

La regeneració hepàtica com a model d'estudi de la proliferació cel.lular

Oriol Bachs, Maria Josep Coll, Carles Enrich, Maria Rosa Piñol,
Maria Jesus Pujol, Joan Serratosa i Montserrat Soriano

Departament de Biologia Cel.lular, Facultat de Medicina,
Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028-Barcelona

1.-Característiques del model.

Els hepatòcits dels animals adults formen una població cel.lular de recanvi lent, és a dir pràcticament mai es divideixen. No obstant, aquestes cèl.lules són sensibles a determinats estímuls, entre ells l'hepatectomia parcial (66%) que desencadenen la replicació de l'ADN i posteriorment la mitosi.

Quan es realitza una hepatectomia parcial, els hepatòcits del fetge remanent inicien la replicació de l'ADN aproximadament a les 16-18 hores, presentant un pic de màxima replicació a les 24 hores post-hepatectomia. Aquesta ona replicativa va seguida d'una ona de mitosi que es produeix 6-8 hores més tard. Aquest procés d'activació proliferativa és relativament sincrònic i aproximadament un 30% dels hepatòcits entren en el primer cicle de reproducció.

Malgrat durant la regeneració hepàtica s'observen alguns canvis metabòlics importants sembla ser que la majoria d'aquests canvis van encaminats a compensar i a restablir les funcions hepàtiques que han estat disminuïdes per la pèrdua de massa hepàtica, de manera que aquestes estiguin essencialment mantenides durant aquest procés. Aquest fet junt amb l'observació que la replicació de l'ADN es produeix en hepatòcits ben diferenciats indica que no hi cap procés de desdiferenciació previ a la divisió cel.lular.

Sembla doncs, que els hepatòcits intenten sobre tot mantenir la

funció hepàtica i per aconseguir-ho utilitzen dues estratègies: l'increment del nivell d'activitat funcional en els hepatòcits remanents i posteriorment la reproducció cel·lular sense desdiferenciació previa.

2.- Factors desencadenants de la regeneració hepàtica

Hi ha bastanta informació sobre el paper que poden jugar les hormones i els neurotransmissors en el desencadenament de la regeneració hepàtica però, malgrat aquesta informació no hi ha una idea clara de quins són els factors fonamentals en l'activació proliferativa. A més, desafortunadament, els resultats de l'acció d'hormones, neurotransmissors i factors de creixement en hepatòcits cultivats "in vitro" són en general contradictoris amb els obtinguts "in vivo" i per tant encara fan més difícil l'interpretació.

Experiments en els que s'estableix una circulació creuada entre rates hepatectomitzades i rates normals demostren que hi ha algun factor circulant capaç d'estimular la síntesi d'ADN en els hepatòcits de les rates no operades. De fet, s'ha descrit que la fracció de beta-globines del plasma (essencialment lipoproteïnes) indueix la síntesi d'ADN en els hepatòcits de rates normals. També s'ha aïllat una proteïna de 150 Kd, la hepatotropina que actua d'una manera similar.

L'activació de la proliferació hepatocel·lular també s'aconsegueix mitjançant l'infusió endovenosa de una solució que contingui T3, Glucagó, heparina i aminoàcids. La resposta proliferativa és en aquest cas semblant en el temps, però menor que l'obtinguda mitjançant l'hepatectomia parcial. Quan s'injecten diferents barrejaes de tres components d'aquesta solució s'observa que la T3 és el component fonamental per tal que es produeixi la resposta proliferativa. S'ha descrit també que l'insulina i el glucagó, malgrat no activen la proliferació són factors que potencien la resposta.

Els experiments d'activació de cèl.lules hepàtiques "in vitro" indiquen que aquesta es pot produir amb Factor de creixement epidermic (EGF) més insulina i glucagó com agents potenciadors, no obstant, el glucagó a dosis altes bloqueja la resposta. L'angiotensina i la vasopresina són dos hormones que també produeixen l'activació proliferativa "in vitro". En aquest cas no es coneix, però, la seva implicació en la resposta "in vivo".

