

Canvis a les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica sinusoidal de l'hepatòcit a la fase pre-replicativa de la regeneració hepàtica.

C.Enrich, O.Bachs, M.Soriano, R.Piñol i J.Domingo

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

Introducció

La regeneració hepàtica a la rata adulta és un model adequat per a l'estudi de l'activació de la proliferació cel.lular in vivo. Durant les primeres quinze hores del procés regeneratiu esdevenen els preparatius per a la iniciació de la síntesi del DNA així com la posterior divisió cel.lular.

En aquesta fase pre-replicativa, la membrana plasmàtica i molt especialment la membrana plasmàtica de la regió sinusoidal de l'hepatòcit pot jugar un paper essencial com a lloc de recepció i de transducció de senyals (hormones, factors de creixement, ions, nutrients) implicades en l'activació proliferativa a la cèl.lula.

En aquest treball, hem estudiat els canvis qualitius i quantitius a la població de glicoproteïnes de la membrana plasmàtica a les 6 i a les 15 hores de la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial. Els resultats trobats són consistents amb una important implicació de la membrana plasmàtica en la fase de transició de les cèl.lules quiescents al estat proliferatiu.

Material i Mètodes

En tots els experiments s'han utilitzat rates mascle, Sprague-Dawley (250-300 gr.). L'hepatectomia parcial (70%) s'ha realitzat segons el mètode de Higgins, Andersson (1931). També s'han realitzat laparatomies consistents en l'apertura de la cavitat abdominal però sense manipulació del fetge.

Per tal d'obtenir la membrana plasmàtica purificada de la regió sinusoidal s'ha utilitzat el mètode de Wisner, Evans (1975).

L'anàlisi de les glicoproteïnes s'ha realitzat mitjançant electroforesi en gels d'acrilamida (Maizel 1971) i posterior tinció amb el reactiu de Schiff o amb un procediment autorradiogràfic amb ^{125}I -Con A.

La quantitat de proteïna a la fracció de membrana s'ha mesurat per el mètode de Lowry et al. (1951) i la quantitat d'àcid siàlic lligat a la membrana plasmàtica sinusoidal per el mètode d'Aminoff (1961).

Resultats

La quantitat d'àcid siàlic unit a la membrana plasmàtica de la regió sinusoidal està significativament afectada al llarg d'aquesta fase pre-replicativa. Tal com es pot observar (Fig. 1) hi ha una reducció a partir de les 6 hores (35.9%), a les 8 hores és del 59.42% i a les 10 hores s'arriba al punt de mínim contingut (reducció: 92.23%). A partir d'aquest moment s'inicia una lenta recuperació assolint els valors control a les 48 hores de la intervenció quirúrgica Kishore, Carubelli (1981). Quan s'estudien els patrons de glicoproteïnes PAS-positives de la membrana plasmàtica sinusoidal, a les 6 i 15 hores de regeneració, les densitometries dels gels indiquen (Fig. 2):

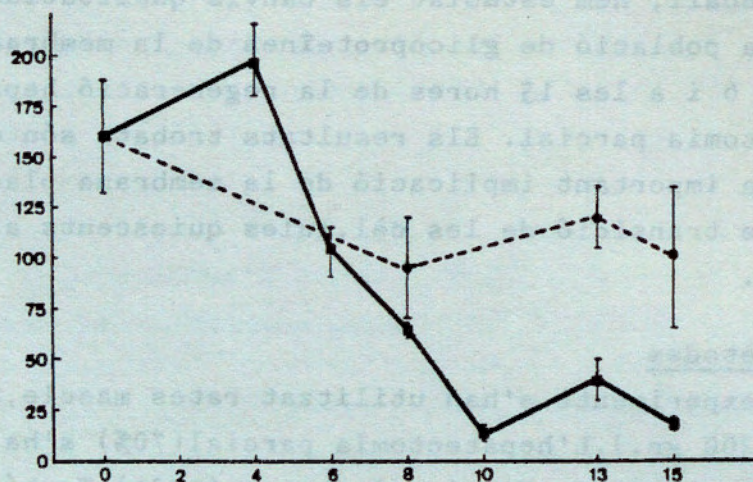


Figura 1.- Contingut d'àcid siàlic (nmol àcid siàlic/mg. proteïna) durant les primeres 15 hores de la regeneració hepàtica. ■ — ■ Animals hepatectomitzats
● - - - - ● Animals laparatomitzats.

