

ser de tots aquests carbohidrats el més significatiu. Aquest té importants funcions (Schauer 1982 a) i és el responsable de donar carga negativa a la superfície de les cèl.lules influint de manera decisiva en el seu comportament (Schauer 1982 b). A més en molts teixits cancerosos humans així com en hepatomes induïts experimentalment els nivells d'aquest sucre es troben incrementats respecte els teixits normals d'on provenen (Abercrombie et al. 1962; Otha et al. 1968). Succeeix el mateix amb els nivells d'activitat de les sialiltransferases (Berge et al. 1984). No obstant en diverses línies cel.lulars els nivells d'aquest monosacàrid es troben disminuïts (Vilaren et al. 1981).

Per tant degut a la gran implicació de l'àcid siàlic en diversos processos proliferatius sembla molt interessant estudiar els nivells d'aquest sucre durant la fase prerreplicativa de la regeneració hepàtica i després de la infusió intravenosa de la solució T.A.G.H.

Material i mètodes

S'han emprat rates Sprague-Dawley d'un pes aproximat de 200-250 gr. i de 8 a 10 setmanes d'edat sotmeses a 12 hores de llum i 12 de foscor cada dia.

L'hepatectomia parcial s'ha fet segons el mètode de Higgins i Anderson (1931) i sempre entre les 8 i les 10 hores del matí. S'han utilitzat rates laparatomitzades com a control.

La infusió de la solució T.A.G.H. formada per 100 mg de 3-3'-5 triiodetironina, 130-150 mg d'hidrolitzat de caseïna, 1mg de glucagó i 100 U.S.P. d'heparina en 0.15 M de ClNa a un pH=7.2 i en un volum final de 10 ml., es realitza per la vena de la cua a un flux constant de 3.3 ml./H. Els controls es realitzen a partir de la injecció de solució salina única i exclusivament.

La subfracció de la membrana plasmàtica derivada de la regió sinusoïdal de l'hepatòcit s'ha obtingut per el mètode de Wisner i Evans (1975).

Per a quantificar el contingut proteic de cada mostra s'ha utilitzat la tècnica de Lowry (1951).

La quantificació del contingut d'àcid siàlic unit a la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal durant els dos processos proliferatius s'ha fet seguint la tècnica d'Aminoff (1961).

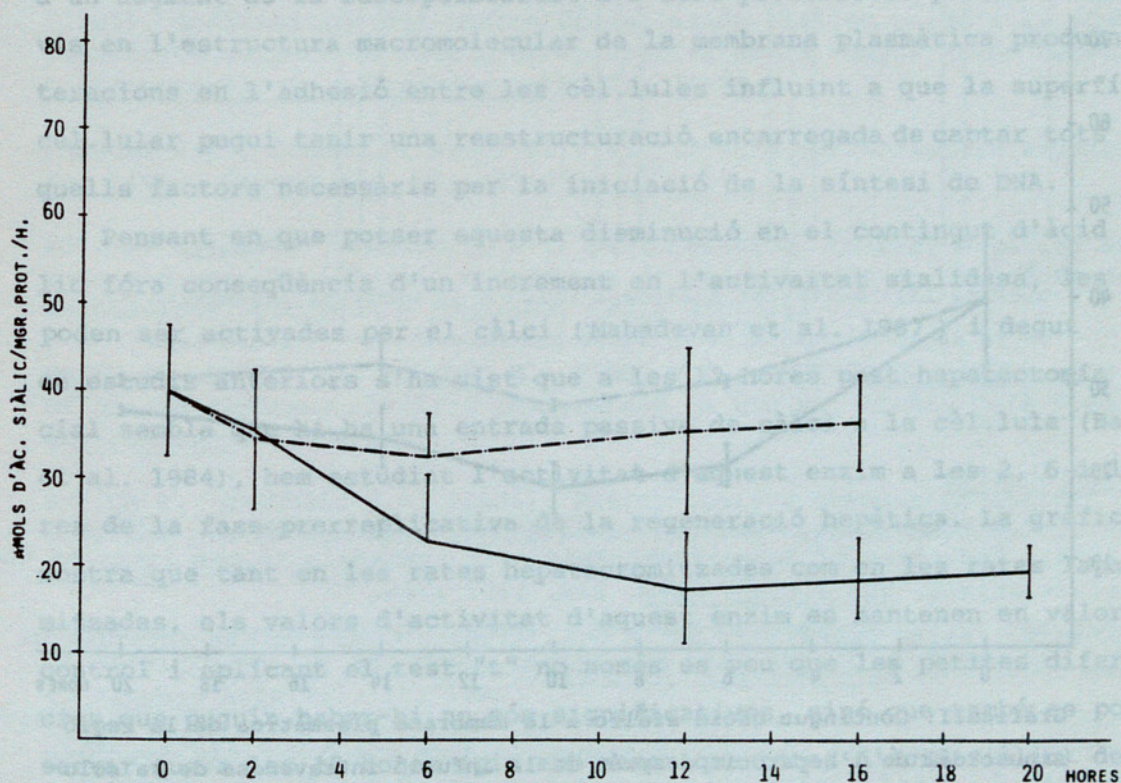
La tècnica emprada per mesurar l'activitat sialidasa associada