També hi ha estudis sobre el paper del sistema nervios en el procés de regeneració hepàtica. Aquests estudis indiquen que la noradrenalina és un inhibidor de la regeneració mentre que l'acetilcolina és un activador. En canvi "in vitro" s'obtenen resultats contradictoris ja que la noradrenalina activa la síntesi d'ADN en hepatòcits en cultiu.

Tota aquesta informació suggereix que la regeneració hepàtica està regulada probablement per més d'un factor i que aquesta resposta apareix com a resultat d'una determinada combinació de hormones i neurotransmissors.

3.-Canvis intracel.lulars implicats en el desencadenament de la regeneració hepàtica.

S'han descrit un nombre considerable de canvis metabòlics que succeeixen durant les fases prereplicativa i replicativa de la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial. No sempre és clar si aquests canvis estan relacionats amb l'adequació funcional dels hepatòcits o amb el desencadenament de la proliferació. No obstant, hi ha una sèrie de aconteixements que es coneix que estan realment implicats en el desencadenament de la replicació de l'ADN i de la mitosi.

En els primers moments després de l'hepatectomia parcial hi ha una entrada de Na^+ . Es conegut que els hepatòcits activats "in vitro" amb EGF presenten també un flux d'entrada de Na^+ associat al sistema de co-transport Na^+/H^+ de manera que a més d'entrar

Na^+ , surten H^+ i per tant, incrementa el pH intracel.lular fet que també es produeix a molts altres tipus cel.lulars quan són activats per mitògens. Hi ha evidències que tant l'entrada de sodi com l'increment del pH intracel.lular són aconeteixements implicats en la resposta proliferativa però en aquests moments no es coneix quins fenòmens desencadenen.

Posteriorment hi ha una sèrie de canvis intracel.lulars que citem segons l'ordre d'aparició: Increment de la síntesi de mRNA, increment de l'activitat ortinina decarboxilasa, increment de la síntesi de poliamines, primera ona d'acumulació intracel.lular d'AMP cíclic (2-4 hores), ona d'acumulació citosòlica de calmodulina (6-12 hores), segona ona intracel.lular d'AMP cíclic (12-16 hores), Increment de la síntesi de Protein quinases dependents d'AMP cíclic (14-16 hores), fosforilació de les subespecíes d'histona H1 (16-18 hores) nova síntesi de ribonucleotid reductasa (16-18 hores) i nova síntesi de precursors de l'ADN (16-18 hores)

Per tal de poder entendre els mecanismes per els que s'inicia la replicació de l'ADN es necessari establir la o les seqüència/es d'aconeteixements, és a dir determinar quins són els canvis inicials que desencadenen els canvis posteriors i així fins arribar a la síntesi d'ADN.

La definició de les cadenes d'aconeteixements que culminen en la iniciació de la replicació de l'ADN està encara a les fases inicials, però amb l'informació disponible en el moment present es pot elaborar un esquema senzill que contempla al menys l'existència de dues vies independents en les fases inicials i que conflueixen a les fases terminals.

Per tal de comentar aquest esquema definirem en primer lloc quins són els elements bàsics, essencials per que es dongui l'iniciació de la replicació de l'ADN. Podem dir que les condicions mínimes que s'han de complir són :

- * Descondensació de la cromatina
- * Presència dels enzims replicatius en el nucli i la
- * Síntesi i acumulació de precursors de l'ADN

Aquests mínims han d'anar acompanyats d'altres fenòmens tals com la síntesi d'histones, la metilació de l'ADN, etc.

A partir d'aquest punt cal, doncs, establir les relacions entre els canvis prereplicatius primers, els canvis tardans i l'aparició d'aquestes condicions mínimes necessàries.

Tal com hem esmentat anteriorment, es pot considerar al menys l'existència de dues vies independents que regulen el desencadenament de la replicació de l'ADN :

- * Una primera via regulada per la vitamina D3 que seria responsable de l'aparició d'una ona de proteïn kinases dependents d'AMP cíclic que s'observa a les 14-16 hores post-hepatectomia. Es conegut que els hepatocits de les rates hipocalcèmiques sotmeses a una hepatectomia parcial no són capaços d'iniciar la replicació de l'ADN. Entre els aconteixements prereplicatius que no s'observen en aquests hepatocits hi ha aquesta ona de proteïn kinases dependents d'AMP cíclic. Quan s'injecta vitamina D3 a aquestes rates aquesta ona de proteïn kinases re-apareix, però malgrat això no es produeix la síntesi d'ADN degut que no es produeixen altres fenòmens importants com per exemple la síntesi de ribonucleotid reductasa, enzim clau de la síntesi de precursors de l'ADN.

