

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

"REGULACION DE LA EXPRESION GENICA EN  
CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS  
FETALES DE RATA BAJO CONDICIONES  
PROLIFERATIVAS Y NO PROLIFERATIVAS"

TESIS DOCTORAL

Cristina Molero Martín-Portugués

Octubre 1992

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**"REGULACION DE LA EXPRESION GENICA EN CULTIVOS  
PRIMARIOS DE HEPATOCITOS FETALES DE RATA BAJO  
CONDICIONES PROLIFERATIVAS Y NO PROLIFERATIVAS"**

*Memoria presentada por la Licenciada  
CRISTINA MOLERO MARTIN-PORTUGUES  
para optar al grado de Doctor en Farmacia  
Madrid 1992*

Este trabajo ha sido realizado íntegramente en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores Dña. Margarita Lorenzo Balado y D. Manuel Benito de las Heras, durante los cursos 89-90, 90-91 y 91-92, concediéndose una beca del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia durante dicho periodo.

*Me gustaría mostrar mi agradecimiento hacia los directores de esta tesis, los Dres. Margarita Lorenzo Balado y Manuel Benito de las Heras, por haberme permitido formarme en su grupo y por su interés en que este trabajo pudiera llevarse a cabo.*

*A la Dra. Isabel Fabregat por toda la atención que ha dedicado a la orientación de esta tesis sobre todo en sus inicios.*

*A los Dres. Eleuterio Hernández y César Roncero por su colaboración en la elaboración de los resultados.*

*A Margarita Fernández, Mary Carmen Guerra, Pilar Iniesta, Carmen de Juan, Angela Martínez, Almudena Porras y Teresa Teruel, por todos los buenos momentos que hemos compartido y porque de todas he aprendido algo.*

*A Alberto Alvarez del Dpto. de Microbiología por su ayuda en los estudios de citometría de flujo.*

*A Teresa Lupiani y a Julia Navarro por toda la colaboración que me han prestado en numerosas ocasiones.*

*A todos los docentes e investigadores del centro, por todos estos años de colaboración y trabajo en común.*

*A mi familia y amigos, por el apoyo y la comprensión que me han dado en todo momento.*

*A mi familia*

*A Javier*



-<sup>3</sup>H-timidina ..... timidina marcada con tritio radiactivo

-IBMX ..... isobutil-metil-xantina

-IDP ..... inosín 5'difosfato

-Kb ..... kilobases

-KDa ..... kilodaltons

-K<sub>M</sub> ..... constante de Michaelis-Menten

-mRNA ..... ácido ribonucleico mensajero

-MOPS ..... ácido morfolino-propano-sulfónico

-NADP<sup>+</sup> ..... nicotín-adenin-dinucleótido fosfato oxidado

-NADPH ..... nicotín-adenin-dinucleótido fosfato reducido

-<sup>32</sup>α-PdCTP ..... α deoxicitidina 5'trifosfato marcada con un isótopo radiactivo del fósforo

-RNA ..... ácido ribonucleico

-rpm ..... revoluciones por minuto

-SDS ..... lauril sulfato sódico

-SF ..... suero fetal bovino

-TCA ..... ácido tricloroacético

-TEMED ..... N,N,N',N' tetrametil-etilén-diamina

- T<sub>3</sub> ..... triiodotironina
- Tris ..... tris(hidroximetil)aminometano
- UMP ..... uridín 5' monofosfato

**ENZIMAS:**

- Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) ..... [EC 4.1.1.32]
- Enzima málica (EM) ..... [EC 1.1.1.40]
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) ..... [EC 1.1.1.49]

# INDICE

## INTRODUCCION

### I-OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

<u>II-ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS</u> .....	1
<u>2.1 La proliferación celular</u> .....	2
2.1.1 Replicación del DNA e inicio de la mitosis .....	2
2.1.2 Proliferación de células hepáticas en cultivo ....	4
2.1.2.1 Factores de crecimiento .....	5
2.1.2.1.1 Factor de crecimiento epidérmico .....	6
2.1.2.1.2 Factor de crecimiento transformante tipo $\alpha$ .....	10
2.1.2.1.3 Factor de crecimiento hepático .....	12
2.1.2.2 Expresión génica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa durante la proliferación hepática ...	15
<u>2.2 La diferenciación celular</u> .....	18
2.2.1 Diferenciación de células hepáticas en cultivo ...	18
2.2.1.1 Expresión génica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa .....	19
2.2.1.2 Expresión génica de la enzima málica .....	24
2.2.1.3 Expresión génica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en hepatocitos no proliferantes .....	29
<u>2.3 Coordinación de los procesos de proliferación y diferenciación celular</u> .....	32

<u>III-MATERIALES Y METODOS</u> .....	36
<u>3.1 Animales de experimentación</u> .....	37
<u>3.2 Medios instrumentales</u> .....	37
<u>3.3 Productos</u> .....	40
<u>3.4 Condiciones del animalario y control de la edad gestacional</u> .....	41
<u>3.5 Obtención de tejido hepático fetal para el cultivo primario</u> .....	42
<u>3.6 Cultivo primario de hepatocitos fetales de rata</u> .....	42
3.6.1 Soluciones y medios de cultivo .....	42
3.6.2 Aislamiento de hepatocitos .....	44
3.6.3 Cultivo de hepatocitos .....	46
<u>3.7 Determinación de actividades enzimáticas</u> .....	47
3.7.1 Determinación de la actividad PEPCK .....	49
3.7.1.1 Determinación de la $K_M$ de la PEPCK .....	50
3.7.2 Determinación de la actividad G6PD .....	50
3.7.3 Determinación de la actividad EM .....	52
3.7.4 Determinación de proteínas .....	52
3.7.5 Expresión de resultados .....	53
<u>3.8 Inmunodetección de proteínas</u> .....	53
3.8.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida .....	54
3.8.2 Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa .....	55
3.8.3 Inmunodetección de las proteínas .....	56
<u>3.9 Medida de la síntesis de DNA en hepatocitos en cultivo</u> .....	57
<u>3.10 Contaje de células de las placas de cultivo y estudio del ciclo celular</u> .....	58
<u>3.11 Determinación del contenido en DNA</u> .....	59
<u>3.12 Aislamiento de cDNAs</u> .....	60
3.12.1 Crecimiento de las bacterias .....	61

3.12.2 Obtención de los DNAs plasmídicos .....	62
3.12.3 Digestión del DNA plasmídico .....	63
3.12.4 Electroforesis de los DNAs en geles de agarosa ..	64
3.12.5 Electroelución de los cDNAs .....	65
<u>3.13 Aislamiento del RNA de las placas de cultivo</u> .....	66
<u>3.14 Aislamiento de RNA de muestras de tejidos</u> .....	67
<u>3.15 Electroforesis de RNA en geles de</u> <u>agarosa-formaldehído</u> .....	68
<u>3.16 Transferencia de los RNAs a filtros de nylon:</u> <u>Vaccum-Blot</u> .....	69
<u>3.17 Ensayo de Dot-Blot</u> .....	70
<u>3.18 Marcaje radiactivo de los cDNAs</u> .....	71
<u>3.19 Prehibridación e hibridación de los filtros de nylon</u>	72
<u>3.20 Revelado de las autorradiografías</u> .....	73
<u>3.21 Rehibridación de los filtros de nylon</u> .....	73
 <u>IV-RESULTADOS Y DISCUSION</u> .....	 75
 <u>4.1 Proliferación de hepatocitos fetales en cultivo</u> <u>primario: Efecto de las hormonas y los factores de</u> <u>proliferación</u> .....	  76
4.1.1 Incorporación de <sup>3</sup> H-timidina y contenido en DNA ..	78
4.1.2 Análisis del ciclo celular .....	82
<u>4.2 Maduración de los hepatocitos fetales en cultivo</u> <u>primario en condiciones no proliferativas</u> .....	 86
4.2.1 Expresión génica de la PEPCK: Regulación hormonal	86
4.2.2 Expresión génica de la EM y la G6PD: Regulación hormonal y nutricional .....	96
<u>4.3 Expresión de la G6PD, la PEPCK y la EM en condiciones</u> <u>proliferativas y no proliferativas</u> .....	 123
4.3.1 Expresión de la G6PD .....	123
4.3.2 Expresión de la PEPCK .....	128

4.3.3 Expresión de la EM .....	131
<u>V-CONCLUSIONES</u> .....	136
<u>VI-REFERENCIAS</u> .....	139

## **INTRODUCCION**

Durante los últimos días de la gestación, los organismos fetales tienen que prepararse activamente para la salida del entorno materno, ya que tras el parto, dejarán de beneficiarse de la protección y el suministro de nutrientes de que disfrutaban hasta entonces.

Necesariamente, tiene que haber una serie de señales responsables de la activación de los mecanismos que permiten la supervivencia del neonato. En este sentido, no es de extrañar que tras la extracción prematura de los fetos del claustro materno, sea posible la simulación "*in vitro*" en células fetales de la activación de procesos que fisiológicamente ocurren durante la vida postnatal.

Por otro lado, se puede presuponer que las células fetales son competentes para la proliferación, en respuesta a diversas señales mitogénicas definidas o al suero fetal, puesto que proceden de un organismo en formación en el cual las células se multiplican activamente. El cultivo de estas células, puede constituir un excelente modelo que permita estudiar las señales

que inducen la síntesis de DNA y la mitosis en las células durante el desarrollo embrionario.

Al mismo tiempo, existe una coordinación entre los procesos que conducen a la multiplicación celular, y los que determinan que las células adquieran las capacidades específicas que les corresponden según su programa genético. Por tanto, el desarrollo de los organismos pluricelulares está sometido a un estricto control de ambos procesos fundamentales, la proliferación y la diferenciación celular, los cuales hacen posible la organogénesis.

Los trabajos experimentales que se presentan, son un intento de valorar la capacidad proliferativa y madurativa de las células hepáticas fetales de rata de 20 días de gestación en cultivo primario. Estas células, una vez adaptadas al entorno "*in vitro*", deben responder a los agentes promotores de la proliferación y la maduración celular.

## **I .-OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

Para la realización de la presente memoria de Tesis Doctoral se han planteado tres objetivos:

- 1-Estudio de la capacidad proliferativa de los hepatocitos fetales de rata en cultivo primario en respuesta a varios factores de crecimiento.
- 2-Estudio de la maduración de los hepatocitos fetales de rata en cultivo primario: Expresión genica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la enzima málica y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- 3-Estudio de la coordinación entre los procesos proliferativos y madurativos en hepatocitos fetales de rata en cultivo primario.

De acuerdo con los objetivos expuestos se propuso el siguiente plan de trabajo:

**1-Establecimiento de unas condiciones experimentales que permitan la proliferación de los hepatocitos.**

1.1 Estudio de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina y el contenido en DNA de las placas de cultivo en respuesta a factores de crecimiento, suero fetal, dexametasona, insulina, glucagón y agentes que aumentan los niveles de AMPc intracelular.

1.2 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

**2-Establecimiento de unas condiciones experimentales que favorezcan la maduración de los hepatocitos.**

2.1 Estudio de la actividad enzimática y expresión génica de la PEPCK en presencia de dexametasona, glucagón, insulina,  $\text{T}_3$ , adrenalina y agentes que aumentan los niveles de AMPc intracelulares.

2.2 Estudio de la actividad enzimática, cantidad de proteína y expresión génica de la enzima málica en presencia de  $\text{T}_3$ , insulina, dexametasona, glucagón, agentes que aumentan los niveles de AMPc intracelulares y diversos sustratos. Estudio de la expresión génica de la G6PD, enzima generadora de NADPH, en presencia de las mismas hormonas y agentes.

**3-Expresión de la G6PD, PEPCK y EM en condiciones proliferativas y no proliferativas.**

3.1 Estudio de la actividad enzimática y la expresión génica de la G6PD en presencia de EGF, suero fetal, insulina, dexametasona, glucagón y agentes que aumentan los niveles de AMPc intracelular.

3.2 Estudio de la actividad enzimática y la expresión génica de la PEPCK en las mismas condiciones.

3.3 Estudio de la expresión génica de la EM en presencia de  $\text{T}_3$ , insulina, EGF y suero fetal.

## **II . - ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

## 2.1 LA PROLIFERACION CELULAR

Mientras que los organismos unicelulares adaptan su crecimiento y metabolismo a la disponibilidad de nutrientes de su entorno, las células de los mamíferos han desarrollado un complejo sistema de control del crecimiento donde la proliferación está regulada no sólo por factores nutricionales sino fundamentalmente por factores de crecimiento solubles, la matriz extracelular y las interacciones y comunicación que mantienen las células entre sí (Schneider y col., 1991). Es conocido que el ciclo celular es el proceso mediante el cual una célula crece y duplica su contenido, incluido su material genético, para luego dividirse y dar lugar a dos nuevas células. Hoy en día, el interés de los científicos se centra en conocer las moléculas responsables de su regulación.

### 2.1.1 Replicación del DNA e inicio de la mitosis

En el ciclo celular está finamente regulado tanto el inicio de la replicación del DNA (fase S o de síntesis) como el comienzo de la mitosis (fase M). Ambas fases se alternan de tal manera que si se bloquea la fase S no comienza la fase M y viceversa. Esta dependencia mutua asegura, por un lado, que las células no puedan iniciar la mitosis antes de completar la replicación del DNA, y por otro, que los cromosomas no se dupliquen más que una vez. Al parecer esta regulación se ejerce, en gran medida, mediante cambios en la actividad de una sola molécula, la proteína *cdc2*. Esta proteína de 34kDa es el producto del gen del ciclo de división celular *cdc2* y posee

actividad serina/treonina quinasa.

La proteína *cdc2* mantiene durante todo el ciclo celular un nivel constante, pero se han detectado otras proteínas, las **ciclinas**, cuya concentración aumenta durante la interfase, que es la etapa del ciclo celular que comprende las fases S, G<sub>1</sub> (etapa preparatoria de S) y G<sub>2</sub> (etapa preparatoria de M), y sin embargo, cae durante la fase M. Esto es debido a que, aunque las **ciclinas** se producen a una tasa constante durante todo el ciclo, su degradación es mucho más rápida durante M que durante la interfase. Las **ciclinas** poseen pesos moleculares comprendidos entre 45 y 62 kDa, y se unen unas u otras específicamente a *cdc2* según el momento del ciclo celular. En concreto, la **ciclina B** (45 kDa), es la que se asocia a *cdc2* para formar el complejo **FPM** (factor de promoción de mitosis).

Durante la interfase, cuando se forma **FPM**, *cdc2* se encuentra fosforilada en tirosina (Tyr<sup>15</sup>) y en treonina (Thr<sup>167</sup>). La fosforilación en tirosina impide la unión del ATP a *cdc2* y por tanto, **FPM** se encuentra inactivo como quinasa. Parece ser, que al final de la fase S, se envía una señal para activar la transcripción del gen *cdc25*, el cual se traduce en una proteína con actividad tirosina fosfatasa que actúa específicamente desfosforilando *cdc2* en Tyr<sup>15</sup> (Dunphy y col., 1991) (Gautier y col., 1991). De esta manera, **MPF** se activa como quinasa y se inicia la mitosis. En las últimas etapas de la mitosis, la degradación de las **ciclinas** y, probablemente, la desfosforilación de *cdc2* en la treonina 167 causan la inactivación del complejo **MPF**.

Igual que *cdc25* es la proteínfosfatasa que activa *cdc2*, se han identificado dos proteínas quinasas en levaduras, *wee1* y *mik1*, encargadas de fosforilar en tirosina a *cdc2* y de esta manera inhibir la entrada de la célula en la mitosis (Lundgren y col., 1991).

Los últimos estudios, indican que en células animales la desfosforilación de la tirosina 15 no es suficiente para activar MPF, puesto que éste presenta una fosforilación adicional en la treonina 14 en su estado inactivo. Para la activación total de *cdc2* como quinasa y la consiguiente entrada en mitosis se requiere la desfosforilación de ambos residuos. A pesar de que rompe con los esquemas tradicionales de la división entre fosfatasa que actúan sobre residuos de tirosina y las que lo hacen sobre residuos de serina o treonina, todo parece indicar que *cdc25* es la responsable directa de la desfosforilación tanto de la tirosina 15, como de la treonina 14 adyacente. Se especula con la posibilidad de que en células animales, la quinasa *wee1* fosforile y la fosfatasa *cdc25* desfosforile ambos residuos de *cdc2*, para determinar el momento de iniciar la mitosis celular (Millar y col., 1992).

El papel de *cdc2* en el comienzo de la duplicación del DNA es mucho menos conocido. Sin embargo, en diversos sistemas, e incluso en células humanas, ya se han aislado ciclinas diferentes de las tipo B (ciclinas de la mitosis). Quizá estas ciclinas sean las supuestas ciclinas de  $G_1$  que colaboren con *cdc2* en el inicio de la fase S (Moreno, 1992).

### 2.1.2 Proliferación de células hepáticas en cultivo

Las células hepáticas en cultivo primario son capaces de iniciar la síntesis de DNA y la mitosis en respuesta a diversos estímulos del crecimiento.

Para ello, es necesario en primer lugar la presencia en el medio de cultivo del aminoácido prolina (Houck y col., 1985). Los aminoácidos son particularmente importantes como nutrientes de las células hepáticas puesto que pueden servir como precursores de proteínas, como sustratos energéticos y como

inhibidores naturales de la degradación de las proteínas hepáticas. Dentro de los aminoácidos no esenciales, la prolina es el único que al igual que los aminoácidos esenciales tiene una acción directa en la síntesis de DNA en hepatocitos en cultivo (Mitaka y col., 1991). Al parecer, esta esencialidad de la prolina en la proliferación de hepatocitos en cultivo se debe a su implicación en la síntesis de colágeno intracelular. No obstante, si el medio de cultivo carece de prolina, se supone que los hepatocitos son capaces de sintetizar este aminoácido a partir de otros, y por tanto, comenzará la síntesis de DNA aunque con un ligero retraso (Nakamura y col., 1984).

En segundo lugar, las funciones relacionadas con el crecimiento de los hepatocitos en cultivo dependen de una manera muy estricta de la densidad celular (Nakamura y col., 1984). Así, los hepatocitos cultivados a bajas densidades celulares tienden a iniciar un nuevo ciclo celular en respuesta a estímulos del crecimiento. La explicación de este proceso se atribuye a cambios en la membrana celular y en el citoesqueleto según las diferentes densidades celulares (Kumatori y col., 1991).

#### **2.1.2.1 Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son un amplio grupo de polipéptidos que modifican la proliferación celular. El conocimiento de estos factores ha aportado numerosos datos acerca de cómo se constituye la respuesta mitogénica. Se considera un mitógeno completo como aquella sustancia capaz por sí sola de estimular la síntesis de DNA y la mitosis celular (Michalopoulos, 1990). Dentro de los considerados mitógenos completos para las células hepáticas, se encuentran los tres

factores que se describen a continuación.

#### 2.1.2.1.1 Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos que se purificó originalmente a partir de la glándula submaxilar de ratón macho adulto. El EGF es un potente mitógeno de diversas células epiteliales y epidérmicas, entre ellas las hepáticas. Por otro lado, en humanos, tiene actividad inhibidora de la secreción ácida gástrica, motivo por el cual también se le denomina "urogastrona".

Este factor tiene un peso molecular de 6 kDa y es una cadena sencilla que posee tres puentes disulfuro que son indispensables para su actividad biológica (Carpenter y col., 1979) (fig. 1). El precursor del EGF (prepro-EGF) es una molécula que contiene aproximadamente 1.200 residuos cuya secuencia incluye, no sólo la secuencia del EGF, sino también las de ocho unidades similares a EGF; además, en su extremo carboxilo posee una secuencia hidrofóbica característica de una proteína integral de membrana. Este prepro-EGF purificado e intacto retiene la actividad biológica del EGF (Carpenter y col., 1990).

Se ha identificado una familia de moléculas similares a EGF codificadas por distintos genes entre las cuales se encuentra el factor de crecimiento transformante tipo  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ), que posteriormente se describe. Todas las moléculas de este grupo se unen con gran afinidad al receptor del EGF y como consecuencia producen respuestas mitogénicas en células sensibles a EGF. En su estructura primaria, contienen seis cisteínas esenciales para su actividad biológica al igual que en el caso del EGF; estos residuos de cisteína, son similares a los que poseen las proteínas de la superficie y el exterior

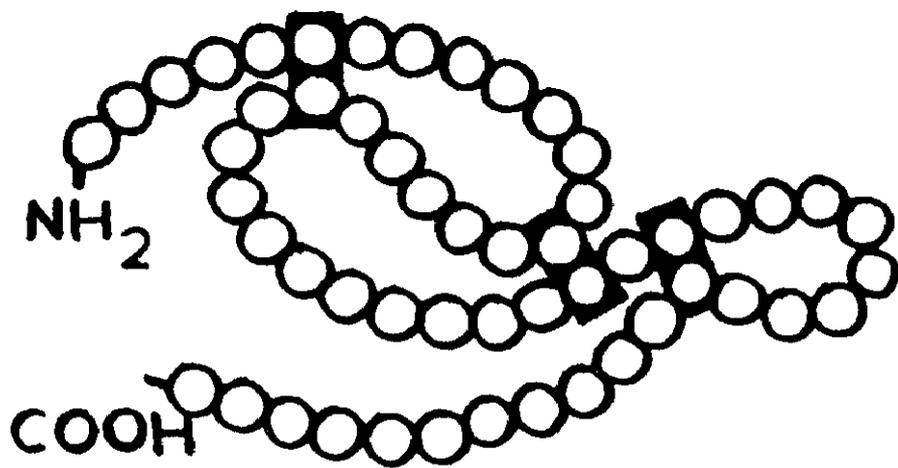


Fig. 1: Representación gráfica del EGF. Los trazos más gruesos corresponden a los puentes disulfuro.

celular que colaboran en funciones de adhesión y en las interacciones proteína-proteína (Carpenter y col., 1990).

El receptor del EGF es una glicoproteína transmembranal de 170 kDa. La región extracelular contiene el dominio de unión al ligando, mientras que en la región intracelular se encuentra un dominio tirosina quinasa (Ullrich y col., 1984). Estas dos funciones del receptor de EGF, es decir, la unión al EGF y la actividad tirosina quinasa, juegan un papel fundamental en la inducción de los efectos biológicos del EGF y por ello, están sujetas a una fina regulación. La actividad tirosina quinasa del receptor está regulada positivamente por la unión del EGF, la cual conduce a la fosforilación en tirosina del receptor y de otros sustratos celulares como la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y la proteína activadora de la actividad GTP-ásica del oncogén *ras* (GAP) entre otras. En este sentido, PLC- $\gamma$  es el sustrato del receptor de EGF que mejor se conoce. La PLC- $\gamma$  pertenece a una familia de isoenzimas que hidrolizan el fosfoinosítido 4,5-bisfosfato para producir inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (Rhee y col., 1989). El diacilglicerol actúa como un segundo mensajero que libera calcio del retículo endoplasmático y así activa enzimas y procesos dependientes de calcio, mientras que el IP<sub>3</sub> es un activador de la proteína quinasa C (PKC). Paralelamente a estos mecanismos de activación, se plantea la posibilidad de exista una desensitización del receptor del EGF, coordinada con una atenuación de la actividad tirosina quinasa del receptor inducida por activación de la PKC, y que representaría un mecanismo eficiente para limitar la amplitud y la duración de la respuesta mitogénica al EGF. De esta manera, los receptores tirosina quinasa de la superficie celular están sujetos a una rápida activación por su ligando, seguida de procesos regulatorios secundarios (Tartare y col., 1992).

Tras la unión del EGF a sus receptores, éstos inician la formación de homodímeros cuya afinidad por el EGF es mayor que la de los monómeros (Hurwitz y col., 1991). El complejo formado por el EGF y el homodímero de receptores se internaliza, y su conformación se mantiene intracelularmente, ya que esta estructura es la que permite la interacción receptor-receptor y la actividad tirosina quinasa. Si el EGF se separa de su receptor éste inmediatamente se monomeriza y no se producen las respuestas esperadas (Sorkin y col., 1991).

El EGF fue la primera sustancia cuya capacidad como activador de la síntesis de DNA en hepatocitos en cultivo se demostró. El EGF es capaz de inducir la síntesis de DNA en cultivos de hepatocitos tanto adultos (McGowan y col., 1981) como fetales (Hoffmann y col., 1989). Como es característico en estos sistemas, la baja densidad celular favorece la acción de este factor (Tsao y col., 1986). Este factor produce en los hepatocitos en cultivo una estimulación de la mitogénesis en ausencia de insulina, aunque se requiere la combinación con insulina para obtener la máxima respuesta (Tomomura y col., 1987). Cuando se añade el EGF a los hepatocitos en cultivo, el aumento en la síntesis de DNA no comienza a las 24 horas sino que los máximos efectos se observan entre las 48 y las 72 horas de cultivo (Vintermyr y col., 1987). Probablemente, esto es debido por un lado, a que los hepatocitos tienen que recuperarse de los posibles daños del proceso de aislamiento, y por otro, a que tienen que adaptarse al entorno "in vitro". La estimulación de la síntesis de DNA por EGF normalmente conduce a dos o tres ciclos secuenciales de síntesis de DNA y mitogénesis tras los cuales, la síntesis de DNA se interrumpe por causas desconocidas (Michalopoulos, 1990).

Los receptores del EGF disminuyen en los cultivos de hepatocitos así como la afinidad del EGF por los mismos. Los

receptores de alta afinidad desaparecen rápidamente después del aislamiento de los hepatocitos, mientras que son los receptores de baja afinidad los que permanecen en número suficiente como para responder a los estímulos mitogénicos. Por ello, se plantea la idea de que los receptores de baja afinidad son los verdaderos receptores mitogénicos del EGF (Wollenberg y col., 1989).

#### 2.1.2.1.2 Factor de crecimiento transformante tipo $\alpha$ (TGF $\alpha$ )

El factor de crecimiento transformante tipo  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ), es una cadena polipeptídica sencilla de 50 aminoácidos que está funcionalmente y estructuralmente (30-40 % de homología) relacionado con el EGF (Marquardt y col., 1984) (Fig. 2). El TGF  $\alpha$  se liga al receptor del EGF y conduce también a la activación de su actividad tirosina quinasa intrínseca (Pike y col., 1982) (Massagué, 1983). El TGF  $\alpha$  tiene menos afinidad que el EGF por su receptor, pero su efecto es más potente; esta disociación entre la afinidad y la potencia puede indicar que estos factores producen diferentes cambios conformacionales en el receptor (Gruppuso, 1989).

El término de "factor transformante" se debe a que su expresión es muy común en células tumorales y transformadas. Estos datos sugieren que el TGF  $\alpha$  contribuye al crecimiento tanto normal como neoplásico a través de mecanismos autocrinos y paracrinos (Sporn, 1980).

El precursor del TGF  $\alpha$ , el pro-TGF  $\alpha$ , es un polipéptido de 160 aminoácidos que posee un dominio hidrofóbico transmembranal. Curiosamente, el pro-TGF  $\alpha$  puede establecer contactos con los receptores del EGF de las células adyacentes e inducir la actividad tirosina quinasa asociada a los mismos. Por lo tanto, el pro-TGF  $\alpha$  y el receptor del EGF, pueden

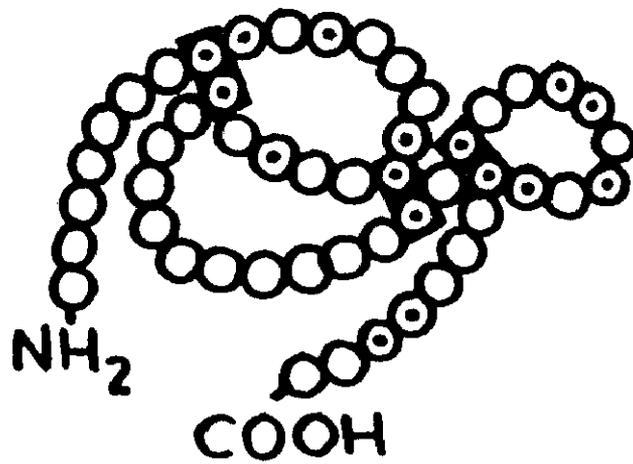


Fig. 2: Representación gráfica del TGF  $\alpha$  . Los trazos más gruesos corresponden a los puentes disulfuro. Los aminoácidos marcados interiormente son los compartidos con el EGF.

actuar como mediadores de la adhesión intercelular y de esta manera promover una respuesta mitogénica. A esta forma de estimulación entre células adyacentes se le ha denominado "yuxtacrina" (Anklesaria y col., 1990).

El TGF  $\alpha$  promueve la síntesis de DNA en los hepatocitos adultos de rata (Mead y col., 1989) y se ha detectado su presencia en el hígado fetal de rata (Gruppuso, 1989), alcanzándose la máxima concentración del mismo en el día 20 de la gestación para después disminuir progresivamente con la edad (Brown y col., 1990). Dado que en la rata el EGF sólo alcanza niveles importantes después del nacimiento, y que la expresión y autofosforilación de los receptores del EGF se incrementa al máximo durante los últimos días de la gestación (días 19-21), se supone que la actividad tipo EGF que se detecta en el feto se deriva de la unión del TGF  $\alpha$  a los receptores del EGF. Esto supondría un papel hepatotrófico del TGF  $\alpha$  en el feto (Gruppuso y col., 1992).

#### 2.1.2.1.3 Factor de crecimiento hepático (HGF)

El factor de crecimiento hepático (HGF) es el mitógeno más potente para hepatocitos parenquimáticos en cultivo primario, y parece ser el factor responsable de la puesta en marcha de la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial o tras una lesión. De hecho, su RNA mensajero se incrementa notablemente en el hígado en estas situaciones (Nakamura y col., 1989).

Esta sustancia se purificó a partir de plaquetas de rata (Nakamura y col., 1987), y se observó, que su estructura se correspondía con la de la hepatopoyetina A identificada en suero de rata hepatectomizada (Michalopoulos y col., 1983). El HGF es un heterodímero formado por una cadena ligera de 34 kDa ( $\alpha$ ) y una cadena pesada de 70 kDa ( $\beta$ ), unidas entre sí por

puentes disulfuro. Su secuencia de aminoácidos tiene una gran homología con la del plasminógeno y otras moléculas relacionadas con la coagulación sanguínea. De manera similar a estas proteínas, la cadena pesada del HGF, forma bucles que se asocian de dos en dos por medio de tres puentes disulfuro entre bucle y bucle (fig. 3). Este tipo de estructura está relacionada con la tendencia del HGF a estar en el plasma en forma de complejo (Zarnegar y col., 1989).

