

Modificación del contenido de ácido siálico de la membrana plasmática en la proliferación hepatocelular

M.ª J. Coll*, O. Bachs, J. Domingo, J. Serratosa y C. Enrich

Departamento de Histología y Biología celular
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona
08028 Barcelona

(Recibido el 28 de octubre de 1985)

M.ª J. COLL, O. BACHS, J. DOMINGO, J. SERRATOSA and C. ENRICH. *Modification of Sialic Acid Content Bound to the Plasma Membrane During Hepatocellular Proliferation*. Rev. esp. Fisiol., 42 (4), 435-440, 1986.

The content of sialic acid bound to the sinusoidal region of plasma membrane during the prereplicative phase after the intravenous injection of a solution containing triiodothyronine, amino acids, glucagon and heparin (T.A.G.H. solution) has been measured. The results obtained show that an important decrease in sialic acid content is produced as it occurs in the hepatic cells of hepatectomized animals. In order to know if sialidase activity is involved in the decrease of sialic acid content during liver regeneration, the activity of sinusoidal plasma membrane sialidases during the prereplicative phase after the partial hepatectomy has been studied. No modifications of sialidase activity were detected during this period of time indicating that this decrease in sialic acid content has to be produced by other mechanisms such as diminution in the synthesis of precursor molecules. On the other hand due to the importance of Ca^{2+} -calmodulin complexes in the activation of the hepatic cell proliferation the possible implication of this complex on the loss of sialic acid, observing the effect of trifluoperazine (inhibitor of Ca^{2+} -calmodulin complexes) during the prereplicative phase of liver regeneration has been studied. The results show a delay in the decrease of the amount of sugar studied from 10 to 12 hours compared to the results obtained with the hepatectomized rats that have not received trifluoperazine.

Key words: Sialic acid, Hepatocellular proliferation, Sialidase, Calmodulin, Trifluoperazine.

El hígado de los mamíferos adultos está formado por una población celular de recambio lento donde la mayoría de las células se encuentran estacionadas en la fase G_0 del ciclo celular. No obstante, la proliferación hepatocelular puede ser activada

in vivo por ciertos estímulos como la hepatectomía parcial o la infusión endovenosa de una solución formada por triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina (solución T.A.G.H.), entre otros.

Durante la fase prerreplicativa después de practicar ambos sistemas estimuladores de la proliferación, en el hígado acontecen

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

un conjunto de cambios que en definitiva determinan la transición del estado quiescente a la proliferación activa. Es durante este período cuando la membrana plasmática puede tener un papel importante en el control y regulación del ciclo de las células hepáticas.

En diversos estudios se ha demostrado que las glicoproteínas de la superficie celular, y en particular sus carbohidratos asociados, poseen relevantes funciones en proceso de diferenciación, tumorigenesis y reconocimiento intercelular (11).

El ácido siálico, monosacárido habitualmente terminal de las cadenas oligosacáridas de las glicoproteínas de la membrana plasmática, es quizás uno de los carbohidratos más importantes. A él se le otorgan importantes funciones (13).

En muchos tejidos cancerosos humanos, así como en hepatomas inducidos experimentalmente, los niveles de este azúcar se encuentran alterados, incrementados o disminuidos respecto de los tejidos normales de donde provienen (12, 19). Lo mismo sucede con los niveles de actividad de las sialiltransferasas (3).

Estudios anteriores (5) muestran que durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática posthepatectomía parcial existe una disminución en el contenido de ácido siálico de la región sinusoidal de la membrana plasmática de los hepatocitos. En este trabajo se ha estudiado el contenido de este monosacárido en la misma subfracción de membrana después de la infusión por vía endovenosa de la solución T.A.G.H., así como algunos aspectos de los posibles mecanismos que pueden regular la pérdida de este azúcar durante el período previo al inicio de la síntesis de ADN después de estimular la proliferación hepatocelular.

Material y Métodos

Animales. Se han utilizado ratas macho Sprague-Dawley de peso entre 220-280 g

sometidas a un ritmo de luz-oscuridad de 12 h. El período de luz ha sido de las 7 a las 19 horas.

El régimen de comidas y bebidas ha sido *ad libitum* hasta 12 horas antes de ser utilizadas, momento en el que se les retira la comida.

Reactivos. Todos los productos utilizados han sido de pureza analítica.

Los gangliósidos utilizados como sustrato, para cuantificar la actividad sialidasa asociada a la membrana plasmática, han sido Sigma (type II).

