresión de la actividad hexoquinasa. Por analogía con la actividad HK máxima (Fig. 3.5) y porque también había sido descrito este tiempo como el de la transición isoenzimática máxima para la piruvato quinasa (Bonney *et al.*, 1973), escogimos los hígados de ratas regenerantes y laparotomizadas de 96 h después de la operación para determinar la posible transición.

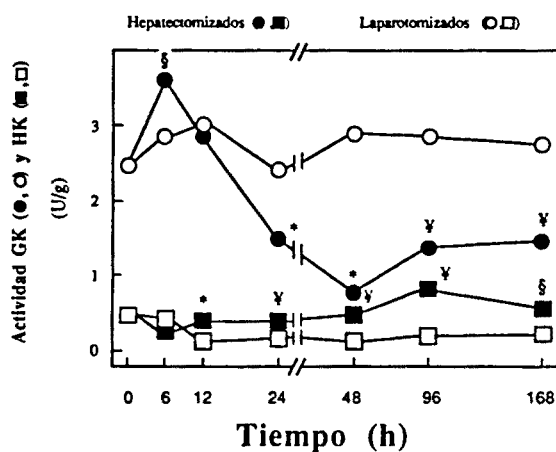


Fig. 3.5. Actividades GK y HK durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa *et al.* (1990). Cada punto representa el promedio de 4-6 animales. Las

desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. \*  $p < 0.001$ ; ¥  $p < 0.01$  y §  $p < 0.05$ .

Había sido descrito que el isoenzima de PFK-2/FBPasa-2 de hígado adulto es más sensible que los isoenzimas de corazón (Rider *et al.*, 1985), de células de hepatomas (Loiseau *et al.*, 1988) y de hígado fetal (Martín-Sanz *et al.*, 1987) a la inhibición por glicerol 3-fosfato. Además, todos estos isoenzimas y el de músculo no son inactivados por la proteína quinasa dependiente de cAMP, al contrario de lo que sucede con la forma hepática adulta (Rider *et al.*, 1985; Loiseau *et al.*, 1988; Martín-Sanz *et al.*, 1987; Kitamura *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta todos estos datos intentamos establecer si la PFK-2/FBPasa-2 sufría una transición isoenzimática comparando los efectos del glicerol 3-fosfato y la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP en la actividad PFK-

2/FBPasa-2 de los animales hepatectomizados y laparotomizados a las 96 h. Como se muestra en la figura 3.6, la actividad PFK-2 de los hígados de rata regenerante fue menos inhibida por el glicerol 3-fosfato que la actividad de los animales laparotomizados. Por lo contrario, la actividad FBPasa-2 de las ratas regenerantes fue más sensible a la activación por glicerol 3-fosfato que la de los animales laparotomizados.

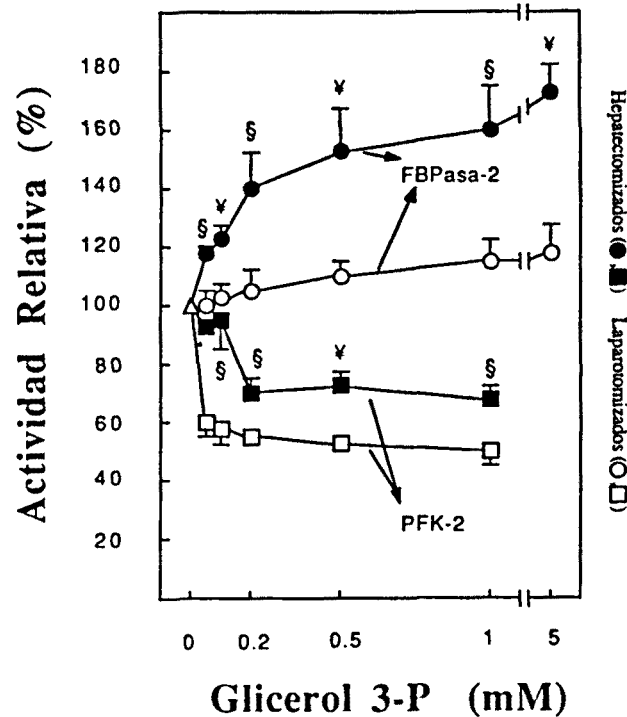


Fig. 3.6. Efecto del glicerol 3-fosfato sobre las actividades PFK-2 y FBPasa-2. Adaptada de Rosa et al. (1990). El 100 % de actividad PFK-2 para los animales hepatectomizados y laparotomizados fue de  $3.9 \pm 1.2$  y  $15.4 \pm 2.9$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  proteína; y  $9.3 \pm 1.2$  y  $9.2 \pm 0.5$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  proteína para la actividad FBPasa-2. Cada punto representa el promedio  $\pm$  s.e.m. de 4-5 animales. \*  $p < 0.001$ ; ¥  $p < 0.01$  y §  $p < 0.05$ .

La incubación con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP no modificó la actividad PFK-2 *activa* de los animales hepatectomizados, mientras inhibió la de los animales laparotomizados. La actividad PFK-2 *total* no fue afectada en ningún caso (Fig. 3.7). Alguien podría pensar que la ausencia de inactivación del enzima regenerante por la proteína quinasa dependiente de cAMP podría ser debido a que el enzima estuviera totalmente fosforilado como es sugerido por Loiseau *et al.* (1988). Sin embargo, no se observa activación cuando los extractos de hígados regenerantes fueron incubados con

MgCl<sub>2</sub> (2 mM; durante 10 min a 30°C), que estimula la actividad fosfoproteína fosfatasa (Pelech *et al.*, 1984).

Animales	Tratamiento	Actividad PFK-2 (μU/mg de proteína)	
		pH 6.6	pH 8.5
Hepatectomizados	ninguno	43 ± 8	120 ± 31
	+ Subunidad catalítica	42 ± 5	131 ± 13
Laparotomizados	ninguno	101 ± 5	144 ± 5
	+ Subunidad catalítica	64 ± 8*	149 ± 4

**Fig. 3.7. Efecto de la incubación con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP sobre la actividad PFK-2.**

Adaptada de Rosa *et al.* (1990). Cada punto representa el promedio ± s.e.m. de 3-5 animales.

\*  $p < 0.01$ .

La no modificación de la actividad PFK-2 de los hígados regenerantes por la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP, unido a la menor inhibición de la actividad PFK-2 y a la mayor activación de la FBPasa-2 por el glicerol 3-fosfato en estos hígados, parecen indicar que la PFK-2/FBPasa-2 de hígado regenerante es diferente a la del hígado normal, teniendo un comportamiento cinético similar a la del isoenzima fetal (Martín-Sanz *et al.*, 1987).

### 3. Semipurificación y caracterización de la PFK-2/FBPasa-2 de hígados regenerantes

La PFK-2/FBPasa-2 de hígado adulto es un enzima bifuncional, formado por dos subunidades idénticas de 470 aminoácidos cada una ( $M_r \approx 55.000$ ). Se ha determinado la estructura primaria del enzima por secuenciación de la proteína (Lively *et al.*, 1988) y por análisis de un ADN complementario completo (full-length cDNA) (Darville *et al.*, 1987). El extremo amino es una serina que se encuentra acetilada y la serina en la posición 32 es el lugar de fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP. Varios dominios han

sido identificados. El dominio PFK-2 contiene 4 cisteínas en las posiciones 107, 160, 183 y 198 (Lively *et al.*, 1988), que están involucradas en el mantenimiento de la conformación del lugar de unión de la fructosa 6-fosfato siendo críticos para la actividad quinasa (El-Maghrabi *et al.*, 1987; Pilkis *et al.*, 1990). Dos lisinas podrían también estar involucradas en este lugar de unión (Kitajima *et al.*, 1985). Dos secuencias consensus de unión de nucleótidos conteniendo lisina han sido identificadas en la proteína (aminoácidos 48-54 y 274-281) (Lively *et al.*, 1988). El dominio FBPasa-2, el cual se localiza en la mitad del extremo carboxi-terminal de la proteína, contiene una histidina en el centro activo (posición 258) que funciona como un fosfoceptor (Pilkis *et al.*, 1987) y siendo esencial para la actividad bisfosfatasa, como lo demuestran los estudios por mutagénesis dirigida que también implican a la histidina-392 en el mantenimiento de esta actividad (Tauler *et al.*, 1990). Este dominio conserva homología estructural y funcional con la fosfoglicerato mutasa de levadura y humanos, y la bisfosfoglicerato mutasa humana (Tauler *et al.*, 1987; Pilkis *et al.*, 1987). La prueba definitiva de que ambos dominios, PFK-2 y FBPasa-2, se encontraban separados se consiguió expresándolos separadamente, utilizando técnicas de ADN recombinante (Tauler *et al.*, 1988 y 1989), localizándose el de la PFK-2 en la mitad del extremo amino y el de la FBPasa-2 en la mitad carboxi-terminal (Fig. 3.8). Todos estos resultados llevaron a postular que el enzima bifuncional es el resultado de una fusión génica (Tauler *et al.*, 1987, 1988 y 1989; Bazan *et al.*, 1989).

