

Canvis enzimàtics a la membrana plasmàtica de l'hepatòcit durant la fase pre-replicativa de la regeneració hepàtica

O. Bachs, M<sup>a</sup> R. Piñol, C. Enrich, M. Soriano i J. Domingo

Departament d'Histologia i Biologia Cel.lular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona-36

Introducció

Quinze hores després de la realització d'una hepatectomia parcial a la rata, les cèl.lules hepàtiques remanents inicien la replicació del DNA (Grisham, 1962). Els mecanismes que regulen aquest procés d'activació proliferativa són encara força desconeguts malgrat s'han descrit un nombre important de factors humorals que intervenen d'alguna manera en la manifestació de la resposta proliferativa (Leffert et al., 1978).

Leffert i Koch (1979) han proposat un model de regulació anomenat hipòtesi dels dos programes en el que plantejen que immediatament després de l'hepatectomia parcial, es produeix un increment del flux d'entrada de sodi que seria responsable dels primers aconteixements moleculars necessaris per el desenvolupament de la resposta proliferativa. En segon lloc, la hipòtesi planteja que aproximadament a les 10-12 hores de regeneració hepàtica existeix un segon punt de control que consisteix en la necessitat de concentracions normals de calci a la sang junt amb una ona d'acumulació intracel.lular d'AMP cíclic, fets que serien responsables del desencadenament d'una segona sèrie de reaccions que culminarien en la iniciació de la replicació del DNA.

En aquest treball presentem resultats de les activitats de la  $(Na^+-K^+)$ -ATPasa, responsable del co-transport actiu de  $Na^+$  i  $K^+$ , i de la  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPasa responsable del transport de calci, mesurades a fraccions purificades de membrana plasmàtica a diferents temps després de l'hepatectomia parcial i discutim aquests resultats en relació al model dels dos programes proposat per Leffert i Koch (1979).

Material i Mètodes

Per a la realització d'aquest treball hem emprat rates Sprague-Dawley de 8-10 setmanes d'edat amb un pes entre els 200 i



250 gr.

L'hepatectomia parcial s'ha realitzat segons el mètode descrit per Higgins i Anderson (1931) utilitzant Ketolar<sup>R</sup> com a agent anestèsic (130mgr/Kgr de pes corporal). La laparatomia s'ha realitzat mitjançant l'obertura de la cavitat abdominal sense cap manipulació del fetge.

Les fraccions de membrana plasmàtica total s'han aïllat segons el mètode descrit per Bachmann et al. (1977) i les subfraccions de membrana sinusoidal, lateral i canalicular s'han purificat segons la tècnica de Wisner i Evans (1975).

L'activitat de l'enzim (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPasa s'ha mesurat segons el mètode descrit per Sulakhe et al. (1971) i l'activitat de la (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa mitjançant el mètode descrit per Lotersztajn et al. (1981).

El contingut proteic de les fraccions purificades de membrana plasmàtica s'ha determinat mitjançant la tècnica descrita per Lowry et al. (1951).

### Resultats

L'activitat específica de la (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPasa mesurada a les fraccions de membrana plasmàtica total procedents de rates sotmeses a una hepatectomia parcial (Taula I) presenta una disminució a les 2 hores després de la intervenció quirúrgica. Aquesta ràpida pèrdua d'activitat es recupera seguidament de manera que a les 4 hores ja s'observen valors control. Posteriorment, s'observa un increment de l'activitat que assoleix valors màxims a les 6-8 hores post-hepatectomia parcial. Tot seguit, l'activitat específica disminueix progressivament fins les 13 hores. A les 15 hores s'observa un altre increment d'activitat.

Quan es mesura l'activitat de la (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPasa a les fraccions de membrana plasmàtica total procedents de rates sotmeses a una laparatomia no s'observen modificacions significatives durant les 13 primeres hores de regeneració hepàtica (Taula I).

L'activitat específica de la (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa mesurada a les fraccions de membrana plasmàtica total procedents de rates



sotmeses a una hepatectomia parcial presenta una ona d'inhibició 12 hores després de la intervenció quirúrgica. Aquesta però a les 15 hores recupera parcialment la seva activitat (Taula II).

Taula I : Activitat específica de la  $(\text{Na}^+-\text{K}^+)$ -ATPasa a les fraccions de membrana plasmàtica després d'una hepatectomia parcial.

<u>Temps</u>	<u>A. específica</u>
Control	10,55 ± 2,40
2 hores	3,29 ± 0,44
4 hores	9,22 ± 2,05
6 hores	22,08 ± 2,18
8 hores	20,75 ± 5,76
10 hores	16,24 ± 4,79
13 hores	11,63 ± 2,71
15 hores	22,00 ± 7,46
2 hores lap.	10,76 ± 1,75
4 hores lap.	8,47 ± 0,85
8 hores lap.	13,97 ± 2,19
13 hores lap.	15,14 ± 3,33

Taula II : Activitat específica de la  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa a les fraccions de membrana plasmàtica després d'una hepatectomia parcial.