Métodos. La hepatectomía parcial se ha realizado según el método de HIGGINS y ANDERSON (7) y siempre entre las 8-10 h. Como control se han utilizado ratas laparatomizadas. En ambos casos se han anes-
tasiado con Ketolar (Parke Davis).

La infusión de la solución T.A.G.H. formada por 100 µg de 3-3'-5-triyodotiro-
nina, 130-150 mg de hidrolizado de caseína, 1 mg de glucagón y 100 U.S.P. de heparina en ClNa 0,15 M, pH = 7,2, y volumen final de 10 ml, se ha realizado por la vena de la cola a un flujo constante de 3,3 ml/hora. Se utilizan ratas inyectadas con solución salina única y exclusivamente como control (16).

La subfracción de membrana plasmática derivada de la región sinusoidal del hepatocito se obtiene por un método de subfraccionamiento celular descrito por WHISHER y EVANS (21).

El contenido de proteínas de las muestras se ha cuantificado por la técnica de LOWRY (9) usando albúmina bovina como estándar.

La trifluoperacina a una dosis de 60 mg/kg se inyecta i.p. 4 horas después de la intervención quirúrgica.

La cuantificación del contenido de ácido siálico unido a la membrana plasmática se ha realizado por la técnica de AMINOFF (1).

La actividad sialidasa asociada a la membrana plasmática se ha valorado por la técnica de VISSER y EMMELLOT (20).

Resultados

Después de la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H., el contenido de ácido siálico unido a la región sinusoidal de la membrana plasmática va disminuyendo de forma que, a las 6 horas postinyección, el descenso ya es significativo estadísticamente ($p \leq 0,05$), alcanzándose a las 10 h el pico con menor contenido (34 %) respecto a los resultados obtenidos en ratas inyectadas con solución salina. Lentamente, se van recuperando los valores control; a las 14 h el descenso es de un 26,2 % y a las 20 sólo de un 9,72 % (fig. 1). La actividad sialidasa de la región sinusoidal de la membrana plasmática durante las 0, 2, 6 y 12 h de la fase prerreplicativa de la regeneración hepática posthepatectomía parcial, contrariamente a lo esperado, es inferior, aunque con diferencias escasamente significativas, a la actividad correspondiente a los animales laparatomizados (figura 2).

La figura 3 muestra el efecto de la trifluoperacina inyectada 4 horas después de practicar una hepatectomía parcial en la

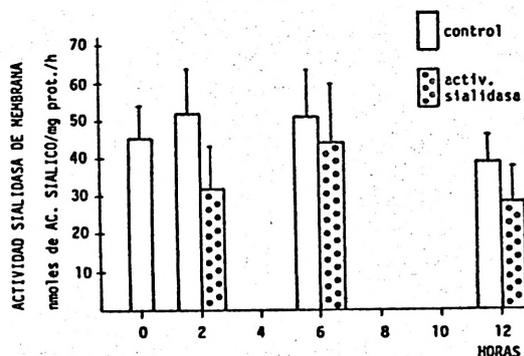


Fig. 2. Actividad sialidasa de la membrana plasmática de la región sinusoidal del hepatocito. Cada valor representa la media \pm D.E. de cuatro muestras distintas como mínimo.

rata, sobre el contenido de ácido siálico en la región sinusoidal de la membrana plasmática de los hepatocitos durante las 20 primeras horas de la regeneración hepática. El contenido de ácido siálico no comienza a disminuir hasta las 16 horas postintervención quirúrgica, mientras que en las ratas hepatectomizadas que no han recibido trifluoperacina el contenido de ácido siálico empieza a disminuir 10 horas antes.

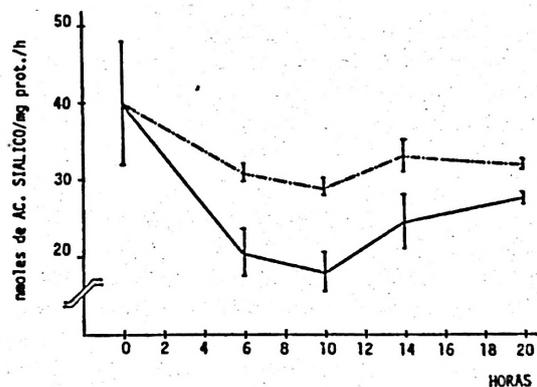


Fig. 1. Contenido de ácido siálico en la membrana plasmática de la región sinusoidal del hepatocito después de la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H.