El receptor de la superficie celular para el HGF es el producto del proto-oncogén *c-met*. Este receptor es tipo tirosina quinasa y está formado por una cadena  $\alpha$  (50 kDa) como dominio extracelular, unida por puentes disulfuro a una cadena  $\beta$  (145 kDa) que constituye el dominio transmembranal y el intracelular, conteniendo este último la actividad tirosina quinasa (Bottaro y col., 1991). La actividad negativa de este receptor está regulada, por un lado, por la PKC, y por otro, por el incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares producido en respuesta al factor, siendo ambos mecanismos inhibitorios independientes entre sí (Gandino y col., 1991).

El RNA mensajero del HGF se expresa en varios tejidos en la rata como hígado, riñón, pulmón y cerebro (Tashiro y col., 1990) y estimula el crecimiento de varios tipos de células epiteliales además de los hepatocitos maduros (Konishi y col., 1991). En cultivos de células tubulares renales, se ha visto que la estimulación de la síntesis de DNA que produce el HGF depende fuertemente de la densidad celular, siendo mayor cuanto más baja es la densidad celular. En este mismo sistema, se ha comprobado que el HGF y el EGF tienen efectos aditivos sobre la síntesis de DNA (Igawa y col., 1991). En este sentido, en hepatocitos en cultivo, ambos factores combinados producen un aumento mayor de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares que por separado; esto se atribuye a que mientras que el HGF sólo es

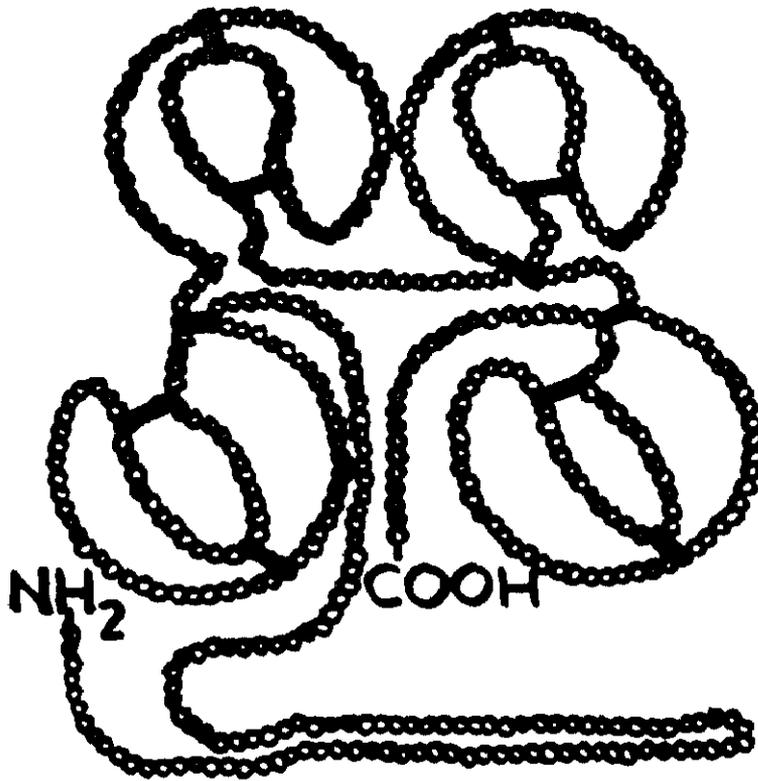


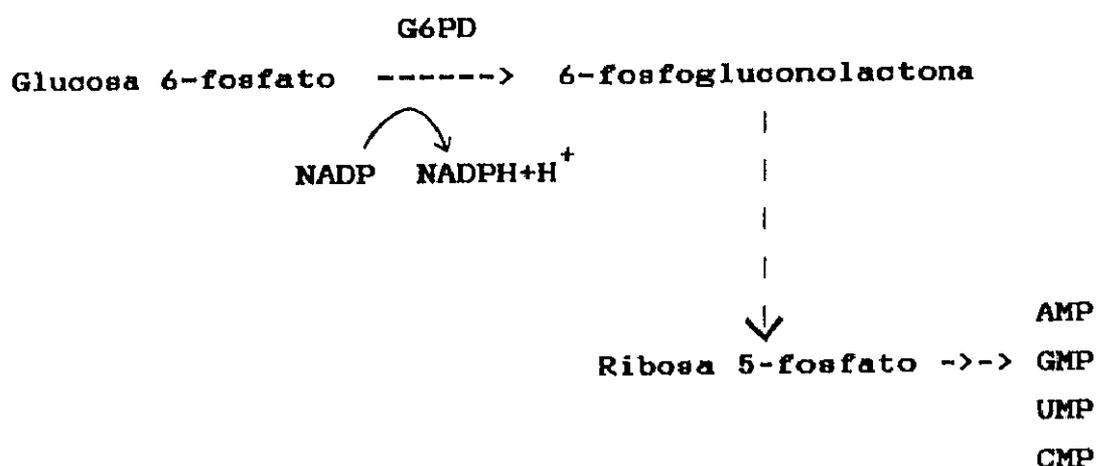
Fig. 3: Representación gráfica del HGF. Los trazos más gruesos corresponden a los puentes disulfuro.

capaz de liberar el  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático, el EGF induce además la entrada del catión desde el exterior celular, (Mine y col., 1991).

Por otro lado, se ha observado un efecto citostático del HGF en el crecimiento de células tumorales que expresan un receptor de HGF similar, en número y afinidad por el ligando, al de las células normales. Probablemente, las señales intracelulares producidas a partir de la autofosforilación del receptor sean diferentes en las células tumorales y en las normales. Asimismo, estos efectos inhibidores del crecimiento del HGF, también se observan en células normales cuando su crecimiento es excesivo y no se produce la diferenciación normal (hiperplasia) (Tajima y col., 1991).

#### 2.1.2.2 Expresión génica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) durante la proliferación hepática

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa-6-fosfato:  $\text{NADP}^+$  oxidoreductasa [EC 1.1.1.49]) (G6PD) es la enzima limitante de la ruta de las hexosas monofosfato:



A esta ruta se le atribuyen dos papeles fisiológicos: uno de ellos es el suministro de NADPH para la lipogénesis y la colesterogénesis, y el otro es el aporte de ribosas 5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos necesarios para el crecimiento celular.

Por ello, los cambios en la actividad de la G6PD pueden influenciar tanto la lipogénesis como el crecimiento celular.

El RNA mensajero de esta proteína tiene un tamaño de 2,3 kb (Kletzien y col., 1985) y se traduce en monómeros inactivos de 58 kDa de peso molecular, los cuales, forman homodímeros, homotetrámeros e incluso homohexámeros activos (Shreve y col., 1977).

En cultivos primarios de hepatocitos adultos, el EGF produce un significativo aumento de la síntesis del RNA mensajero y de la síntesis proteica de la G6PD, sinergizando en este efecto con la insulina. Esta inducción no se ve suprimida por la presencia ni de glucagón ni de dibutiril AMPo en el cultivo (Yoshimoto y col., 1983a). Por otro lado, la inducción del EGF y la insulina de la expresión de la G6PD en este sistema, se ve favorecida por la baja densidad celular, disminuyendo si se duplica o triplica la misma (Yoshimoto y col., 1983a).

Estos datos, sugieren que en los hepatocitos proliferantes la G6PD interviene en la síntesis de ácidos nucleicos. Este papel en la proliferación de la G6PD supone que la valoración de su actividad enzimática puede ser de gran utilidad para la determinación del estado del crecimiento celular en los hepatocitos en cultivo (Tsao y col., 1986).

En otros sistemas celulares, también se ha encontrado una relación entre los cambios en el estado proliferativo de las células y el nivel de expresión de la G6PD. Así, en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata, la presencia de mitógenos como el EGF produce un aumento del RNA mensajero y

de la actividad enzimática específica de la G6PD (Valverde y col., 1991). Asimismo, en células corticales renales de rata en cultivo, el tratamiento con factores de crecimiento como el EGF conduce a un incremento en la actividad G6PD y a una activación de la ruta de las hexosas monofosfato. Al parecer, la G6PD se encuentra unida en forma inactiva a alguna estructura y se libera en respuesta a factores de crecimiento. La liberación debe provocar algún cambio conformacional o de otro tipo en la G6PD lo cual conduciría a su activación (Stanton y col., 1991).

## 2.2 LA DIFERENCIACION CELULAR

En el proceso de formación de un organismo, las nuevas células surgidas de las sucesivas mitosis, tienen la posibilidad de abandonar el ciclo celular y entrar en una fase denominada  $G_0$  (opuesta a  $G_1$ ) o fase de quiescencia. A partir de esta fase, las células se diferencian adquiriendo las capacidades metabólicas y funcionales propias del tejido del que vayan a formar parte. Todavía no se sabe bien si el paso de una célula a este estado de prediferenciación se produce, bien por efectores que actúan en el momento de la salida de la fase M, o bien, en el punto de control previo a la entrada en fase S (Schneider y col., 1991).

### 2.2.1 Diferenciación de células hepáticas en cultivo

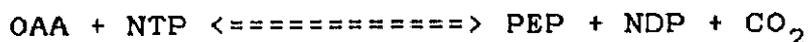
El periodo perinatal del desarrollo de la rata, se asocia con importantes cambios en la estructura y la función del hígado. Así, se observa una pérdida progresiva de los elementos hematopoyéticos propios de los estadios tempranos del hígado fetal, en favor del tamaño y el número de los hepatocitos parenquimáticos, los cuales van adquiriendo las capacidades funcionales de los hepatocitos maduros (Rothrock y col., 1988). Es importante señalar que muchas de las proteínas expresadas en el hígado adulto son prácticamente indetectables durante la gestación, y van apareciendo en momentos concretos justo antes o después del nacimiento. Este es el caso de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la enzima málica entre otras. Por ello, se considera que el sistema de hepatocitos fetales en cultivo es un modelo muy útil para investigar los

mecanismos implicados en la diferenciación enzimática del hígado (Shelly y col., 1991).

#### 2.2.1.1 Expresión génica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

La mayor parte de los datos que se conocen acerca del desarrollo y la regulación de la gluconeogénesis hepática, se basan en estudios realizados con ratas. En esta especie, no hay proceso gluconeogénico en el hígado fetal, y la capacidad de sintetizar glucosa a partir de varios precursores, se adquiere tras el nacimiento en paralelo con la aparición de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) citosólica, que es la última enzima de la secuencia gluconeogénica en desarrollarse (Hanson y col., 1975).

La PEPCK (GTP: Oxalacetato carboxi-liasa (transfosforilante) [EC 4.1.1.32]) es la enzima que cataliza la formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato y nucleótido trifosfato en presencia de  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ :



La PEPCK es un polipéptido con una única cadena de peso molecular alrededor de 70 kDa (dato de hígado de rata), aunque tanto el peso molecular, como la composición de aminoácidos varía de una especie a otra. Está presente con una alta

actividad específica en hígado, corteza renal y tejido adiposo blanco, y con actividades específicas más bajas en pulmón, yeyuno y cerebro. Posee dos isoenzimas, una citoplasmática y otra mitocondrial, que en la mayoría de las especies son inmunológicamente distintas. Se ha establecido que únicamente la enzima citoplasmática responde a estímulos hormonales y a variaciones de la dieta. En la rata, la PEPCK hepática es casi totalmente citoplasmática, sin embargo, en la mayoría de los mamíferos un 50% de la enzima es mitocondrial (Hanson y col., 1972).

La regulación hormonal de la transcripción del gen de la PEPCK reviste gran importancia puesto que constituye el paso limitante de la gluconeogénesis. El gen de la PEPCK de hígado de rata tiene una longitud de 6 kb y contiene 10 exones y 9 intrones. Este gen codifica para un RNA mensajero de 2,6 kb (Beale y col., 1985) y su transcripción se estimula por glucocorticoides, AMPc y hormonas tiroideas, mientras que la insulina y los ésteres de forbol inhiben su expresión. Al parecer, toda la información requerida para la regulación de la expresión de la PEPCK en respuesta a hormonas, está contenida en el fragmento del promotor comprendido entre la posición -460 y la +73 (McGrane y col., 1988).

La secuencia que regula la estimulación de la transcripción de la PEPCK por glucocorticoides es un complejo denominado GRU (unidad de respuesta a glucocorticoides). GRU comprende dos elementos de unión a receptores (entre -395 y -349) denominados GR1 y GR2, y dos factores accesorios, AF1 (entre -455 y -431) y AF2 (entre -420 y -403), los cuales ligan proteínas diferentes. Todos los elementos de GRU son necesarios para la máxima inducción de la expresión de la PEPCK por glucocorticoides. Así, la ausencia de los factores accesorios da como resultado una reducción a la mitad de la máxima respuesta. Por su parte,

GR1 y GR2 independientemente, en presencia de los factores accesorios, también producen sólo la mitad de la máxima respuesta (Imai y col., 1990).

En la inducción de la transcripción del gen de la PEPCK mediada por AMPc, están implicados numerosos elementos de su promotor. En primer lugar, se han identificado ocho dominios de unión a proteínas denominados CRE-1 (elemento de respuesta a AMPc-1), CRE-2, y P1, P2, P3, P4, P5 y P6. Por otro lado, entre los diversos factores de transcripción que se unen a estos dominios, se han identificado: NF1 (factor nuclear 1), que se une a P1, HNF-1 (factor nuclear hepático-1), que se une a P2 (Roesler y col., 1989), y CREB (proteína que se une al elemento de respuesta al AMPc), que se une a CRE-1 (Park y col., 1990). Los últimos datos indican que CRE-1 (de -92 a -82), P3(I) (de -250 a -234), y en menor medida, P3(II) (de -260 a -250) y P4 (-286 a -270), son fundamentales para la respuesta del promotor de la PEPCK al AMPc (Liu y col., 1991).

Asimismo, se ha identificado un elemento de respuesta a  $T_3$  (TRE) entre las posiciones -332 y -308 del promotor. Curiosamente, el elemento P3(I) citado para el caso del AMPc, también es necesario para la respuesta del promotor a  $T_3$ . Ambos elementos, producen un sinergismo en la inducción de la transcripción del gen de la PEPCK por estimulación simultánea con AMPc y  $T_3$  (Giralt y col., 1991). Sin embargo, este sinergismo no se produce con CRE-1 (Liu y col., 1991).

El efecto inhibitorio de la insulina sobre la transcripción de la PEPCK, se ejerce a través de dos secuencias de respuesta denominadas IRS distal (entre -416 y -402), e IRS proximal (entre -271 y +69). Ninguna de las dos IRSs por separado, es capaz de inhibir completamente la inducción de la transcripción de la PEPCK mediada por AMPc y glucocorticoides. Sin embargo, cuando ambas secuencias están presentes, la acción inhibitoria

de la insulina es la predominante (O'Brien y col., 1990). Por otro lado, se ha localizado una secuencia de respuesta a ésteres de forbol (PRS) en las posiciones entre -416 y -407 del promotor de la PEPCK, la cual coincide con IRS distal. Así, aunque los ésteres de forbol y la insulina actúan a través de rutas distintas, finalmente convergen en una misma secuencia de DNA (IRS/PRS) para inhibir la expresión del gen de la PEPCK. Dado que IRS/PRS coincide con AF2, está estratégicamente situado para anular su función, lo cual explicaría, cómo ejercen la insulina y los ésteres de forbol su efecto inhibitor sobre la estimulación de la transcripción de la PEPCK por glucocorticoides (O'Brien y col., 1991).

Para el estudio de la regulación de la expresión génica de la PEPCK *in vitro*, se han utilizado fundamentalmente los hepatocitos de rata adulta en cultivo primario. En este sistema, los glucocorticoides juegan un papel crucial como factores permisivos de la inducción de la transcripción de la PEPCK mediada por otras hormonas, y además, aunque en menor medida, actúan como estabilizadores del RNAm. En concreto, se ha visto que el glucagón es incapaz por sí solo de estimular la expresión génica de la PEPCK a concentraciones fisiológicas (0,1 nM) en ausencia de glucocorticoides (dexametasona 100 nM); a concentraciones de 10 nM, el glucagón produce tan sólo la mitad del incremento de RNAm de la PEPCK que se da en presencia de las dos hormonas juntas a concentraciones fisiológicas. Estos datos, sugieren que la dexametasona aumenta la sensibilidad de las células por el glucagón permitiendo su acción a concentraciones fisiológicas (Runge y col., 1991). El incremento inducido por el glucagón en el RNAm de la PEPCK es paralelo a un aumento en la síntesis de proteínas, lo cual conduce a mayores niveles de enzima y actividad en 60-90 minutos. Por su parte, la insulina, es capaz de antagonizar la

inducción producida por el glucagón cuando ambas hormonas se encuentran a concentraciones fisiológicas (insulina 5 nM-glucagón 0,1 nM). La insulina ejerce su efecto no sólo reduciendo la actividad transcripcional del gen, sino también acelerando la degradación del RNAm de la PEPCK (Christ y col., 1990). Sin embargo, según se va aumentando la concentración de glucagón (hasta 10 nM), la insulina va perdiendo su capacidad antagonista incluso a concentraciones de 10 nM, siendo el glucagón la hormona dominante (Christ y col., 1988).

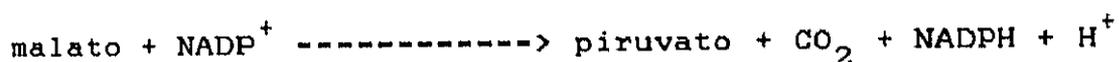
En cultivos de hepatocitos de ratas adultas hipotiroideas, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas aumentan el efecto estimulador del AMPc sobre la transcripción del gen de la PEPCK, y asimismo, aumentan la síntesis de la enzima. Su efecto es rápido, significativo y aditivo, lo cual indica que actúan independientemente (Höppner y col., 1986).

El RNAm de la PEPCK en hígado de fetos de rata "*in vivo*", no comienza a acumularse hasta justo unas horas antes del nacimiento. Cuando se cultivan hepatocitos de fetos de 14 días de gestación durante 48 horas en presencia de dexametasona, AMPc o T<sub>3</sub> por separado, sólo se produce un ligero aumento de los niveles del RNAm de la PEPCK en el caso del AMPc. Sin embargo, combinando la dexametasona con el AMPc, y en mayor medida, si además se añade T<sub>3</sub>, se obtienen incrementos muy significativos del RNAm de la PEPCK. En este sistema, la insulina no produce el bloqueo de la transcripción de la PEPCK típico del adulto. Por otro lado, la inducción de la síntesis proteica de la PEPCK por estas hormonas, es entre 3 y 6 veces más lenta que la de su RNAm. Según estos datos, en los primeros días de cultivo, el RNAm de la PEPCK no es capaz de traducirse, y se acumula intracelularmente hasta alcanzar una concentración relativamente alta. Considerando que los hepatocitos embrionarios en cultivo tienen una capacidad de síntesis de

proteínas total similar a la de los hepatocitos procedentes de neonatos, se puede deducir que la limitación de la eficiencia traduccional, es uno de los mecanismos más importantes para controlar la expresión de genes específicos hepáticos en las fases iniciales del desarrollo. Finalmente, estos datos demuestran que los hepatocitos embrionarios cultivados en un medio suplementado con hormonas, son capaces de acumular RNAs mensajeros y proteínas características del fenotipo de los hepatocitos adultos (Roon y col., 1988).

### 2.2.1.2 Expresión génica de la enzima málica

La enzima málica citosólica (EM) (L-malato: NADP oxidoreductasa (descarboxilante) [EC 1.1.1.40]), cataliza la descarboxilación oxidativa NADP-dependiente del malato para dar piruvato:



Es un tetrámero de 250 kDa formado por cuatro subunidades estructuralmente idénticas e individualmente inactivas.

La EM se encuentra a altas concentraciones en todos los tejidos donde se sintetizan triglicéridos activamente, especialmente en el hígado y en el tejido adiposo. El NADPH generado por la EM, es una gran fuente de equivalentes reductores requeridos para la biosíntesis "de novo" de palmitato y otros ácidos grasos de cadena larga.

La EM del hígado de roedores y aves, se ha estudiado como un ejemplo de enzima hepática regulada por múltiples factores nutricionales y hormonales. Los factores dietéticos, juegan un importante papel en la regulación de la actividad de las enzimas lipogénicas como la EM. Así, en ratas adultas, una

dieta rica en carbohidratos y pobre en grasas, induce la formación de estas enzimas, mientras que el ayuno, disminuye sus niveles (Fitch y col., 1960) (Gibson y col., 1972) (Volpe y col., 1976). Por otro lado, muchas de las enzimas lipogénicas, entre ellas la EM, responden a la administración de la  $T_3$  (Diamant y col., 1972) (Roncari y col., 1975) (Kumar y col., 1977) (Mariash y col., 1980a). Incluso, existe un sinergismo entre los estímulos producidos por la dieta y por la  $T_3$  sobre enzimas lipogénicas como la EM en ratas adultas (Mariash y col., 1980b). La insulina, también tiene un papel inductor de la transcripción de la EM en el hígado de rata adulta (Katsurada y col., 1988). Por el contrario, se ha observado un efecto inhibitor de la transcripción de la EM por parte de la hormona glucagón, o el AMPc, en hepatocitos embrionarios de pollo (Goodridge y col., 1976).

La actividad EM es muy baja en el hígado fetal de rata, pero se acumula rápidamente en los neonatos tras el destete (Ballard y col., 1967). Los responsables de este cambio podrían ser, por un lado, la sustitución de la leche materna, rica en grasas, por una dieta sólida rica en carbohidratos, y por otro lado, los aumentos que se producen en los niveles circulantes de  $T_3$  (Dussault y col., 1975), así como la disminución de la aparente resistencia del neonato a la acción de la insulina (Isaad y col., 1988). Este aumento de la expresión de la EM en este momento viene precedido de un aumento específico similar de su RNAm (Mann y col., 1991).

La EM de hígado de rata está codificada por un gen de longitud 95 kb que contiene 14 exones (Morioka y col., 1989). La transcripción de este gen da lugar a dos RNAs de 4,5 y 2,7 kb respectivamente (Dozin y col., 1985).

El gen de la EM contiene un elemento de respuesta a  $T_3$  (TRE) entre las posiciones -315 y -248, que incluye una zona de unión

para los receptores nucleares de  $T_3$  (posiciones entre -281 y -261) (Petty y col., 1990). Las tres isoformas de receptores de  $T_3$  conocidas,  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , se pueden unir con similar afinidad a TRE (Yen y col., 1991). Además, existen unas proteínas auxiliares del receptor de  $T_3$  (TRAP) que heterodimerizan con el mismo y se unen a TRE (Darling y col., 1991), con lo cual la unión de  $T_3$  a TRE puede verse aumentada de una manera específica por interacción con proteínas nucleares (Yen y col., 1991).

La inducción de la EM citosólica en el hígado de rata por  $T_3$ , se debe a un incremento en el nivel de su RNAm producido por cambios pretranscripcionales (Towle y col., 1981). En concreto, la  $T_3$  activa la transcripción del gen de la EM a la vez que disminuye la tasa de degradación de su pre-RNAm (Song y col., 1988). Así se justifica el que los niveles de actividad enzimática, y la tasa de síntesis de la EM, se vean aumentados prácticamente en la misma proporción que los niveles de RNAm en respuesta a  $T_3$  (Towle y col., 1980).

La insulina también produce un aumento en los niveles de RNAm de la EM en el hígado de rata adulta. Sin embargo, la insulina no altera la tasa de transcripción del gen de la EM, sino que aumenta su estabilidad por un mecanismo postranscripcional (Davis y col., 1988). Por otro lado, en hepatocitos de embriones de pollo, la insulina por sí sola no es capaz de aumentar los niveles de RNAm de la EM (Back y col., 1986).

El efecto del glucagón sobre la expresión génica de la EM se ha estudiado sobre todo en hepatocitos embrionarios de pollo. En este sistema, el glucagón (o el AMPc) es capaz de producir una inhibición de la transcripción del gen de la EM inducida por  $T_3$  e insulina (Salati y col., 1991). Estos datos sugieren que la fosforilación mediada por protein quinasa A (PKA) puede

tener un papel en la regulación del gen de la EM (Swierozynski y col., 1991).

La influencia de la dieta sobre la expresión génica de la EM en el hígado de rata adulta se ejerce fundamentalmente a nivel postranscripcional. Así, se ha observado que mientras las dietas ricas en carbohidratos estabilizan el RNAm de la EM, las grasas estimulan la degradación del mismo (Katsurada y col., 1987).

Al estudiar la influencia de todos estos factores nutricionales y hormonales sobre la expresión de la EM en cultivos primarios de hepatocitos adultos, se ha descrito que la presencia de insulina, o bien de  $T_3$ , en el medio de cultivo, produce un incremento de 2-3 veces en la actividad EM. Por el contrario, la adición de glucagón disminuye ligeramente la actividad EM. El suplemento del medio de cultivo con glucosa en ausencia de hormonas, no modifica la actividad EM. Pero cuando a la vez que la glucosa se añade insulina, se observa un aumento mayor de la actividad EM que en presencia únicamente de la hormona. Por su parte, la fructosa por sí sola en ausencia de hormonas, aumenta entre 2-3 veces la actividad EM. Por tanto, la actividad de las enzimas envueltas en la lipogénesis se incrementa en respuesta al metabolismo de carbohidratos independientemente, en parte, de los efectos hormonales (Spence y col., 1982).

Otros estudios en este mismo sistema, muestran como si se aumenta la concentración de glucosa en el medio de cultivo hasta concentraciones similares a las que se encuentran en la sangre después de las comidas, la glucosa sí es capaz de inducir la actividad EM por sí sola en ausencia de hormonas (Mariash y col., 1981). La  $T_3$  añadida al medio de cultivo, sinergiza con los carbohidratos del mismo en la inducción de la EM, como si fuera un multiplicador de las señales originadas

por los carbohidratos (Mariash y col., 1981). Por su parte, la dexametasona parece tener una influencia mínima en la inducción de la EM en este sistema (Mariash y col., 1981).

También se han realizado numerosos estudios en cultivos primarios de hepatocitos embrionarios de pollo. En este sistema, la insulina no tiene ningún efecto por sí misma en la transcripción de la EM (Back y col., 1986). Cuando se añade  $T_3$  al medio de cultivo, se produce un aumento en la actividad enzimática y en la abundancia del RNAm de la EM (Salati y col., 1991). La insulina combinada con  $T_3$ , aumenta tres veces la inducción de la actividad EM producida por  $T_3$  sola (Goodridge y col., 1976), pero el efecto que producen ambas hormonas combinadas no supera el máximo efecto de  $T_3$  sobre el aumento de los niveles de RNAm de la EM (Salati y col., 1991). Como ya se ha citado, en este sistema el glucagón es capaz de bloquear la inducción tanto de los niveles de RNAm (Salati y col., 1991) como de la actividad EM (Goodridge y col., 1976) producidas por la combinación de insulina y  $T_3$ .

En hepatocitos fetales de rata de 22 días de gestación en cultivo primario, los carbohidratos y los metabolitos glucolíticos producen la inducción de la EM en ausencia de suero y hormonas. Esta inducción se ve bloqueada por la presencia de palmitato en el medio de cultivo. La insulina y la  $T_3$  por separado producen un aumento significativo en la actividad específica EM, y cuando se combinan, se observa un efecto sinérgico entre ambas sólo cuando la concentración de glucosa en el medio es alta. En este sistema, el glucagón es capaz de inhibir parcialmente el aumento de la actividad EM producido por insulina y  $T_3$  (Fabregat y col., 1989).

Según los últimos datos expuestos, los hepatocitos fetales en cultivo primario pueden constituir un buen modelo para el

estudio de la expresión génica de la EM.

### 2.2.1.3 Expresión génica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hepatocitos no proliferantes

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), pertenece a un grupo de enzimas lipogénicas clave implicadas en el metabolismo hepático de los ácidos grasos, cuya actividad, se induce por factores hormonales y nutricionales (Volpe y col., 1976). En células no proliferantes, la actividad G6PD suministra poder reductor (NADPH) para la lipogénesis hepática (Yoshimoto y col., 1983a).

"*In vivo*", se ha descrito que el contenido de RNAm de la G6PD hepática de la rata aumenta en respuesta a una dieta rica en carbohidratos cuando las ratas han sido ayunadas previamente durante 48 horas (Sun y col., 1978). Este aumento del RNAm de la G6PD en estas condiciones, se debe a un incremento transitorio de la transcripción de su RNAm acompañado de una estabilización del mismo (Prostko y col., 1989). El aumento de actividad enzimática G6PD en estas condiciones, se produce de manera paralela al de los niveles de su RNAm, sugiriendo que la regulación nutricional de esta enzima se ejerce a nivel pretranscripcional (Kletzien y col., 1985). Sin embargo, parece ser que la realimentación con dietas ricas en proteínas favorece la traducción del RNAm de la G6PD en el hígado de rata (Katsurada y col., 1986).

Por otro lado, las dietas sin carbohidratos pero ricas en grasas, no aumentan los niveles de RNAm ni la actividad de la G6PD hepática en ratas ayunadas 48 horas (Kim y col., 1990).

Asimismo, cuando tras las 48 horas de ayuno las ratas se realimentan con una dieta rica en carbohidratos y sin grasas, y se tratan con diburiril AMPc, los niveles de RNAm de la G6PD

disminuyen frente a ratas control tratadas con solución salina. Dado que esta disminución en el contenido de RNAm de la G6PD se corresponde con variaciones semejantes en la actividad G6PD, se sugiere que la degradación de la G6PD no tiene una regulación significativa (Kim y col., 1990).

El efecto de la insulina sobre la inducción de la expresión génica de la G6PD se ha estudiado en hígado de ratas adultas diabéticas adaptadas a una dieta con glucosa libre en grasas. En este sistema, la tasa de transcripción de la G6PD hepática se encuentra disminuída frente a los valores que presentan las ratas normales. La inyección de insulina a estas ratas diabéticas hace que se restaure la tasa de transcripción de las ratas normales (Katsurada y col., 1989).