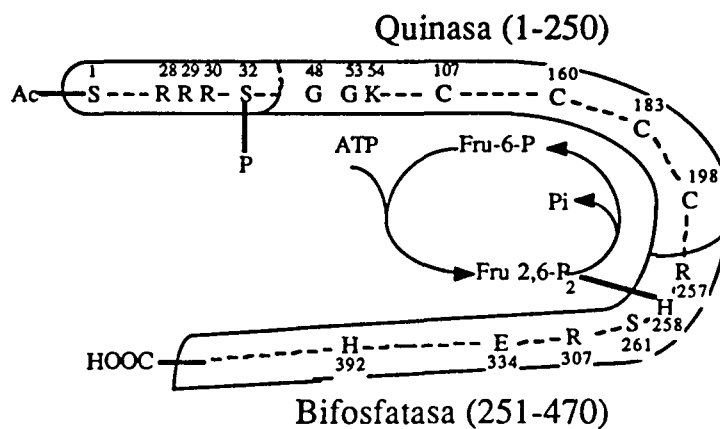


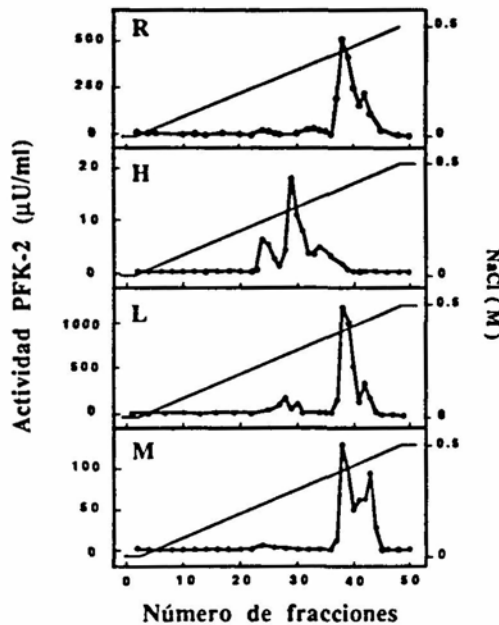
Fig. 3.8. Representación de los dominios de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado.

Adaptada de Pilkis *et al.* (1990). La serina inicial está acetilada (Ac). El aminoácido 32 es el lugar de fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP. En el dominio quinasa los aminoácidos 48-55 representan parte del lugar de unión del ATP y las cisteínas 107, 160, 183 y 198 son importantes para la unión de la fructosa 6-fosfato (Fru 6-P). La histidina 258 en el dominio bifosfatasa funciona como un fosfoceptor siendo esencial para la actividad bifosfatasa. La histidina 392 también está implicada en el mantenimiento de esta actividad.

Diversos isoenzimas de la PFK-2/FBPasa-2 han sido purificados y caracterizados de tejidos de mamífero (revisados por Hue y Rider, 1987). Los isoenzimas de hígado adulto (L) y músculo (M) contienen 438 aminoácidos comunes, diferenciándose sólo en el extremo amino. El isoenzima L posee 32 aminoácidos incluyendo la serina fosforilable por la proteína quinasa dependiente de cAMP, mientras que el M posee 10 aminoácidos incluyendo una serina en posición 6 fosforilable por proteína quinasa C (Lively *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1989a; Darville *et al.*, 1989). El isoenzima de corazón (H) contiene 530 aminoácidos, diferenciándose de los anteriores por sus extremos amino y carboxilo, teniendo la particularidad de que es fosforilable tanto por la proteína quinasa dependiente de cAMP como por la proteína quinasa C (Rider y Hue, 1986; Kitamura *et al.*, 1988), localizándose los lugares de fosforilación en el extremo carboxilo de la proteína a diferencia de lo que ocurre con los de L y M (Sakata y Uyeda, 1990). Estos isoenzimas difieren en sus pesos moleculares, su inmunoreactividad y sus propiedades cinéticas (Sakakibara *et al.*, 1984; Rider *et al.*, 1985; El-Maghrabi *et al.*, 1986; Van Shaftingen y Hers, 1986; Hue y Rider, 1987; Kitamura y Uyeda, 1988; Taniyama *et al.*, 1988). Teniendo en cuenta estas características desarrollamos un proceso de purificación en dos etapas (fraccionamiento con polietilenglicol 6-21% y una columna mono-Q de HPLC) que nos permitía diferenciar los isoenzimas anteriormente descritos (Ventura *et al.*, 1991).

Como puede observarse en la figura 3.9, el perfil de elución de la columna mono-Q muestra que la PFK-2 L y M se eluyen en dos picos alrededor de 0.4 M de NaCl. Estos dos picos representan diferentes estados de fosforilación de los isoenzimas correspondiendo el primer pico a la forma no fosforilada y el segundo a la forma fosforilada. Como se demuestra si incubamos el primer pico (forma no fosforilada) del isoenzima L con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP y volvemos a aplicar a la columna mono-Q, observándose de nuevo los dos picos. El segundo pico del isoenzima M siempre sale un poco más tarde que el correspondiente al isoenzima L, lo que nos permite diferenciarlos. El isoenzima H eluye alrededor de 0.2 M de NaCl indicándonos una estructura proteica diferente a la de los isoenzimas L y M. El isoenzima de cerebro (B) ha sido descrito eluir con un perfil similar al de H (Ventura *et al.*, 1991). Al aplicar a la columna el extracto fraccionado de los hígados de ratas regenerantes 96 h post-hepatectomía (R), se observa un perfil idéntico que el de hígado adulto, copurificando la actividad FBPasa-2.

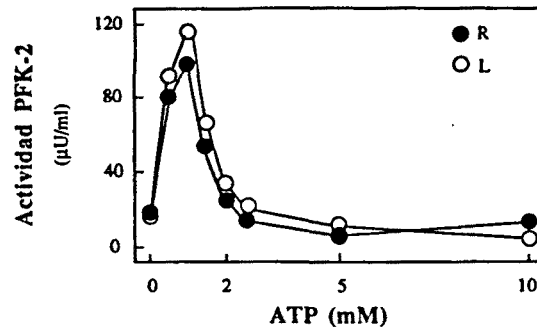




**Fig. 3.9.** Perfiles de elución de las PFK-2/FBPasa-2 de hígado regenerante (R), corazón (H), hígado normal (L) y músculo (M) después de la separación por una columna Mono Q.

Adaptada de Ventura et al. (1991) y datos propios. Las muestras de tejido de rata después de un fraccionamiento con PEG (6-21 %) fueron aplicadas a una columna Mono Q (1 ml). Los enzimas fueron eluidos con un gradiente lineal de NaCl (0-0.5 M). Fracciones de 0.5 ml fueron recogidas y la actividad PFK-2 determinada. Para más información mirar la cita anterior.