— Ratas inyectadas con solución T.A.G.H.;
 - - - - - ratas inyectadas con solución salina. Cada valor representa la media \pm D.E. de cuatro muestras distintas, como mínimo.

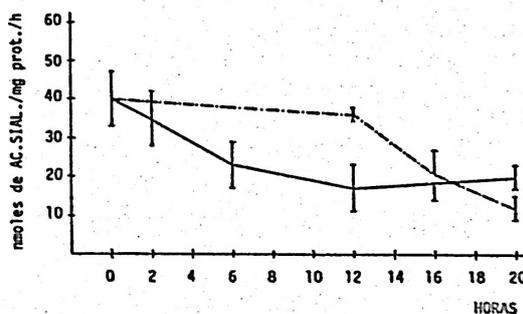


Fig. 3. Efecto de la trifluoperacina sobre el contenido de ácido siálico de la membrana plasmática de la región sinusoidal del hepatocito durante la regeneración hepática posthepatectomía parcial.

— Ratas regenerantes; - - - - - ratas regenerantes inyectadas con trifluoperacina (60 mg/kg) 4 horas después de la intervención quirúrgica. Cada valor representa la media \pm D.E. de cuatro muestras distintas como mínimo.

Discusión

La región sinusoidal de la membrana plasmática de los hepatocitos es, por su localización, la que está más en contacto con la sangre y, por lo tanto, el lugar fundamental de la célula para recibir y transducir señales desde el exterior al interior; iones, nutrientes, hormonas y factores de crecimiento.

Estudios anteriores demuestran que, durante la regeneración hepática posthepatectomía parcial y después de la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H., hay modificaciones específicas en diversas actividades de enzimas de membrana (2, 17), así como en los patrones de glicoproteínas de membrana de la región sinusoidal de la membrana plasmática (6).

Durante la fase prerreplicativa de la regeneración hepática posthepatectomía parcial, existe una disminución significativa en el contenido de ácido siálico (5), y también después de la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H. Esta disminución daría lugar a una pérdida importante en la carga negativa de la superficie de las células. Es decir, durante el período de tiempo estudiado existiría una menor capacidad de la membrana plasmática para unir cationes, como calcio, los cuales facilitan una mayor especificidad en la unión entre ligandos y sus receptores (8). Además, la pérdida de este azúcar de las glicoproteínas de la superficie celular podría dar lugar a un aumento de la susceptibilidad al ataque proteolítico y cambios en la estructura interna del plasmalema y en la adhesión intercelular (14). Este conjunto de modificaciones podría reestructurar a la membrana plasmática en el sentido de facilitar la captación de todos aquellos factores necesarios para iniciar la proliferación celular.

Desde el punto de vista metabólico, existirían tres posibles mecanismos para explicar el descenso en el contenido de ácido siálico unido a la región sinusoidal de la membrana plasmática de los hepatocitos durante la proliferación hepatocelular:

una actividad incrementada de las sialidasas; una actividad disminuida de las sialiltransferasas; y una actividad disminuida en algún o algunos enzimas de la vía de síntesis del ácido siálico.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el descenso en el contenido del azúcar estudiado no se puede explicar por el primer mecanismo.

En cuanto al segundo mecanismo, a pesar de existir controversia al respecto, estudiando la actividad sialiltransferasa localizada en la fracción microsomal del hígado de rata, no se han encontrado modificaciones significativas utilizando aceptores endógenos durante el período comprendido entre las 7 y las 48 horas después de practicar una hepatectomía parcial (15).

Respecto al tercer y último mecanismo de acción, se ha demostrado que 12 horas posthepatectomía parcial, las actividades de la UDP-N-acetil-D-glucosamina 2'-epimerasa y de la N-acetil-D-manosamina quinasa (ambas enzimas implicadas en la vía de síntesis del ácido siálico) están significativamente disminuidas (10), lo cual indica que, en principio, el mecanismo fundamental para explicar el descenso del contenido de ácido siálico de la región sinusoidal de la membrana plasmática, después de estimular la proliferación hepatocelular, es consecuencia de una disminución de la síntesis de moléculas precursoras.

Debido a la importancia que tiene el sistema Ca^{2+} -calmodulina para producir la activación proliferativa en las células hepáticas (4), se ha estudiado la posible implicación de este complejo en el mecanismo de desialización de la membrana plasmática observando el efecto de una droga anticalmodulina.