La  $T_3$  no tiene un papel claro sobre la expresión de la G6PD en hígado de rata adulta. Estudios en ratas hipertiroideas, muestran unos niveles superiores en el contenido del RNAm de la G6PD frente a las ratas eutiroides (Miksicek y col., 1982). Asimismo, la inyección de  $T_3$  a ratas eutiroides produce un aumento de dos veces en el contenido de RNAm para la G6PD (Miksicek y col., 1982). Sin embargo, como más adelante se describirá, en cultivos primarios de hepatocitos adultos se han presentado resultados contradictorios sobre este aspecto, debido probablemente a las variaciones en las condiciones experimentales empleadas.

Para el estudio de la regulación nutricional y hormonal de la G6PD "*in vitro*", se han utilizado frecuentemente hepatocitos de rata adulta en cultivo primario. En este sistema, los hepatocitos, con los tratamientos adecuados, son capaces de expresar actividades y niveles de RNAm de la G6PD del mismo rango que en ratas "*in vivo*" (Manos y col., 1991).

La actividad G6PD de los hepatocitos adultos de rata en cultivo primario, se incrementa por la sola presencia de

aminoácidos esenciales en el medio de cultivo, pero los aminoácidos no esenciales no son capaces de producir esta inducción (Fukuda y col., 1987). En este sentido, parece ser que la inducción de la G6PD depende más de las proteínas que de los carbohidratos (Fukuda y col., 1987).

En cultivos de hepatocitos de rata adulta ayunada 48 horas, el tratamiento con insulina o con dexametasona provoca un aumento en los niveles de RNAm de la G6PD. El aumento del RNAm de la G6PD producido por la insulina se ve reflejado en un aumento de la actividad enzimática G6PD, pero en el caso de la dexametasona, la actividad G6PD no se ve modificada. No obstante, la combinación de la insulina con la dexametasona, produce un aumento tanto de los niveles de RNAm como de la actividad G6PD superior al producido por la insulina sola, lo cual puede indicar que el RNAm inducido por la dexametasona posee una menor eficiencia traduccional (Fritz y col., 1986). En este mismo sistema, los carbohidratos como la glucosa y la fructosa no son capaces por sí mismos de aumentar la actividad G6PD, y de igual modo, no colaboran con la insulina en la inducción de la actividad G6PD (Manos y col., 1991).

Cuando los hepatocitos adultos se cultivan en presencia de  $T_3$  o de glucagón, no se observan cambios en los niveles de RNAm de la G6PD. Asimismo, cuando ambas hormonas se combinan con insulina, ninguna de ellas modifica la inducción del RNAm de la G6PD producida por la misma (Yoshimoto y col., 1983b). En cultivos primarios de hepatocitos adultos ayunados, la  $T_3$  no afecta a la actividad G6PD ni sola ni en presencia de carbohidratos (Manos y col., 1991). Estos datos contrastan con estudios previos en hepatocitos adultos en cultivo, donde se observaban incrementos en la actividad G6PD en respuesta a  $T_3$  (Spence y col., 1982), así como con los resultados descritos "in vivo".

### 2.3 COORDINACION DE LOS PROCESOS DE PROLIFERACION Y DIFERENCIACION CELULAR

El desarrollo de los órganos fetales, se caracteriza por el crecimiento inicial de estructuras inmaduras, seguido de la diferenciación celular y la maduración funcional. Es necesario que la proliferación esté acoplada al proceso de la diferenciación. En este sentido, tiene que haber una integración entre los efectores positivos y negativos del control de la proliferación y los agentes diferenciadores.

Un caso muy gráfico de la coordinación que tiene que haber entre los procesos proliferativos y diferenciadores es el desarrollo del pulmón fetal de ratones. En este sistema, el pulmón de fetos de sexo femenino "*in vivo*", muestra un relevo de la síntesis de DNA por el inicio de la diferenciación en una fase más temprana de la gestación que en el caso del sexo masculino. Se piensa, que la causa de que la fase de proliferación del pulmón se prolongue más en el macho que en la hembra, es la presencia de andrógenos en los organismos masculinos. Es decir, los andrógenos se comportarían en este caso como promotores del crecimiento e inhibidores de la diferenciación, apoyando la hipótesis de que el control del crecimiento y la diferenciación celular están recíprocamente ligados (Nielsen y col., 1990).

El mecanismo por el que las células pasan de la fase de proliferación a la de diferenciación es una cuestión fundamental en la biología del desarrollo. El hígado es un excelente sistema para estudiar este proceso. Los hepatocitos quiescentes normales son unas células epiteliales altamente diferenciadas responsables de múltiples funciones específicas.

Sin embargo, en respuesta a un daño o una hepatectomía parcial, los hepatocitos rápidamente comienzan a proliferar. Una vez que la estructura tridimensional del hígado se ha regenerado, el crecimiento cesa y se reanudan las funciones normales. La identificación de las claves que controlan estos procesos y su relevo es crítica para la comprensión del funcionamiento normal del hígado y para el desarrollo de nuevos tratamientos para los daños hepáticos. En este sentido, se ha estudiado profundamente el papel de los factores de crecimiento y de otras moléculas regulatorias. Sin embargo, hay que considerar además otros factores como es el caso de la matriz extracelular y su influencia en el relevo de la proliferación y la diferenciación (Mooney y col., 1992).

Los hepatocitos adultos de rata en cultivo primario, retienen los niveles que tenían "in vivo" de varias funciones hepáticas. En esta nueva situación, responden a varias hormonas pero no son capaces de proliferar ni siquiera en presencia de suero. No obstante, cuando se cultivan a densidades celulares bajas, los hepatocitos maduros pueden proliferar en presencia de insulina y EGF. Por ello, se considera que existen dos tipos de actividades celulares en relación con la densidad celular. Por un lado, se distinguen las funciones relacionadas con el crecimiento, estimuladas por bajas densidades celulares, y por otro lado, las características específicas hepáticas, estimuladas por altas densidades celulares (Nakamura y col., 1983). Estudios más recientes, señalan que cuando los hepatocitos se cultivan a baja densidad celular, tienden a pasar de la fase  $G_0$  a la  $G_1$ , pero a altas densidades celulares permanecen en la fase  $G_0$  (Kumatori y col., 1991). Luego la densidad celular, juega un papel muy importante en la integración de los mecanismos de proliferación y diferenciación, puesto que orienta a la célula tras la mitosis

determinando si debe seguir proliferando ( $G_1$ ) o si por el contrario debe diferenciarse ( $G_0$ ).

Como se ha citado, el hígado ha sido objeto de numerosos estudios de proliferación, y ha servido como un modelo de diferenciación sobre todo en el caso del adulto. En cuanto al desarrollo fetal, los factores de crecimiento y las hormonas deben jugar un papel muy significativo en la ordenación del crecimiento y diferenciación hepáticos.

Los hepatocitos fetales son capaces de multiplicarse en cultivo primario. En determinadas condiciones, el EGF junto con la insulina estimulan la síntesis de DNA sin que funciones específicas hepáticas, como la expresión de la albúmina o la  $\alpha$ -fetoproteína, se vean afectadas (Hoffmann y col., 1989). En este sentido, tiene un gran interés el estudio del papel en la proliferación de los hepatocitos fetales de la expresión de la G6PD, una enzima implicada en el aporte de ribosas 5-fosfato necesarias para la síntesis de DNA, que se ha relacionado con el estado proliferativo de los hepatocitos. De hecho, el EGF provoca una inducción de la G6PD en los hepatocitos de rata adulta en cultivo (Yoshimoto y col., 1983a)

Por otro lado, los hepatocitos fetales en cultivo pueden expresar genes característicos del estado adulto. Así, la maduración de los hepatocitos fetales puede ser monitorizada por la inducción de enzimas de expresión postnatal como la PEPCK. Los estudios realizados en hepatocitos fetales de rata, muestran que la actividad específica PEPCK puede inducirse por epinefrina y glucagón (Bulanyi y col., 1979). Asimismo, en hepatocitos embrionarios de rata, se ha descrito una acumulación del RNAm de la PEPCK en respuesta a la presencia de dexametasona, AMPc y  $T_3$  (Roon y col., 1988).

Los hepatocitos fetales cultivados en presencia de glucagón y dexametasona mantienen un estado quiescente, y muestran una

baja expresión de la G6PD a la vez que se observa una fuerte inducción de la PEPCK. En estas condiciones, la presencia del EGF estimula la proliferación de los hepatocitos produciéndose un aumento en la síntesis y el contenido de DNA, así como en la expresión de la G6PD, mientras que la expresión de la PEPCK se ve drásticamente reducida.

Sin embargo, en este mismo sistema, la presencia en el cultivo de forskolina junto con IBMX prácticamente suprime los incrementos en la síntesis de DNA y la expresión de la G6PD provocados por el EGF, mientras que induce la expresión de la PEPCK.

De acuerdo con estos datos, es posible establecer una relación inversa entre la expresión de la G6PD, característica de los hepatocitos fetales proliferantes, y la expresión de la PEPCK, asociada a la diferenciación de los hepatocitos fetales quiescentes bajo estímulos hormonales específicos (Molero y col., 1992), como una prueba más de la coordinación que existe entre ambos procesos, proliferación y diferenciación.

### **III.-MATERIALES Y METODOS**

### 3.1 Animales de experimentación

Los animales de experimentación utilizados han sido ratas de raza Wistar suministradas por el animalario del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

En concreto, para los cultivos celulares se utilizaron fetos de 20 días de gestación. En el caso de los estudios "in vivo" se han empleado: Para el análisis de actividades enzimáticas hepáticas fetos de 20, 21 y 22 días de gestación, neonatos de 1 y 2 días de vida, y adultos de pesos comprendidos entre 200 y 300 g ayunados durante 48 horas, y para la extracción del RNA total hepático, neonatos de 10 y 35 días de vida, adultos ayunados durante 48 horas, y adultos ayunados y posteriormente realimentados otras 48 horas con una dieta sólida de laboratorio fundamentalmente hidrocarbonada.

### 3.2 Medios instrumentales

Las pesadas se realizaron en balanzas modelo Sartorius 1405 (Sartorius Werke GMBH, Alemania) y modelo ER-120A (A y D Co, Tokio).

Para las determinaciones de pH se utilizó un pHímetro tipo Crison D-501 (Crison, España).

Las centrifugaciones han sido realizadas en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5414 (Eppendorf, Alemania), en una centrífuga de mesa modelo GLC-1 (Sorvall, Dupont Inst. U.S.A.) y en una centrífuga Kontron modelo Centrikon H-401 (Kontron, Suiza).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un

espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-60 (Shimadzu, Japón). Se han utilizado cubetas de plástico de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz procedentes de la firma Sarstedt (Alemania) y cubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz.

Las medidas fluorimétricas se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer, modelo LS-50 (U.S.A.) utilizándose cubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad y un cm de paso de luz.

Las determinaciones radiométricas fueron realizadas en un contador de centelleo líquido Kontron modelo Betamatic I (Kontron, Suiza).

Para la homogenización de los tejidos se utilizó un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón de la marca Pobel, adaptado a un aparato Tri-R-Stir-R modelo K43, o bien, un mezclador Ultra-Turrax (Ika Werk, Alemania).

Las muestras de células fueron sonicadas en un sonicador Microson de la firma Heat Systems-Ultrasonics Inc., (U.S.A.).

Para la agitación de los tubos se empleó un agitador Heidolph, modelo REAX 200 (Selecta, España) y para las distintas soluciones un agitador magnético (Selecta, España).

Las incubaciones se realizaron en un baño Grant (Grant Inst., Inglaterra) dotado con sistema de agitación lineal.

El manejo de las muestras para el cultivo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical Assab, modelo V<sub>4</sub> (Assab, Suecia).

El mantenimiento de los cultivos se realizó en un incubador termostatzado con gaseo de CO<sub>2</sub> de la firma Assab, modelo T-304 GF (Assab, Suecia).

Las células se incubaron en placas de 60 ó 100 mm de diámetro procedentes de la firma Costar (U.K.).

La esterilización del material se realizó en un autoclave Selecta, modelo Clino-matic (Selecta, España).

El conteo de células se realizó en un hemocitómetro Neubauer (Schreck, Alemania).

El microscopio de luz directa era de la firma Will (Heerburg, Suiza) y el microscopio de luz invertida era de la firma Nikon (Japón).

El manejo de las muestras y productos líquidos se realizó con pipetas automáticas Gilson (Francia) modelos P-20, P-100, P-200 y P-1000, y con pipetas P-10 de la firma Eppendorf (Alemania).

Las electroforesis de proteínas se han realizado con un equipo Mini Protean II de los laboratorios Bio-Rad, (Richmond, U.S.A.). Todos los reactivos utilizados en los experimentos de inmunolectroforesis así como la cubeta de transferencia, modelo Trans-Blot Cell, y la membrana de nitrocelulosa (0,45 um), fueron suministrados por Bio-Rad.

El papel Whatman nº1, el 3MM y el GF/C procedían de Whatman International Ltd. (Maidstone, England).

Las electroforesis de ácidos nucleicos se han realizado en cubetas de la firma Bio-Rad y E-C Aparatus Corporation (Florida, U.S.A.). Asimismo, la fuente de alimentación utilizada en el desarrollo de las electroforesis fue el modelo 200/2.0 de la firma Bio-Rad.

Las pinzas denominadas "Millipore" procedían de Millipore Corporation (Bedford, Massachusetts).

Las membranas de nylon eran del tipo GeneScreen de la firma NEN Research Products (Boston, U.S.A.). El aparato utilizado para el Vacumm-Blot era el modelo Vacu Gene XL de Pharmacia LKB y el de Dot-Blot procedía de Bio-Rad. La bomba de vacío empleada era el modelo 5KH 33EN25T de la firma General Electric (Indiana, U.S.A.).

Las medidas densitométricas se realizaron en un densitómetro de la firma E-C Aparatus Corporation (Florida, U.S.A.).

Los estudios de citometría de flujo se realizaron en un

citómetro de la firma Beckton-Dickinson (U.S.A.).

Las películas utilizadas en autorradiografía eran de la casa Kodak modelo Omat X-AR y los cassettes utilizados eran el modelo X-Omatic de la misma casa.

### 3.3 Productos

Los tampones, soluciones salinas y reactivos en general se han preparado con productos de la casa Sigma Chemical CO (U.S.A.) y Merck (Alemania).

Los sustratos, enzimas y coenzimas empleados han sido suministrados por la firma Boëhringer Mannheim (Alemania).

El medio 199, con y sin glucosa, las soluciones salinas de lavado y recogida de células, el bicarbonato sódico estéril, la glutamina y el suero fetal de ternera fueron suministrados por Flow (U.S.A.).

La albúmina bovina libre en ácidos grasos fue suministrada por Sigma Chemical CO (U.S.A.).

La penicilina G, la estreptomycinina y la tetraciclina eran de Sigma Chemical CO (U.S.A.). La gentamicina fue cedida por Antibióticos S.A. (España) y la nistatina por Squibb S.A. (España). La ampicilina procedía de Beecham (España).

La insulina, el glucagón, la dexametasona, la noradrenalina, la  $T_3$ , la vasopresina, la forskolina, el IBMX, el dibutiril AMPc y el factor de crecimiento epidérmico eran de la casa Sigma Chemical CO (U.S.A.).

El IGF-I fue suministrado por Amgen Biologicals (Thousand Oaks, U.S.A.).

El Sephadex G 25-80 era de Sigma Chemical CO (U.S.A.).

Todos los productos utilizados en la preparación de geles de agarosa y poliacrilamida proceden de los laboratorios Bio-Rad (Richmond, U.S.A.). Los patrones de proteínas utilizados en las

electroforesis de poliacrilamida eran también de Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular de DNA fueron suministrados por Boëhringer Manheim (Alemania).

Los productos utilizados en los estudios de citometría de flujo eran de la firma Beckton-Dickinson (U.S.A.).

La solución de extracción de RNA era de la firma Cinna/Biotex Lab. Int. (Texas, U.S.A.).

El formaldehído empleado en los geles de agarosa era de la firma Fluka (Suiza) y la formamida de la firma Clontech Lab. Inc. (California, U.S.A.).

El reactivo de determinación de proteínas fue suministrado por Bio-Rad, así como el patrón de albúmina.

Los isótopos  $^3\text{H}$ -Timidina,  $^{14}\text{C}$  y  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -PdCTP procedían de Amersham internacional.

Como líquido de centelleo se empleó el Cocktail-22-Normascint de la firma Scharlau Ferosa (España).

### 3.4 Condiciones del animalario y control de la edad gestacional

Los animales se criaban en una habitación cerrada dotada de aire acondicionado y de estufas, con un ritmo de luz-oscuridad de 12h/12h, con la fase de oscuridad entre las 20 y las 8 h, humedad de 45-55 %, temperatura de  $22\pm 2^\circ\text{C}$  y alimentación y bebida "ad libitum".

La edad gestacional se controló limitando a una noche el tiempo de cohabitación de ratas vírgenes con machos de conocida fertilidad y apartando a la mañana siguiente del posible coito a las que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal, considerándose dicha fecha como día primero de la gestación. Un 80 % de las ratas gestantes así obtenidas, si se les permitía llegar al parto, lo hacían entre las 14 y las 16 h del día 22 de gestación.

### 3.5 Obtención de tejido hepático fetal para el cultivo primario

Las ratas gestantes de 20 días fueron sacrificadas por dislocación cervical a primera hora del día 20 de gestación, extrayéndose los fetos por cesárea. Una vez cortado el cordón umbilical, los fetos fueron trasladados a una cabina de flujo laminar para sacrificarlos por decapitación y extraerles posteriormente el hígado, todo ello con material quirúrgico estéril. De cada rata gestante se obtenían aproximadamente 2 g de hígado fetal.

### 3.6 Cultivo primario de hepatocitos fetales de rata

Para el aislamiento de los hepatocitos de feto de rata se ha utilizado el método de Seglen (1976), con las modificaciones necesarias (Roncero, 1987), debido a la imposibilidad de perfundir el hígado fetal. El procedimiento consta de dos pasos: el primero es una preincubación en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que se ha encontrado que la eliminación del ion calcio facilita la separación subsiguiente de las células por la acción de la colagenasa (Seglen, 1972).

El segundo paso consiste en la incubación de los trozos de tejido con una solución salina que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  2,5 mM y colagenasa a la concentración de 0,5 mg/ml. La colagenasa es una enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que la inclusión del mismo durante la incubación, aumenta la actividad enzimática de la colagenasa y acelera la dispersión de las células parenquimáticas (Seglen, 1976).

#### 3.6.1 Soluciones y medios de cultivo

Las soluciones y medios de cultivo han sido preparados en la

campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Asimismo, todas las soluciones y tampones preparados para el cultivo han sido filtrados mediante filtros de nitrocelulosa estériles de 0,2 y 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Durante los procesos de aislamiento de hepatocitos se han utilizado soluciones salinas enriquecidas en  $\text{NaHCO}_3$  (Krebs y Henseleit, 1932). Las concentraciones molares de cada uno de los compuestos en las soluciones eran las siguientes:

-Solución salina libre en  $\text{Ca}^{2+}$ :

$\text{NaCl}$ .....	119 mM
$\text{KCl}$ .....	4,6 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	1,1 mM
$\text{MgSO}_4$ .....	1,1 mM
$\text{NaHCO}_3$ .....	23,6 mM

-Solución salina con  $\text{Ca}^{2+}$ :

$\text{NaCl}$ .....	119 mM
$\text{KCl}$ .....	4,6 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	1,1 mM
$\text{MgSO}_4$ .....	1,1 mM
$\text{NaHCO}_3$ .....	23,6 mM
$\text{CaCl}_2$ .....	2,5 mM

El pH de estas soluciones, que inicialmente se encontraba a un valor de 7,8 se ajustaba a 7,4 mediante el gaseo de la solución en atmósfera de carbógeno, durante 10 minutos antes de su utilización.

Las soluciones salinas se suplementaron con glucosa 5 mM para prevenir la degradación del glucógeno durante el periodo

de aislamiento. Asimismo, se adicionaron antibióticos:

- Penicilina G ..... 120 µg/ml
- Estreptomicina ..... 100 µg/ml
- Gentamicina ..... 50 µg/ml
- Nistatina ..... 4,75 µg/ml

Para el cultivo de los hepatocitos, se ha utilizado Medio 199 (Morgan, 1950) suplementado con glutamina 1 mM y bicarbonato sódico 14 mM. Asimismo, el medio de cultivo se suplementó con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino o un 0,2 % (p/v) de albúmina bovina sérica según las condiciones experimentales.

Para el lavado de las células se utilizó una solución salina de Dulbecco's estéril suplementada con penicilina G, estreptomicina, gentamicina y nistatina a pH 7,4.

Para la recogida de las células se utilizó una solución salina de Dulbecco's libre en calcio y magnesio suplementada con EDTA 20 mM.

### 3.6.2 Aislamiento de hepatocitos

Siguiendo básicamente el método de Roncero (1987), los hígados fetales se troceaban finamente mediante el empleo de tijeras curvas hasta conseguir trozos no mayores de 0,5 mm de grosor. A continuación, se añadía solución salina libre en  $\text{Ca}^{2+}$  (5 ml/g de hígado) suplementada con EGTA 0,5 mM, incubándose (predigestión) durante 10-15 minutos con agitación (80 oscilaciones por minuto) en matraces Erlenmeyer de 150 ml de capacidad, a 37°C, atmósfera de carbógeno y gaseo continuo del mismo.

Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifugaba a 35

x g durante 30 segundos, con el objeto de cambiar de medio y al mismo tiempo eliminar gran parte de los eritrocitos, ya que estos no sedimentaban en gran medida a tan baja velocidad de centrifugación. El precipitado resultante se resuspendía en solución salina con  $\text{Ca}^{2+}$  (5 ml/g de tejido), donde se había incluido colagenasa de alta actividad a la concentración de 0,5 mg/ml. De nuevo, se incubaba (digestión) en las mismas condiciones anteriores y por un tiempo de 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedía a la separación de las células ya aisladas del resto de tejido sin digerir. Para ello, se centrifugaba el material a 35 x g durante 30 segundos, quedando así las células aisladas en el sobrenadante y el resto de tejido sin digerir en el precipitado. El sobrenadante se volvía a centrifugar a 35 x g durante 5 minutos, siendo el sobrenadante recuperado (solución salina con colagenasa) y el precipitado (células aisladas) resuspendido en solución salina. El precipitado del material no digerido era de nuevo incubado en medio con colagenasa durante otros 20 minutos. Esta secuencia de digestión-separación de células aisladas se repetía hasta que todo el tejido inicial estuviera digerido, siendo necesaria normalmente 1 hora total de digestión.

Una vez terminada la digestión, el último digerido de células se filtraba a través de una malla de nylon de 500  $\mu\text{m}$  de poro para eliminar el tejido no digerido. El filtrado se centrifugaba 5 minutos a 35 x g, se aspiraba el sobrenadante, y el precipitado de células se resuspendía en solución salina. Estas células junto con las aisladas en pasos anteriores se filtraban a través de una malla de 100  $\mu\text{m}$  de poro. De nuevo el filtrado se centrifugaba 5 minutos a 35 x g, se aspiraba el sobrenadante, y el precipitado de células aisladas se lavaba con solución salina para eliminar el mayor número de globulos rojos posible. A continuación, las células se resuspendían en

un volumen conocido de medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal de ternera.

Para determinar el número de células y la viabilidad de las mismas, una alícuota de la suspensión final de células se diluía 5 veces en una solución de azul de tripano al 0,2 % (p/v) en NaCl al 0,9 % (p/v). Las muestras se introducían por duplicado en el hemocitómetro y se realizaba el conteo celular. Las células teñidas por el colorante se consideraban no viables. De esta manera se obtuvieron entre 25-30 millones de células por gramo de tejido.

### 3.6.3 Cultivo de hepatocitos

Los hepatocitos fetales de rata han sido cultivados en diferentes condiciones según la finalidad de dichas células.

En primer lugar, los hepatocitos se sembraron a diferentes densidades celulares según si lo que se pretendía era conseguir unas condiciones que favoreciesen la quiescencia o si por el contrario, se buscaba que los hepatocitos proliferasen activamente.

En el primer caso, una vez realizado el conteo de las células, se sembraron  $9-9,5 \times 10^6$  células por placa de cultivo de 100 mm de diámetro, en un volumen final de 7,5 ml de medio de cultivo.

En el segundo caso, se sembraron  $0,8-1,3 \times 10^6$  hepatocitos por placa de cultivo de 60 mm de diámetro, en un volumen final de 2,5 ml de medio de cultivo.

En ambas condiciones, el medio de cultivo fue suplementado con un 10% de suero fetal de ternera. Salvo en algunas condiciones especiales, al medio de cultivo se le adicionaba dexametasona 100 nM para evitar la adherencia y crecimiento de células no hepáticas como fibroblastos.

Tras la siembra, las placas se incubaban a 37°C en un incubador dotado con atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> / 95 % aire / 80 % humedad. A las cuatro horas de cultivo, tiempo necesario para que las células se adhirieran a la placa de cultivo, el medio era renovado aspirándose con una pipeta pasteur estéril conectada a una trompa de vacío. A continuación, las células se sometían a dos lavados consecutivos con 7,5 o 2,5 ml de medio de lavado respectivamente, con el fin de eliminar las células hematopoyéticas y los hepatocitos no adheridos. Posteriormente, las células se cultivaban en medio libre en suero suplementado con albúmina bovina sérica al 0,2 % y hormonas o factores de crecimiento a las siguientes concentraciones:

- dexametasona: 100 nM
- insulina: 40 nM
- noradrenalina: 10 µM
- T<sub>3</sub>: 1 µM
- Vasopresina: 18 nM
- glucagón: 1 µM
- dibutiril AMPc: 0,5 mM.
- Forskolina: 10 µM
- IBMX: 50 µM.
- EGF: 3,3 nM
- IGF-I: 1,4 nM

De esta manera, las células se mantenían durante 16, 40 ó 64 horas según el experimento, renovándose el medio, las hormonas y/o los factores cada 24 horas de cultivo.

### 3.7 Determinación de actividades enzimáticas

Para determinar las actividades enzimáticas de los

hepatocitos, una vez finalizado el tiempo de cultivo se recogían las células de las placas. Para ello, se retiraba el medio y se lavaban las células dos veces consecutivas con solución salina de lavado. A continuación, se añadían 1,5 ml de solución de recogida de células por cada placa de cultivo, y se mantenían las placas en el incubador durante 15 minutos con el fin de despegar las células. Pasado este tiempo, se procedía al raspado de las placas quedando las células en suspensión en el medio. Con una pipeta se pasaba la suspensión a tubos eppendorf y se centrifugaba durante 2,5 minutos a 12.000 rpm. Después de aspirar el sobrenadante, se volvían a añadir 1,5 ml de solución de recogida con el fin de recuperar el mayor número posible de células. De nuevo, con una pipeta se pasaba la suspensión celular a los tubos eppendorf correspondientes y se repetía la centrifugación en las mismas condiciones. Se volvía a aspirar el sobrenadante quedando en el fondo del tubo un precipitado de células que se mantenía a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En ocasiones, era necesario determinar las actividades enzimáticas de muestras de tejido hepático fetal o adulto. Para ello, tras el aislamiento, se lavaba el tejido con una solución de NaCl 0,9 % (p/v) y se alicuoteaba en fracciones de 400-500 mg que podían congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El tejido se introducía en un homogenizador de vidrio y se añadían 4 volúmenes de un tampón de homogenización similar al descrito para las células. Con un pistilo de teflón, se realizaba la homogenización del tejido tras lo cual se centrifugaba a  $12.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. En el sobrenadante obtenido se ensayaban las actividades enzimáticas de manera similar a las células. Al igual que en el caso de las células las muestras debían mantenerse siempre en hielo.

### 3.7.1 Determinación de la actividad PEPCK

Los precipitados de células se resuspendían en 500  $\mu$ l de un tampón de homogenización que contenía: sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y tris 15 mM pH 7,4. A continuación, las células eran sonicadas a 1,5 mA durante 45 segundos, tras lo cual se centrifugaban 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido era la fracción citosólica donde se determinaban las actividades enzimáticas. Las muestras debían mantenerse en hielo durante todo el proceso.

La actividad enzimática de la PEPCK se puede determinar radiométricamente midiendo la incorporación a oxalacetato de  $^{14}\text{C}$  a partir de  $^{14}\text{CO}_3\text{HK}$  y fosfoenolpiruvato potásico según el método descrito por Ballard y Hanson (1967b). La reacción se fuerza en el sentido de la síntesis de oxalacetato añadiendo malato deshidrogenasa que evita que la reacción alcance el equilibrio, al mismo tiempo que estabiliza la radiactividad incorporada.

En cada tubo de reacción las cantidades de sustrato, enzimas y cofactores son: 100  $\mu$ moles de imidazol, 1  $\mu$ mol de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 1  $\mu$ mol de DTT, 50  $\mu$ moles de  $^{14}\text{CO}_3\text{HK}$  (1  $\mu$ Ci), 2  $\mu$ moles de NADH, 1,8  $\mu$ moles de fosfoenolpiruvato potásico, 1,25  $\mu$ moles de IDP y 2,75 unidades de malato deshidrogenasa, todo ello en un volumen final de 1 ml.

La reacción se dispara con 100  $\mu$ l de extracto citosólico de hepatocitos y transcurre en un baño a 37°C con agitación. La reacción se detiene a los 10 minutos con 1 ml de TCA al 10 %. Seguidamente, se gasea con  $\text{CO}_2$  frío durante 3 minutos con el fin de eliminar, por dilución isotópica, el resto de  $^{14}\text{CO}_3\text{H}$  disuelto en el medio de reacción. Finalmente, se valoran radiométricamente 0,5 ml del volumen final con 10 ml de líquido de centelleo en viales de vidrio.

### 3.7.1.1 Determinación de la $K_M$ de la PEPCK

Con objeto de caracterizar la actividad PEPCK en el hígado de rata, se realizaron estudios cinéticos para determinar la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) del enzima frente al sustrato fosfoenolpiruvato. Para ello, se tomaron muestras de tejido hepático de ratas adultas ayunadas 48 horas y se determinó la actividad enzimática PEPCK frente a diversas concentraciones de sustrato según el método descrito anteriormente.