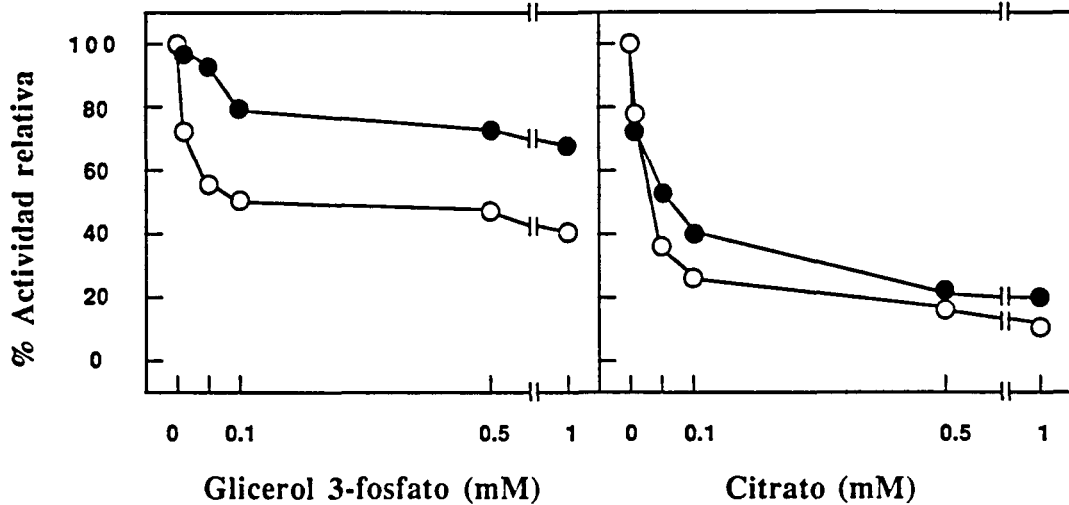
Intentamos separar los enzimas de hígado normal y regenerante utilizando una columna "Blue-sepharose" después del fraccionamiento con polietilenglicol. Se escogió esta columna porque tiene mucha afinidad por la PFK-2/FBPasa-2 de hígado que se eluye con un gradiente de ATP-Mg<sup>2+</sup> a 1 mM (Van Shaftingen y Hers, 1986) y porque se había descrito que eluía el isoenzima de hígado fetal a 2.5 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup> (Paloma *et al.*, 1991), un isoenzima cuyo comportamiento cinético era muy similar al del hígado regenerante, y el de corazón entre 5-10 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup> (Rider *et al.*, 1985). En la figura 3.10 se puede observar como la actividad PFK-2 eluyó a 1 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup> tanto para hígado adulto, como para el hígado regenerante.



**Fig. 3.10.** Perfiles de elución de las PFK-2/FBPasa-2 de hígado regenerante (R), y normal (L) después de la separación por una columna "Blue-sepharose".

Las muestras de tejido de rata fueron homogenizadas y fraccionadas con PEG (6-21 %) tal y como se describe en Ventura et al. (1991). A continuación fueron aplicadas a una columna "Blue-sepharose" (2 ml). La columna fue lavada con 10 ml de tampón de homogenización al que se le añadió KCl a una concentración final 0.4 M. Los enzimas fueron eluidos con un gradiente discontinuo de ATP (0-10 mM) añadido al medio anterior. Se recogieron fracciones de 4 ml para cada concentración de ATP y se determinó la actividad PFK-2 (pH 8.5).

Observando la incapacidad de separar cromatográficamente el enzima de hígado regenerante del de hígado normal, decidimos confirmar los datos obtenidos de inhibición de la actividad PFK-2 con glicerol 3-fosfato (Fig. 3.6) y de la no modificación de la actividad PFK-2 por la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP (Fig. 3.7) con el primer pico de los enzimas purificados después de la columna mono-Q. En la figura 3.11 se puede apreciar como se confirma la menor inhibición de la actividad PFK-2 del enzima de hígado regenerante de 96 h por glicerol 3-fosfato. Comprobamos también si el citrato, otro inhibidor de la actividad PFK-2 (Hue y Rider, 1987; Hue *et al.*, 1988), mostraba diferencias de inhibición con respecto al hígado regenerante. En la figura 3.11 se puede observar como prácticamente no hay diferencias.



**Fig. 3.11. Efectos del glicerol 3-fosfato y el citrato en la actividad PFK-2 de hígado regenerante (●) e hígado normal (○).**

El enzima purificado después de la columna Mono Q fue ensayado en 50 mM Hepes, 100 mM KCl, 20 mM KF, 1 mM DTT, 0.1 mM fructosa 6-fosfato y 0.5 mM MgATP con las concentraciones de glicerol 3-fosfato y citrato indicadas, a pH 7.1. Las actividades específicas correspondientes al 100 % fueron 0.87 mU/mg proteína para el hígado normal y 1.10 mU/mg proteína para el regenerante. Los valores son el promedio de dos experimentos separados.

En la figura 3.12, se muestran los efectos de la incubación con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP sobre la actividad PFK-2 y la actividad FBPasa-2. Las actividades PFK-2 *activa* y *total* mostraron un comportamiento similar al descrito en la Fig.3.7. La actividad FBPasa-2 de hígados normales se incrementó (> 3.5 veces), mientras que apenas varió en la de hígados regenerantes (> 1.3 veces). Para comprobar que el enzima regenerante no estuviera totalmente fosforilado (Loiseau *et al.*, 1988) fue incubado con glucosa, ADP-Mg<sup>2+</sup>, hexoquinasa y la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP en unas condiciones que desfosforilan al enzima (El-Maghrabi *et al.*, 1980); no activación de la actividad PFK-2 fue observada.

Se había descrito que el isoenzima H podía fosforilarse por la proteína quinasa C (Rider y Hue, 1986; Kitamura *et al.*, 1988), produciendo una modificación de la actividad PFK-2 (Kitamura *et al.*, 1988). En el isoenzima M se había encontrado la secuencia consensus (Ser-X-Arg) descrita por Woogett *et al.* (1986) de fosforilación por proteína quinasa C (Crepin *et al.*, 1989a). Pensando en la posibilidad de tener una forma isoenzimática diferente a la de hígado normal y que pudiese fosforilarse por proteína quinasa C cambiando su actividad, incubamos los enzimas de hígado normal y regenerante con

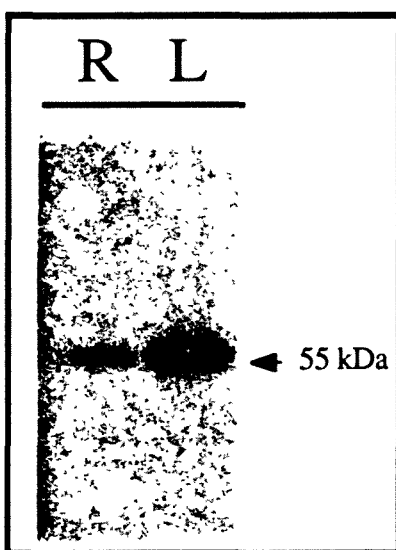
proteína quinasa C. La actividad PFK-2, como puede apreciarse en la figura 3.12, no se modificó. Previamente a la incubación con proteína quinasa C habíamos incubado los enzimas durante 20 min con una unidad de fosfatasa alcalina unida a agarosa por si estaban previamente fosforilados (Ventura *et al.*, 1991).

		PFK-2 (mU/mg prot.)		FBPasa-2 (mU/mg prot.)	PFK-2 (mU/mg)	
		Activa	Total		- PKC	+ PKC
<b>L</b>	- PKA	3.88	3.65	0.050	- PKC	2.14
	+ PKA	0.73	3.48	0.178	+ PKC	2.09
<b>R</b>	- PKA	2.22	2.38	0.173	- PKC	1.03
	+ PKA	2.35	2.52	0.226	+ PKC	0.99

**Fig. 3.12. Efecto del tratamiento de la PFK-2/FBPasa-2 con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y la proteína quinasa C (PKC).** Los enzimas purificados después de la columna Mono Q fueron incubados en presencia de PKA (0.1 mU) y PKC (0.1 mU), y las actividades PFK-2 y FBPasa-2 determinadas tal y como está descrito por Ventura *et al.* (1991), a excepción de las actividades PFK-2 *activa* y *total* que fueron determinadas como en Rosa *et al.* (1990). Los valores son el promedio de dos experimentos separados.

Durante la catálisis de la Fru-2,6-P<sub>2</sub>, el grupo fosfato en la posición 2 de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> es rápidamente transferido a la histidina 258 del enzima, hidrolizándose este fosfoenzima intermediario mucho más lentamente (Stewart *et al.*, 1985). Basándose en esta característica cinética El-Maghrabi *et al.* (1986) desarrollaron un ensayo radioactivo para detectar este fosfoenzima. Este ensayo consistía en la incubación del enzima con Fru-2,6-P<sub>2</sub> marcada con P<sup>32</sup> en la posición 2 durante un breve tiempo (15 s), transfiriendo a continuación la mezcla a un papel de fosfocelulosa y lavándolo con abundante ácido fosfórico. Los lavados con ácido eliminan la Fru-2,6-(2-P<sup>32</sup>)P<sub>2</sub>, manteniendo al fosfoenzima estable. Lo que permite una vez secado el papel contarlos con un detector de líquido de centelleo. Debido a la especificidad de la reacción de la bisfosfatasa, se puede utilizar este ensayo con muestras no totalmente purificadas. Además se puede adaptar el ensayo de forma que una vez formado el fosfoenzima lo podamos aplicar a un gel de poliacrilamida (PAGE)/SDS y realizar una electroforesis; después de lo cual el gel se seca y se pone a contactar (El-Maghrabi *et al.*, 1986).