Los efectos producidos por la inyección de trifluoperacina indican que esta droga retrasa 10-12 horas la pérdida de ácido siálico de la membrana plasmática, retraso similar al observado con la iniciación de la síntesis de ADN utilizando el mismo fármaco (18). Los resultados sugieren que

esta proteína puede estar implicada en el descenso del monosacárido estudiado aunque no se puede afirmar contundentemente ya que a las dosis de trifluoperacina inyectadas, no es seguro que se obtenga un efecto específico sobre la calmodulina. Por ello se cree que sería interesante estudiar el efecto de la calmodulina sobre la UDP-N-acetil-D-glucosamina 2'-epimerasa, enzima fundamental en la biosíntesis del ácido siálico.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 0648-84). Los autores agradecen a los laboratorios Smith, Kline & French y a los laboratorios Novo Española, S. A. el suministro gratuito de la trifluoperacina y del glucagón, respectivamente.

Resumen

Se estudia el contenido de ácido siálico de la región sinusoidal de la membrana plasmática del hepatocito durante la fase prerreplicativa después de la infusión endovenosa de una solución formada por triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina (T.A.G.H.), así como algunos aspectos de los posibles mecanismos reguladores de su metabolismo. Los resultados obtenidos muestran un descenso significativo en el contenido de este monosacárido. La actividad sialidasa de la región sinusoidal de la membrana plasmática después de practicar una hepatectomía parcial, no detecta modificaciones significativas en las actividades de estas enzimas, indicando que el descenso observado en el contenido de ácido siálico ha de estar producido por otros mecanismos.

Por otro lado, debido a la importancia del complejo para producir la activación proliferativa de las células hepáticas, se ha estudiado la posible implicación del complejo Ca^{2+} -calmodulina sobre la pérdida de ácido siálico observando el efecto de una droga anticalmodulina: la trifluoperacina, inyectada 4 horas posthepatectomía parcial. Los resultados muestran un retraso de 10 a 12 horas en el inicio del descenso del contenido del azúcar estudiado, con respecto a los resultados obtenidos en ratas hepatectomizadas a las que no se ha administrado trifluoperacina.

Bibliografía

1. Aminoff, D.: *Biochem. J.*, **81**, 384-392, 1961.
2. Bachs, O., Enrich, C., Soriano, M., Piñol, M. R. y Domingo, J.: *Cell. Biochem. Funct.*, **3**, 95-100, 1985.
3. Berge, P. G., Wilhem, A. y Schriewer, H.: *Klin. Wochechr.*, **62**, 331-337, 1984.
4. Boyton, A. L., Whitfield, J. F. y McManus, J. P.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 745-749, 1980.
5. Enrich, C., Coll, M.ª J., Bachs, O., Soriano, M., Gahmberg, C. G. y Domigo, J.: *Gastroenterol. Hepatol.*, **8**, 73-78, 1985.
6. Enrich, C. y Gahmberg, C. G.: *Febbs Lett.*, **181**, 12-16, 1985.
7. Higgins, G. M. y Anderson, R. M.: *Arch. Path.*, **12**, 186-202, 1931.
8. Kouvonen, J. y Gräsbeck, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **797**, 163-170, 1984.
9. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
10. Okamoto, Y. y Akamatsu, N.: *Biochem. J.*, **188**, 905-911, 1980.
11. Olden, K., Brian Parent, J. y White, S. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 209-232, 1982.
12. Otha, N., Pardee, A. B., Mac Auslan, B. R. y Burger, M. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **158**, 98-102, 1968.
13. Reutter, W., Köttgen, E., Bauer, Ch. y Gerok, W.: En «Cell Biology Monographs», **10** (Shauer, R., ed.). Springer-Verlag, Viena, 1982, pp. 263-305.
14. Schauer, R.: *Carbohydrate Chem. Biochem.*, **40**, 214-232, 1982.
15. Serafini-Cessi, F.: *Biochem. J.*, **166**, 381-386, 1977.
16. Short, J., Brown, R. F., Husakoba, A., Gilbertson, J. R., Cemel, R. y Liverman, I.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 1757-1766, 1972.
17. Soriano, M.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. 1983.
18. Soriano, M., Piñol, M. R., Enrich, C. y Bachs, O.: *Cell. Tissue Kinet.*, **18**, 475-481, 1985.
19. Vilarem, M. J., Jouanneau, J. y Bourrillon, R.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **98**, 7-14, 1981.
20. Visser, A. y Emmelot, P.: *J. Membrane Biol.*, **14**, 73-84, 1973.
21. Whisher, M. H. y Evans, W. H.: *Biochem. J.*, **146**, 376-388, 1974.