En la figura 4, mediante la representación de Lineweaver-Burk, se calculó la  $K_M$  de la PEPCK con respecto al fosfoenolpiruvato potásico en el tejido hepático de rata, obteniéndose un valor de 0,28 mM. Este dato resultó ser del mismo orden de magnitud que el valor de 0,12 mM descrito para el caso de la PEPCK mitocondrial del hígado de cerdo (Lane y col., 1969).

### 3.7.2 Determinación de la actividad G6PD

Las muestras de células se preparaban tal como se ha descrito para la PEPCK. La actividad G6PD se ha determinado espectrofotométricamente según el método de Sapag-Hagar y col. (1973). Las medidas se realizaban a 37°C y 340 nm de longitud de onda en cubetas de plástico de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz. La mezcla de reacción contenía:  $Cl_2Mg$  5 mM,  $NADP^+$  0,25 mM, 6-fosfogluconato deshidrogenasa 0,3 U, tris 50 mM pH 7,5, y la muestra en un volumen final de 1 ml.

La reacción se iniciaba añadiendo glucosa 6-fosfato a la cubeta y se valoraba la formación de NADPH frente a un blanco donde la glucosa 6-fosfato era omitida. De esta manera se determinaban conjuntamente las actividades G6PD y

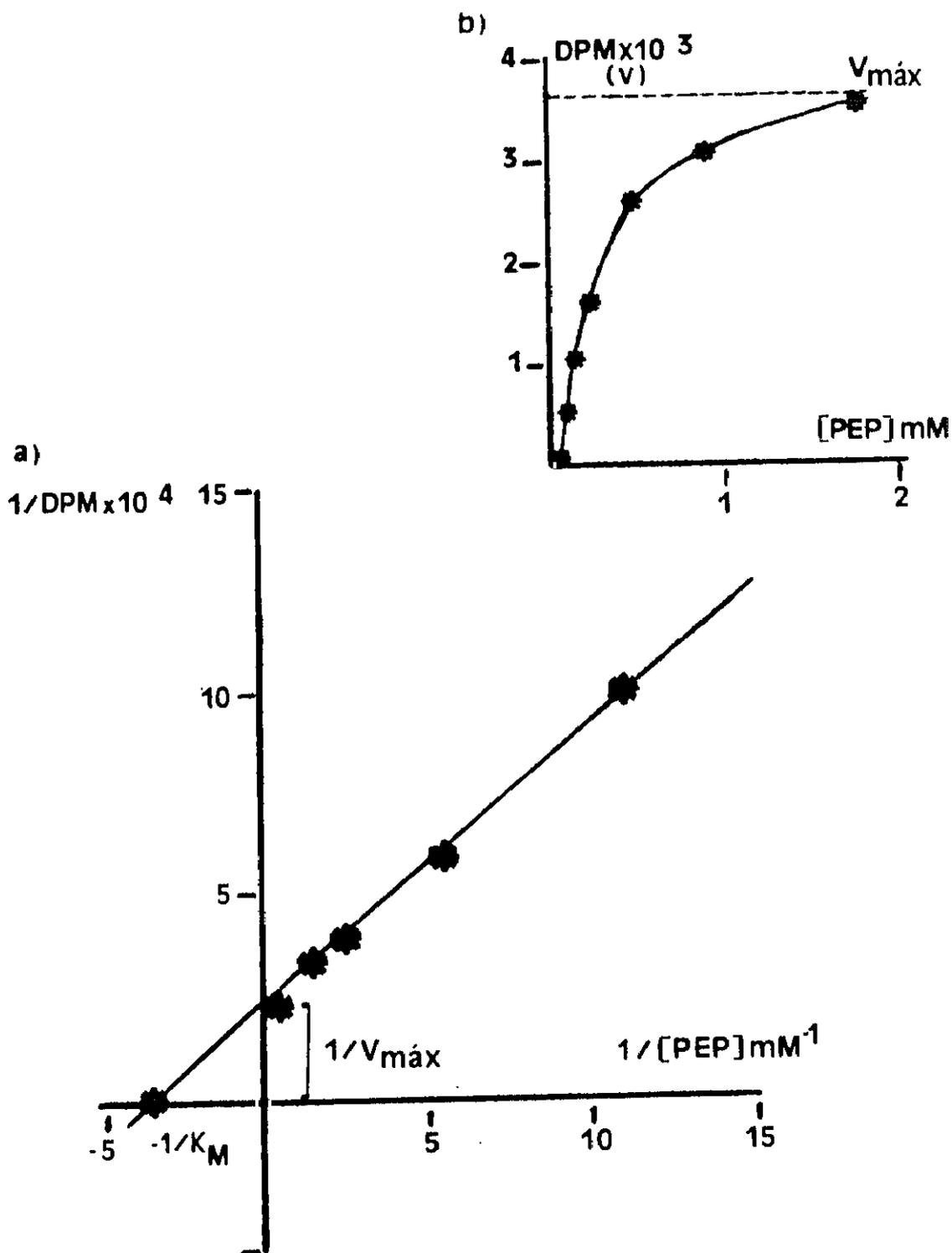


Fig. 4: Cinética de la PEPCK de hígado de rata con respecto al sustrato fosfoenolpiruvato (PEP); a) representación de inversos b) representación de directos.

6-fosfogluconato deshidrogenasa que había sido añadida en exceso a las cubetas, siendo la actividad G6PD la mitad del valor obtenido por este procedimiento, puesto que un 50 % del NADPH originado por reducción del  $\text{NADP}^+$  corresponde a la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato y el otro 50 % a la segunda.

### 3.7.3 Determinación de la actividad EM

La actividad enzima málica de las fracciones citosólicas de las células, se determinó espectrofotométricamente según el método descrito por Ochoa y col. (1948). Las medida de la formación de NADPH se realizaba a  $37^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 340 nm de longitud de onda, en cubetas de plástico de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz. La mezcla de reacción contenía  $\text{MnCl}_2$  1 mM,  $\text{NADP}^+$  0,25M, tris 0,1 M pH 7,4 y la muestra en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba añadiendo malato 1,5 mM a la cubeta y la formación de NADPH se valoraba frente a un blanco donde el malato era omitido.

### 3.7.4. Determinación de proteínas

Las proteínas de las fracciones citosólicas donde se habían medido las actividades enzimáticas se determinaron según el método de Bradford (1976). Los reactivos utilizados fueron:

- albúmina bovina sérica 1 mg/ml
- reactivo Bradford (Bio Rad)

Se construía una curva patrón de proteínas con cantidades crecientes de albúmina comprendidas entre 2,5 y 15  $\mu\text{g}$ , completándose cada muestra patrón con agua hasta 800  $\mu\text{l}$  y con

200  $\mu$ l de reactivo. Las muestras problema se preparaban con agua y reactivo de manera análoga. Una vez agitadas todas las muestras, se dejaban transcurrir 5 minutos y se leían en el espectrofotómetro a 595 nm a temperatura ambiente, obteniéndose así los valores correspondientes a las absorbancias.

Finalmente, se construía una gráfica patrón donde se representaban en ordenadas las absorbancias y en abscisas los  $\mu$ g de proteína. Las absorbancias correspondientes a las muestras eran interpoladas y así se obtenían los mg de proteína totales de las mismas.

### 3.7.5 Expresión de resultados

Las actividades enzimáticas específicas se expresaron en todos los casos como nanomoles de sustrato consumido, o producto aparecido, por minuto y por mg de proteína a la temperatura de la reacción.

Para la PEPCK se define una miliunidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que incorpora 1 nmol de  $\text{CO}_2$  a oxalacetato por minuto a  $37^\circ\text{C}$ .

En el caso de la G6PD y la enzima málica, una miliunidad se define como la cantidad de enzima que forma un nanomol de NADPH por minuto a  $37^\circ\text{C}$ .

Las tablas de actividades enzimáticas específicas se han elaborado utilizando los valores medios  $\pm$  los errores estandar de las medias (S.E.M.).

## 3.8 Inmunodetección de proteínas

En algunas ocasiones, era importante visualizar alguna proteína concreta en las distintas muestras. Para ello, en primer lugar se realizaba una electroforesis de las proteínas

en geles de poliacrilamida para separarlas según sus tamaños. A continuación, se transferían las proteínas del gel a un filtro de nitrocelulosa y con el anticuerpo adecuado se localizaba la proteína de interés.

### 3.8.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (Sambrook, 1989). Los geles se montaban entre cristales de 7-10 cm con espaciadores de 0,75 mm de sección. El gel espaciador se preparaba con acrilamida al 5 % y bisacrilamida al 0,13 % en tampón tris 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,1 % (v/v). El gel separador se preparaba con acrilamida al 8 % y bisacrilamida al 0,22 % en tampón tris 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,06 % (v/v).

Las muestras se preparaban añadiendo un tampón de muestra tres veces concentrado que contenía:

- Tris 150 mM pH 6,8
- DTT 300 mM
- SDS 6 % (p/v)
- Azul de bromofenol 0,006% (p/v)
- Glicerol 30 % (v/v)

Posteriormente se hirvieron a 100°C durante 5 minutos, se pusieron inmediatamente en hielo y posteriormente se cargaron en el gel espaciador. Generalmente se utilizaban entre 40 y 80 µg de proteína por muestra.

El tampón utilizado en el desarrollo de la electroforesis tenía la siguiente composición:

- Tris 25 mM pH 8,3
- Glicina 250 mM
- SDS 0,1 % (p/v)

Para la electroforesis se usó una fuente de alimentación de Bio-Rad, aplicándose primero 125 voltios durante 20 minutos para favorecer el paso de las muestras al gel separador, y después, 100 voltios durante 45-60 minutos. La electroforesis terminaba cuando el azul de bromofenol había salido del gel.

Como patrón de pesos moleculares se empleó una mezcla de proteínas de la firma Bio-Rad formada por proteínas de pesos moleculares entre 21 y 97,4 kDa.

### 3.8.2 Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa

Una vez acabada la electroforesis, se separaba cuidadosamente el gel de los cristales y se colocaba en el sistema utilizado para la transferencia. Este sistema consistía en un soporte de plástico dotado de un cátodo y un ánodo, en el interior del cual se montaba una estructura tipo "sandwich" con el gel y el filtro en el centro. Se utilizó un tampón de transferencia que contenía:

- Tris 25 mM pH 8,3
- Metanol 20 % (v/v)
- Glicina 198 mM

El soporte tenía dos hojas de rejilla de plástico que se abrían y se sumergía la que contenía el cátodo en el tampón citado. Sobre esta hoja se colocaba una esponja tipo "Scotch Brite" empapada en tampón. A continuación, se colocaban encima

dos láminas de papel Whatman nº1 y el gel, todo ello humedecido con tampón. Sobre el gel se colocaba un filtro de nitrocelulosa de tamaño ligeramente superior al gel, el cual había sido previamente sumergido en tampón durante unos minutos. En todo momento había que evitar que quedasen burbujas entre el gel y el filtro. Para terminar, se colocaban otras dos láminas de papel Whatman nº1 y otra esponja, se cerraba el sistema con la hoja que contenía el ánodo, y se sumergía todo en una cubeta con tampón de transferencia.

La transferencia se realizaba conectando la cubeta a la fuente eléctrica Bio-Rad y fijando la intensidad de la corriente a 250 mA durante toda la noche. Para evitar el calentamiento del sistema, se utilizaba un sistema de refrigeración alrededor de la cubeta.

Una vez terminada la transferencia, se estimaba la eficiencia del proceso mediante la tinción reversible de las proteínas con Ponceau S diluído 1/10 durante 2 minutos, y lavando posteriormente con agua destilada para eliminar el colorante no fijado. Así, se visualizaban las bandas de las proteínas transferidas.

### 3.8.3 Inmunodetección de las proteínas

En primer lugar se realizaba el bloqueo o saturación de todos los sitios de unión específica a proteínas del filtro. Para ello, se sumergía el filtro durante 1 minuto en tampón TBS 1 x y después se incubaba durante 1 hora con agitación suave en tampón "Blotto". El tampón TBS se preparaba 10 veces concentrado y estaba compuesto de NaCl 2 M y tris 0,5 M pH 7,4. A su vez, el tampón "Blotto" contenía: 5 g de leche desnatada en polvo, 10 ml de tampón TBS 10 x y 5 mg de Acida sódica, completándose el volumen con agua hasta 100 ml.

A continuación, se procedía a la incubación del filtro con el primer anticuerpo. En nuestro caso, se utilizó una  $\gamma$ -globulina anti enzima málica (Valverde, 1991) con un título de 0,25 mU/ $\mu$ l. La incubación se prolongaba durante dos horas con agitación suave. Transcurrido este tiempo, el filtro se lavaba una vez con TBS 1 x durante 1 minuto y 3 veces con Blotto suplementado con Tritón X-100 0,25 % (v/v) y SDS 0,05 % (p/v) durante 5 minutos. Después se lavaba de nuevo con TBS 1 x 3 veces durante 1 minuto.

Entonces, se realizaba una incubación con un segundo anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas G de conejo, el cual estaba conjugado con la fosfatasa alcalina. Este anticuerpo se añadía al filtro en proporción 1/3000 (v/v) en Blotto y se realizaba una incubación en las mismas condiciones que con el primer anticuerpo.

Finalizada la incubación, se realizaban los mismos lavados que en el caso del primer anticuerpo, y se procedía al revelado del filtro con un sistema de Bio Rad que desarrollaba color en las muestras al reaccionar con la fosfatasa alcalina. La reacción se paraba lavando con agua destilada y el filtro se dejaba secar para su posterior cuantificación en el videodensitómetro.

### 3.9 Medida de la síntesis de DNA en hepatocitos en cultivo

La medida de la síntesis de DNA se ha realizado según el método descrito por Mosley y col. (1981). Una vez cultivados los hepatocitos en las distintas condiciones experimentales, se retiraba el medio de cultivo y tras dos lavados consecutivos se añadía medio fresco suplementado con hormonas o factores de crecimiento y 0,2  $\mu$ Ci/ml de  $^3$ H-timidina. En estas condiciones, se mantenían las células durante las 4 últimas horas de

cultivo.

Finalizado este tiempo, se retiraba el medio y las placas se volvían a lavar dos veces. A continuación, se añadía 1 ml de ácido tricloroacético al 10 % (v/v) por placa de cultivo y las placas se mantenían durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente se retiraba el ácido tricloroacético y se lavaban las placas dos veces con etanol al 70 % (v/v) dejándose secar posteriormente. Por último, se añadía a cada una de las placas 1 ml de una solución que contenía NaOH 0,1 N, carbonato sódico 2 % (p/v) y SDS 1 % (p/v), se incubaban a 37°C durante 20 minutos y se contaban alícuotas de 100 ul en el contador de centelleo.

### 3.10 Contaje de células de las placas de cultivo y estudio del ciclo celular

Para determinar el número de células contenidas en cada placa de cultivo se empleó la técnica de citometría de flujo. Para la realización del ensayo, una vez finalizado el periodo de cultivo las placas se sometían a dos lavados consecutivos. Posteriormente, se añadían 0,5 ml de una solución que contenía tripsina 0,05 %-EDTA 0,02 % (Laboratorios Flow) para despegar las células de la superficie de cultivo. Las placas se mantenían en el incubador a 37°C durante 3-4 minutos, y posteriormente, se añadían 2,5 ml de medio de cultivo suplementado con suero fetal al 10 % con objeto de parar la acción de la tripsina. De esta manera, se obtenía una suspensión de células que se centrifugaba a 800 rpm durante 5 minutos. El precipitado de células se resuspendía en solución salina de lavado y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendían en 1 ml de medio de lavado y se realizaba el contaje en el citómetro de flujo (Beckton-Dickinson).

Paralelamente, con una alícuota de 100  $\mu$ l de la suspensión celular se realizaba el estudio del ciclo celular. En primer lugar, las células se sometían a tratamiento con tripsina con objeto de facilitar la disgregación celular y la solubilización de las membranas. A continuación, se paraba la acción de la tripsina y se trataban las células con RNAsa para digerir el RNA. Finalmente, se añadía ioduro de propidio y las muestras se analizaban en el citómetro de flujo con objeto de determinar el porcentaje de células que se encontraban en cada fase del ciclo celular.

### 3.11 Determinación del contenido en DNA

La determinación del contenido en DNA se realizaba por el método fluorimétrico de Labarca y Paigen (1980), basado en la interacción específica del colorante Hoersch (bisbenzimidá 50  $\mu$ g/ml) con el DNA.

El precipitado de células se resuspendía en 0,5 ml de tampón que contenía: NaCl 2 M, EDTA 2 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, a un pH de 7,4. A continuación, las muestras se sonicaban durante 45 segundos a 1,5 mA de intensidad. Durante todo el proceso las muestras se mantenían en hielo.

Para el ensayo fluorimétrico se tomaban alícuotas de las muestras de 25, 50 y 100  $\mu$ l por duplicado, y se añadían a tubos de reacción que contenían el mismo tampón pero sin EDTA junto con 50  $\mu$ l del colorante Hoersch en un volumen final de 1 ml. Las longitudes de onda a las que se realizaba el ensayo eran 356 nm, como longitud de onda de excitación, y 458 nm, como longitud de onda de emisión.

La curva patrón de DNA se preparaba con DNA purificado de timo de ternera a concentraciones de 0,5, 1, 2,5, 5, 7 y 10  $\mu$ g/ml de DNA. Este DNA patrón se preparaba a una concentración

de 0,5 mg/ml en agua estéril, ajustándose posteriormente la concentración a 75 µg/ml mediante la medida de la densidad óptica a 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica equivale a 50 µg de DNA.

### 3.12 Aislamiento de los cDNAs

Las bacterias en cuyos plásmidos estaban insertados los distintos cDNAs se conservaban a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un tampón que contenía: tris 0,01 M,  $\text{MgCl}_2$  0,01 M y glicerol al 50 % (v/v).

El cDNA de la PEPCCK de tamaño 0,9 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para el enzima de restricción Pst I en el plásmido pPCK10 de tamaño 6,9 kb. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr. R. W. Hanson (School of Medicine, Cleveland, Ohio, U.S.A.).

El cDNA de la enzima málica de tamaño 1 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para el enzima de restricción Eco RI en el plásmido pUC 13-JM103 de tamaño 2,7 kb. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por la Dra. V. Nikodem (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.)

El cDNA de la G6PD de tamaño 2,4 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI del plásmido Pks (blue script) de 3 kb. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr Ye-Shih Ho (Duke University Medical Centre, Durham, North Caroline, U.S.A.).

El cDNA de la  $\beta_2$ -microglobulina de tamaño 0,9 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI y Hind III del plásmido pGEM. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr. Soprano (Philadelphia, U.S.A.).

El cDNA de la  $\beta$ -actina de tamaño 0,9 kb se encontraba

insertado en un lugar de corte para Hind III en el plásmido pBR322. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr. E. Santos (National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.).

### 3.12.1 Crecimiento de las bacterias

Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB que contenía:

- 10 g de bacto-triptona
- 10 g de NaCl
- 5 g de bacto-yeast

todo ello en un volumen final de 1 litro. El medio se ajustó a pH 7 y posteriormente se esterilizó en autoclave. Este medio siempre se suplementaba con el antibiótico al cual la bacteria que contenía el plásmido de interés era resistente. En este caso, todas las bacterias utilizadas eran resistentes a ampicilina (100 µg/ml) excepto la correspondiente a la PEPCK que era resistente a tetraciclina (10 µg/ml).

En primer lugar, con el asa de platino se hacía un preinóculo en un tubo de vidrio estéril que contenía 5 ml de medio LB. Una vez realizada la siembra, los tubos se mantenían en agitación suave constante toda la noche en un baño a 37°C. A la mañana siguiente, cuando habían crecido las bacterias, se inoculaban 3 ml del preinóculo en 100 ml de medio LB, y se incubaba a 37°C con agitación rápida durante 6-8 horas, hasta que la lectura de la DO a 600 nm fuera de 0,6. A continuación, se añadía a la suspensión de bacterias medio LB nuevo hasta 500 ml, y se incubaba toda la noche a 37°C con agitación rápida. A la mañana siguiente, cuando la lectura de la densidad óptica se había

duplicado, se centrifugaba el contenido de los matraces a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall (rotor GSA). Se eliminaba el sobrenadante por aspiración, y las bacterias que habían quedado en el fondo del tubo se lavaban con tampón TES estéril que contenía: EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y tris 50 mM a pH 7. A continuación, se volvía a centrifugar en las mismas condiciones eliminándose de nuevo el sobrenadante.

### 3.12.2 Obtención de los DNAs plasmídicos

Para la extracción de DNA plasmídico se han utilizado columnas Paack-500 y Tip-500 (Quiagen, Alemania) indistintamente. El proceso de extracción, comenzaba con una lisis bacteriana alcalina. Para ello, se resuspendía el precipitado de bacterias en 10 ml de tampón P<sub>1</sub>-RNAsa que contenía: EDTA 10 mM, tris 50 mM pH 8 y RNAsa (400 µg/ml), y se añadían 10 ml de tampón P<sub>2</sub> que contenía: NaOH 0,2 M y SDS al 1% (p/v), invirtiendo el tubo varias veces para que se mezclara todo adecuadamente. Después, se dejaba en reposo 5 minutos a temperatura ambiente y se añadían 10 ml de tampón P<sub>3</sub>, que contenía acetato potásico 2,55 M. Se mezclaba todo rápidamente para evitar la precipitación del SDS, hasta que la solución era viscosa y turbia. Entonces, se centrifugaba a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C obteniéndose un sobrenadante que se aplicaba a la columna.

El equilibrado de la columna se realizaba cargando una jeringa estéril de 5 ml, previamente acoplada a la columna, con tampón QB que contenía: NaCl 750 mM, MOPS 50 mM y etanol al 15% (v/v) pH 7, y forzando el paso con un émbolo hasta conseguir un flujo constante de 1-2 gotas por segundo.

La muestra se cargaba en la jeringa con una pipeta estéril y se hacía pasar con un flujo de una gota cada 1-2 segundos. A

continuación, la columna se lavaba 2 veces con 10 ml de tampón QC que contenía: NaCl 1 M, MOPS 50 mM y etanol al 15% (v/v) pH 7, con un flujo de 1-2 gotas/segundo.

La elución del DNA se realizaba con 5 ml de tampón QF que contenía: NaCl 1,2 M, MOPS 50 mM y etanol al 15% (v/v) pH 8, con un flujo de 1 gota/1-2 segundos.

El DNA eluido se precipitaba con 0,8 volúmenes de isopropanol y se centrifugaba a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado de DNA se dejaba secar y se resuspendía en tampón TE que contenía EDTA 1 mM y tris 10 mM pH 8 conservándose a -20°C.

En el caso de la columna Tip-500, el flujo era regulado por la propia columna que se equilibraba con un tampón QB suplementado con tritón al 0,15 %.

### 3.12.3 Digestión del DNA plasmídico

La digestión del DNA plasmídico que contenía insertado el cDNA de la PEPCK se realizaba con la enzima de restricción Pst I. En el caso de los DNAs plasmídicos que contenían los cDNAs para G6PD y enzima málica, se realizaba con la enzima de restricción Eco RI. La digestión del DNA plasmídico que contenía el cDNA de la  $\beta_2$ -microglobulina se realizaba con Eco RI y Hind III. Para el plásmido que contenía el cDNA de la  $\beta$ -actina se utilizó la enzima Hind III.

La reacción se realizaba en tubos eppendorf a los que se añadía el DNA plasmídico, tampón de digestión 10 x y la enzima o enzimas según el caso, teniendo en cuenta que una unidad de actividad de enzima de restricción se define como la cantidad de enzima capaz de digerir 1  $\mu$ g de DNA durante una hora a 37°C. La reacción se realizaba en un baño a 37°C y una vez finalizada la digestión se paraba calentando la muestra durante 1-2

minutos a 95-100°C. A continuación, las muestras se ponían inmediatamente en hielo.

#### 3.12.4 Electroforesis de los DNAs en geles de agarosa

Para poder comprobar si la digestión de los DNAs plasmídicos había sido completa se tomaban alícuotas de las muestras digeridas y se sometían a electroforesis en geles de agarosa al 0,7 % (p/v).

Los geles se preparaban fundiendo la agarosa en un horno microondas en tampón TAE 1 x y bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El tampón se preparaba a partir de una solución 50 veces concentrada que contenía por litro: 242 g de tris, 57,1 ml de acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8. Una vez fundida la agarosa se dejaba enfriar hasta alcanzar una temperatura de 60°C y se añadía lentamente a la cubeta evitando la formación de burbujas.

Las muestras se preparaban en tubos eppendorf a los cuales se añadía el DNA digerido en tampón que contenía: azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xileno cianol 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v).

Para poder conocer el tamaño y cantidad de los cDNAs, se utilizaba un marcador que consistía en DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III, poniéndose carriles de 0,5 ó 1 µg. A continuación, se cargaban las muestras en el gel y se cubría con tampón de electroforesis (TAE 1 x) suplementado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) hasta que el gel quedaba totalmente sumergido en el tampón. La electroforesis se realizaba a un voltaje de 50-60 voltios durante 2-3 horas.

Una vez finalizada la electroforesis el gel se exponía a la luz ultravioleta y se podían visualizar los distintos

fragmentos de DNA.

### 3.12.5 Electroelución de los cDNAs

El proceso de electroelución comenzaba con la electroforesis del DNA plasmídico digerido en geles de agarosa al 0,7 % tal como se ha descrito previamente. A continuación, los geles se observaban a la luz ultravioleta en el transiluminador y se procedía a realizar una incisión por la parte superior y otra por la parte inferior de las bandas correspondientes a los distintos cDNAs. Una vez delimitadas las posiciones de las bandas, y ya sin necesidad del transiluminador, se daban cortes laterales y se extraían las bandas del gel con ayuda de unas pinzas Millipore. Además, en cada banda de un mismo cDNA, se daba un corte en diagonal en uno de los extremos. Previamente, se habían preparado y esterilizado unos tubos eppendorf agujereados en su parte inferior que contenían una bolita de papel Whatman GF/C (microfibras de vidrio) y que a su vez, estaban introducidos en otros tubos eppendorf sin agujerear. Cada banda se introducía en uno de estos tubos por el extremo acabado en punta, se cerraban los eppendorfs y se mantenían a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron 15 minutos a  $12.000 \times g$  a temperatura ambiente, pero con mucho cuidado de que no diese tiempo a que la muestra se descongelase en el traslado del congelador a la centrífuga. Tras la centrifugación, los cDNAs se encontraban en la solución que había pasado del eppendorf superior al inferior, mientras que los restos de agarosa habían quedado retenidos en el papel del eppendorf superior. La solución que contenía el cDNA se precipitaba con un 10 % (v/v) de acetato sódico 3 M pH 5,35 y 3 volúmenes de etanol durante 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o durante 1 hora a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Después, se centrifugaba 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminaba

el sobrenadante y el precipitado (cDNA) se lavaba con etanol al 70 % (v/v). Una vez eliminado el etanol, el cDNA se resuspendía en tampón TE que contenía tris 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8.

Para poder calcular la cantidad de cDNA recuperado, se corría un gel de agarosa al 0,7 % con una alícuota de 1 µl de cDNA electroeluido. Una vez valorados, los distintos c-DNAs se conservaban a -20°C.

### 3.13 Aislamiento del RNA de las placas de cultivo

Para la extracción del RNA de las placas de cultivo se ha seguido el método descrito por Chomzynski y Sacchi (1987). Una vez finalizado el periodo de cultivo en estudio, se procedía al lavado de las placas de cultivo 2 veces consecutivas con solución salina de lavado. Esta solución, se encontraba en botellas de vidrio tratadas a 180°C durante 8 horas, y el agua utilizada para su preparación, se había tratado con DEPC (0,1 % v/v) durante 30 minutos tras los cuales se había autoclavado. Asimismo, se siguió este mismo tratamiento con todo el material de vidrio y el agua empleados en los experimentos de RNA con objeto de eliminar las RNAsas responsables de la degradación del mismo.

Una vez lavadas las placas de cultivo, se añadía 1 ml de reactivo RNazol (Cinna/Biotex, Texas, U.S.A.) por placa. Este reactivo era una mezcla de tiocianato de guanidina, fenol y 2-mercaptoetanol. El RNA se solubilizaba en el medio con una pipeta con punta de plástico estéril y se pasaba a tubos eppendorf estériles (1 ml/tubo) que se mantenían constantemente en hielo. A continuación, se añadían 0,1 ml de cloroformo (cloroformo : alcohol isoamílico, 24:1) por cada tubo eppendorf, se agitaban las muestras durante 30 segundos y se mantenían en hielo durante 15 minutos. Entonces, se

centrifugaban los tubos a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C visualizándose dos fases en cada tubo. La fase inferior fenol-cloroformo contenía el DNA, mientras que el RNA se encontraba en la fase superior acuosa. Asimismo, se apreciaba una interfase opaca que contenía la fracción proteica. La fase superior se pasaba a otro tubo donde se precipitaba con un volumen igual de alcohol isopropílico durante 30 minutos a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaban las muestras a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C, observándose un precipitado blanco de RNA en el fondo del tubo. El sobrenadante se retiraba y el precipitado de RNA se lavaba añadiendo 1 ml de alcohol etílico al 75 % (v/v) por tubo. En este punto, el RNA se podía almacenar a -20°C, o bien, se centrifugaba a 12.000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente, se eliminaba el etanol completamente y el precipitado de RNA se resuspendía en EDTA 1 mM pH 7 tratado previamente con DEPC. En este caso, las muestras de RNA se mantenían a -80°C hasta su posterior procesamiento.

### 3.14 Aislamiento de RNA de muestras de tejidos

Para la extracción de RNA de muestras de tejido hepático se siguió el mismo método descrito para las células en cultivo con ligeras modificaciones.