a la membrana plasmàtica ha sigut la de Visser i Emmelot (1973). amb una modificació: l'àcid siàlic alliberats'ha quantificat pel mètode de l'àcid tiobarbitúric descrit per Warren i modificat per Aminoff (1961). El sustrate utilitzat han sigut gangliosids amb un 20% d'àcid siàlic unit (type II Sigma).

Resultats i discussió

La regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica dels hepatòcits degut a la seva localització és la que està amb contacte amb la sang portal i per tant és el lloc fonamental de la recepció i transducció de senyals de l'exterior a l'interior de les cèl.lules. Les molècules encarregades de tal missió són fonamentalment les glicoproteïnes i glicolípidis i en totes elles l'àcid siàlic hi juga un paper fonamental.

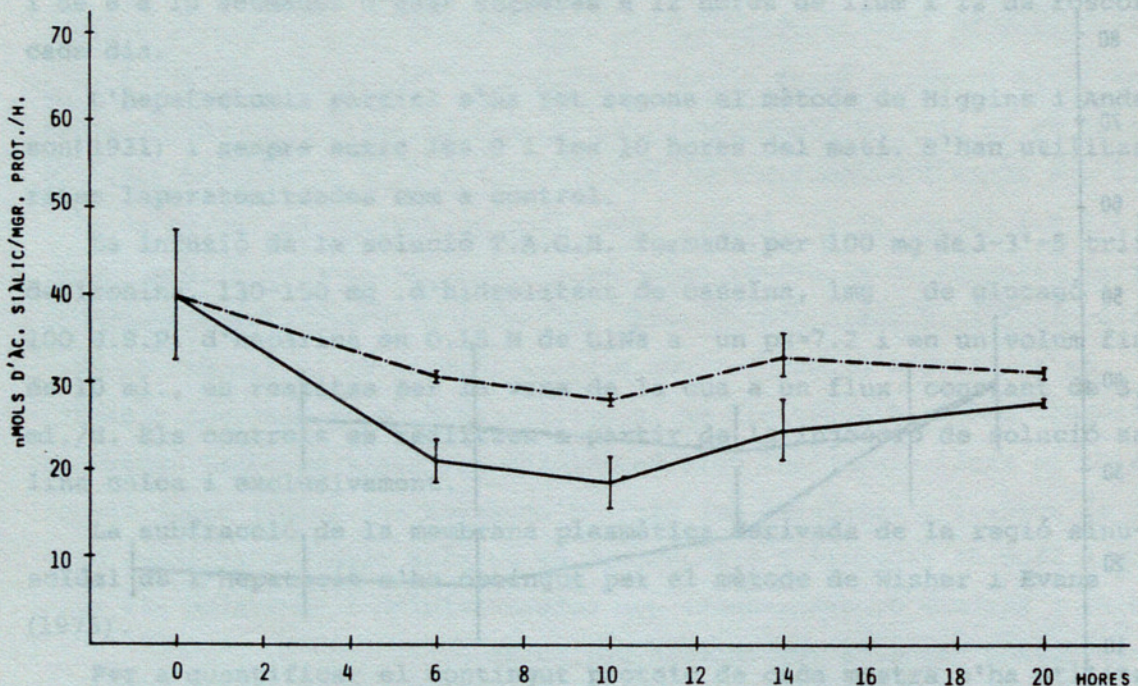
S'ha descrit que el contingut d'àcid siàlic unit a aquesta subfracció de membrana plasmàtica disminueix a partir de les 6 hores fins aproximadament les 24 hores després d'una hepatectomia parcial (Enrich et al.1985, Kishore i Karubelli 1981) (Gràfica I).