-A les 6 hores (fig. 2b): 1) una reducció global del 35.9% (àrea) respecte al control; 2) l'increment d'intensitat de les bandes PAS 12 i PAS 15; 3) l'aparició de 4 bandes 200K, 85K, 80K i 40K daltons (fletxes fig. 2b); 4) canvis de mobilitat relativa de algunes bandes específiques.

-A les 15 hores (fig. 2c): 1) la reducció global és del 15.25% respecte del control; 2) desaparició de les bandes PAS 9 i PAS 14; 3) també es detecten les bandes 200 K, 85K

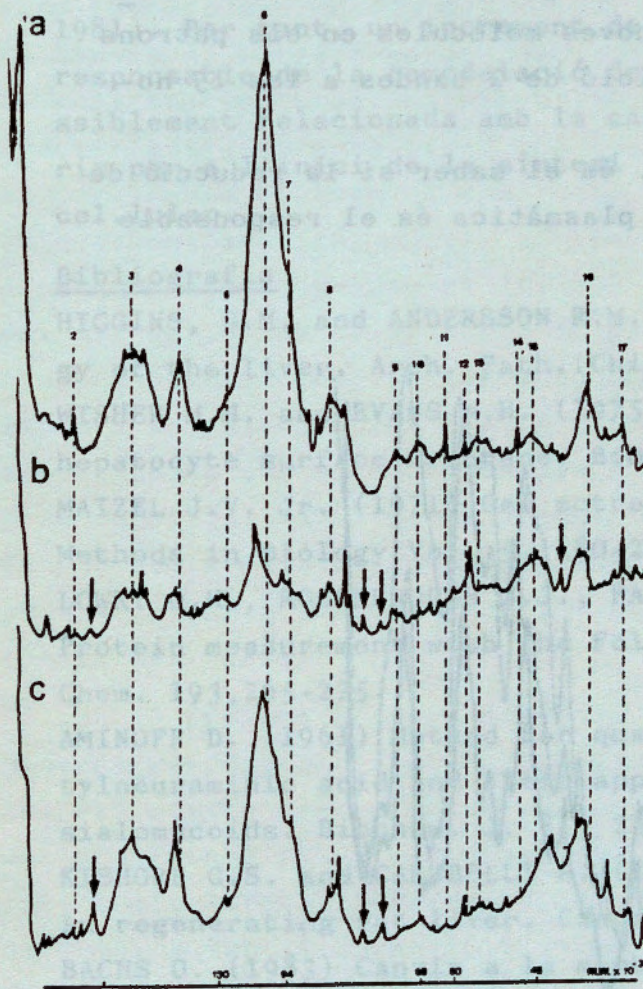


Figura 2.-Densitometries dels gels després de la tinció amb el reactiu de Schiff, a 560 nm. Totes les mostres contenen 800 µg. de proteïna. a, control; b, 6 hores i c, 15 hores.

i 80 K daltons; 4) els canvis de mobilitat relativa es limiten a les bandes PAS 4, 6 y 15 respecte del control.

Els autorradiogrames dels gels tractats amb ^{125}I -Con A (Fig. 3), a les 6 hores, demostren: 1) un increment del marcatge del 19%; 2) aparició d'una banda de pes mol.lecular aproximat de 80 K daltons (fletxa fig. 3b).

A les 15 hores, l'increment del marcatge es del 58% (39% més que a les 6 hores). Aquí també s'observa l'aparició de la banda de 80 K daltons.

Discussió

La preparació per a la reproducció cel.lular comporta una seqüència ordenada d'esdeveniments a la fase pre-replicativa i que a nivell de superfície cel.lular es tradueixen per :

modificacions de les activitats específiques d'enzims de la membrana plasmàtica (Bachs, 1983, i Enrich, 1983) i del nombre de receptors hormonals; canvis a l'organització del citoesquelet associat a la membrana plasmàtica i canvis als components de la matriu extracel·lular. A més a més, en aquest treball hom demostra que també hi han canvis a la composició glicoproteica de la membrana plasmàtica, en el sentit de: 1) reducció del contingut d'àcid siàlic i d'altres sucres; 2) aparició de noves molècules en els patrons electroforètics i 3) desaparició de 2 bandes a les 15 hores de la regeneració.