Una vez aislado el tejido se lavaba con solución salina y se dividía en alícuotas que se podían conservar en nitrógeno líquido sin que se degradase el RNA celular. Se tomaba una muestra de 5-50 mg de tejido y se introducía en un tubo de plástico estéril al que se añadían 4 ml de reactivo RNAzol. Posteriormente, se realizaba la homogenización del tejido por medio de un mezclador Ultra-Turrax cuyo vástago había sido previamente introducido 3-4 horas en NaOH 0,4 N y 12 horas en

agua tratada con DEPC. Tras la homogenización, se seguían los mismos pasos que en el caso de las células salvo que la precipitación con isopropanol se prolongaba durante 3 horas. De igual manera, se debían extremar las precauciones para que las muestras siempre estuviesen en hielo o a 4°C durante todo el proceso de aislamiento.

### 3.15 Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehído

Una vez extraído el RNA de las placas de cultivo en las distintas condiciones experimentales, se procedía a realizar la electroforesis según el método descrito por Sambrook (1989) con algunas modificaciones.

Se preparaba un gel con 0,9 g de agarosa que se fundía en un horno microondas en 85 ml de agua estéril tratada con DEPC y 10 ml de un tampón de electroforesis 10 veces concentrado (MOPS 10 x) que contenía: MOPS 0,2 M, acetato sódico 80 mM y EDTA 10 mM pH 7. Una vez fundida la agarosa, se dejaba enfriar hasta 60°C tras lo cual se añadía formaldehído al 37 % hasta una concentración de 0,66 M. El gel así preparado se añadía lentamente a la cubeta de electroforesis, dejándose solidificar en una campana extractora de gases debido a la toxicidad de los vapores de formaldehído que se desprendían.

Las muestras de RNA se preparaban precipitando 20 ug de RNA en tubos eppendorf con 1/10 (v/v) de acetato sódico 3 M pH 5,35 y 3 volúmenes de etanol durante toda la noche a -20°C, o bien, durante 1 hora a -80°C. A continuación, los tubos se centrifugaban a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C y, tras aspirar el sobrenadante, el precipitado se lavaba con etanol al 70 % (v/v), volviéndose a centrifugar a 12.000 x g durante 8 minutos. Después de secar el precipitado, se resuspendía en 10 µl de agua o EDTA 1 mM pH7 y se añadían 24 µl de un tampón que

contenía por ml: 500 µl de formamida desionizada, 100 µl de tampón MOPS 10 x, 160 µl de formaldehído al 37 %, 80 µl de glicerol al 87 % (p/v), 50 µl de azul de bromofenol al 0,1 % (p/v) y 110 µl de agua. Además, se añadía 1 µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) a cada muestra con el fin de poder observar posteriormente al ultravioleta la marcha de las mismas en el gel. Las muestras se incubaban a 65°C durante 15 minutos y a continuación se ponían inmediatamente en hielo. Finalmente, se cargaban las muestras en el gel, el cual se encontraba en la cubeta sumergido en tampón de electroforesis MOPS 1 x. La electroforesis se realizaba a 40-50 voltios durante 3-4 horas. En estas condiciones el azul de bromofenol se había desplazado unos 8 cm de los pocillos en los cuales se habían depositado las muestras.

### 3.16 Transferencia de los RNAs a filtros de nylon: Vacuum-Blot

La transferencia de los RNAs a filtros de nylon por medio de la técnica del Vacuum-Blot consistía en forzar el paso de los RNAs del gel a un filtro de nylon por medio del vacío. Para ello, se utilizó un aparato de Pharmacia que constaba de una superficie porosa y sobre ella una lámina de plástico no porosa denominada máscara, ambas ajustadas en una cubeta conectada a una bomba de vacío. En el centro de la máscara, se había recortado un trozo de forma similar al gel pero unos milímetros más pequeño por los bordes. A través de este hueco se ejercía el vacío posteriormente.

Antes de iniciar el montaje de la transferencia, se preparaba un tampón 20 veces concentrado (SSC 20 x) que contenía 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato sódico, disueltos en 1 litro de agua estéril tratada con DEPC. El tampón se ajustaba a pH 7 y posteriormente se autoclavaba. Además, se recortaba un filtro

de nylon del mismo tamaño que el gel y se hidrataba sumergiéndolo durante 5 minutos en agua estéril y a continuación otros 5 minutos en tampón SSC 20 x.

Una vez finalizada la electroforesis, se colocaba el filtro sobre el hueco de la máscara procurando que lo cubriera completamente, y sobre él, se ponía el gel de tal manera que no quedasen burbujas entre ambos. Asimismo, los pocillos del gel debían quedar fuera del hueco de la máscara. De esta manera, se delimitaba la superficie a través de la cual se ejercía el vacío. Entonces, se cubría con tampón SSC 10 x la superficie del gel y se aplicaba una presión absorbente mediante la bomba de vacío.

Se dejaba transferir el gel durante 2,5-3 horas, tras lo cual, se desmontaba el sistema y se procedía a la unión covalente del RNA transferido al filtro. Para ello, se exponía el filtro durante 7 minutos a la luz ultravioleta (254 nM) a 15 cm de distancia de la superficie del mismo. Después, el filtro se introducía en una carpeta de papel Whatman 3MM y se secaba en estufa a 60°C durante 1 hora. Así, el filtro quedaba ya listo para realizar la hibridación.

### 3.17 Ensayo de Dot-Blot

En algunos casos se empleó la técnica del Dot-Blot para fijar RNA celular a filtros de nylon puesto que este método permitía incluir mayor número de muestras diferentes en un mismo filtro. El RNA de las células en cultivo, se extraía tal como se ha descrito previamente, y para el ensayo se preparaban muestras de 8 ug de RNA por triplicado de cada condición, a las que se añadían 100 ul de tampón SSC 10 x/muestra. Se utilizó un aparato de Bio-Rad en el que se introducía un papel Whatman 3 MM empapado en tampón SSC 6 x, sobre el cual, se colocaba un

filtro de nylon que había sido previamente tratado con agua estéril y tampón SSC 6 x. Para lavar los pocillos donde posteriormente se iban a aplicar las muestras, se añadían 100 µl de SSC 6 x/pocillo y se hacía que atravesaran el filtro y el papel con la ayuda del vacío. Las muestras, se calentaban durante 15 minutos a 65°C, se ponían inmediatamente en hielo, se aplicaban a los pocillos, y se forzaba su paso a través del nylon por medio del vacío. En estas condiciones, los RNAs se fijaban al filtro. A continuación, se lavaban de nuevo los pocillos, se abría el aparato y se sacaba el filtro. Para unir el RNA covalentemente al filtro, éste se exponía a la luz ultravioleta (254 nm) durante 5 minutos a 15 cm de su superficie. Después, el filtro se dejaba secar una hora a 60°C en la estufa dentro de una carpeta de papel Whatman 3MM. Así el filtro quedaba listo para la hibridación como en el caso anterior.

### 3.18 Marcaje radiactivo de los cDNAs

En todos los experimentos, los cDNAs se marcaron radiactivamente por el método de "Multiprimer DNA labelling", comercializado por Amersham. En primer lugar, se procedía al tratamiento de los cDNAs (50 ng) a 95-100°C en tubos eppendorf durante 2 minutos con objeto de producir la desnaturalización del DNA. A continuación, las muestras se ponían inmediatamente en hielo, evitando así la renaturalización. La reacción se iniciaba añadiendo a los tubos los siguientes reactivos:

- solución 1 (mezcla de nucleótidos no marcados)...10 µl
- solución 2 (primer BSA).....5 µl
- <sup>32</sup>α-P dCTP.....50 µCi
- DNA polimerasa (fragmento Klenow).....2 µl

La reacción se realizaba a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Transcurrido este tiempo, la muestra se pasaba por una columna de Sephadex G-50 de 10 cm de longitud, que había sido empaquetada y equilibrada con tampón NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,1 % (p/v) y tris 50 mM pH 7,5 estéril. Una vez cargada la muestra en la columna, esta se centrifugaba a 1.500 rpm durante 4 minutos. La muestra eluida contenía los cDNAs marcados, quedando retenida en la columna la radiactividad no incorporada. Finalmente, una alícuota del eluido se valoraba en el contador de centelleo.

### 3.19 Prehibridación e hibridación de los filtros de nylon

Para la prehibridación e hibridación de los filtros, se ha seguido el método descrito por Amasino (1986).

Para ello, los filtros de nylon que contenían los RNAs transferidos, se introducían en bolsas de plástico a las que se añadían 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de solución de prehibidación que contenía: formamida desionizada 50 % (v/v), DNA de esperma de salmón 100 µg/ml, SDS al 7% (p/v), EDTA 1 mM, NaCl 250 mM y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 250 mM pH 7,2, completándose a 100 ml el volumen con agua tratada con DEPC.

Una vez introducida la solución en las bolsas de plástico, estas se sellaban con una selladora eléctrica, y a su vez, se introducían en una segunda bolsa de plástico que también quedaba completamente sellada. A continuación, se introducían en un baño a 42<sup>o</sup>C durante 2-4 horas.

Transcurrido el periodo de prehibridación, se abrían las bolsas, se retiraba la solución de prehibridación, y se volvía a añadir un volumen igual de la misma solución fresca a la que se había incorporado el cDNA marcado a razón de  $2 \times 10^6$  DPM/ml.

Este cDNA marcado, se había desnaturalizado previamente calentándolo a 95-100°C durante 10 minutos e introduciéndolo inmediatamente en hielo. Después, las bolsas se volvían a sellar y se ponían en el baño a 42°C durante 24 horas. Entonces, se abrían las bolsas, se eliminaba el líquido radioactivo, y el filtro se lavaba con una solución que contenía SSC 2 x y SDS al 0,1 %. En concreto, se realizaban 2 lavados a temperatura ambiente y a continuación un lavado de 20 minutos a 42°C con agitación. Si la señal radioactiva era muy fuerte, se hacían nuevos lavados con solución fresca a 45-50°C. Después, el filtro se colocaba en un cassette de autorradiografía para ser expuesto bajo un film de rayos X de la marca Kodak X-AR Omat a -70°C.

### 3.20 Revelado de las autorradiografías

El primer revelado de las autorradiografías se realizaba transcurridas 12 horas de exposición. El film se trataba durante 3 minutos con solución reveladora, a continuación se sumergía 30 segundos en agua para eliminar los restos de esta solución, y finalmente se trataba durante 5 minutos con solución fijadora. Según la señal que se observase, los filtros se exponían nuevamente durante más o menos tiempo.

### 3.21 Rehibridación de los filtros de nylon

Una vez realizada la hibridación y el revelado de un filtro de nylon, dicho filtro podía volver a hibridarse con otro cDNA diferente eliminando previamente la marca radioactiva anterior. Para ello, se preparaba una solución que contenía Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5-8 y SDS al 1 % (p/v), y se hervía en ella el filtro durante 20-30 minutos. Después, se exponía el filtro

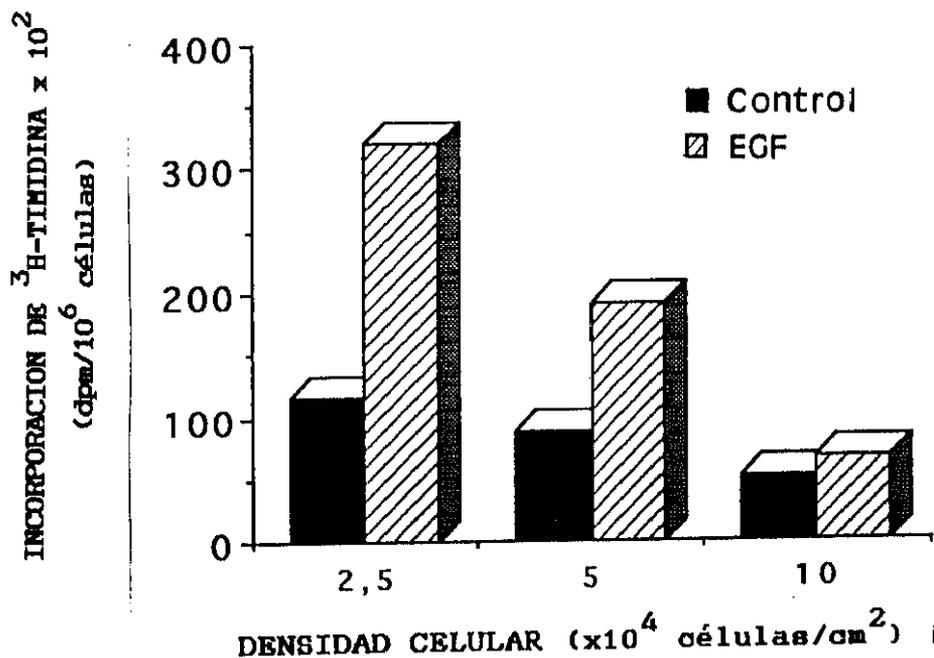
bajo un film de rayos X para comprobar que la marca radiactiva anterior había desaparecido, tras lo cual, el filtro podía volver a ser hibridado. En caso contrario, se hervía de nuevo el filtro con solución fresca con SDS al 3-5 % (p/v).

## **IV.-RESULTADOS Y DISCUSION**

#### 4.1 PROLIFERACION DE HEPATOCITOS FETALES EN CULTIVO PRIMARIO: EFECTO DE LAS HORMONAS Y LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

La puesta a punto de un sistema que favorezca la proliferación de los hepatocitos fetales de rata de 20 días de gestación en respuesta a hormonas y factores de crecimiento se centró en dos puntos básicos: densidad celular y tiempo de cultivo en presencia de los supuestos agentes mitogénicos. Para estudiar ambas variables, tras el proceso de aislamiento los hepatocitos se sembraron en medio suplementado con suero fetal al 10 % a tres densidades celulares crecientes ( $2,5$ ,  $5$  y  $10 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), y tras 4 horas de adherencia al plato, se mantuvieron en ausencia de suero y presencia del factor EGF durante las 16, 40 ó 64 horas subsiguientes. Por otro lado, durante todo el periodo de cultivo el medio se suplementó con dexametasona 100 nM para evitar el crecimiento de células no deseadas (Lefert y col., 1972), y prolongar la supervivencia de los hepatocitos en ausencia o presencia de factores de crecimiento u hormonas (Hoffmann y col., 1989). En estas condiciones, los valores máximos de incorporación de timidina tritiada, frente a células control sin tratar, se obtienen en los platos con menor densidad celular y a las 64 horas de cultivo en presencia de EGF (fig. 5).

Por ello, dado que las funciones relacionadas con el crecimiento se estimulan a bajas densidades celulares, y alcanzan valores muy significativos tras 64 horas de cultivo, para los experimentos que a continuación se detallan se escogió la densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y el tiempo de 64 horas, siempre en presencia de dexametasona.



**Fig. 5:** Influencia de diferentes densidades celulares sobre la síntesis de DNA en respuesta a EGF. Las células se sembraron a tres densidades celulares crecientes (2,5 , 5 y 10  $\times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) en medio suplementado con suero fetal al 10 %, y se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) en ausencia de suero y en presencia o ausencia de EGF. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina se midió en las 4 últimas horas de cultivo. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM (n=4-6) y representan las DPM por 10<sup>6</sup> células.

#### 4.1.1 Incorporación de $^3\text{H}$ -timidina y contenido en DNA

El cultivo primario de los hepatocitos fetales en presencia de suero fetal al 10 % produce una estimulación de 3 veces en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en comparación con células no tratadas (tabla 1); este dato se consideró como un control positivo de la proliferación celular.

Cuando se añade EGF al medio de cultivo, se obtiene un incremento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina de cuatro veces frente a las células no tratadas.

También se investigó el efecto de la insulina (40 nM), el IGF-I (1,4 nM), la vasopresina (18 nM) y el glucagón (1  $\mu\text{M}$ ) en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los cultivos. Estos factores individualmente no modifican la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina observada en células no tratadas (tabla 1). La combinación de estos factores con EGF no supera en ningún caso la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina producida por el EGF en solitario (tabla 1).

La presencia de forskolina (10  $\mu\text{M}$ ), un activador directo de la adenilato ciclasa, junto con isobutil-1-metilxantina (IBMX) (50  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, no modifica la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, la forskolina junto con el IBMX disminuye la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en hepatocitos estimulados con EGF hasta casi a los niveles observados en células no tratadas (tabla 1).

Paralelamente, se valoró el contenido de DNA a las 64 horas de cultivo en las diferentes condiciones experimentales (tabla 2). En las células sin tratar, se observa una buena correlación entre el contenido de DNA y el número de células con un valor de  $27,6 \pm 3,0 \mu\text{g}$  de DNA/ $10^6$  células; esto indica que la densidad celular en ausencia de suero o señales, con la única

<u>Adición</u>	<u>Incorporación de <sup>3</sup>H-timidina</u> (porcentaje)	
	—	EGF (3,3 nM)
Control .....	100	416 ± 30
Glucagón (1 µM) .....	112 ± 20	416 ± 23
Insulina (40 nM) .....	119 ± 60	432 ± 49
IGF-I (1,4 nM) .....	118 ± 60	—
Vasopresina (18 nM) .....	<100	306 ± 20
IBMX (50 µM) + Forscolina (10 µM) .	<100	184 ± 44
Suero fetal 10% .....	303 ± 20	—

**Tabla 1: Efecto de las hormonas y los factores de crecimiento sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en hepatocitos fetales de rata en cultivo primario.** Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) y varias hormonas y factores de crecimiento. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina se midió en las 4 últimas horas de cultivo. Los resultados son las medias ± SEM (n=10-15) y están expresados como porcentaje de la incorporación en las células control no tratadas.

<u>Adición</u>	<u>Contenido en DNA (µg/plato)</u>	
	—	EGF (3,3 nM)
Control .....	19,3 ± 3,3	35,0 ± 4,0
Glucagón (1 µM) .....	17,0 ± 2,0	39,0 ± 2,7
Insulina (40 nM) .....	21,6 ± 1,4	40,0 ± 5,0
IGF-I (1,4 nM) .....	—	—
Vasopresina (18 nM) .....	—	—
IBMX (50 µM) + Forscolina (10 µM) .	14,6 ± 1,0	15,0 ± 0,1
Suero fetal 10% .....	29,6 ± 3,2	—

**Tabla 2: Efecto de las hormonas y los factores de crecimiento sobre el contenido de DNA en hepatocitos fetales de rata en cultivo primario.** Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) y varias hormonas y factores de crecimiento. El contenido de DNA se determinó al final del tiempo de cultivo. Los resultados son las medias ± SEM (n=10-15) y están expresados como µg de DNA/plato.

presencia de dexametasona en el medio, se mantiene constante a través de todo el tiempo de cultivo.

El cultivo de las células en presencia de suero fetal al 10% produce un incremento en el contenido de DNA de 1,5 veces en comparación con células sin tratar (tabla 2). El EGF solo o combinado con glucagón o insulina produce un aumento de dos veces en el contenido de DNA respecto de las células control sin tratar (tabla 2). Este efecto del EGF sobre el contenido de DNA se ve muy disminuído en presencia de forskolina e IBMX, obteniéndose unos valores más bajos incluso que en células sin tratar (tabla 2).

Los resultados obtenidos muestran que los hepatocitos fetales quiescentes responden al EGF y al suero fetal tras 64 horas en presencia de los mismos. Sin embargo, el efecto mitogénico del suero fetal es menor que el producido por el EGF. Por otro lado, el EGF no sinergiza con insulina, IGF-I, vasopresina o glucagón a diferencia de lo observado en cultivos primarios de hepatocitos adultos (McGowan y col., 1981). El hecho de que el EGF no sinergice con otros factores de crecimiento indica que es un mitógeno completo para los hepatocitos fetales en cultivo primario.

La combinación de forskolina e IBMX es un potente sistema generador de AMPc (Vintermyr y col., 1989), que en las condiciones de estos experimentos es capaz de reprimir casi totalmente el efecto proliferativo del EGF. El papel que juega el AMPc en la regulación de la proliferación hepática es un tema que sigue suscitando debate. Así, mientras que en hepatocitos adultos en cultivo en presencia de EGF e insulina la adición de glucagón, isoproterenol o IBMX provoca un aumento en la síntesis de DNA (McGowan y col., 1981), otros experimentos indican que los agentes que aumentan los niveles de AMPc inhiben la estimulación de la síntesis de DNA inducida

por EGF (Vintermyr y col., 1989) (Kubin y col., 1990) (Thoresen y col., 1990). Esta inhibición de la proliferación celular se ve fuertemente potenciada por la presencia de la dexametasona en el cultivo (Vintermyr y col., 1989). Bajo estas condiciones, el AMPo y la dexametasona actúan sinérgicamente inhibiendo la entrada en la fase S del ciclo celular (Vintermyr y col., 1989) (Thoresen y col., 1990). En nuestros cultivos de hepatocitos fetales, donde la dexametasona está presente de manera continua, se observa un efecto inhibitorio de la forskolina junto con el IBMX sobre la estimulación de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina producida por EGF igual al observado en hepatocitos adultos en condiciones experimentales similares.

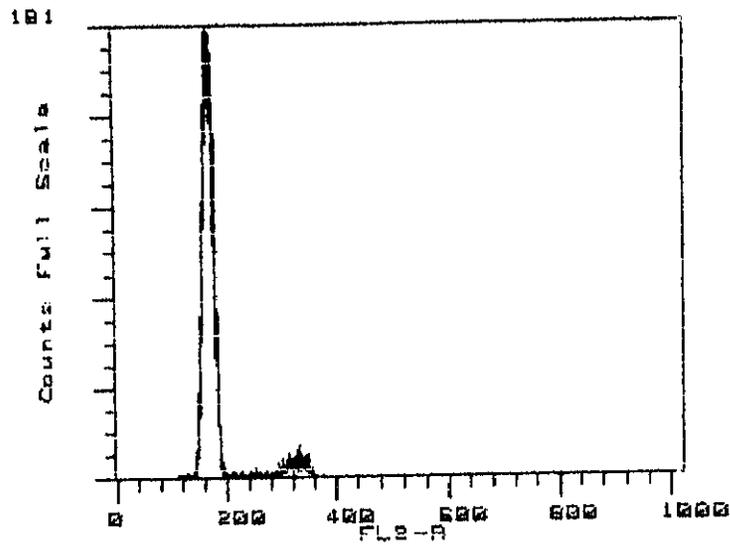
Por lo tanto, en hepatocitos fetales, la forskolina y el IBMX combinados pueden inhibir la activación de la vía de transmisión de señales a través de tirosina quinasa que produce el EGF, anulando la respuesta mitogénica a este factor. Sin embargo, el glucagón no afecta a la proliferación inducida por el EGF. Queda pues por establecer si las diferencias observadas entre los agentes generadores de AMPo y el glucagón sobre la inhibición del efecto proliferativo del EGF, pueden deberse a diferencias en los niveles de AMPo que se producen en cada condición, como sucede en el caso de los hepatocitos adultos (Vintermyr y col., 1989).

#### 4.1.2 Análisis del ciclo celular

Una vez determinadas las condiciones en las que se producen las incorporaciones de  $^3\text{H}$ -timidina máximas y mínimas, se estudiaron las diferencias que había entre la fase del ciclo celular en que se encontraban las células en ambos casos. Las muestras control mantenidas durante 64 horas en medio sin suero y presencia de dexametasona, presentan un 92,8 % de células en

fase  $G_0/G_1$  (fig. 6) y tan solo un 2 % de células en fase S (fig. 6).

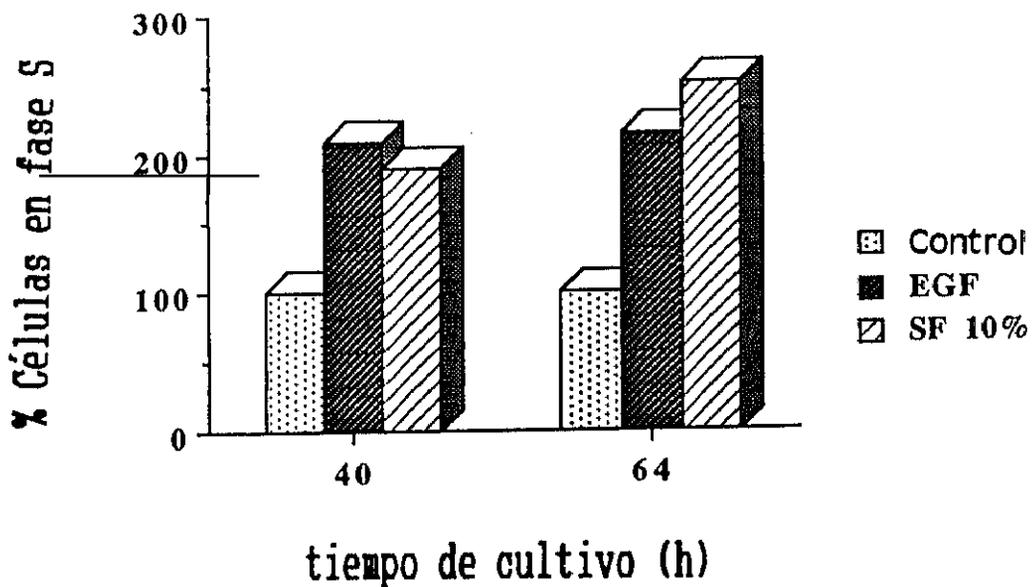
El tratamiento de las células durante 40 horas con EGF o con suero fetal al 10 % produce un incremento de 2,1 ó de 1,9 veces respectivamente en el porcentaje de células en fase S (fig. 7), en comparación con los controles no tratados (fig. 7). Asimismo, a las 64 horas de cultivo en presencia de EGF o suero fetal al 10 %, se producen aumentos de 2,2 ó 2,6 veces respectivamente frente al porcentaje de células en fase S en las muestras control (fig. 7). El aumento del número de células en fase S en estas condiciones, supone que un cierto porcentaje de células abandonan la fase  $G_0$  y se incorporan de nuevo al ciclo celular en respuesta al estímulo proliferativo producido por el EGF y el suero fetal, justificándose así los aumentos en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina y contenido en DNA observados en presencia de los mismos.



Pop.1 Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent	%SD
G1	4271	92.8	0.01
S	92	2.0	
G2+M	240	5.2	0.06
Total:	4603	100.0	

**Fig. 6: Análisis del ciclo celular en células quiescentes.** Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) en ausencia de suero y factores de crecimiento. Los resultados se expresan como porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.



**Fig. 7: Efecto del EGF y el suero sobre la fase S del del ciclo celular.** Las células se cultivaron durante 40 ó 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) en presencia o ausencia de EGF 3,3 nM o suero fetal al 10 %. Los resultados se expresan como porcentaje de células en fase S frente a los datos de células control no tratadas.

## 4.2 MADURACION DE LOS HEPATOCITOS FETALES EN CULTIVO PRIMARIO EN CONDICIONES NO PROLIFERATIVAS

Para la realización de este estudio, los hepatocitos aislados de fetos de rata de 20 días de gestación se sembraron en medio suplementado con suero fetal al 10 %, a una densidad de  $10 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  puesto que las altas densidades celulares favorecen la permanencia de las células en fase  $G_0$  (Kumatori y col., 1991), y en consecuencia, la diferenciación celular y la aparición de las características específicas hepáticas (Nakamura y col., 1983). A esta densidad celular, el grado de confluencia de las células es de aproximadamente un 75 %.

A las 4 horas del establecimiento del cultivo, se substituyó el medio con suero fetal al 10 % por medio suplementado con albúmina bovina sérica al 0,2 %. En estas condiciones, las células se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en presencia de diversas hormonas y sus combinaciones.

### 4.2.1 Expresión génica de la PEPCK: Regulación hormonal

La expresión génica de la PEPCK es prácticamente nula en el feto y su mRNA se acumula y se traduce tras el nacimiento (García Ruiz y col., 1978) en respuesta a AMPc (Lyonnet y col., 1988).

Cuando se estudia la actividad enzimática específica de la PEPCK "*in vivo*" en extractos de hígado de rata de diversos periodos del desarrollo, se obtienen los resultados que se exponen a continuación (tabla 3). Los extractos de hígado de fetos de 20 y 21 días de gestación no muestran una actividad enzimática PEPCK significativa (tabla 3). Sin embargo, en los

---

<u>AEE PEPCK (mU/mg prot.)</u>	
Feto 20 días .....	0,51 ± 0,40
Feto 21 días .....	0,58 ± 0,84
Feto 22 días .....	3,78 ± 0,40
Neonato 1 día .....	20,99 ± 1,46
Neonato 2 días .....	20,20 ± 0,20
Adulto ayunado 48 horas .....	31,40 ± 4,00

**Tabla 3: Actividad enzimática específica PEPCK hepática en diversos estadios del desarrollo de la rata.** Los extractos hepáticos se obtuvieron a partir de fetos de rata de 20, 21 y 22 días de gestación, neonatos de 1 y 2 días de vida, y de adultos ayunados 48 horas. Los resultados son las AEE medias ± SEM (n=2-4) y se expresan como mU/mg de proteína.

extractos hepáticos de fetos "a término" (22 días de gestación), se detecta un aumento de 7,5 veces en la actividad enzimática PEPCK frente a los dos valores anteriores (tabla 3). En los extractos de hígado de neonatos de 24 y 48 horas de vida se observa un aumento de 40 veces en la actividad enzimática PEPCK respecto de los valores fetales iniciales (tabla 3). La máxima actividad enzimática PEPCK se obtiene en extractos de hígado de rata adulta ayunada 48 horas (tabla 3), lo cual significa que los neonatos de tan solo 24 horas de vida son capaces de desarrollar un 65 % de la actividad enzimática PEPCK máxima "in vivo".

Asimismo, cuando se investigan los niveles de RNAm de la PEPCK en extractos hepáticos fetales, se observa la ausencia de este mensajero en los hepatocitos de fetos de 20 días (resultado no mostrado).

Por ello, para estudiar la inducción de la PEPCK "in vitro", se utilizaron hepatocitos fetales de 20 días de gestación, donde ni la actividad enzimática específica, ni el RNAm de la PEPCK son detectables.

En los hepatocitos fetales cultivados durante 64 horas en ausencia de hormonas no se detecta actividad enzimática PEPCK. Sin embargo, la presencia de dexametasona (100 nM) en el medio durante 64 horas es capaz de inducir ligeramente la actividad de esta enzima (tabla 4).

Las combinaciones de la dexametasona con glucagón (1  $\mu$ M) o agentes que aumentan los niveles de AMPo intracelulares, como IBMX (50  $\mu$ M) junto con forskolina (10  $\mu$ M), producen aumentos de 3,5 y 4 veces respectivamente (tabla 4) en la actividad de esta enzima, siendo dicha inducción pobremente inhibida por la adición simultánea de insulina 40 nM (tabla 4).