Gràfica I: Contingut d'àcid siàlic a la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal de l'hepatòcit durant la regeneració hepàtica.

— rates regenerants; -.-.- rates laparatomitzades.

Observant la gràfica II es pot veure que al igual que en l'hepatectomia parcial hi ha una disminució en el contingut d'àcid siàlic a la membrana sinusoïdal de l'hepatòcit durant les 20 primeres hores després de la infusió intravenosa de la solució T.A.G.H. A les 6 hores comença a disminuir però aquesta disminució no pot considerar-se significativa respecte els resultats obtinguts amb rates injectades amb solució salina fins a les 10 hores on la disminució representa un 34% amb un nivell de significació $p \leq 0.05$ segons el test de la "t". Poc a poc aquests nivells es van recuperant 26.20% a les 14 hores i 9.72% a les 20 hores, semblant que cap a les 24 hores es tornin a obtenir valors control. Aquest sistema d'activació té l'avantatge de no ocasionar una agressió directe ni de donar lloc a una pèrdua de la massa hepàtica amb el que a diferència del que succeeix a l'hepatectomia parcial, qualsevol canvi observat en la fase prerreplicativa post infusió de la solució T.A.G.H. estarà més directament relacionat amb la resposta proliferativa que en una compensació funcional.



Gràfica II: Contingut d'àcid siàlic a la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal de l'hepatòcit després de la infusió intravenosa de la solució T.A.G.H. — rates injectades amb la solució T.A.G.H.; - - - - - rates injectades amb solució salina.

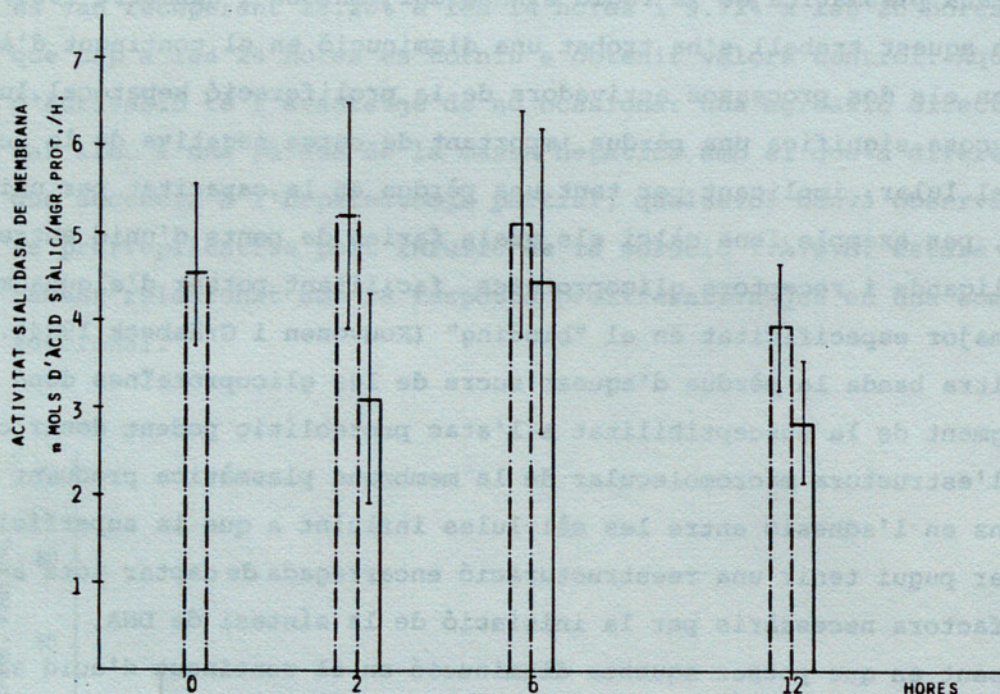
La disminució observada en la gràfica II és menys acusada que la observada a la gràfica I i està desfassada unes 2-4 hores. Aquest fet concorda amb diversos estudis enzimàtics i de síntesi de DNA fets a partir de la infusió intravenosa de la solució T.A.G.H. (Soriano 1983) comparats amb els trobats en diversos estudis de la regeneració hepàtica.