Un fet que pot ser important, és el saber si la reducció de l'àcid siàlic de la membrana plasmàtica és el responsable

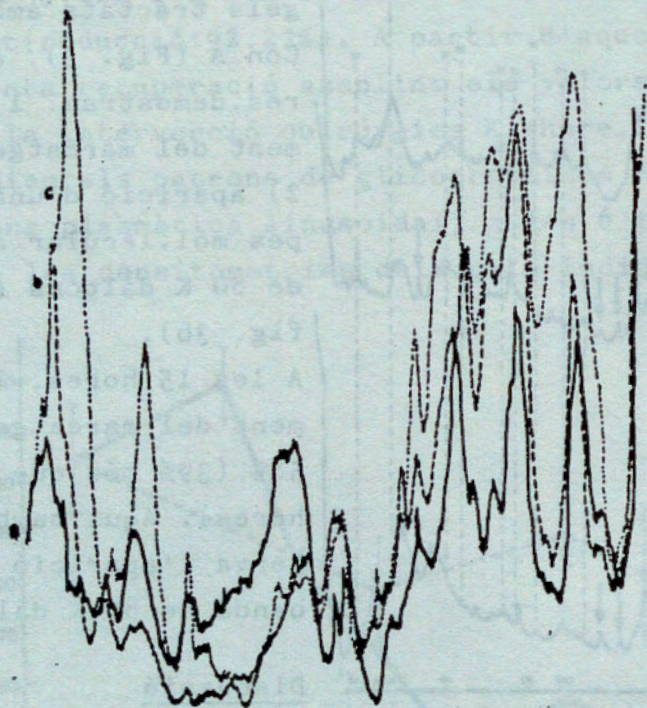


Fig. 3.-Densitometries dels autorradiogrames amb ^{125}I -Con A, a 550 nm. a, control (—) ; b, 6 hores (----) i c, 15 hores (...). Totes les mostres contenen 125 μg . de proteïna.

de la disminució dels patrons de Schiff, dels canvis de la capacitat d'unió de la Concanavalina A, de la desaparició de bandes PAS-positives i de l'aparició de noves bandes. L'àcid siàlic i la fucosa juguen un paper important en el manteniment de la correcta configuració de les glicoproteïnes de la membrana i d'alguna manera les protegeix de l'atac proteolític. Evidentment, una pèrdua d'aquests sucres terminals incrementaria la susceptibilitat proteolítica (Gahmberg 1981). Per tant, un increment de la proteolísis podria ser responsable de la remodelació de la superfície cel.lular possiblement relacionada amb la captació de factors necessaris per a l'inici de la síntesi del DNA i de la proliferació cel.lular.

Bibliografia

- HIGGINS, G.M. and ANDERSSON R.M. (1931) Experimental pathology of the liver. Arch. Path. (Chicago) 12, 186-202
- WISHER M.H. and EVANS W.H. (1975) Functional polarity of the hepatocyte surface membrane. Biochem. J. 146, 375-388.
- MAIZEL J.V. Jr. (1971) Gel electrophoresis of proteins. In : Methods in Biology Vol. 5, 180-246.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- AMINOFF D. (1961) Method for quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolyzates of sialomucoids. Biochem. J. 81, 284-392.
- KISHORE G.S. and CARUBELLI R. (1981) Sialic acid metabolism in regenerating rat liver. Cancer Lett. 13, 281-289.
- BACHS O. (1983) Canvis a la membrana plasmàtica de l'hepatòcit durant la fase prereplicativa de la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial a la rata. Tesi doctoral.
- ENRICH C. (1983) Estudio de la membrana plasmática de la región sinusoidal del hepatocito durante la regeneración. Tesis doctoral.
- GAHMBERG C.G. (1981) Membrane glycoproteins and glycolipids: structure, localization and function of the carbohydrate. In Membrane Structure. (Finean/Michell eds.) Elsevier.