Los hepatocitos fetales cultivados durante 16, 40 ó 64 horas en ausencia tanto de suero como de hormonas, no expresan el

<u>Adición</u>	<u>AEE PEPCK (mU/mg prot)</u>
Dexametasona (100 nM) .....	5,3 ± 0,8
Dexametasona (100 nM) + Glucagón (1 µM) .....	18,3 ± 0,4
Dexametasona + IBMX (50 µM) + Forscolina (10 µM) .....	19,7 ± 1,6
Dexametasona + Glucagón + Insulina (40 nM) .....	15,2 ± 1,4

**Tabla 4: Efecto de las hormonas sobre la actividad PEPCK en hepatocitos fetales de rata en cultivo primario.** Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) y varias hormonas. Las actividades enzimáticas específicas se determinaron al final del cultivo. Los resultados son las medias ± SEM (n=4-6) y se expresan como mU/mg de proteína. La actividad específica PEPCK antes del cultivo era indetectable.

RNAM de la PEPCK (fig. 8a). Por su parte, la presencia de dexametasona (100 nM) produce una pequeña inducción de este mensajero tras 64 horas de cultivo (fig. 8, a y b).

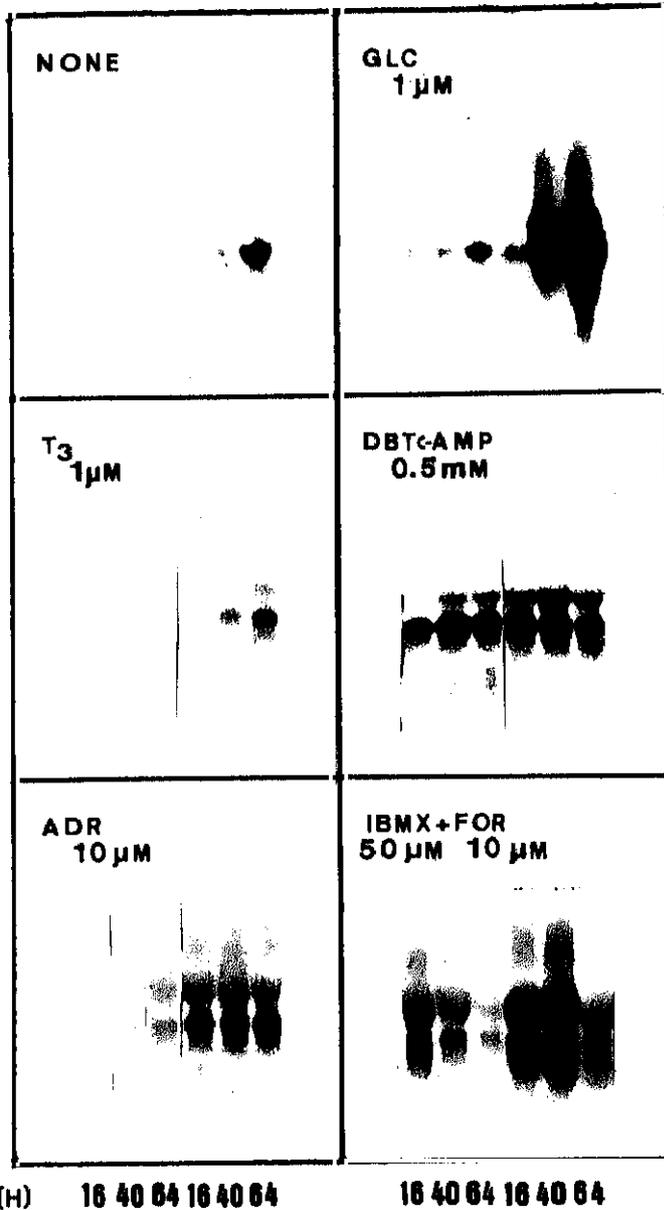
Cuando se añaden al medio hormonas como glucagón (1  $\mu$ M) o adrenalina (10  $\mu$ M) en solitario, no se observan aumentos significativos en los niveles de RNAm de PEPCK ni siquiera a las 64 horas de cultivo en presencia de las mismas (fig. 8a). Sin embargo, la presencia conjunta de glucagón con dexametasona produce un efecto sinérgico que induce el RNAm de la PEPCK 10 ó 20 veces tras 40 ó 64 horas de cultivo respectivamente (fig. 8, a y b). Asimismo, la presencia de adrenalina junto con dexametasona aumenta diez veces los niveles de RNAm de la PEPCK ya a las 16 horas de cultivo, inducción que se mantiene durante las 64 horas (fig. 8, a y b).

El dibutilil AMPc (0,5 mM) produce una apreciable inducción de la transcripción del gen de la PEPCK a las 16 horas de cultivo, la cual se ve aumentada a las 40 horas (fig 8, a y b). En este caso, el dibutilil AMPc no sinergiza con la dexametasona, ya que cuando se añaden al medio ambas hormonas juntas los niveles de mensajero no sufren cambios significativos (fig. 8, a y b).

La isobutil-1-metilxantina (IBMX) (50  $\mu$ M) junto con la forskolina (10  $\mu$ M) producen un aumento de 14 veces en el contenido del RNAm correspondiente a la PEPCK a las 16 horas de cultivo, para después disminuir de manera progresiva a 40 y 64 horas (fig. 8, a y b). Al combinar estos agentes generadores de AMPc con dexametasona, los niveles de inducción son superiores sobre todo a las 40 horas de cultivo, pero igualmente caen a las 64 horas (fig. 8, a y b).

Finalmente, se observa que en este sistema la hormona triiodotironina ( $T_3$ ) (1  $\mu$ M) añadida individualmente no induce la expresión génica de la PEPCK en ninguno de los tiempos de

Dx  
100 nM    - - - + + +                    - - - + + +



**Fig. 8: Inducción hormonal del RNAm de la PEPCK en hepatocitos fetales en cultivo primario.** Los hepatocitos fetales se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en presencia de glucagón (GLC), triiodotironina (T<sub>3</sub>), dibutilil AMPc (DBT c-AMP), adrenalina (ADR) e IBMX +<sup>3</sup> forscolina (FOR) en presencia o ausencia de dexametasona (DX). Al final del tiempo de cultivo, el RNA total (20 μg) se sometió a análisis por Northern-Blot y se hibridó con un <sup>32</sup>P-cDNA específico para la PEPCK; a) la figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

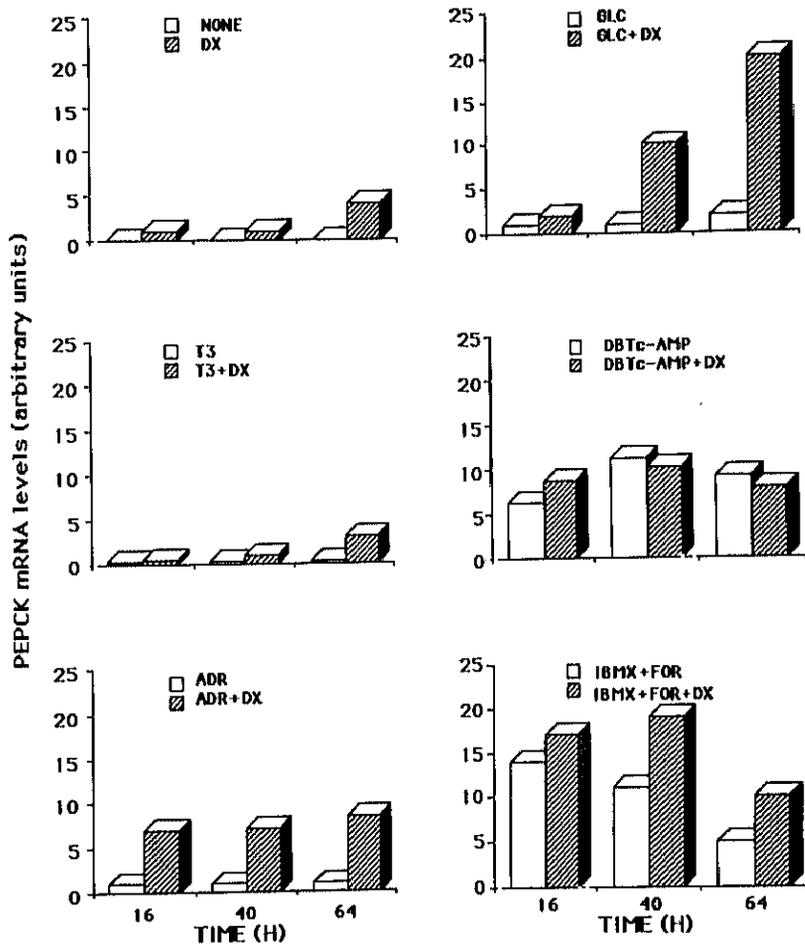
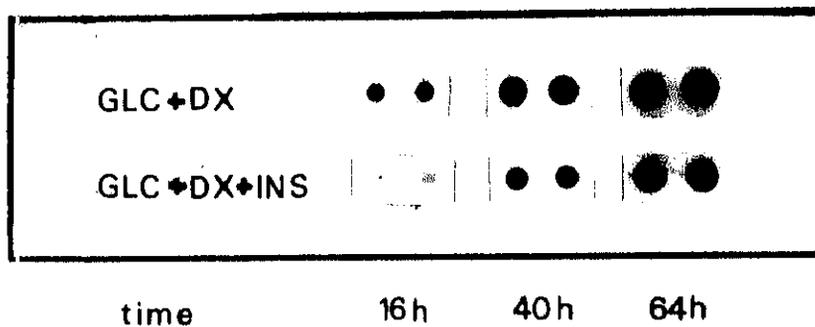


Fig. 8b: Análisis densitométrico de una autorradiografía representativa.

cultivo estudiados (fig. 8a). Por otro lado, la combinación de T3 con dexametasona tampoco produce aumentos significativos en los niveles de RNAm de la PEPCK (fig. 8, a y b).

La mayor inducción de la expresión génica de la PEPCK observada en cultivos primarios de hepatocitos fetales, se produce por la combinación de IBMX y forskolina con dexametasona durante 40 horas (fig. 8, a y b), así como por la presencia de glucagón con dexametasona durante 64 horas (fig. 8, a y b). En ambos casos, el contenido de RNAm de la PEPCK alcanza valores que representan alrededor de un 80 % de aquellos encontrados en hígado adulto ayunado 48 horas (Fig. 17a). En estas condiciones, una segunda isoforma de RNAm de la PEPCK de aproximadamente 4 Kb empieza a ser aparente en las células fetales (fig. 8a) a diferencia del adulto donde se observa una única forma de 2,8 Kb (fig. 17a). Así, los hepatocitos fetales muestran un patrón característico de formas de RNAm de la PEPCK distinto del expresado en el hígado de rata adulta.

Para estudiar el papel de la insulina en la expresión de la PEPCK en hepatocitos fetales, se cultivaron las células en presencia de glucagón y dexametasona con o sin insulina (40 nM) en el medio durante 16, 40 y 64 horas. En todos los casos la insulina disminuye en aproximadamente un 20 % la inducción de los niveles de RNAm de la PEPCK producida por el glucagón y la dexametasona (fig. 9, a y b). Por tanto, en este sistema, la expresión de la PEPCK no acusa la presencia de la insulina de una manera tan intensa como el hígado adulto (Christ y col., 1990). Quizás este pobre efecto inhibitorio de la insulina frente a la inducción de la transcripción de la PEPCK por glucagón y dexametasona, se deba a un fallo en el mecanismo postreceptor, ya que la unión de la insulina a sus receptores de la superficie celular no provoca la regulación a la baja de los



**Fig. 9:** Efecto de la insulina sobre la expresión del RNA de la PEPCK en cultivos primarios de hepatocitos fetales. Las células se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en presencia de glucagón (GLC) + dexametasona (DX), y en presencia o ausencia de insulina (INS). El RNA total (8 µg) se sometió a análisis por Dot-blot y a una posterior hibridación con un <sup>32</sup>P-cDNA específico para la PEPCK; a) la figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

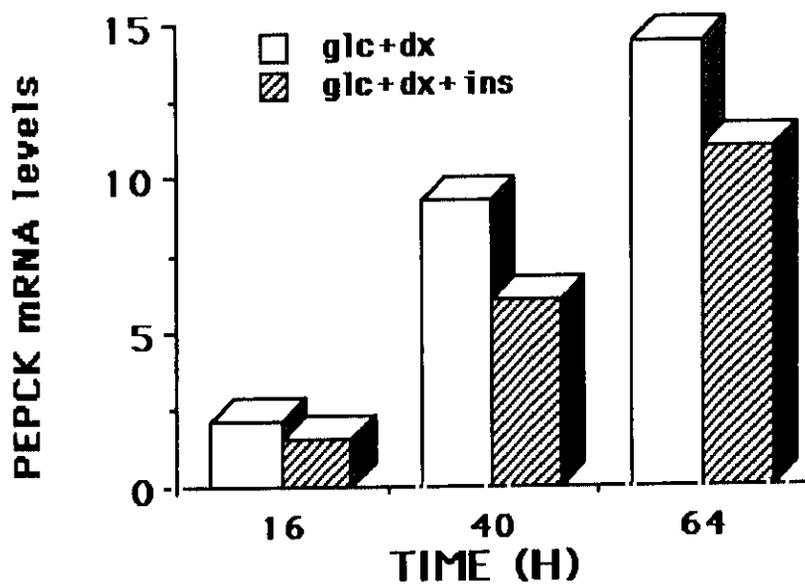


Fig. 9b: Análisis densitométrico de una autorradiografía representativa.

mismos (Menuelle y col., 1991).

En conclusión, la expresión del RNAm de la PEPCK en hepatocitos fetales de 20 días puede inducirse precózmemente por IBMX junto con forscolina a corto plazo (16 horas), así como a largo plazo (64 horas) con glucagón combinado con dexametasona, siendo esta inducción ligeramente reprimida por la presencia de insulina.

#### 4.2.2 Expresión génica de la EM y la G6PD: Regulación hormonal y nutricional

Durante el periodo perinatal de la rata, el hígado desempeña una función relevante en la lipogénesis. En este sentido, la EM citosólica hepática es una enzima lipogénica implicada en la producción de NADPH para la síntesis de ácidos grasos. Durante el desarrollo temprano de la rata, la EM está sometida a una regulación hormonal y nutricional. La actividad enzimática EM es muy baja en el hígado fetal de rata (Ballard y col., 1967a) (Perez-Castillo y col., 1987), y su RNAm en esta etapa del desarrollo sólo se detecta en muestras de poli A<sup>+</sup> RNA (Mann y col., 1991). Tras el nacimiento, durante la transición lactancia-destete, se produce una rápida acumulación de la enzima debido, por un lado, a la sustitución de la leche materna rica en grasa por una dieta sólida hidrocarbonada, y por otro, al cambio en el estado hormonal del neonato. Ambos factores, provocan un fuerte incremento de la lipogénesis hepática y de la actividad EM (Lockwood y col., 1970), precedido por un aumento similar de su RNAm (Mann y col., 1991).

Los hepatocitos fetales en cultivo primario pueden expresar genes específicos característicos del estado adulto. Así, la EM puede ser expresada precózmemente en hepatocitos fetales

quiescentes mediante una estimulación hormonal específica (Fabregat y col., 1989). Los carbohidratos y los metabolitos glucolíticos, producen una inducción prematura de la actividad específica EM en los hepatocitos fetales de 22 días cultivados en ausencia de suero y hormonas (Fabregat y col., 1989). Por su parte, la adición de insulina y  $T_3$  produce un incremento en la actividad específica EM, mientras que el glucagón bloquea parcialmente esta inducción (Fabregat y col., 1989). Estos cambios en la actividad EM, concuerdan con el aumento de la tasa de lipogénesis que se observa, en este mismo sistema, a las 24 horas de cultivo en presencia de insulina y  $T_3$ , así como con la disminución de la misma detectada a las 3 horas de cultivo en presencia de glucagón (Roncero y col., 1989).

El propósito de los estudios que se detallan a continuación, ha sido la determinación de la regulación de la expresión del RNAm y la proteína EM por diversas hormonas y fuentes de carbono, en hepatocitos fetales de 20 días cultivados en ausencia de suero.

El RNAm de la EM no se detecta en los hepatocitos fetales de 20 días tras el aislamiento (resultado no mostrado). Sin embargo, cuando los hepatocitos se cultivan en presencia de glucosa 5 mM en ausencia de hormonas, aunque la expresión del RNAm de la EM no se detecta a las 16 horas, tras 40 ó 64 horas de cultivo se observa una inducción del mismo de 4 ó 6 unidades arbitrarias respectivamente (fig. 10, a y b). La adición de dexametasona (100 nM) al medio, es capaz de inhibir parcialmente esta inducción del RNAm de la EM producida por la glucosa (fig. 10, a y b).

La presencia de  $T_3$  (1  $\mu$ M) en el medio de cultivo, produce un aumento de dos veces en la inducción del RNAm de la EM tras 64 horas de cultivo, en comparación con el contenido del mismo en presencia únicamente de glucosa (fig. 10, a y b). En este caso,

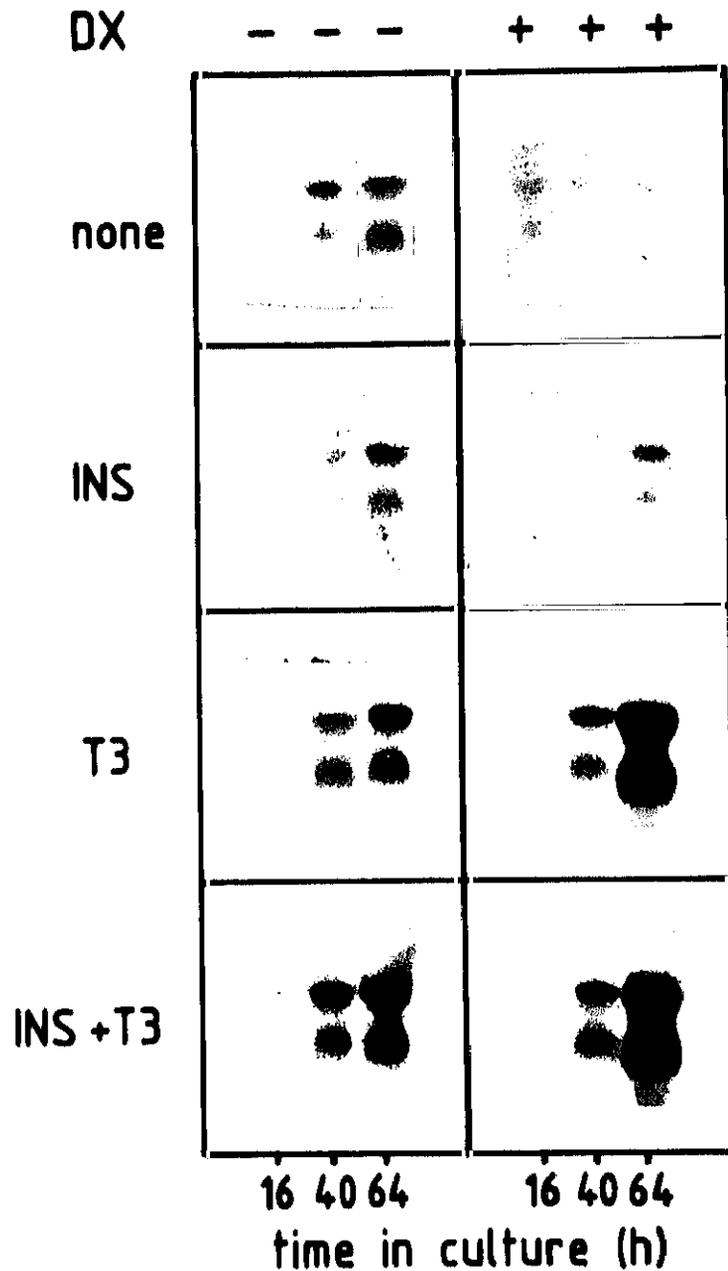


Fig. 10: Inducción del RNAm de la enzima málica en cultivos primarios de hepatocitos fetales: Efecto de la dexametasona, la insulina y la triiodotironina. Los hepatocitos fetales se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM como fuente de carbono en presencia o ausencia de insulina (INS 40 nM), triiodotironina ( $T_3$  1  $\mu$ M) y dexametasona (DX 100 nM), como se indica en la figura. El RNA total (20  $\mu$ g) se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con un  $^{32}$ P-cDNA específico para la EM; a) la figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

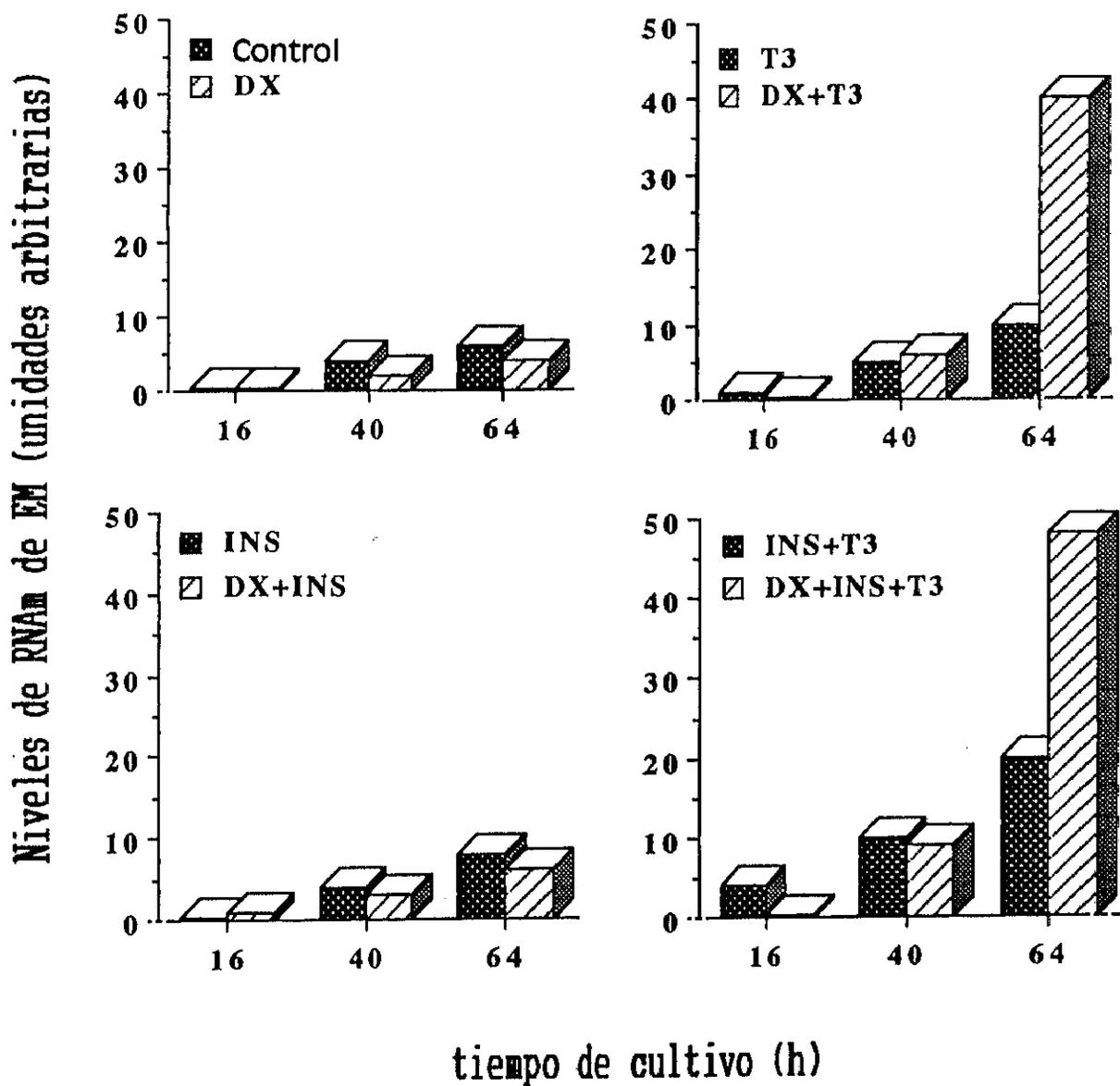


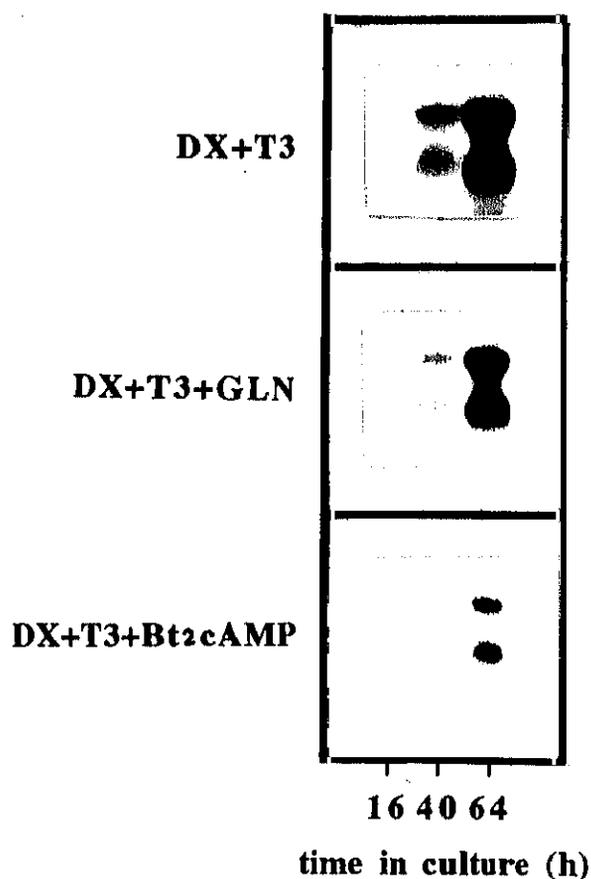
Fig. 10b: Análisis densitométrico de una autorradiografía representativa.

la dexametasona potencia el efecto de la  $T_3$ , produciéndose a las 64 horas un incremento de 10 veces en la acumulación de RNAm de la EM, en comparación con los niveles observados en presencia de glucosa y dexametasona (fig. 10, a y b).

La insulina (40 nM) no tiene un efecto significativo sobre la expresión del RNAm de la EM, ni en presencia ni en ausencia de dexametasona (fig. 10, a y b). Sin embargo, la presencia conjunta de insulina y  $T_3$ , produce un efecto sinérgico sobre la acumulación del RNAm de la EM a lo largo del tiempo de cultivo, dando lugar a las 64 horas a un aumento de tres veces en el nivel de RNAm de la EM, en comparación con los niveles obtenidos en ausencia de hormonas (fig. 10, a y b). Este efecto se ve potenciado a las 64 horas por la dexametasona, alcanzándose un incremento de 13 veces en el contenido de RNAm de la EM en comparación con el observado en ausencia de ambas hormonas (fig. 10, a y b).

La adición de glucagón (1 uM) al medio con glucosa,  $T_3$  y dexametasona, produce una inhibición de un 35% en la acumulación de RNAm de la EM inducida por ambas hormonas, tanto a 40 como a 64 horas de cultivo (fig. 11, a y b). Por su parte, el dibutiril-AMPC (0,5 mM) es capaz de inhibir la inducción del RNAm de la EM por  $T_3$  y dexametasona en un 80%, a 40 y a 64 horas (fig. 11, a y b).