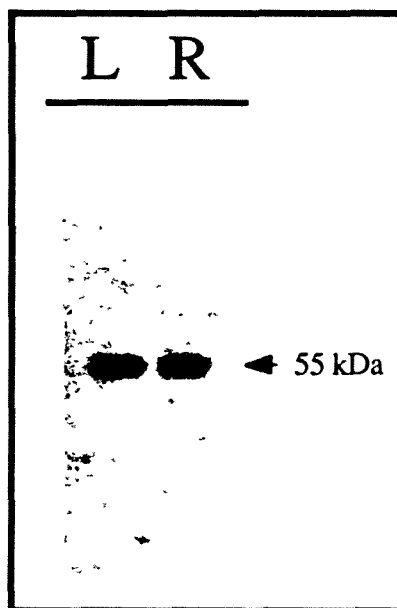
Esto último fue lo que realizamos con nuestros enzimas purificados. Después de incubarlos brevemente con Fru-2,6-(2-P<sup>32</sup>)P<sub>2</sub> (1 μM y ≈15.000 cpm/pmol) en el medio de incubación de la actividad FBPasa-2 (Rosa *et al.*, 1990), añadimos el buffer de muestra y calentamos durante 1 min a 90°C. A continuación, aplicamos las muestras a un gel al 8% de PAGE/SDS y realizamos la electroforesis (I=30 mA x 40 min). Eliminamos el exceso de radioactividad, la Fru-2,6-(2-P<sup>32</sup>)P<sub>2</sub> que no ha reaccionado y el posible P<sup>32</sup> hidrolizado, cortando el frente del gel. El resto del gel se seca y se pone a contactar. En la figura 3.13, se aprecia como ambas enzimas (hígado normal y regenerante) poseen una movilidad electroforética similar (≈55.000 kDa) que indicaba una estructura proteica muy parecida. Se puede observar la especificidad de la reacción al observarse nítidamente una sola banda en cada muestra.



**Fig. 3.13. Fosfoenzima de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado regenerante (R) y normal (L).**  
Los enzimas purificados después de la columna Mono Q fueron incubados con Fru-2,6-(2-P<sup>32</sup>)P<sub>2</sub> (1 μM y ≈15.000 cpm/pmol) tal y como hemos descrito en el texto.

Los autores del mismo grupo anterior que había desarrollado el ensayo del fosfoenzima (El-Maghrabi *et al.*, 1986), prepararon anticuerpos contra la PFK-2/FBPasa-2. Gracias a la colaboración del Dr. Tauler conseguimos estos anticuerpos. Aplicamos los enzimas purificados a un gel al 8% de PAGE/SDS y realizamos una electroforesis. A continuación transferimos las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Western Blot) e incubamos con el anticuerpo anti-(PFK-2/FBPasa-2) (Towbin *et al.*, 1979). Después de los lavados pertinentes, utilizamos proteína A marcada con <sup>125</sup>I como segundo anticuerpo (Burnette, 1981) y, una vez lavadas las membranas, las pusimos a

contactar. El resultado se puede observar en la figura 3.14, donde no se aprecian diferencias entre el enzima de hígado normal y regenerante. Reconociéndose una banda de  $\approx 55.000$  kDa, peso molecular descrito para la de hígado normal.



**Fig. 3.14. Análisis por Western blot de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado regenerante (R) y normal (L).**

Los enzimas purificados después de la columna Mono Q fueron aplicados a un gel al 8% de PAGE/SDS. La transferencia y la incubación con el anticuerpo anti (PFK-2/FBPasa-2) y proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$  fueron realizadas tal y como hemos descrito en el texto. Para más detalles ver Rosa et al. (1991a)

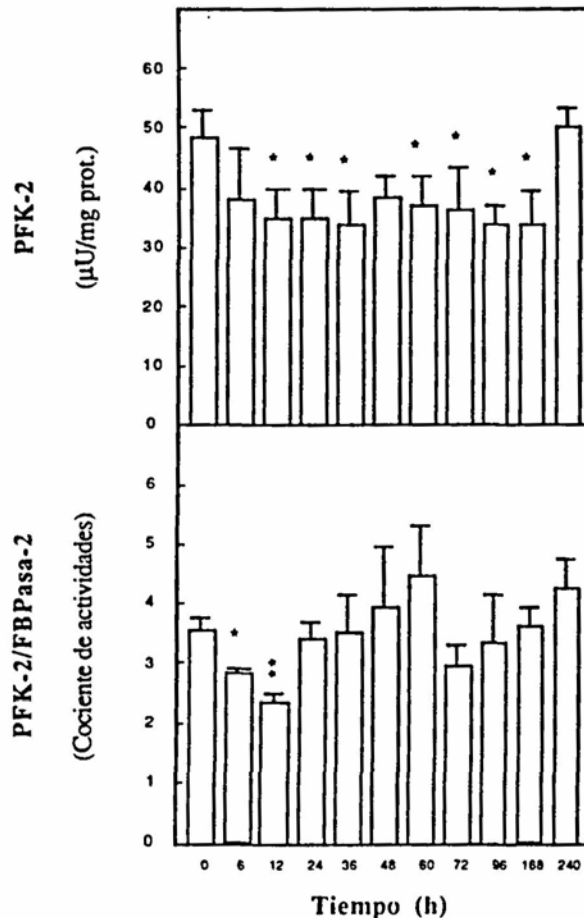
Después de todas las pruebas anteriores podíamos resumir la información que habíamos obtenido sobre el enzima de hígado regenerante a: i) que poseía un tamaño y estructura muy similar, sinó idéntica, a la del hígado normal (por el comportamiento cromatográfico, electroforético e inmunológico); ii) que presentaba algunas propiedades cinéticas diferentes (incubaciones con el glicerol 3-fosfato y la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP), pero no todas (ejemplo la inhibición por citrato es similar); y iii) que estos efectos no eran debidos a la posible fosforilación del enzima por la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

#### 4. Estudio inmunológico de la PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática

Crepin *et al.* (1989a) demostraron mediante *screening* de una librería de ADNc de hígado de rata que en el hígado normal se expresaban diversos isoenzimas de la PFK-2/FBPasa-2. Dos de los clones que identificaron se diferenciaban solamente en su extremo amino. Uno de ellos codificaba el isoenzima de hígado de 470 aminoácidos y el otro el isoenzima de músculo de 448 aminoácidos. El hígado poseía 32 aminoácidos diferentes en el extremo amino, incluyendo la serina fosforilable por la proteína quinasa dependiente de cAMP, mientras que el músculo tenía 10 incluyendo la serina fosforilable por la proteína quinasa C. Estos mismos autores (1989b) demostraron que en cultivo de células de tejido de hepatomas (HTC) se expresaba mayoritariamente el ARNm del isoenzima de músculo. Tanto el enzima expresado en *Escherichia coli* (Crepin *et al.*, 1989b) como el purificado a partir de las células HTC (Loiseau *et al.*, 1988) mostraron propiedades cinéticas e inmunológicas diferentes a la PFK-2/FBPasa-2 de hígado normal siendo más parecidas a la de músculo. Crepin *et al.* (1989b) realizaron anticuerpos contra péptidos sintéticos de la región amino que diferenciaba al enzima de hígado y músculo, demostrando que el anticuerpo específico de hígado (Ab<sub>L</sub>) detectaba únicamente a la forma de hígado, no reconociendo al isoenzima de músculo. Sucediendo al revés con el anticuerpo específico de músculo (Ab<sub>M</sub>) y reconociéndose todos los isoenzimas (hígado y músculo) si utilizaban un anticuerpo realizado contra toda la proteína (Ab<sub>p</sub>).

Como nosotros ya teníamos el anticuerpo anti-(PFK-2/FBPasa-2) (lo denominaremos a partir de ahora Ab<sub>p</sub>), solicitamos alguno de los específicos al Dr. Hue. Este amablemente nos cedió el específico de hígado (Ab<sub>L</sub>). Con estos dos anticuerpos realizamos un estudio inmunológico durante la regeneración hepática, esperando que el Ab<sub>p</sub> reflejara la cantidad de PFK-2/FBPasa-2 que había y el Ab<sub>L</sub> identificara alguna posible variación isoenzimática. Como para realizar los Western blot necesitábamos purificar el enzima mediante un fraccionamiento con polietilenglicol (6-21%), decidimos confirmar previamente la disminución de actividad PFK-2 *total* que se observaba durante la regeneración hepática (Fig. 3.2) con el enzima purificado y en los tiempos que ahora estudiábamos, así como la fosforilación del enzima y su recuperación a partir de las 24 h (Fig.3.2). Para esto último, en lugar de realizar el ensayo mediante la actividad PFK-2 *activa*, que es un ensayo indirecto, realizamos el ensayo directo de la actividad FBPasa-2 de modo que el cociente quinasa/bisfosfatasa volviese a reflejar el estado de fosforilación del enzima. En la figura 3.15 se puede apreciar que la actividad PFK-2 *total* siguió un perfil similar al ya descrito (Fig. 3.2), recuperándose la actividad a los 10 días posthepatectomía. El cociente de actividades quinasa/bisfosfatasa también confirmó la fosforilación del enzima por un aumento

de la actividad bisfosfatasa que hizo disminuir el cociente, con un mínimo a las 12 h, y no mostrando una variación significativa con respecto al control después de este tiempo.