- * Una segona via que començaria per la primera ona d'AMP cíclic que donaria lloc a l'increment de la síntesi de calmodulina que s'acumularia en el citosol entre les 6 i les 12 hores post-hepatectomia. Aquesta ona de calmodulina seria responsable de l'aparició de la segona ona d'AMP cíclic probablement a través de l'activació de l'adenilat ciclase. La segona ona d'AMP cíclic, produïda entre les 12-16 hores post-hepatectomia coincideix en el temps amb l'ona de proteïn kinases dependents d'aquest nucleotid i

per tant, l'AMP cíclic activaria les proteïn quinases alliberant la subunitat catalítica que translocaria al nucli on seria responsable de la fosforilació de diferents subespecíes de l'histona H1 fet que podria estar implicat en la descondensació de la cromatina, un dels passos essencials per a l'inici de la replicació de l'ADN.

L'ona citosòlica de calmodulina també es responsable de la desorganització del citoesquelet, de la disminució de l'acid sialic a la membrana plasmàtica i de l'increment de la síntesi de fibronectina, fets associats a l'activació proliferativa.

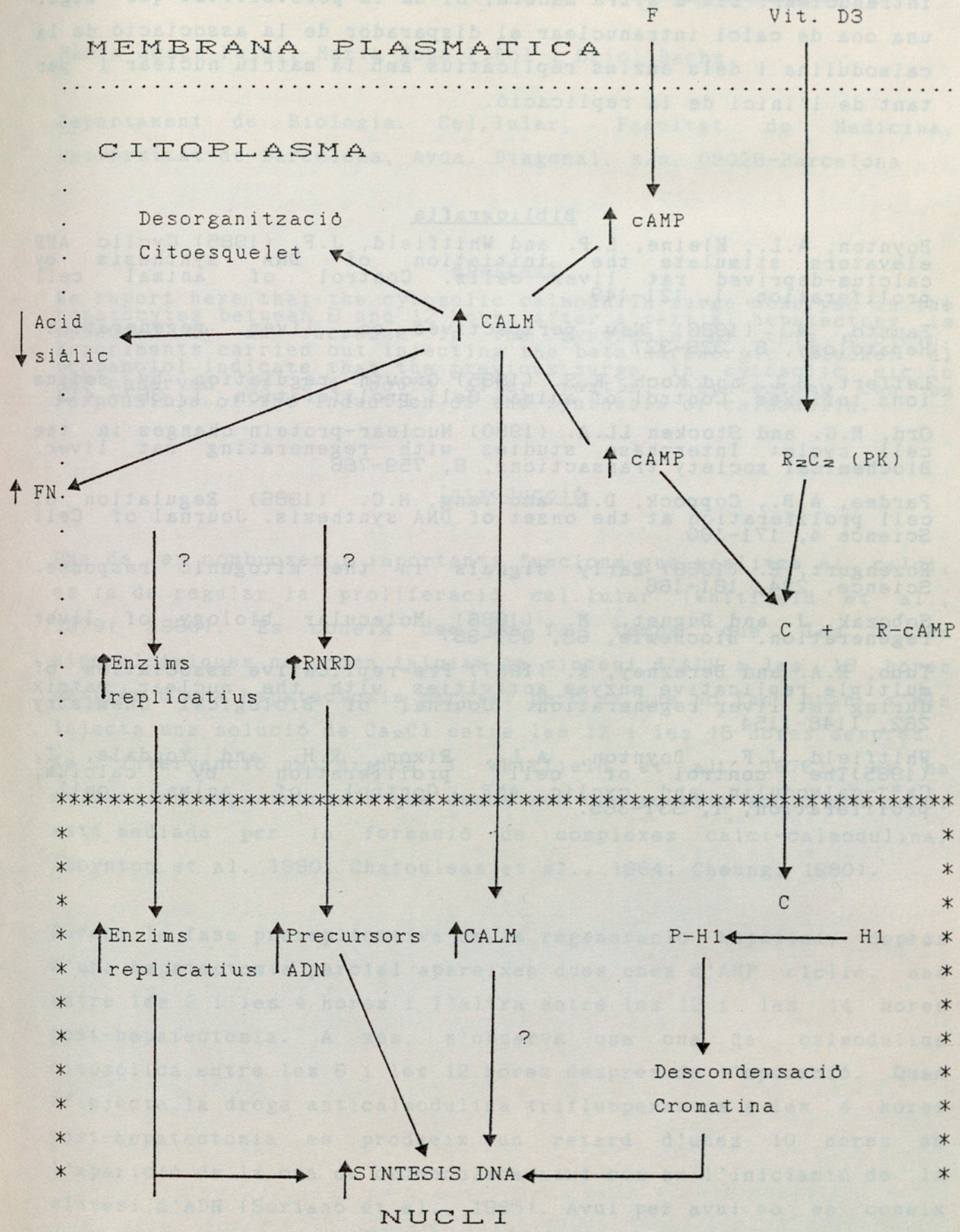
La calmodulina citosòlica transloca posteriorment al nucli on pot estar implicada en algun fet relacionat amb l'inici de la replicació que després comentarem.