Para establecer si los cambios producidos por las hormonas en el contenido de RNAm de la EM se veían reflejados en cambios paralelos en el contenido de proteína y la función de la EM, se realizaron análisis por Western-blot y determinaciones de actividad específica EM en los hepatocitos, tras 64 horas de cultivo en presencia o ausencia de dichas hormonas. Así, en un medio con glucosa, la dexametasona no es capaz de inducir niveles significativos de proteína y actividad específica EM (fig. 12, carril 1). La insulina junto con la dexametasona



**Fig. 11: Inducción del RNAm de la enzima málica en hepatocitos fetales en cultivo primario: Efecto del glucagón y el AMPc.** Las células se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM, triiodotironina ( $T_3$  1  $\mu$ M) y dexametasona (DX 100 nM) en presencia o ausencia de glucagón (GLN 1 $\mu$ M) o dibutiril AMPc (Bt<sub>2</sub>cAMP 0,5 mM), como se indica en la figura. El RNA total (20  $\mu$ g) se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con un <sup>32</sup>P-cDNA específico para la EM; a) la figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

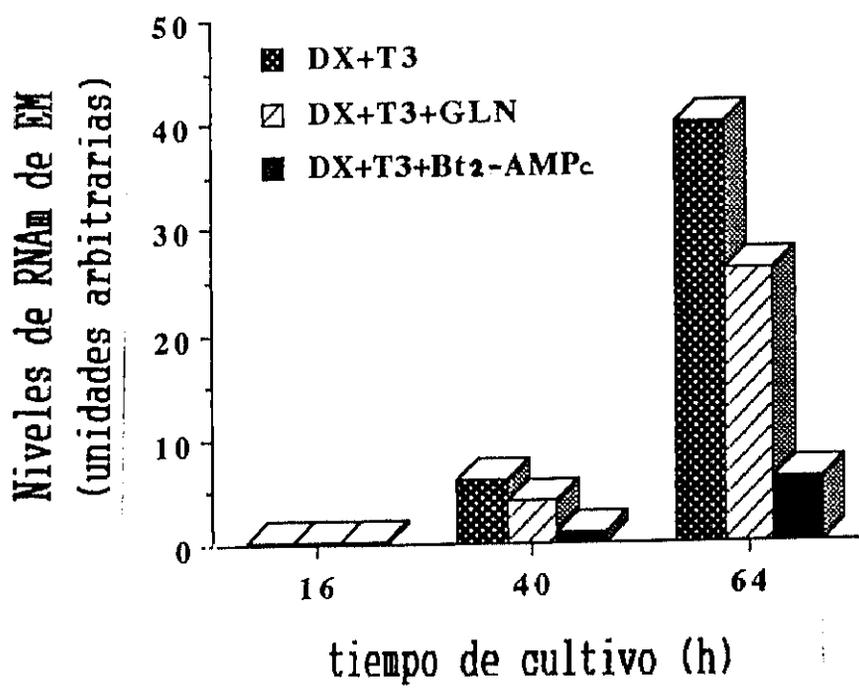
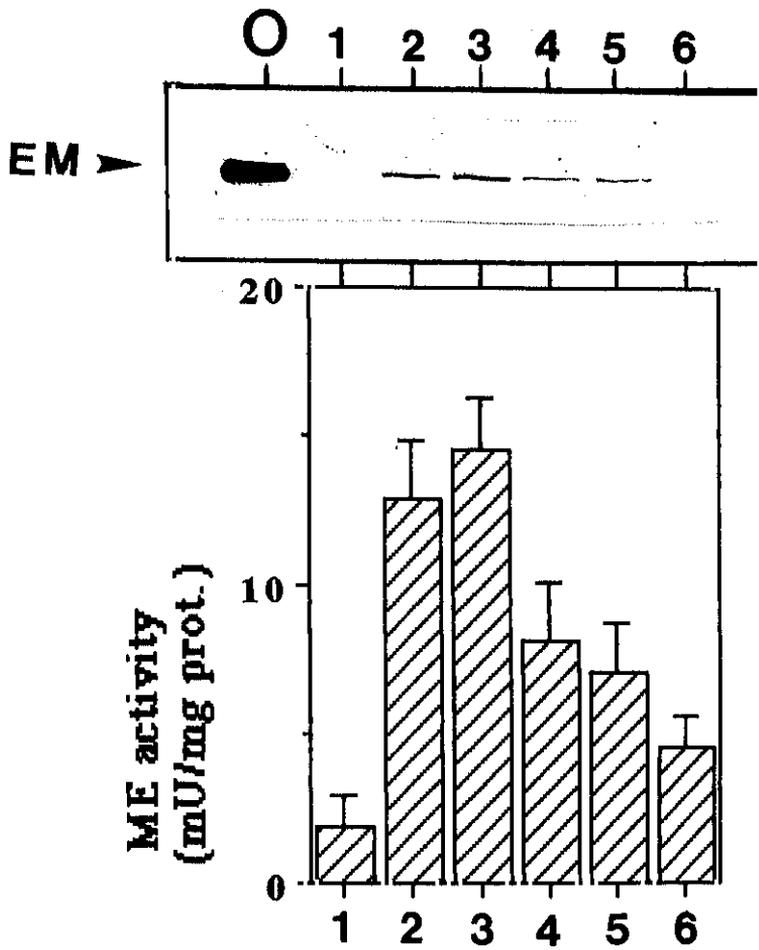


Fig. 11b: Análisis densitométrico de una automradiografía representativa.



**Fig. 12:** Inducción del contenido de proteína y la actividad específica de la enzima málica en cultivos primarios de hepatocitos fetales: Efectos hormonales. Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM en presencia de dexametasona (100 nM) (carril 1),  $T_3$  (1  $\mu$ M) + dexametasona (carril 2),  $T_3$  + insulina (40 nM) + dexametasona (carril 4),  $T_3$  + dexametasona + glucagón (1  $\mu$ M) (carril 4),  $T_3$  + dexametasona + dibutiril-AMPc (0,5 mM) (carril 5) e insulina + dexametasona (carril 6);-panel superior- Western-blot de la proteína EM con 125 ng de proteína pura como control (carril 0) -panel inferior- valores medios  $\pm$  SEM (n=3-6) de las actividades específicas EM.

produce un pequeño aumento en la actividad específica EM (fig. 12, carril 6), aunque en estas condiciones, la proteína apenas se detecta (fig. 12, carril 6). La presencia conjunta de dexametasona y  $T_3$  en el medio, produce una gran inducción del contenido de proteína EM (fig. 12, carril 2), acompañado de un aumento de 7 veces en la actividad específica EM (fig. 12, carril 2). Esta inducción se produce independientemente de la presencia o ausencia de la insulina en el medio (fig. 12, carriles 2 y 3). Por su parte, el glucagón y el dibutiril AMPc disminuyen en un 45%-50% el contenido de proteína y la actividad específica EM (fig. 12, carriles 4 y 5) inducidos por  $T_3$  y dexametasona.

Por lo tanto, en los hepatocitos fetales de 20 días cultivados durante 64 horas en un medio sin suero suplementado con glucosa, la presencia de  $T_3$  junto con dexametasona, induce precozmente la expresión tanto del RNAm como de la proteína EM (fig. 10a, fig. 12, carril 2).

Ya estaba descrito el potente efecto inductor que la  $T_3$  posee sobre la expresión de la EM en el hígado y en cultivos de hepatocitos de rata adulta (Mariash y col., 1983) (Song y col., 1988), así como en los hepatocitos embrionarios de pollo (Salati y col., 1991). Este efecto de la  $T_3$ , está mediado por un elemento de respuesta a la hormona identificado en el gen de la EM de la rata (Petty y col., 1990). Los resultados expuestos, muestran que en los hepatocitos fetales la  $T_3$  produce un incremento de dos veces en el RNAm de la EM tras 64 horas de cultivo en presencia de glucosa (fig. 10, a y b). Este dato, concuerda con el aumento de la tasa de lipogénesis que se observa en presencia de  $T_3$  en cultivos de hepatocitos de 22 días (Roncero y col., 1989), y sugiere, que la inducción precoz de la EM puede estar contribuyendo a la producción de NADPH necesaria para la síntesis lipídica.

La dexametasona, parece tener un papel permisivo en la inducción del RNAm de la EM por  $T_3$  tras 64 horas de cultivo, lo cual se ve reflejado en el aumento de 10 veces en el RNAm de la misma (fig. 10, a y b), en comparación con el contenido en ausencia de  $T_3$  (fig. 10, a y b). En este sentido, en hepatocitos embrionarios de pollo, se ha descrito que la corticosterona puede controlar los niveles de factores proteicos, que a su vez, regulan la respuesta transcripcional de los genes lipogénicos a  $T_3$  (Roncero y col., 1992). De manera semejante, el hecho de que el efecto de la dexametasona se observe tras 64 horas de cultivo, se justificaría por la inducción que la dexametasona pudiera producir sobre la síntesis de factores transcripcionales necesarios para el efecto de la  $T_3$  sobre la expresión génica de la EM.

Como se ha expuesto, la insulina sola o en presencia de dexametasona, tiene un efecto muy pobre sobre la expresión del RNAm y la proteína EM, en los hepatocitos fetales en cultivo primario en medio suplementado con glucosa (fig. 10, a y b, fig. 12, carril 6). De igual manera, en cultivos de hepatocitos embrionarios de pollo, se ha descrito que la insulina no ejerce ningún efecto sobre la transcripción del gen de la EM (Salati y col., 1991). Por el contrario, en hígado de rata adulta, la insulina produce cambios en el nivel de RNAm de la EM por mecanismos postranscripcionales (Davis y col., 1988). Asimismo, en células fetales no hepáticas como los adipocitos marrones fetales de rata, la insulina aumenta la expresión del RNAm y la proteína EM (Valverde y col., 1992).

La presencia conjunta de insulina y  $T_3$ , produce un efecto sinérgico dependiente del tiempo sobre la inducción del RNAm de la EM, en comparación con el efecto de ambas hormonas por separado (fig. 10, a y b). En presencia de dexametasona, la insulina y la  $T_3$  producen los mayores aumentos en el contenido

de RNAm (13 veces) (fig. 10, a y b), proteína (fig. 12, carril 3) y actividad específica EM (8 veces) (fig. 12, carril 3), respecto de los hepatocitos cultivados en presencia únicamente de glucosa y dexametasona (fig. 10, a y b, fig. 12, carril 1). Por tanto, se observa de nuevo un efecto permisivo de la dexametasona en la inducción del RNAm de la EM por  $T_3$ , similar al descrito para la corticosterona en los hepatocitos embrionarios de pollo (Roncero y col., 1992).

El glucagón y el AMPc, actúan como reguladores negativos de la estimulación de la expresión del gen de la EM por insulina y  $T_3$  en hepatocitos embrionarios de pollo (Back y col., 1986) (Salati y col., 1991), y en hepatocitos fetales de rata (Fabregat y col., 1989). En los hepatocitos fetales en cultivo primario, el glucagón disminuye en un 35% la inducción del RNAm de la EM producido por  $T_3$  y dexametasona en ausencia de insulina (fig. 11, a y b), y por su parte, el dibutiril AMPc bloquea esta inducción casi totalmente (fig. 11, a y b). Este efecto negativo del glucagón y el dibutiril AMPc en el RNAm de la EM, se refleja en una disminución en el contenido de proteína (fig. 12, carriles 4 y 5). En consecuencia, la inducción de la actividad específica EM producida por  $T_3$  y dexametasona (fig. 12, carril 2), se ve reducida casi a la mitad en presencia de glucagón o de dibutiril AMPc (fig. 12, carriles 4 y 5). Este efecto inhibitor del glucagón y el dibutiril AMPc sobre la expresión de la EM no depende de la presencia de insulina. Estos resultados están de acuerdo con la función del AMPc en la inhibición de la transcripción del gen de la EM, y sugieren que la transducción de señales mediada por la actividad fosforilativa de la proteína quinasa A juega un papel en la regulación de la expresión de este gen (Swierczynski y col., 1991).

Los nutrientes, desempeñan una función muy importante en la

regulación de la expresión de la EM en el hígado de neonatos de rata durante la transición lactancia-destete (Perez-Castillo y col., 1987) (Mann y col., 1991), así como en los hepatocitos de rata adulta en cultivo primario (Mariash y col., 1983). Esta regulación dependiente de los nutrientes es específica del hígado, puesto que no se observa en tejidos no hepáticos (Dozin y col., 1986). Por ello, se investigó la influencia de diferentes fuentes de carbono en la inducción precoz del RNAm de la EM, tras 64 horas de cultivo en presencia o ausencia de insulina,  $T_3$  y dexametasona (fig. 13, panel izquierdo).

Como ya se ha citado, la presencia de glucosa 5 mM en el medio de cultivo induce la acumulación del RNAm de la EM a lo largo del tiempo de cultivo (fig. 10, a y b). Sustratos como glucosa 25 mM, lactato 10 mM junto con piruvato 1mM, o dihidroxiacetona 5 mM, también inducen la expresión génica de la EM tras 64 horas de cultivo en medio sin suero (fig. 13, sustratos 2, 3 y 4). Entre ellos, la dihidroxiacetona duplica la acumulación del RNAm de la EM (fig. 13, sustrato 4), en comparación con los niveles del mismo obtenidos con glucosa 5 mM (fig. 13, sustrato 1).

La combinación de insulina y  $T_3$ , aumenta 2 veces el contenido de RNAm de la EM en presencia de glucosa 5 mM o de dihidroxiacetona en el medio (fig. 13, sustratos 1 y 4), mientras que en medio con lactato-piruvato, produce un aumento de 8 veces del mismo (fig. 13, sustrato 3) en comparación con los valores detectados en ausencia de hormonas (fig. 13, sustratos 1, 4 y 3). La dexametasona, potencia los efectos de la insulina y la  $T_3$  en la acumulación del RNAm de la EM en presencia de glucosa 5 mM ó 25 mM (fig. 13, sustratos 1 y 2). Sin embargo, esta inducción no se observa en presencia de los sustratos lactato-piruvato o dihidroxiacetona, produciéndose una disminución de la acumulación del RNAm de la EM en

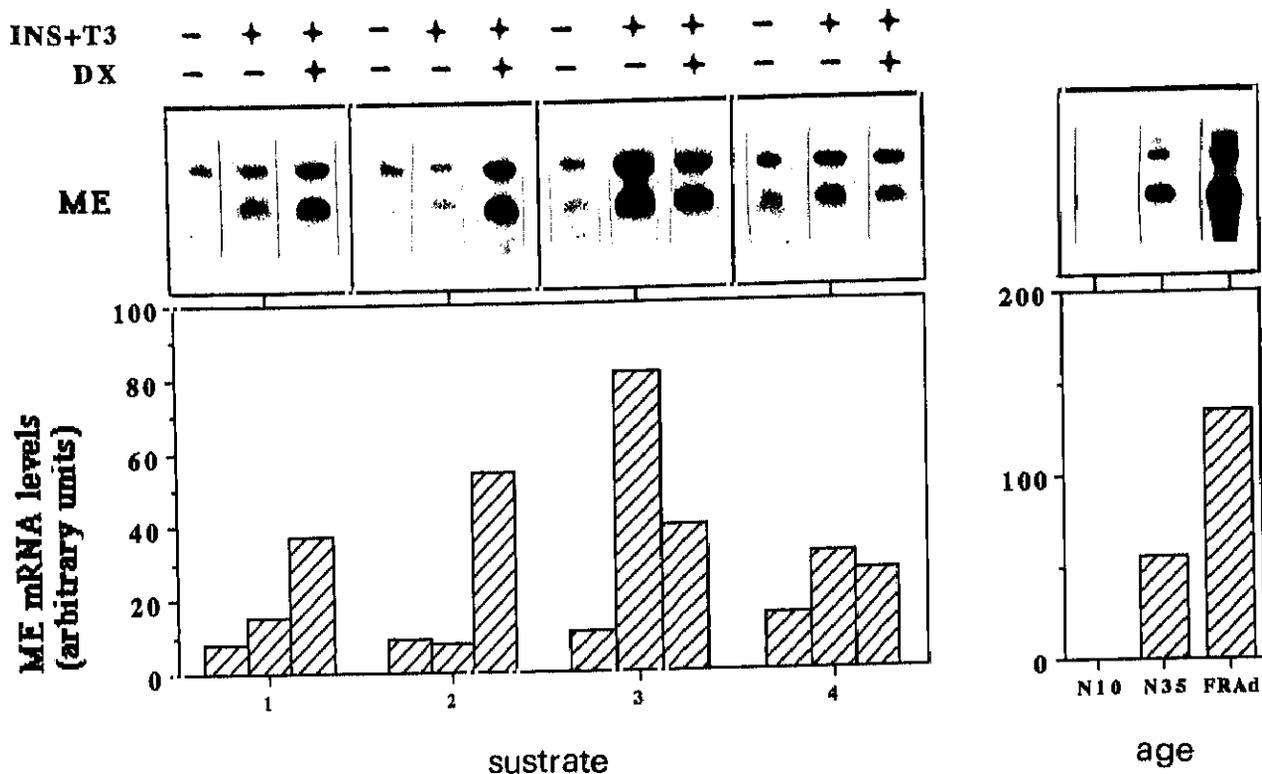


Fig. 13: Efecto de las fuentes de carbono sobre la inducción hormonal del RNAm de la enzima málica en cultivos primarios de hepatocitos fetales. Los hepatocitos fetales se cultivaron durante 64 horas en medio 199 con glucosa 5mM (sustrato 1), glucosa 25 mM (sustrato 2), lactato 10 mM + piruvato 1 mM (sustrato 3) o dihidroxiacetona 5 mM (sustrato 4), en presencia o ausencia de las hormonas indicadas en la figura (panel izquierdo). En la figura también se muestra (panel derecho) la valoración del contenido de RNAm de la EM "in vivo" en extractos hepáticos de neonatos de rata de 10 (N10) y 35 (N35) días y de adultos ayunados(48h)-realimentados(48h) (FRAd). En ambos estudios, 20 µg de RNA total se sometieron a análisis por Northern-blot y se hibridaron con un <sup>32</sup>P-odNA específico para la EM. En ambos casos el panel superior muestra la autorradiografía de un experimento representativo y el panel inferior muestra la valoración densitométrica de la misma.

comparación con los valores detectados en ausencia de dexametasona (fig. 13, sustratos 3 y 4).

Todos estos resultados, muestran que la inducción del RNAm de la EM por insulina,  $T_3$  y dexametasona, depende también de la fuente de carbono presente en el medio. En ausencia de hormonas, la glucosa 5 ó 25 mM, el lactato-piruvato, y la dihidroxiacetona, son capaces de producir una pequeña acumulación del RNAm de la EM tras 64 horas de cultivo (fig. 13, panel izquierdo). Está descrito que la glucosa y los metabolitos glucolíticos, son capaces de inducir la actividad específica EM en cultivos primarios de hepatocitos adultos en presencia de insulina (Mariash y col., 1983). Sin embargo, los datos aquí presentados, muestran que los carbohidratos pueden inducir la acumulación del RNAm de la EM independientemente de la presencia o la ausencia de insulina u otra hormona en el medio de cultivo, siendo la dihidroxiacetona el mejor sustrato para la inducción del RNAm de la EM en hepatocitos fetales de 20 días.

Ya se había demostrado que estas fuentes de carbono inducían tanto la actividad específica EM (Fabregat y col., 1989), como la tasa de lipogénesis, en hepatocitos fetales de 22 días (Roncero y col., 1989), y en hepatocitos adultos (Lorenzo y col., 1985). En consecuencia, todos estos sustratos pueden aumentar las necesidades de NADPH para la síntesis lipídica, desencadenando la inducción precoz de la expresión del gen de la EM como proveedora de NADPH.

En presencia de lactato-piruvato, la insulina y la  $T_3$  producen el mayor aumento de la expresión del RNAm de la EM en ausencia de dexametasona (fig. 13, sustrato 3). Este dato, es coherente con el efecto estimulador que presentaba la insulina sobre la tasa de lipogénesis de hepatocitos fetales aislados, cuando se añadía lactato-piruvato al medio. Este efecto no se

observaba cuando el sustrato utilizado era la glucosa 5 mM (Roncero y col., 1989). Por tanto, quizás la insulina puede incrementar la eficacia del lactato-piruvato como inductor de la síntesis lipídica, y como resultado, se produce una mayor expresión del RNAm de la EM en el cultivo.

La presencia de dexametasona durante 64 horas, produce un efecto permisivo en la inducción del RNAm de la EM por  $T_3$  cuando los hepatocitos fetales se cultivan en presencia de glucosa 5 ó 25 mM (fig. 13, sustratos 1 y 2). Sin embargo, la dexametasona no sinergiza con la insulina y la  $T_3$  cuando los hepatocitos se cultivan en presencia de lactato-piruvato o dihidroxiacetona como fuentes de carbono (fig. 13, sustratos 3 y 4). Luego el efecto de la dexametasona como potenciador de la inducción de la EM por  $T_3$ , parece que depende de la presencia de glucosa en el medio de cultivo. La interacción entre  $T_3$ , dexametasona y glucosa en la expresión del gen de la EM, es algo que todavía queda por establecer.

Por último, para investigar la influencia de las fuentes de carbono y el estado hormonal en la expresión "in vivo" del gen de la EM hepática, se determinó la expresión del RNAm de la EM en hígado de neonatos de rata de 10 (lactantes) y 35 días de vida (destetados), así como en hígado de ratas adultas ayunadas-realimentadas. Los resultados muestran que el RNAm de la EM no está presente en el hígado de ratas lactantes (fig. 13, panel derecho), pero aparece tras el destete, detectándose una acumulación de RNAm de la EM que constituye la mitad de la encontrada en el hígado de rata adulta ayunada-realimentada (fig. 13, panel derecho).

La cantidad de RNAm de la EM expresada en los hepatocitos fetales cultivados en presencia de glucosa 25 mM y bajo el estímulo de insulina,  $T_3$  y dexametasona (fig. 13, sustrato 2), es similar al observado "in vivo" en el hígado de neonatos de

rata de 35 días de vida (fig. 13, panel derecho), ya que estas condiciones de cultivo, simulan la situación nutricional y hormonal del neonato tras el destete (Mann y col., 1991).

El RNAm de la EM de rata, presenta dos formas de 2,7 y 4,5 kb respectivamente, debido a la selección de lugares de poliadenilación alternativos (Morioka y col., 1989). Ambas formas se encuentran en diferente proporción según el tejido (Dozin y col., 1985). Tanto en el hígado de neonato de rata de 35 días (fig. 13, panel derecho), como en el de rata adulta ayunada-realimentada (fig. 13, panel derecho), se observa una razón entre las formas de RNAm de la EM 2,7/4,5 kb de 4/1, lo cual coincide con lo ya descrito en la bibliografía (Mann y col., 1991). Sin embargo, los hepatocitos fetales de rata muestran una razón de 0,6/1 cuando la expresión del RNAm de la EM es moderada (fig. 13, panel izquierdo). Esta razón es bastante similar a la que se presenta en otras células fetales como los adipocitos marrones fetales (Valverde y col., 1992), o las células pulmonares fetales de rata (Batenburg y col., 1989). Cuando la expresión del RNAm de la EM es muy alta, como en el caso de la inducción con  $T_3$ , insulina y dexametasona en medio con glucosa (fig. 13, sustratos 1 y 2), o con insulina y  $T_3$  en medio con lactato-piruvato (fig. 13, sustrato 3), ambas formas muestran una razón de 1,1/1, similar a la que se presenta en hígado de rata hipertiroidea (Strait y col., 1989).

Por tanto, el cultivo de hepatocitos fetales de 20 días en presencia de  $T_3$ , insulina y dexametasona, en medio suplementado con glucosa 5 mM, produce la expresión precoz del RNAm de la EM hasta niveles similares a los observados en neonatos "in vivo" tras el destete. Esta inducción del RNAm de la EM, es paralelo a un incremento en el contenido de proteína y actividad específica de la misma. La glucosa, y otras fuentes de carbono como el lactato-piruvato o la dihidroxiacetona, producen una

acumulación del RNAm de la EM en ausencia de hormonas. Mientras que la  $T_3$ , en medio con glucosa 5 mM, es el principal inductor de la expresión de la EM, la insulina tan solo ejerce un pequeño efecto sinérgico sobre esta inducción combinada con  $T_3$ . Sin embargo, en presencia de lactato-piruvato, la insulina y la  $T_3$  producen el mayor aumento en la expresión del RNAm de la EM. La dexametasona tiene un papel permisivo potenciando la inducción del RNAm de la EM por  $T_3$ , independientemente de la presencia de insulina. Este efecto de la dexametasona, es dependiente del tiempo (64 horas) y de la presencia de glucosa en el medio. El glucagón, y en mayor medida el dibutiril AMPo, reprimen la expresión del RNAm y la proteína EM inducida por  $T_3$  y dexametasona.

Paralelamente a estos experimentos de inducción de la expresión de la EM en hepatocitos fetales de 20 días, se ha realizado un estudio de la regulación de la expresión génica en este sistema de otro enzima productor de NADPH, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es un enzima clave en la regulación de la lipogénesis puesto que proporciona equivalentes reductores para una variedad de reacciones biosintéticas que incluyen la síntesis de ácidos grasos. A diferencia de la EM, el RNAm de la G6PD es detectable en los hepatocitos fetales de 20 días tras el aislamiento, al igual que su actividad enzimática específica, que fue de  $33 \pm 1,0$  mU/mg de proteína. En este sentido, el objetivo de este estudio es la obtención de datos para poder contrastar la influencia de las hormonas y los agentes que aumentan los niveles de AMPo intracelular sobre la expresión génica de dos enzimas fundamentales en la síntesis hepática de ácidos grasos, la EM y la G6PD.

Cuando se cultivan los hepatocitos fetales de 20 días en

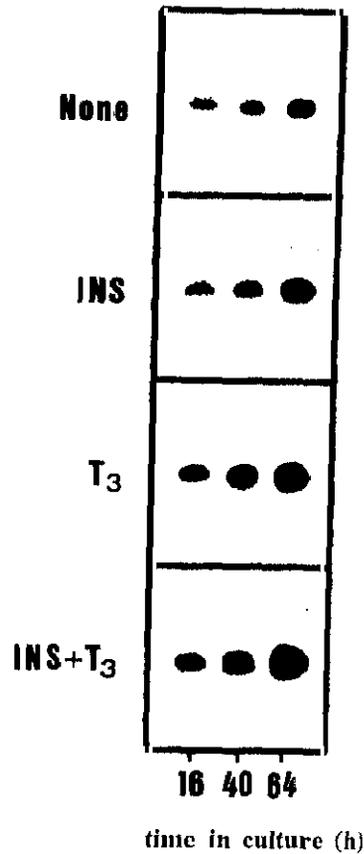
medio suplementado con glucosa 5 mM en ausencia de suero y hormonas, la expresión del RNAm de la G6PD ya existente a las 16 horas, se va incrementando lentamente durante el tiempo de cultivo en estas condiciones, alcanzándose niveles 3 veces superiores a las 64 horas (fig. 14, a y b).

La insulina (40 nM) adicionada al medio, duplica el contenido de RNAm de la G6PD en los hepatocitos tanto a las 40 como a las 64 horas de cultivo en presencia de la misma respecto a las células control sin tratar (fig. 14, a y b).

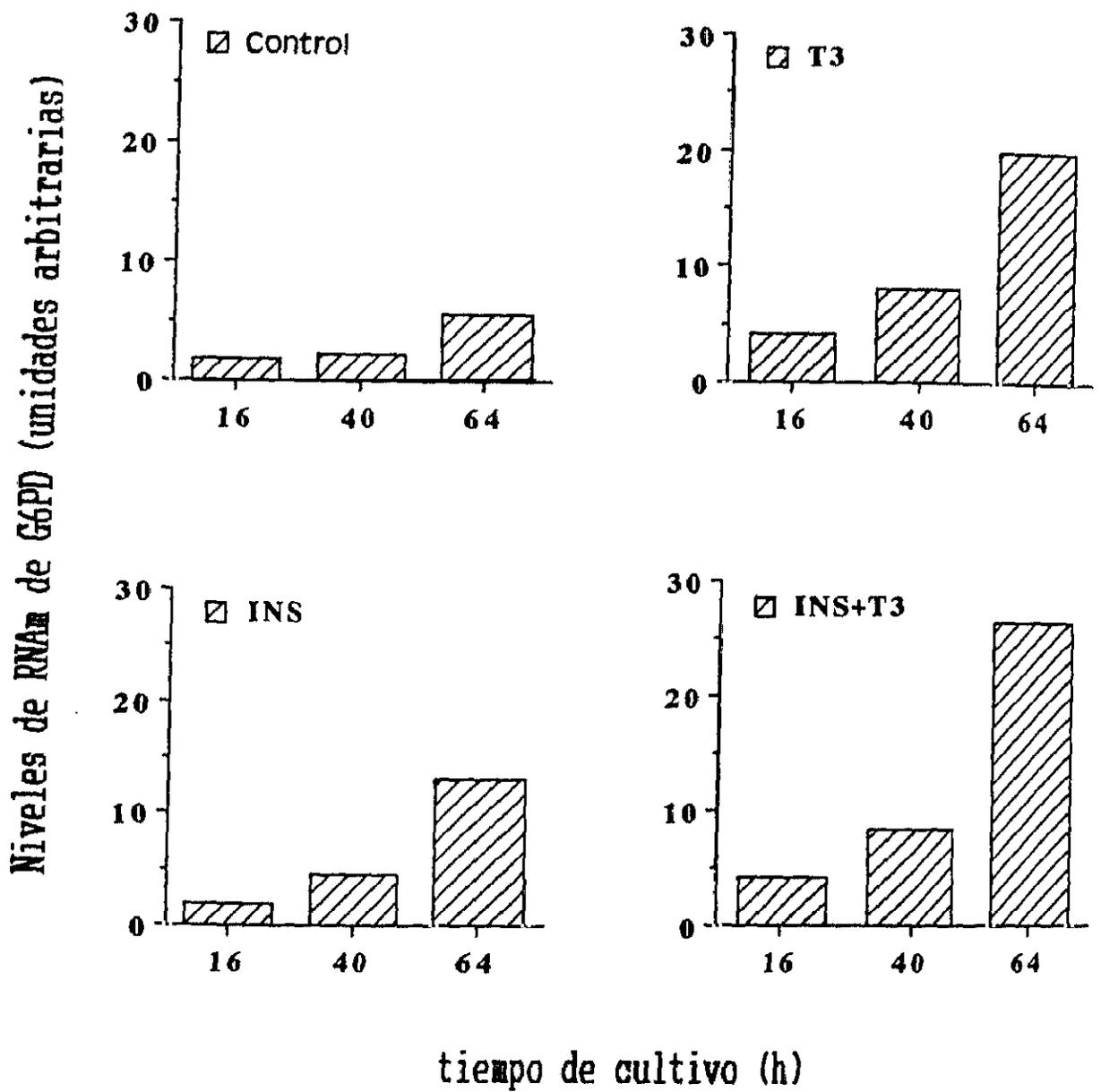
La presencia de  $T_3$  (1  $\mu$ M) en el medio de cultivo, produce incrementos de 2, 3,3 ó 3,5 veces en la expresión del RNAm de la G6PD tras 16, 40 ó 64 horas de cultivo respectivamente frente a las células control sin tratar (fig. 14, a y b).

Cuando se combinan la insulina y la  $T_3$ , tras 16 ó 40 horas de cultivo en presencia de ambas hormonas los niveles de RNAm de la G6PD son equivalentes a los obtenidos en presencia únicamente de  $T_3$  (fig. 14, a y b). Sin embargo, tras 64 horas de cultivo, sí que se aprecia un efecto sinérgico entre ambas hormonas en la acumulación de RNAm de la G6PD, alcanzándose unos niveles 4,5 veces superiores a los obtenidos tras 64 horas de cultivo en ausencia de hormonas (fig. 14, a y b).

La adición de dexametasona (100 nM) al medio, es capaz de inhibir casi totalmente la expresión génica de la G6PD tras 64 horas de cultivo en presencia de glucosa 5 mM y en ausencia de suero y hormonas (fig. 15). De manera semejante, la presencia de dexametasona inhibe casi por completo la acumulación del RNAm de la G6PD estimulada por la insulina tras 64 horas de cultivo (fig. 15). Asimismo, cuando además de  $T_3$  se añade al medio dexametasona, se produce una reducción de un 55 % en el aumento de la expresión del RNAm de la G6PD producido por  $T_3$  tras 64 horas de cultivo (fig. 15). Igualmente, la inducción de



**Fig. 14:** Expresión del RNAm de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en cultivos primarios de hepatocitos fetales: Efecto de la insulina y la triiodotironina. Los hepatocitos fetales se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM como fuente de carbono en presencia o ausencia de insulina (INS 40 nM), triiodotironina (T<sub>3</sub> 1 μM) o la combinación de ambas, como se indica en la figura. El RNA total (20 μg) se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con un <sup>32</sup>P-cDNA específico para la G6PD; a) la figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.