<u>Temps</u>	<u>A. específica</u>
Control	88,95 ± 11,22
4 hores	88,47 ± 6,21
8 hores	81,55 ± 8,56
12 hores	33,16 ± 4,74
15 hores	62,91 ± 5,29
12 hores lap.	62,54 ± 13,23
15 hores lap.	70,06 ± 3,79

L'activitat específica d'aquest enzim mesurada a les fraccions de membrana plasmàtica procedent de rates laparatomitzades està lleugerament disminuïda però la disminució observada després de l'hepatectomia parcial és clarament significativa.



Hem mesurat també l'activitat específica de la  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPasa a les subfraccions de membrana sinusoidal, lateral i canalicular a les 12 hores després de l'hepatectomia parcial. Els resultats que hem obtingut indiquen que l'activitat disminueix a les regions canalicular i sinusoidal mentre que a la regió lateral l'activitat no es modifica (Taula III).

Taula III : Activitat específica de la  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPasa a les subfraccions de membrana sinusoidal, canalicular i lateral

	<u>sinusoidal</u>	<u>canalicular</u>	<u>lateral</u>
Control	43,01 ± 13,68	47,27 ± 4,15	30,14 ± 0,34
12 h. hep.	22,99 ± 6,57	33,96 ± 4,07	31,34 ± 5,10
12 h. lap.	36,94 ± 15,36		

### Discussió

La disminució de l'activitat de la  $(Na^+-K^+)$ -ATPasa observada a les 2 hores després de l'hepatectomia parcial indica que en aquest moment es produeix una acumulació intracel.lular de sodi. Algunes hores després, a les 6-8 hores després de l'intervenció quirúrgica es produeix un increment de l'expulsió de sodi a l'espai extracel.lular segons indica l'increment de l'activitat d'aquest enzim observada a aquestes hores.

Aquests resultats permeten explicar l'efecte inhibidor sobre la regeneració hepàtica que manifesten l'amiloride (inhibidor de l'entrada de  $Na^+$ ) i l'ouabaina (inhibidor de la  $(Na^+-K^+)$ -ATPasa) (Leffert i Koch, 1979). Probablement l'amiloride bloqueja el flux d'entrada de sodi i per tant no es produirà l'acumulació intracel.lular d'aquest ió mentre que l'ouabaina bloquejaria la sortida de sodi previament acumulat al citoplasma. Els efectes d'aquestes drogues indiquen que tant l'acumulació de sodi com l'expulsió d'aquest ió són fenòmens importants per al desencadenament de la resposta proliferativa.

La disminució de l'activitat de la  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPasa observada a les 12 hores després de l'hepatectomia parcial tant a les fraccions de membrana plasmàtica total com a les subfraccions de membrana sinusoidal i canalicular indica que es produeix una disminució de la sortida de calci a l'espai extracel.lular.



lular i per tant, es produirà una acumulació intracel.lular de calci.

El fet que les rates hipocalcèmiques sotmeses a una hepatectomia parcial no manifestin la resposta proliferativa així com el fet que aquest bloqueig pugui ésser superat mitjançant una injecció intraperitoneal de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  entre les 12 i les 15 hores després de l'hepatectomia indica la necessitat de calci extracel.lular a concentracions normals entre les 12 i les 15 hores per tal que es produeixi la resposta proliferativa (Whitfield et al., 1980).

Els nostres resultats suggereixen que aquesta necessitat de calci extracel.lular pot ésser deguda a que durant aquest període de temps és necessària l'acumulació intracel.lular d'aquest ió per que es desencadeni la replicació del DNA.

#### Bibliografia

- \* GRISHAM J.W. (1962) Morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver. *Cancer Res.*, 22, 842-849.
- \* LEFFERT H.L., KOCH K.S., RUBALCAVA B., SELL S., MORAN T. and BOORSTEIN R. (1978) Hepatocyte growth control: In vitro approach to problems of liver regeneration and function. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 48, 87-101.
- \* LEFFERT H.L., KOCH K.S., MORAN T. and RUBALCAVA B. (1979) Hormonal control of rat liver regeneration. *Gastroenterology*, 76, 1470-1482.
- \* HIGGINS G.M. and ANDERSON R.M. (1931) Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.*, 12, 186-202.
- \* BACHMANN W., HARMS E., HASSELS E., HENNINGER H. and REUTER W. (1977) Studies on rat liver plasma membranes. *Biochem. J.*, 166, 455-462.
- \* WISHER M.H. and EVANS W.H. (1975) Functional polarity of the rat hepatocyte membrane. *Biochem. J.*, 146, 375-388.
- \* SULAKLE P.V. (1971) Isolation of skeletal muscle membrane fractions containing active  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  stimulated ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 793-800.
- \* LOTERSZTAJN S., HANOUNE J. and PECKER F. (1981) A high affinity calcium-stimulated Magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 256, 11209-11215.