Entre les 14-16 hores post-hepatectomia també es produeix un increment de l'activitat DNA polimerasa-alfa i d'altres enzims replicatius així com un increment de la síntesi de ribonucleotid reductasa, enzims clau de la síntesi de precursors de l'ADN. Es coneix que ambdós fenòmens no es produeixen en les rates hipocalcèmiques sotmeses a una hepatectomia parcial, per tant són fenòmens que necessiten calci però, malgrat això no es conegut quin es el pas previ que podria ésser responsable de la seva síntesi.

Una vegada s'ha produït la descondensació de la cromatina, la presència dels enzims replicatius i de precursors en el nucli la pregunta a respondre és: Quin és el disparador de la replicació? Evidentment avui encara no hi ha una resposta clara però, al menys podem llençar una hipòtesi de treball: Es conegut que els enzims replicatius moments abans de l'iniciació de la replicació s'associen a la matriu nuclear de manera que es tornen resistents a l'extracció amb 1.6 M NaCl. Curiosament, un fenomen similar s'observa amb la calmodulina. Hi ha evidències preliminars que suggereixen que l'associació de la calmodulina amb la matriu nuclear es un fenomen dependent de la concentració de calci

MEMBRANA PLASMÀTICA

CITOPLASMA



intranuclear. Dit d'altra manera, hi ha la possibilitat que sigui una ona de calci intranuclear el disparador de la associació de la calmodulina i dels enzims replicatius amb la matriu nuclear i per tant de l'inici de la replicació.

Bibliografia

- Boynton, A.L., Kleine, L.P. and Whitfield, J.F. (1985) Cyclic AMP elevators stimulate the initiation of DNA synthesis by calcium-deprived rat liver cells. Control of animal cell proliferation, 1, 121-149
- Fausto, N. (1986) New perspectives on liver regeneration. Hepatology, 6, 326-327
- Leffert, H.L. and Koch, K.S. (1985) Growth regulation by sodium ions influxes. Control of animal Cell proliferation, 1, 367-413
- Ord, M.G. and Stocken LL.A. (1980) Nuclear-protein changes in the cell cycle: Interphase studies with regenerating rat liver. Biochemical society transactions, 8, 759-766
- Pardee, A.B., Coppock, D.L. and Yang, H.C. (1986) Regulation of cell proliferation at the onset of DNA synthesis. Journal of Cell Science 4, 171-180
- Rozengurt, E. (1986) Early signals in the mitogenic response. Science, 234, 161-166
- Sobczak, J. and Duguet, M. (1986) Molecular biology of liver regeneration. Biochemie, 68, 957-967
- Tabo, R.A. and Berezney, R. (1987) Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration. Journal of Biological Chemistry 262, 1148-1154
- Whitfield, J.F., Boynton, A.L., Rixon, R.H. and Youdale, T. (1985) The control of cell proliferation by calcium, Ca^{2+} -calmodulin and cyclic AMP. Control of animal cell proliferation, 1, 331-365.