Estudis anteriors demostren que durant la regeneració hepàtica hi ha modificacions específiques en les activitats de diversos enzims de membrana (Bachs et al. 1985) així com també en els patrons de glicoproteïnes de la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal (Enrich i Gahmberg 1985). A més en aquest treball s'ha trobat una disminució en el contingut d'àcid siàlic en els dos processos activadors de la proliferació hepatocel·lular, la qual cosa significa una pèrdua important de carga negativa de la superfície cel·lular, implicant per tant una pèrdua en la capacitat per unir cations, per exemple ions càlci els quals farien de ponts d'unió entre certs lligands i receptors glicoproteïcs, facilitant potser d'alguna manera una major especificitat en el "binding" (Kouvonen i Gräsbeck 1984).

D'altra banda la pèrdua d'aquest sucre de les glicoproteïnes dona lloc a un augment de la susceptibilitat a l'atac proteolític podent donar canvis en l'estructura macromolecular de la membrana plasmàtica produint alteracions en l'adhesió entre les cèl·lules influint a que la superfície cel·lular pugui tenir una reestructuració encarregada de captar tots aquells factors necessaris per la iniciació de la síntesi de DNA.

Pensant en que potser aquesta disminució en el contingut d'àcid siàlic fóra conseqüència d'un increment en l'activitat sialidasa, les quals poden ser activades per el càlci (Mahadevan et al. 1967) i degut que en estudis anteriors s'ha vist que a les 12 hores post hepatectomia parcial sembla que hi ha una entrada passiva de càlci a la cèl·lula (Bachs et al. 1984), hem estudiat l'activitat d'aquest enzim a les 2, 6 i 12 hores de la fase prerreplicativa de la regeneració hepàtica. La gràfica III mostra que tant en les rates hepatectomitzades com en les rates laparatomitzades, els valors d'activitat d'aquest enzim es mantenen en valors control i aplicant el test "t" no només es veu que les petites diferències que puguin haver-hi no són significatives, sinó que també es pot observar que a les 12 hores (pic amb menor quantitat d'àcid siàlic) després d'una hepatectomia parcial, l'activitat d'aquest enzim està significativament disminuïda, la qual cosa ens permet dir que la disminució en el contingut d'àcid siàlic de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit durant la regeneració hepàtica, en principi no és deguda

a un increment de l'activitat d'aquests enzims. Pot ser que el sustracte utilitzat no sigui l'adequat, no obstant caldria pensar que potser en aquesta fase prerreplicativa de la regeneració hepàtica, l'activitat de les sialil transferases i d'enzims de síntesi de l'àcid siàlic estiguin disminuïts. Per tant ens sembla que en un futur seria molt interessant estudiar la incorporació de N acetyl-manosamina (precursor de l'àcid siàlic) al llarg dels dos processos estimuladors de la proliferació cel·lular hepàtica.