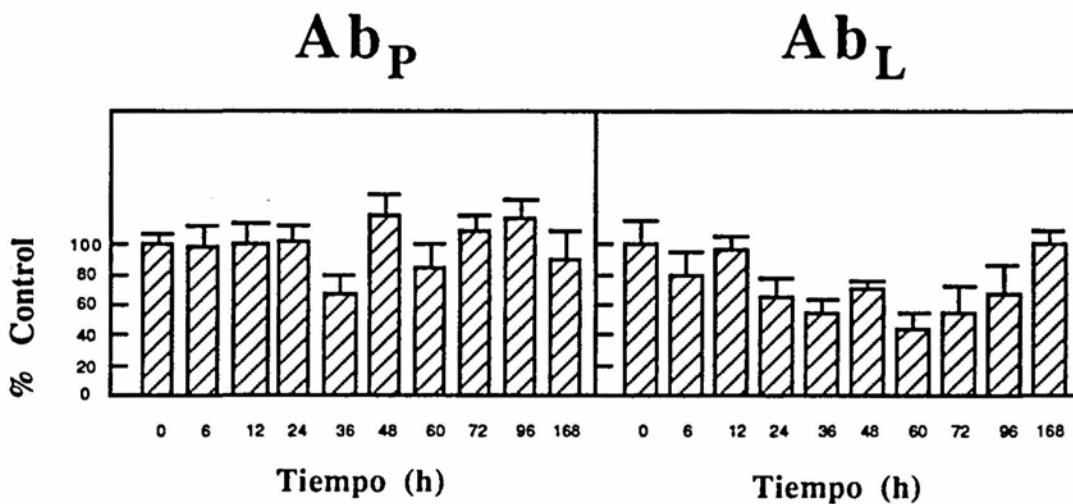


**Fig. 3.15. Actividad PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática.**  
Adaptada de Rosa et al. (1991a). Cada punto representa el promedio  $\pm$  s.e.m. de 3-5 ratas.  
\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

Una vez confirmados los datos de actividad realizamos con estas mismas muestras los Western blot. En la figura 3.16 se muestran los perfiles obtenidos con ambos anticuerpos. Sorprendentemente, el perfil obtenido con el Ab<sub>L</sub> fue bastante similar al de la actividad PFK-2 (Fig. 3.15), mientras que en el obtenido con el Ab<sub>p</sub> prácticamente no se observan modificaciones (si exceptuamos el tiempo de 36 h). Todos estos datos parecen indicar una serie de conclusiones: i) que hay una cantidad de enzima que no es reconocido por el Ab<sub>L</sub> y sí por el Ab<sub>p</sub> durante la regeneración hepática, lo que sugiere que hay una cierta cantidad de proteína que posee, como mínimo, su extremo amino modificado; ii) que



esta modificación del extremo amino no puede ser debida a la fosforilación del enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP porque cuando el enzima está fosforilado el reconocimiento de ambos anticuerpos es prácticamente similar (6 y 12 h), observándose las diferencias posteriormente cuando el enzima deja de estar fosforilado; iii) que esta modificación del enzima puede alterar su velocidad máxima y, por tanto, el valor de actividad PFK-2 obtenido reflejar la suma de las contribuciones de ambas formas y no la cantidad total de proteína; iiiii) que el perfil obtenido con el Ab<sub>L</sub> refleja la cantidad de la forma isoenzimática típica del hígado normal, mientras que el perfil obtenido con el Ab<sub>P</sub> indicaría la cantidad total de PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática.



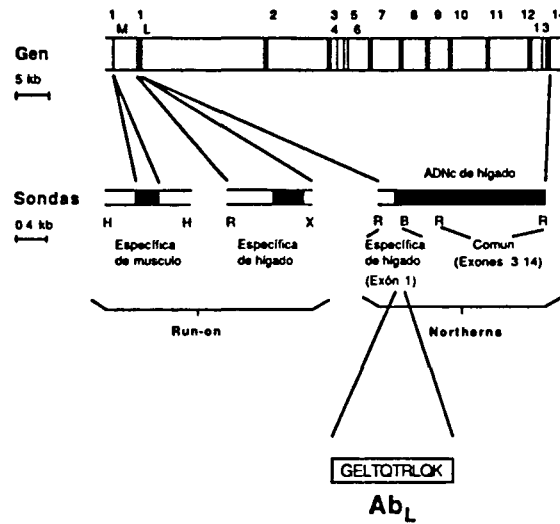
**Fig. 3.16. Análisis inmunológico de la PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática.**

Adaptada de Rosa et al. (1991a) y datos añadidos. Cada punto representa el promedio  $\pm$  s.e.m. de 3-5 ratas.

## 5. Expresión del gen de la PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática

Varios ARNm que codifican diferentes isoenzimas de la PFK-2/FBPasa-2 han sido identificados (Darville *et al.*, 1987; Algaier y Uyeda, 1988; Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1989a y b; Sakata y Uyeda, 1990 y 1991; Sakata *et al.*, 1991; Ventura *et al.*, 1991). El gen que codifica los isoenzimas de músculo e hígado ha sido caracterizado (Darville *et al.*, 1989; Lange *et al.*, 1989) y localizado en el cromosoma X de rata y humanos (Hilliker *et al.*, 1991). Este gen de 55 kb de longitud y 15 exones codifica ambos isoenzimas por un alternativo *splicing* a partir de dos promotores distintos. Los dos isoenzimas contienen 13 exones comunes diferenciándose solamente por el primer exon. Recientemente, Darville *et al.* (1991) han caracterizado otro gen de 22 kb de longitud y 16 exones que codifica el isoenzima de corazón. Este gen se ha localizado en el cromosoma 13 de rata y en el 1 de humanos (Hilliker *et al.*, 1991). Comparando ambos genes se observa que poseen 12 exones sucesivos similares, diferenciándose en los exones iniciales y finales; confirmando los diferentes dominios reguladores que se habían encontrado en los extremos amino y carboxilo de estos isoenzimas.

Nosotros habíamos deducido mediante la utilización de anticuerpos que durante la regeneración hepática aparecía una forma enzimática con el extremo amino modificado. Como Crepin *et al.* (1989a) habían demostrado la existencia de diferentes ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> en el hígado de rata, pensamos si no se estaría expresándose algunos de estos isoenzimas u otros diferentes durante la regeneración hepática. Para analizar esta suposición diseñamos una estrategia muy similar a la realizada con los anticuerpos (Fig. 3.17). Utilizamos una sonda de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado de rata ( $\approx 1.4$  kb) que incluía el dominio bisfosfatasa y parte del de la quinasa (Colosia *et al.*, 1988), suponiendo que reconocería cualquier ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> que se expresase, puesto que contenía la secuencia común de los diferentes isoenzimas descritos (la denominaremos sonda común). Y construimos otra de  $\approx 0.3$  kb, conteniendo el primer exón de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado y siendo, por tanto, específica para el ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> de hígado (la llamaremos sonda específica). La sonda específica incluía al péptido que se había utilizado para producir el anticuerpo Ab<sub>L</sub>. Con estas dos sondas realizamos el análisis de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> durante la regeneración hepática mediante técnicas de *Northern blot* (Sambrook *et al.*, 1989).



**Fig. 3.17.** El gen de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado y músculo. Estrategia y sondas utilizadas.

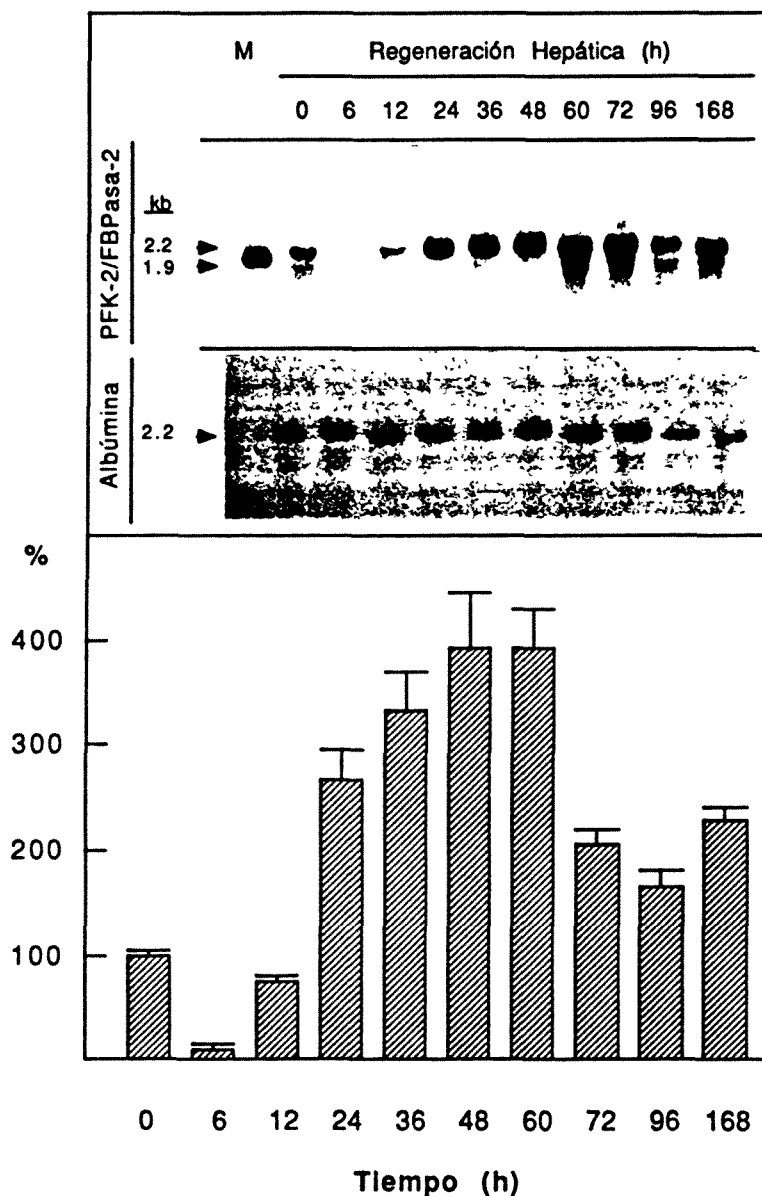
Adaptada de Cifuentes et al. (1991). Las cajas negras representan los exones y las líneas que las conectan los intrones. M, músculo; L, hígado. Los enzimas de restricción están representados por las letras: H, HaeIII; R, EcoRI; X, XbaI y B, BanII. Para más información ver Rosa et al. (1991a).

En la figura 3.18 podemos observar como la sonda común reconoce dos ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup>, uno de  $\approx 2.2$  kb correspondiente al hígado y otro de  $\approx 1.9$  kb correspondiente al músculo. También se puede apreciar la variación de los niveles del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> y la no modificación de su tamaño durante la regeneración hepática. Al utilizar la sonda específica (Fig. 3.19) se detecta un único ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> de  $\approx 2.2$  kb, correspondiente al hígado. El perfil de variación de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> a lo largo de la regeneración hepática es similar al obtenido con la sonda común. Estos resultados parecen indicar que el ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> que se expresa durante la regeneración hepática es el específico de hígado adulto y que las modificaciones encontradas con el Ab<sub>L</sub> en el extremo amino del enzima deberían ser debidas a una modificación post-transcripcional. Un posible mecanismo de esta modificación podría ser la ADP-ribosilación (Shimoyama *et al.*, 1985). Matsuura *et al.* (1988) han demostrado que la ADP-ribosilación de la L-PK suprime la fosforilación de este enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP, evitando de este modo su inactivación por fosforilación. Estos autores demuestran que la ADP-ribosilación ocurre en una arginina del enzima y que la ADP-ribosilación del péptido sintético Kemptide (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) suprime la fosforilación del péptido por la proteína quinasa

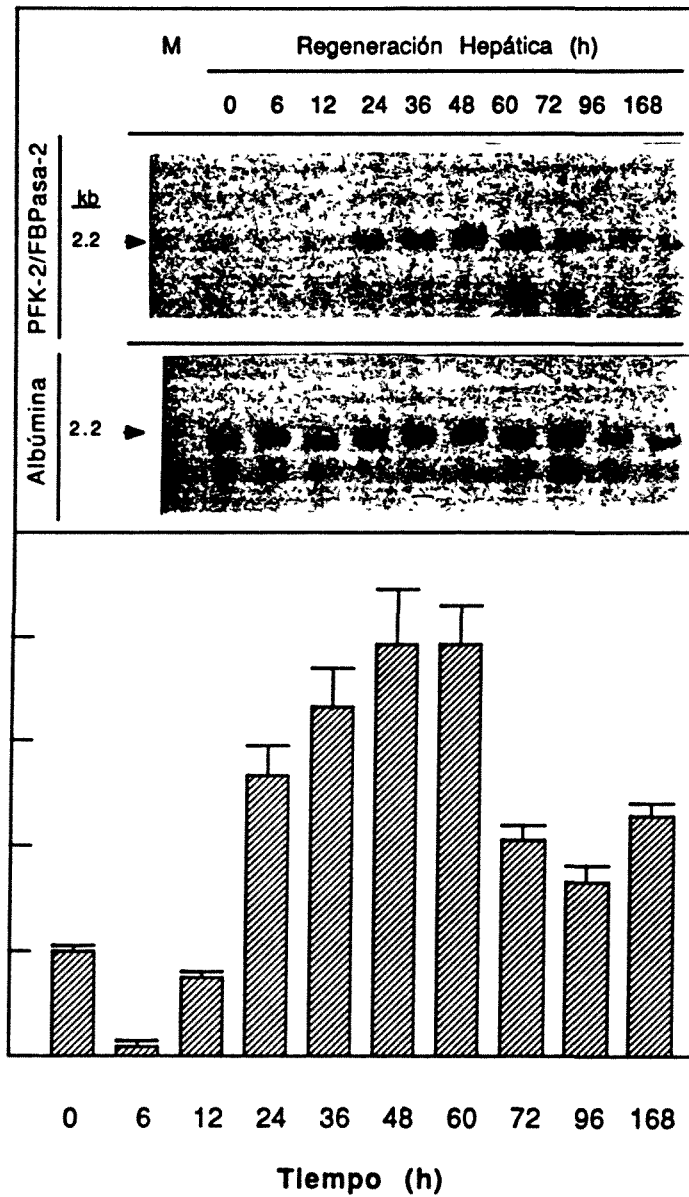
dependiente de cAMP. La secuencia de este péptido está relacionada con las secuencias de reconocimiento de la L-PK y la PFK-2/FBPasa-2 por la proteína quinasa dependiente de cAMP. Estos datos parecen sugerir que los cambios encontrados en la PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática pueden ser debidos a la ADP-ribosilación de una arginina del extremo amino del enzima. Esto explicaría la no inactivación del enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP, los cambios cinéticos, y el diferente reconocimiento del Ab<sub>L</sub>. Este mecanismo podría ser un importante sistema de modulación de la estructura y función de las proteínas durante la regeneración hepática, ya que se ha descrito un aumento de la actividad poli(ADP-ribosa) polimerasa durante la regeneración hepática (Alvarez-González y Ringer, 1988). La ADP-ribosil transferasa que ADP ribosila a la L-PK *in vitro* se encuentra en el núcleo, mientras que la PFK-2/FBPasa-2 se localiza en el citosol. Aunque existen ADP-ribosil transferasas citoplasmáticas este mismo enzima podría ADP-ribosilar a la PFK-2/FBPasa-2 ya que durante el ciclo celular la membrana nuclear se rompe y podrían interaccionar. El perfil observado con el anticuerpo Ab<sub>L</sub> (Fig. 3.16) coincide con el proceso proliferativo pudiendo estar relacionado con esta hipótesis.