Gràfica III: Activitat sialidasa unida a la membrana plasmàtica de la regió sinusoidal. — rates regenerants; - - - - rates laparatomitzades.

Bibliografia

- SHORT J., BROWN R.F., HUSAKOBA A. GILBERTSON J.R., CEMEL R. LIVERMAN I. (1972). Induction of deoxiribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. The J. Biol. Chem. 274, 1757-1766.
- OLDEN K., BRIAN PARENT J., WHITE S.L. (1982). Carbohydrate moieties of glycoproteins. Biochimica et Biophysica Acta. 650, 209-232.
- SCHAUER R. (1982). Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. 40, chapter 7, 214-232(a).
- SCHAUER R. (1982). Sialic acids. Chemistry metabolism and function in Cell Biology Monographs 10, 263-307. (b).
- OHTA N., PARDEE A.B., MAC AUSLAN B.R., BURGER M.M. (1968). Sialic acid contents and controls of normal and malignant cells. Biochim. et Biophys-

Estudi morfològic del compartiment citoplasmàtic de l'hepatòcit regenera-

Acta. 158, 98-102.

BERGE P.G., WILHEM A., SCHRIEWER H. (1984). Sialyltransferase activity in tumor tissues. Klin. Wochenschr. 62, 331-337.

VILAREM M.J. JOUANNEAU J., BOURRILLON R. (1981). Differences in sialic acid contents of low cancer cells high cells and normal mouse lung counterparts. Biochem Biophys. Res. Comm. 98, 7-14.

HIGGINS G.M., ANDERSON R.M. (1931). Experimental pathology of liver. Arch.Path. 12, 322.

WHISHER M.H., EVANS W.H. (1974). Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Isolation and Characterization of plasma membrane subfraction from blood-sinusoidal, bile canalicular and contiguous surface of hepatocyte. Biochem. J. 146, 376-388.

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the foling phenol reagent. J. Biol Chem. 193,265-275.

AMINOFF D. (1961). Method for quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hidrolysate of sialomucoïds. Biochem J. 81, 384-392.

VISSER A., EMMELOT P. (1973). Estudios on plasma membranes. Sialidase in hepatic plasma membranes. J. Membrane Biol. 14, 73-84.

ENRICH C., COLL M.J., BACHS O., SORIANO M., GAHMBERG C.G., DOMINGO J. (1985). Modificación del contenido del ácido siálico unido a la membrana plasmática durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática. Gastroenterología y Hepatología 8 (2), 73-78.

KISHORE G.S., CARUBELLI R. (1981). Sialic acid metabolism in regeneration rat liver. Cancer Res. 13, 281-289.

SORIANO M. (1983). Inducción a la proliferación celular hepática en la rata mediante la infusión endovenosa de una solución de Triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina. Tesis Doctoral

BACHS O., ENRICH C., SORIANO M., PIÑOL M.R., DOMINGO J. (1985). Induction of plasma membrane alkaline phosphatase in the rat liver. Cell Biochem. and function. (in press).

ENRICH C., GAHMBERG C.G. (1985). Prereplicative changes of the rat sinusoidal plasma membrane glycoproteins during hepatic regeneration. Febbs Lett. 181 (1) 12-16

KOUVONEN J., GRÄSBECK R. (1984). The role of sialic acid in the binding of calcium ions to intrinsic factor and its intestinal receptor. Biochim. et Biophys Acta. 797, 163-170.

MAHADEVAN S., NDUAGUBA J.C., TAPPEL A.L. (1967). Sialidase of rat liver and kidney. J. Biol. Chem. 242 (19) 4409-4413.

BACHS O., PIÑOL M.R., SORIANO M., ENRICH C., DOMINGO J. (1984). Estudio de la actividad Ca^{++} ATP-asa y del transporte de calcio en la membrana plasmática del hepatocito durante la regeneración hepática. Rev. Farmacol. Clin. Exp. 1 (2), 149-156.