Al analizar las variaciones del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> durante la regeneración hepática (Fig. 3.18, 3.19 y 3.20), observamos una rápida y transitoria disminución de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> a las 6 h post-hepatectomía, incrementándose posteriormente con un máximo entre 48-60 h, y retornando a valores cercanos a los del control hacia las 96 h. Los niveles de ARNm<sup>albumina</sup> se utilizan como un control de la cantidad de ARN total colocado, ya que no se modifican durante la regeneración hepática (Petropoulos *et al.*, 1983; Sobczak *et al.*, 1989). Si comparamos ahora el perfil de expresión del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> con el perfil de actividad PFK-2 (Fig. 3.15) y con el de inmunodetección con el Ab<sub>L</sub> (Fig. 3.16), podríamos sugerir que el descenso inicial de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> podría ser en parte el causante de la disminución de la actividad PFK-2 y de la cantidad de enzima no modificado. También podemos apreciar que el aumento de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> a partir de las 24 h no tiene un reflejo inmediato en la cantidad (Fig. 3.16) ni en la actividad (Fig. 3.15), posiblemente porque la velocidad con que se esté modificando el enzima sea superior o al menos igual a la de la traducción del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> en proteína durante este intervalo. Sólo después de 60 h parece que la cantidad de enzima no modificado comienza a recuperarse (Fig. 3.16). Una situación bastante similar ocurre en animales sometidos a un ayuno prolongado (72 h), donde la cantidad y actividad del enzima bifuncional decrece sin modificarse los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> sugiriéndose que la disminución del enzima podría ser debida a un efecto traduccional y/o a una intensificación de la degradación de la proteína (Colosia *et al.*, 1988). También, en la diabetes experimental se había descrito una situación semejante (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1988), aunque Miralpeix *et al.* (1992) han demostrado en nuestro laboratorio que el contenido de

ARN<sub>m</sub><sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> decrece en la diabetes a un 25 % de los valores control y se recupera con la administración de insulina.



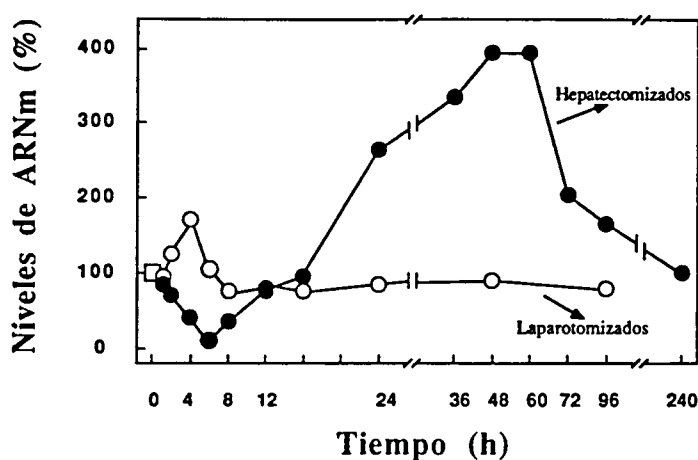
**Fig. 3.18. Expresión del gen de la PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática.** Adaptada de Rosa et al. (1991a). 20 µg de ARN fue aplicado a cada carril. Después de la electroforesis y la transferencia a la membrana de nylon, fue hibridado con la sonda común de la PFK-2/FBPasa-2 y la de albúmina. Se muestra un Northern blot representativo. Los niveles de ARN<sub>m</sub><sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> fueron cuantificados por densitometría y corregidos por los niveles de ARN<sub>m</sub><sup>albúmina</sup>. Los valores se expresan relativos al valor del tiempo 0 (hígado normal) que fue considerado 100%. Los datos son el promedio ± s.e.m. de 3-5 animales. M, músculo.



**Fig. 3.19. El ARNm de la PFK-2/FBPasa-2 que se expresa durante la regeneración hepática es específico de hígado.**

Leyenda similar a la de la fig. 3.18 a excepción de que las membranas fueron hibridadas con la sonda específica de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado.

Alguien podría pensar que las variaciones de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> fuese debida a un efecto del estrés quirúrgico. Por este motivo analizamos también el ARN de las ratas laparotomizadas que servirían como control del estrés. Los resultados se expresan en la figura 3.20, donde se observa que cuando hay una tendencia clara a la disminución de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> en los animales hepatectomizados (primeras horas), en los animales laparotomizados se observa un ligero incremento (pico a las 4 h) que es rápidamente normalizado (a las 6 h), no modificándose posteriormente. Este ligero aumento inicial de los niveles de ARNm por el efecto del estrés también ha sido descrito por Sobczak *et al.* (1989) para otras proteínas.



**Fig. 3.20.** Efecto del estrés en los niveles de ARNm de la PFK-2/FBPasa-2 durante la regeneración hepática.

Leyenda similar a la de la fig. 3.18.

## 6. Regulación de la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa-2

La PFK-2/FBPasa-2 hepática está sometida también a una compleja regulación multihormonal a través del control de la expresión de su gen (Pilkis *et al.*, 1990). En animales ayunados (72 h) o diabéticos ha sido descrito un aumento de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> con la realimentación o con la administración de insulina, respectivamente (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1988; Miralpeix *et al.*, 1992). También se ha observado este aumento de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> en ratas adrenalectomizadas y en ratas hipotiroideas después del tratamiento con glucocorticoides (Marker *et al.*, 1989) y triiodotironina (Wall *et al.*, 1989), respectivamente. Los glucocorticoides incrementaron la velocidad de transcripción del gen (Marker *et al.*, 1989) y este efecto fue directo como posteriormente se comprobó en cultivos de hepatocitos (Lange *et al.*, 1989). En células de hepatoma de rata (FTO-2B) la insulina o la dexametasona incrementaron los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> por un aumento de la velocidad de transcripción del gen sin modificar la velocidad de degradación del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> (Cifuentes *et al.*, 1991).

La proliferación hepática que sigue a una hepatectomía parcial está regulada de una manera compleja por una variedad de factores (hormonas, factores de crecimiento, proto-oncogenes, neuromediadores) que actuando en combinaciones sinérgicas modulan una señal específica para que el hígado, y sólo el hígado, prolifere (Fausto y Mead, 1989; Michalopoulos, 1990; Bucher *et al.*, 1990). Los cambios en los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> que ocurren (Fig. 3.18 y 3.20) podrían ser debidos a la acción de estos factores, mediante mecanismos que incluirían la regulación de la transcripción del gen (control transcripcional), el procesamiento del ARN, su transporte desde el núcleo al citoplasma y su estabilidad (control post-transcripcional), la síntesis de la proteína (control traduccional) o alguna combinación de todos estos procesos (Shafritz, 1988). Algunos de estos factores, tal y como hemos comentado anteriormente, afectan a la transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2 (glucocorticoides e insulina). Por este motivo decidimos analizar, en primer lugar, si la velocidad de transcripción del gen durante la regeneración hepática seguía los cambios previamente descritos en los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup>.

### 6.1 Velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2

Debido a que el porcentaje de nucleótidos incorporados en un determinado transcrito es muy bajo con respecto a la concentración de nucleótidos que hay en el animal, no ha sido posible medir la velocidad de transcripción de un gen *in vivo*. Sin embargo, se puede realizar



*in vitro* usando núcleos aislados e incubándolos con UTP radioactivo (McKnight y Palmiter, 1979). Darnell (1982) demostró que los transcritos de ARN nuclear de células eucariotas que ya se han iniciado *in vivo* pueden incorporar ( $\alpha$ -P<sup>32</sup>)UTP *in vitro* y extender la cadena de ARN naciente hasta 300-500 nucleótidos, denominándose transcripción *run-on* o *run-off*. Se asume que todas las cadenas de ARN iniciadas *in vivo* y conteniendo ARN polimerasa II son elongadas *in vitro* a la misma velocidad y con la misma extensión. Por consiguiente, la proporción de transcritos de ARN etiquetados, identificados por hibridación con una sonda de ADN complementaria de un ARNm específico, representaría la cantidad relativa de ese ARNm que se está iniciando en el núcleo y la velocidad con que se elonga en el momento que los núcleos fueron aislados (Shafritz, 1988).

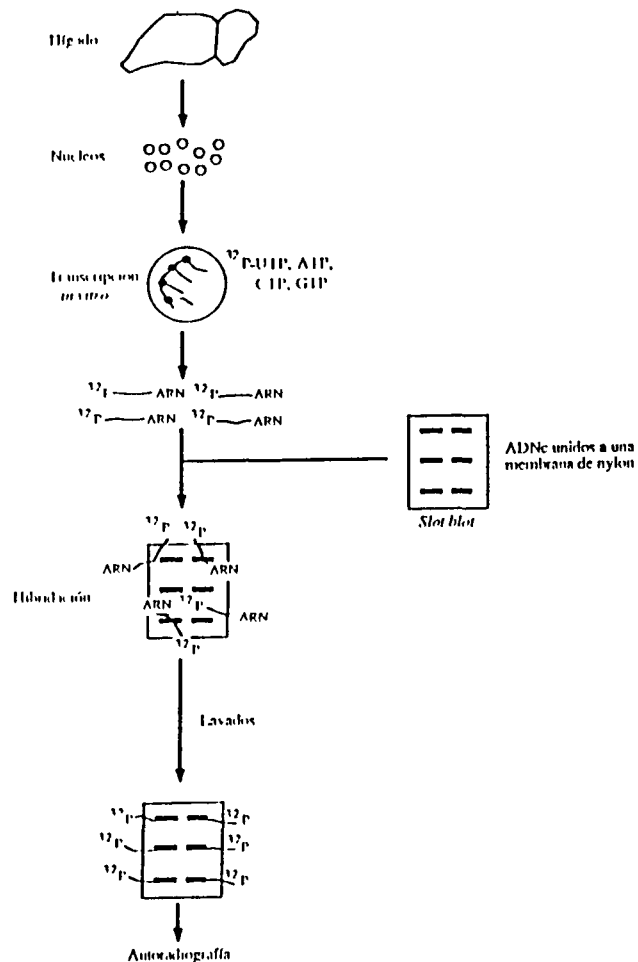


Fig. 3.21. Esquema del proceso seguido para estudiar la velocidad de transcripción de un gen.

Adaptada de Shafritz (1988).

En la figura 3.21 se ilustra esquemáticamente el proceso seguido para medir la velocidad relativa de transcripción de un gen determinado. Los núcleos fueron aislados de hígados de rata a diferentes tiempos post-hepatectomía mediante una modificación del método descrito por Laitinen *et al.* (1990) e incubados con ( $\alpha$ -P<sup>32</sup>)UTP (Rosa *et al.*, 1991a). Los tiempos escogidos (0, 6, 30, 72 y 96 h) intentan representar los diferentes tiempos con variaciones en los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> (Fig. 3.18 y 3.20). Después de la incubación, el ARN etiquetado fue extraído e hibridizado con dos diferentes fragmentos del gen (Fig. 3.17). Estos fragmentos corresponden a la región 5' del ARNm de los isoenzimas de la PFK-2/FBPasa-2 de músculo e hígado, conteniendo cada fragmento sólo el primer exón de su isoenzima. Los ARNs etiquetados fueron fácilmente detectables con la sonda de hígado no observándose ninguna señal con la sonda específica de músculo. Estos datos confirmaban la observación que ya habíamos deducido a partir de los Northern (Fig. 3.18 y 3.19), de que durante la regeneración hepática sólo se expresa el isoenzima de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado. Medimos como control del experimento la velocidad de transcripción del gen de la albúmina, esperando que no se modificase como había sido descrito para sus niveles de ARNm durante la regeneración del hígado (Petropoulos *et al.*, 1983; Sobczak *et al.*, 1989). Había sido descrita una activación transcripcional del gen de la PEPCK en presencia de cAMP y glucocorticoides en otros sistemas (Lamers *et al.*, 1982; Sasaki *et al.*, 1984), y por este motivo analizamos también la velocidad transcripcional de este enzima gluconeogénico. En la figura 3.22 se muestran las velocidades de transcripción de estos genes durante la regeneración hepática. Podemos observar como el gen de la albúmina prácticamente no modifica su velocidad, mientras que sí lo hacen los de la PFK-2/FBPasa-2 y la PEPCK. La velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2 alcanza un valor mínimo a las 6 h (50 %) post-hepatectomía, coincidiendo con el nivel mínimo de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> (Fig. 3.18 y 3.20). Después se incrementa, alcanzando un máximo a las 72 h y tendiendo a normalizarse hacia las 96 h. La velocidad de transcripción del gen de la PEPCK se incrementó rápidamente (12 veces a las 6 h post-hepatectomía), manteniéndose elevada durante todos los tiempos estudiados. Esta diferente respuesta inicial (6 h) en las velocidades de transcripción de los genes de la PFK-2/FBPasa-2 y de la PEPCK correlaciona muy bien con el papel opuesto de estos enzimas en el control de la glucólisis/gluconeogénesis.

Regeneración (h)	Velocidad relativa de transcripción génica					
	Albúmina		PEPCK		PFK-2/FBPasa-2	
	Unidades arbitrarias	Veces	Unidades arbitrarias	Veces	Unidades arbitrarias	Veces
0	0.58	1	1.14	1	1.89	1
6	0.56	1.0	13.60	12.0	0.97	0.5
30	0.46	0.8	4.82	4.2	1.94	1.0
72	0.52	0.9	2.04	1.8	4.38	2.3
96	0.65	1.1	6.16	5.4	2.34	1.2

Fig. 3.22. Velocidades relativas de transcripción de los genes de la PFK2/FBPasa-2, albúmina y PEPCK durante la regeneración hepática. Adaptada de Rosa et al. (1991a)

## 6.2 Influencia de la hepatectomía parcial en la vida media del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup>

La regulación transcripcional del gen no excluye otros mecanismos pretraduccionales de control de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup>. La estabilidad del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> podría ser uno de los mecanismos implicados. Ha sido descrito que la vida media del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> es de 1.5 h en cultivo de células de hepatoma (FTO-2B) (Cifuentes *et al.*, 1991) y de 3.5 h en cultivos de hepatocitos (Kummel y Pilkis, 1990). Teniendo en cuenta estos valores de vida media, hemos analizado la estabilidad del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> en hepatocitos de rata dos horas después de la hepatectomía parcial y la hemos comparado con la observada en hepatocitos de rata control para intentar explicar el elevado descenso de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> observados a las 6 h (5 % del valor control), ya que la velocidad de transcripción sólo disminuyó a la mitad (50 %).

Los hepatocitos fueron aislados del hígado de la rata normal o hepatectomizada mediante una perfusión recirculante con colagenasa siguiendo una variación del método descrito por Seglen (1973) (Bartrons *et al.*, 1983). Los hepatocitos fueron incubados a 37°C en un medio conteniendo un tampón Krebs-Henseleit bicarbonato (Krebs y Henseleit, 1932) equilibrado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1), a pH 7.4 y en presencia de glucosa 10 mM y albúmina (BSA) al 1 %. La actinomicina D (5 µg/ml) fue añadida y a diferentes tiempos el ARN fue extraído y analizado por *Northern blot*. La viabilidad de los hepatocitos fue siempre superior al 90 % durante el tiempo estudiado. En la figura 3.23 se muestran los

resultados obtenidos. La vida media del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> fue de 2.5 h y no fue modificada a las 2 h de la hepatectomía parcial. Estos resultados sugieren que la estabilidad del ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> no influye en el cambio de los niveles de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> que sigue a la hepatectomía parcial, y que durante el estado pre-replicativo de la regeneración hepática la concentración de ARNm<sup>PFK-2/FBPasa-2</sup> está regulada principalmente a nivel transcripcional.

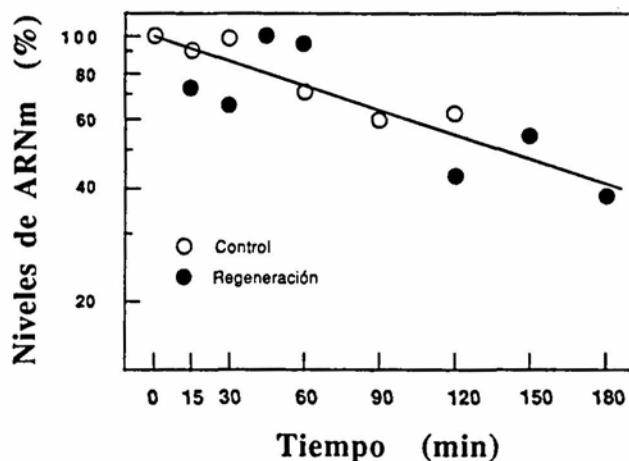


Fig. 3.23. Estabilidad del ARNm<sup>PFK2/FBPasa-2</sup> en suspensión de hepatocito.

Adaptada de Rosa et al. (1991a). Los hepatocitos aislados de hígado de rata normal o hepatectomizada fueron incubados en presencia de actinomicina D (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante los tiempos indicados. El ARN fue aislado y analizado mediante técnicas de *Northern blot*. Los niveles de ARNm fueron cuantificados por densitometría láser de los autoradiogramas y expresados relativos a la cantidad presente a tiempo cero que fue escogido como 100 %.