**Fig. 14b:** Análisis densitométrico de una autorradiografía representativa.

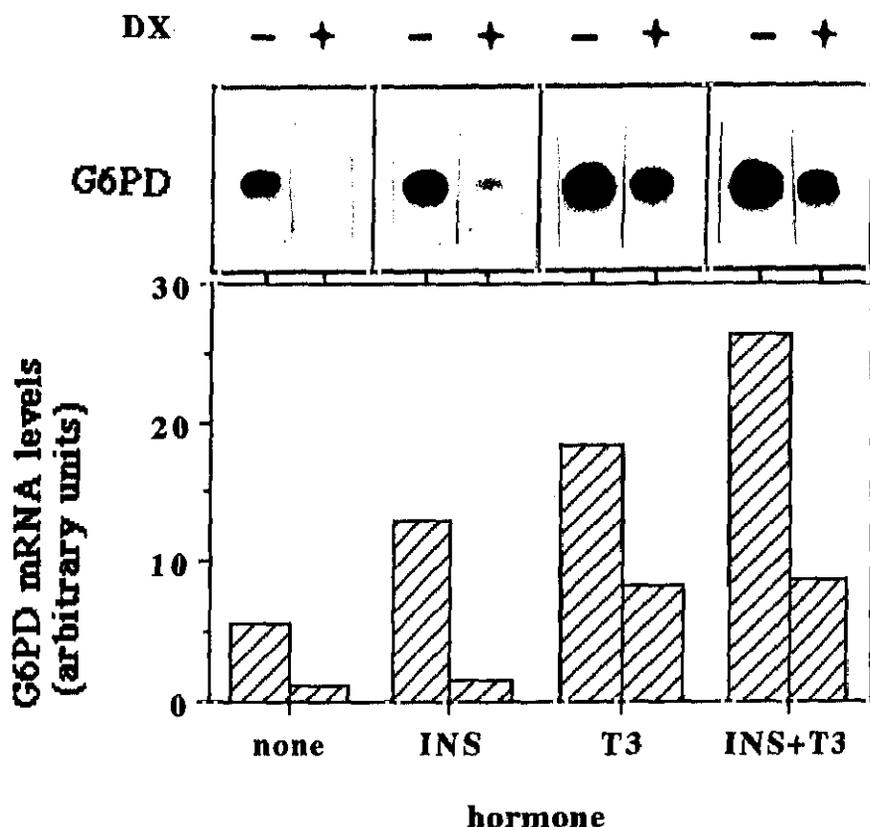


Fig. 15: Expresión del RNAm de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en hepatocitos fetales en cultivo primario: Efecto de la dexametasona. Las células se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM, triiodotironina ( $T_3$ , 1  $\mu$ M), insulina (INS 40 nM), o la combinación de ambas, en presencia o ausencia de dexametasona (DX 100 nM), como se indica en la figura. El RNA total (20  $\mu$ g) se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con un  $^{32}$ P-cDNA específico para la G6PD; en el panel superior se muestra la autorradiografía de un experimento representativo y en el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de la misma.

la expresión génica de la G6PD producida por la presencia conjunta de  $T_3$  e insulina tras 64 horas de cultivo, se ve reducida en un 67 % por la presencia de dexametasona (fig. 15).

Los niveles de RNAm de la G6PD observados en presencia de dexametasona y  $T_3$  tras 64 horas de cultivo (fig. 15), se ven disminuídos en un 54 % por la adición de glucagón  $1 \mu\text{M}$  al cultivo (fig. 16). Si en vez de glucagón se añade dibutiril-AMPc ( $0,5 \text{ mM}$ ), la disminución que se produce es más drástica y del orden de un 90 % (fig. 16).

Cuando se estudia la influencia de las diferentes fuentes de carbono en la acumulación del RNAm de la G6PD en los hepatocitos fetales, no se observan diferencias significativas entre los niveles detectados con los sustratos glucosa  $5$  ó  $10 \text{ mM}$ , dihidroxiacetona  $5 \text{ mM}$  ó lactato  $10 \text{ mM}$  junto con piruvato  $1 \text{ mM}$  (resultados no mostrados).

El aumento de la expresión génica de la G6PD en hepatocitos de 20 días cultivados en medio sin suero suplementado con glucosa  $5 \text{ mM}$  en ausencia de hormonas, podría estar relacionado con el metabolismo de los carbohidratos y su posible influencia en la expresión de la G6PD. Sin embargo, parece ser que la transcripción de la G6PD depende en mayor medida de las proteínas que de los carbohidratos (Fukuda y col., 1987). En este sentido, en los hepatocitos adultos en cultivo, está descrito que los carbohidratos por sí solos no son capaces de afectar a la expresión de la G6PD (Manos y col., 1991). Al mismo tiempo, la simple presencia de aminoácidos esenciales en el medio es capaz de inducir la expresión de la G6PD en los hepatocitos adultos a lo largo del tiempo de cultivo (Fukuda y col., 1987). Luego quizás la evolución creciente del RNAm de la G6PD a lo largo del cultivo se deba en gran parte a los aminoácidos que forman parte del medio 199.

Como se ha descrito, cuando se cultivan los hepatocitos

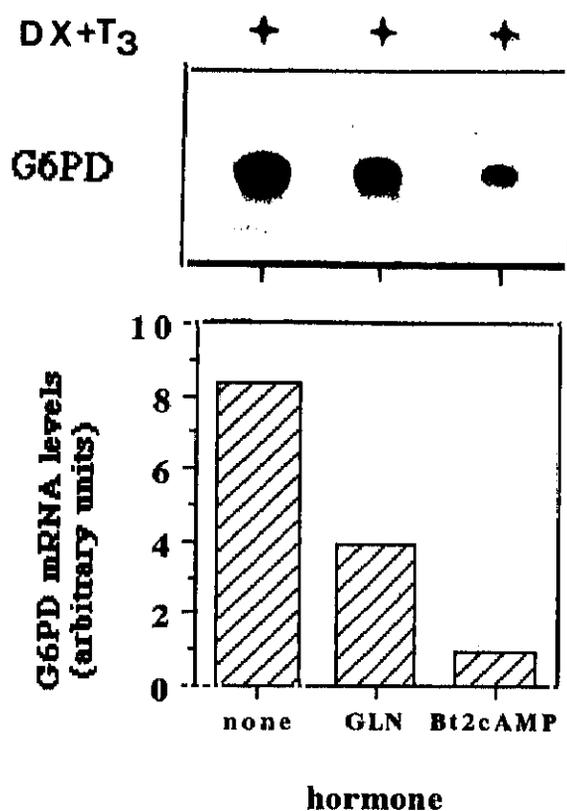


Fig. 16: Expresión del RNAm de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en hepatocitos fetales en cultivo primario: Efecto del glucagón y el AMPc. Las células se cultivaron durante 16, 40 ó 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM, triiodotironina ( $T_3$  1  $\mu$ M) y dexametasona (DX 100 nM) en presencia o ausencia de glucagón (GLN 1 $\mu$ M) o dibutiril AMPc (Bt<sub>2</sub>cAMP 0,5 mM), como se indica en la figura. El RNA total (20  $\mu$ g) se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con un <sup>32</sup>P-cDNA específico para la G6PD; en el panel superior se muestra la autorradiografía de un experimento representativo y en el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de la misma.

fetales de 20 días en un medio suplementado con glucosa 5 mM en ausencia de suero fetal, la presencia tanto de insulina como de  $T_3$  por separado produce un aumento de la expresión génica de la G6PD ya existente en ausencia de hormonas.

El efecto de la insulina como inductor del contenido de RNAm para la G6PD, se había descrito ya para los hepatocitos adultos de rata en cultivo primario (Fritz y col., 1986). Además, en estudios anteriores en este mismo sistema, se afirmaba que la insulina inducía no sólo la expresión de la G6PD sino también la lipogénesis (Nakamura y col., 1982). Los resultados expuestos, muestran que en los hepatocitos fetales la insulina produce un incremento de dos veces en el contenido de RNAm para la G6PD tras 40 y 64 horas de cultivo frente a las células control sin tratar (fig. 14, a y b). Esta observación, sugiere que la G6PD puede estar contribuyendo a la producción del NADPH requerido para hacer frente al estímulo de la síntesis de lipídica producido por la insulina. En otras células fetales como los adipocitos marrones de rata, la insulina también es capaz de aumentar la expresión génica de la G6PD (Valverde y col., 1992).

La presencia de  $T_3$  en el cultivo produce un aumento en el contenido de RNAm para la G6PD tras 64 horas casi dos veces superior al producido por la insulina (fig. 14, a y b). Este efecto de la  $T_3$  en los hepatocitos fetales contrasta con la ausencia de efecto sobre la expresión de la G6PD descrita por algunos autores en cultivos de hepatocitos adultos (Nakamura y col., 1982) (Yoshimoto y col., 1983b), pero concuerda con otros estudios en los que sí se le atribuye un papel a la  $T_3$  en la inducción de la expresión de la G6PD, tanto "in vivo" (Miksicek y col., 1982) como "in vitro" (Spence y col., 1982). Asimismo, en los adipocitos marrones fetales de rata la  $T_3$  tampoco es capaz de modificar la expresión de la G6PD (Valverde y col.,

1992).

La máxima inducción de la G6PD en los hepatocitos fetales se obtiene tras 64 horas de cultivo en presencia de  $T_3$  e insulina (fig. 14, a y b). En este sistema, la  $T_3$  y la insulina actúan de manera sinérgica sobre la acumulación del RNAm de la G6PD. Este efecto, podría ser comparable a lo que ocurre en los cultivos de adipocitos marrones fetales, donde la  $T_3$  es capaz de aumentar el efecto estimulador de la insulina sobre la expresión del RNAm de la G6PD (Valverde y col., 1992). Sin embargo, en los estudios de hepatocitos adultos este sinergismo no se ha descrito. Dado que tanto la  $T_3$  como la insulina son capaces de inducir la expresión génica de la G6PD por sí solas, se sugiere que ambas hormonas ejercen su efecto por mecanismos diferentes con un objetivo común, de tal manera que al combinarlas sus efectos son aditivos.

La dexametasona presenta un efecto negativo sobre la inducción de la expresión génica de la G6PD en los hepatocitos fetales (fig. 15). En este sentido, es capaz de inhibir casi totalmente la acumulación del RNAm de la G6PD que se produce en ausencia de hormonas o en presencia de insulina (fig. 15). Sin embargo, la dexametasona en presencia de  $T_3$  o de insulina junto con  $T_3$ , aunque reduce a menos de la mitad los niveles de RNAm de la G6PD, no es capaz de inhibir completamente su efecto (fig. 15). La acción inhibitoria de la dexametasona en este sistema, no tiene semejanza con su comportamiento en otros sistemas. Así, en cultivos de hepatocitos de rata adulta ayunada, la dexametasona produce un aumento en los niveles de RNAm de la G6PD (Fritz y col., 1986).

En cuanto al papel del glucagón sobre la expresión del RNAm de la G6PD en los hepatocitos fetales, se observa que es capaz de reducir en un 50 % la acumulación del mismo que se detecta en presencia de  $T_3$  y dexametasona tras 64 horas de cultivo

(fig. 16). Si en estas mismas condiciones, se añade dibutiril AMPc en lugar de glucagón, la disminución de los niveles del RNAm de la G6PD es mucho mayor, quedando su expresión reducida a un 10 % de los niveles obtenidos en presencia únicamente de  $T_3$  y dexametasona (fig. 16). Estos datos contrastan una vez más con los descritos para los hepatocitos adultos, donde el glucagón no afecta a la expresión génica de la G6PD (Yoshimoto y col., 1983b).

Dada la importancia del hígado en la lipogénesis durante el periodo perinatal, resulta muy interesante el estudio comparativo de la expresión en los hepatocitos fetales de 20 días de estas dos enzimas lipogénicas clave, la EM y la G6PD.

Como se ha descrito, la expresión génica de la EM se puede inducir precózmamente en estas células tras 40 ó 64 horas de cultivo en medio suplementado con glucosa 5 mM en ausencia de hormonas. Por su parte, el RNAm de la G6PD está presente ya en los hepatocitos fetales tras el aislamiento, y sus niveles se incrementan a lo largo del tiempo de cultivo en las mismas condiciones.

En los hepatocitos fetales, la insulina tiene un efecto inductor muy pobre sobre la expresión del RNAm de la EM. Sin embargo, la presencia de insulina en el medio cuadruplica los niveles de RNAm de la G6PD tras 64 horas de cultivo. Por lo tanto, la presencia de la insulina sola en el cultivo afecta en mayor medida a la expresión génica de la G6PD que a la de la EM.

La  $T_3$  se presenta como un importante inductor tanto de la expresión precoz de la EM como de la expresión de la G6PD en los hepatocitos fetales. Cuando se combina la insulina con la  $T_3$  se produce un efecto sinérgico en la inducción de la expresión de los RNAm de ambas enzimas, siendo más importante el efecto aditivo en el caso de la G6PD.

La presencia de dexametasona en el cultivo, acompañada o no por insulina, produce en los hepatocitos fetales una disminución de los niveles de RNAm de la EM, y en mayor medida, del RNAm de la G6PD. Sin embargo, en presencia de  $T_3$  y un medio glucosado, la dexametasona produce la máxima inducción de la expresión del RNAm de la EM, mientras que reduce a la mitad la expresión del RNAm de la G6PD. Ambos efectos son independientes de la presencia o ausencia de la insulina junto con la  $T_3$  y la dexametasona. Luego el papel permisivo de la dexametasona en la inducción de la expresión génica de la EM en presencia de  $T_3$ , no se reproduce en el caso de la G6PD, aunque la presencia de  $T_3$ , modera el efecto negativo de la dexametasona sobre su expresión.

El efecto inhibitor del glucagón y del dibutiril AMPo sobre los niveles de expresión de los RNAm de la EM y la G6PD en presencia de dexametasona y  $T_3$ , es de una magnitud comparable en ambos casos.

En conclusión, en los hepatocitos fetales de 20 días en cultivo, la inducción de la expresión de la EM y la G6PD en respuesta a insulina,  $T_3$ , dexametasona, y sus combinaciones, plantea significativas diferencias en su regulación de carácter cualitativo y cuantitativo. Estas diferencias en su regulación pueden justificarse con el hecho de que aunque ambas enzimas están implicadas en la producción de NADPH necesaria para la síntesis de ácidos grasos, mientras que la EM se dedica íntegramente a esta tarea, la G6PD tiene además una función en el aporte de ribosa fosfato necesario para la síntesis de ácidos nucleicos.

### 4.3 EXPRESION DE LA G6PD, LA PEPCK Y LA EM EN CONDICIONES PROLIFERATIVAS Y NO PROLIFERATIVAS

Los experimentos que se detallan a continuación, se realizaron cultivando hepatocitos fetales de 20 días de gestación a una densidad celular baja ( $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) durante 64 horas en presencia constante de dexametasona y de diversas combinaciones de agentes de comprobada acción inductora de la proliferación o bien de la maduración en estas células. Se trataba de conocer cómo se veía afectada la expresión de las enzimas G6PD, PEPCK y EM por los agentes madurativos en un medio suplementado con agentes mitogénicos. Las variaciones en la expresión de la G6PD se interpretaron como marcadores del estado proliferativo de las células en cada condición.

#### 4.3.1 Expresión de la G6PD

La G6PD es una enzima que participa en la producción de ribosomas fosfato para la síntesis de DNA. Su expresión en las condiciones de proliferación ya descritas, constituye un posible marcador enzimático implicado en el estado proliferativo de los hepatocitos fetales.

Trás 64 horas de cultivo en medio suplementado con dexametasona y en presencia o ausencia de otras hormonas o factores de crecimiento, los hepatocitos fetales se recogieron para la determinación de la actividad enzimática específica (tabla 5) y el contenido de RNAm de la G6PD (fig. 17).

La actividad específica G6PD inicial de los hepatocitos fetales justo después de su aislamiento es de  $33,3 \pm 1,0$  mU/mg

de prot. (tabla 5), pero tras 64 horas de cultivo en un medio sin suero en presencia únicamente de dexametasona (células quiescentes), la actividad decaé a  $23,8 \pm 2,2$  mU/prot. (tabla 5). Sin embargo, cuando el medio se suplementa con suero fetal al 10 % durante las 64 horas de cultivo (células proliferantes), las células presentan una actividad G6PD de  $34,8 \pm 2,0$  mU/mg de prot. similar a la de los hepatocitos recién aislados (tabla 5).

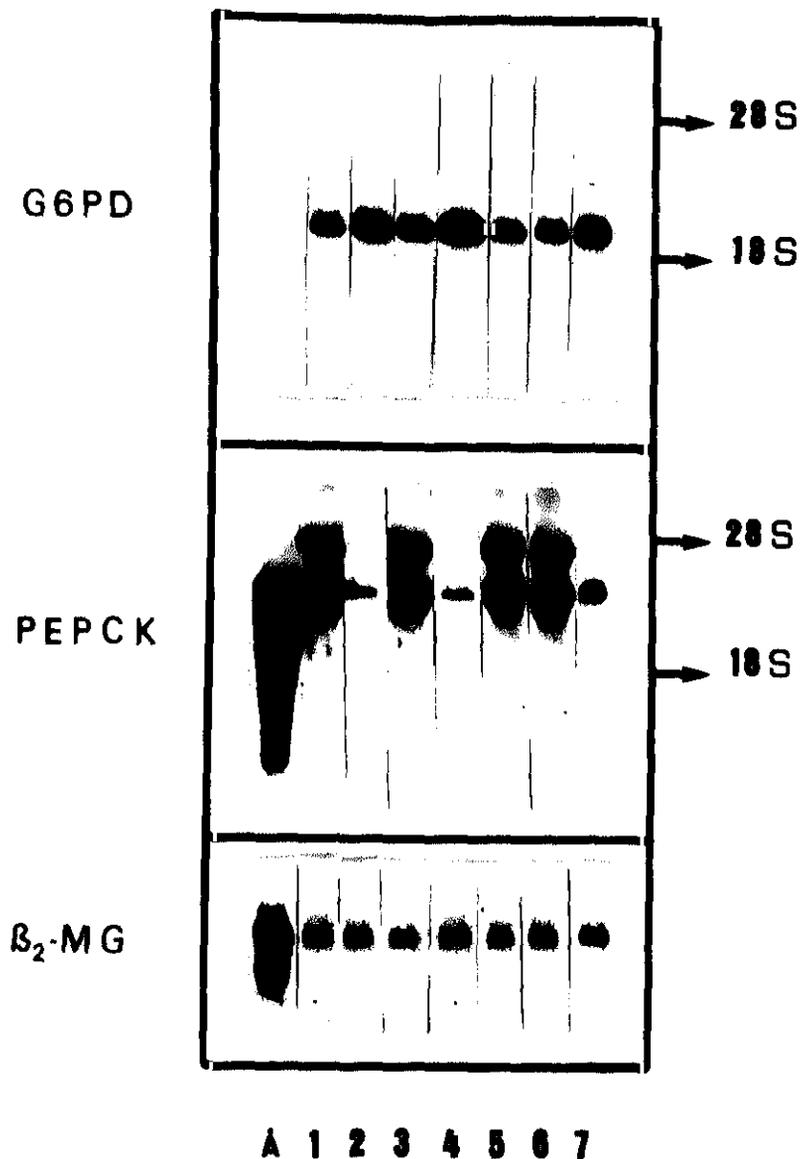
El cultivo de los hepatocitos fetales en presencia de glucagón no modifica prácticamente la actividad G6PD respecto de las células sin tratar (tabla 5). Por otro lado, la presencia de IBMX y forskolina en el medio produce incluso una disminución en la actividad G6PD frente a las células control (tabla 5). El análisis del RNAm de la G6PD en estas células que se mantienen quiescentes en respuesta al tratamiento con glucagón o con IBMX y forskolina muestra unos niveles de expresión de la G6PD más bajos, sobre todo en el caso de las células tratadas con IBMX y forskolina (fig. 17, a y b), que los obtenidos en los hepatocitos que se encuentran en estado proliferativo por la presencia de suero fetal al 10 % (fig. 17, a y b).

La combinación del glucagón con insulina no produce tampoco un aumento significativo ni de la actividad específica G6PD (tabla 5), ni del nivel de RNAm de la misma (fig. 17, a y b). Por tanto, la respuesta proliferativa de los hepatocitos fetales a la insulina en este sistema es muy pobre, puesto que no es capaz de producir un aumento en la expresión de la G6PD como ocurre en los hepatocitos adultos (Manos y col., 1991).

La presencia de EGF junto con glucagón, solo o con insulina, produce un aumento de 2,5 veces en la actividad específica G6PD (tabla 5) y de 2 veces en el contenido de RNAm de la misma (fig. 17, a y b), en comparación con células cultivadas en

<u>Adición</u>	<u>AEE G6PD</u> (mU/mg prot)	<u>AEE PEPCK</u> (mU/mg prot)
Control .....	23,8 ± 2,2	5,0 ± 1,0
Glucagón (1 µM) .....	20,0 ± 2,2	17,8 ± 1,2
Glucagón + EGF (3,3 nM) .....	48,7 ± 2,2	4,2 ± 0,4
Glucagón + Insulina (40 nM) .....	26,2 ± 3,8	13,2 ± 2,3
Glucagón + Insulina + EGF .....	51,6 ± 4,9	2,5 ± 0,3
Forskolina (10 µM) + IBMX (50 µM) .....	16,0 ± 2,0	19,5 ± 2,0
Forskolina + IBMX + EGF .....	28,5 ± 3,0	26,0 ± 3,0
Suero fetal 10 % .....	34,8 ± 2,0	4,8 ± 1,2

Tabla 5: Efecto de las hormonas y los factores de crecimiento sobre las actividades G6PD y PEPCK en cultivos primarios de hepatocitos fetales. Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) y varias hormonas y factores de crecimiento. Las actividades enzimáticas específicas se determinaron al final del tiempo de cultivo. Los resultados son las medias ± SEM (n=10-15) y se expresan como mU/mg de proteína. La actividad específica G6PD previa al cultivo era de 33,3 ± 1,0 mU/mg prot., mientras que la actividad específica PEPCK era indetectable.



**Fig. 17: Efecto de las hormonas y los factores de crecimiento sobre la expresión del RNA de la G6PD y la PEPCK en cultivos primarios de hepatocitos fetales.** Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 suplementado con dexametasona (100 nM) y en presencia de glucagón (1 μM) (carril 1), glucagón + EGF (3,3 nM) (carril 2), glucagón + insulina (40 nM) (carril 3), glucagón + insulina + EGF (carril 3), forskolina (10 μM) + IBMX (50 μM) (carril 4), forskolina + IBMX + EGF (carril 5) y suero fetal al 10 % (carril 6). El carril A corresponde al RNA de hígado de rata adulta ayunada 48 horas. El RNA total se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con <sup>32</sup>P-*c*DNAs específicos para la G6PD, la PEPCK y la β<sub>2</sub>-microglobulina (normalización); a) la figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

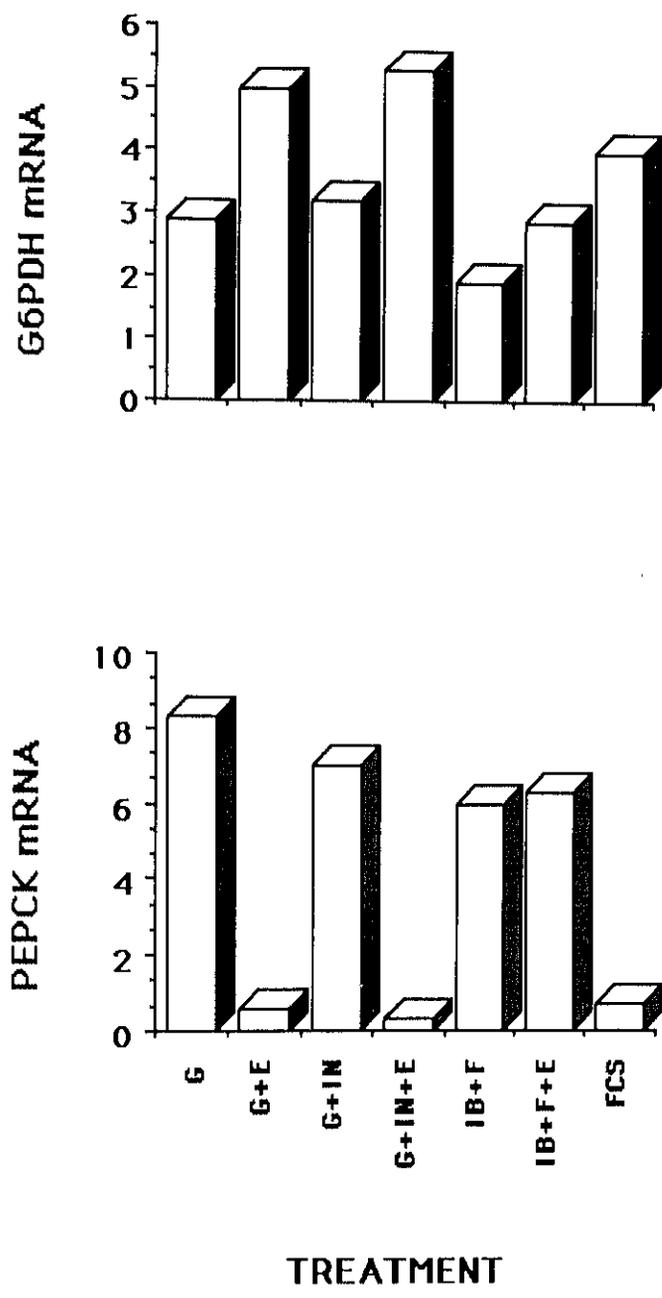


Fig. 17b: Análisis densitométrico de una autorradiografía representativa.

ausencia de dicho factor (tabla 5, fig. 17, a y b). Sin embargo, la presencia de IBMX y forskolina conjuntamente con EGF, es capaz de anular el efecto inductor del mismo sobre la actividad (tabla 5) y el contenido de RNAm de la G6PD (fig. 17, a y b), de tal manera que ambos parámetros permanecen al mismo nivel que en células quiescentes (tabla 5, fig. 17, a y b).

En todas las condiciones estudiadas, los RNAs se hibridaron con la  $\beta_2$ -microglobulina para la normalización del contenido de RNA total de las muestras. En este sentido, se observó que los hepatocitos adultos expresan dos isoformas de RNAm de  $\beta_2$ -microglobulina mientras que los hepatocitos fetales sólo expresaron una de ellas (fig. 17a).

De acuerdo con estos datos, los hepatocitos fetales quiescentes muestran una baja expresión de la G6PD, mientras que los hepatocitos proliferantes mantienen una alta expresión de G6PD. Por tanto, se sugiere que la G6PD juega un papel en la síntesis de DNA en los hepatocitos fetales en crecimiento, como lo hace en el caso de los hepatocitos adultos en cultivo (Yoshimoto y col., 1983a).

#### 4.3.2 Expresión de la PEPCK

Simultáneamente al estudio de la G6PD, se investigó la expresión de la PEPCK, una enzima de expresión postnatal que puede inducirse precózmemente por hormonas, como un posible marcador de la maduración de los hepatocitos fetales.

Como en el caso anterior, tras 64 horas de cultivo en medio sin suero y en presencia de dexametasona, se recogieron las células para la determinación de la actividad enzimática específica (tabla 5) y el contenido de RNAm (fig. 17) de la PEPCK.

En los hepatocitos recién aislados no se detecta actividad

específica PEPCK. Sin embargo, tras 64 horas de cultivo en medio sin suero y en presencia de dexametasona (células control), se encuentra una actividad específica PEPCK de  $5,0 \pm 1,0$  mU/mg de proteína (tabla 5).

Las células cultivadas en medio suplementado con suero fetal al 10 %, presentan una baja actividad enzimática PEPCK de  $4,8 \pm 1,2$  mU/mg de proteína (tabla 5), equivalente al valor de la actividad en las células control sin tratar. Asimismo, el contenido de RNAm de la PEPCK en estas condiciones es reducido (fig. 5).

La presencia de glucagón en el medio de cultivo produce un incremento de 3 veces en la actividad específica PEPCK (tabla 5) en comparación con las células control (tabla 5). Paralelamente, el estudio del RNAm de la PEPCK en estas condiciones muestra un alto nivel de expresión de la misma en respuesta al glucagón (fig. 17, a y b).

Cuando se añade al medio de cultivo insulina junto con glucagón, se produce una disminución de un 20 % tanto en la actividad específica PEPCK (tabla 5) como en los niveles de RNAm de la misma (fig. 17, a y b) frente a los inducidos por el glucagón en solitario (tabla 5, fig. 17, a y b). Luego, el conocido efecto supresor de la insulina sobre la expresión de la PEPCK descrito para los hepatocitos adultos (Christ y col., 1988), no se observa en los hepatocitos fetales en este sistema. Como ya se ha citado, la causa del pobre efecto de la insulina en este sistema puede ser una inmadurez en el mecanismo postreceptor (Menuelle y col., 1991).

El cultivo de los hepatocitos fetales en presencia de forskolina junto con IBMX, produce un aumento de 4 veces en la actividad específica PEPCK (tabla 5), y una alta expresión del RNAm de la misma (fig. 17, a y b) en comparación con las células control no tratadas (tabla 5, fig. 17, a y b).

Por tanto, los hepatocitos quiescentes cultivados en presencia de glucagón, glucagón junto con insulina o IBMX junto con forskolina, muestran un alto nivel de expresión de PEPCK que alcanza un 50 % del encontrado en el hígado de ratas adultas ayunadas 48 horas (fig. 17a).

La normalización del RNA total de las muestras se realizó por hibridación con  $\beta_2$ -microglobulina (fig. 17a).

La presencia de EGF junto con glucagón, con o sin insulina, produce una drástica inhibición de la expresión de la PEPCK que inducía el glucagón, observándose una actividad específica (tabla 5) y un contenido de RNAm (fig. 17, a y b) de la PEPCK muy bajos. Este hecho podría explicarse por la paulatina pérdida de sensibilidad de los receptores tipo adenilato-ciclasa (receptor del glucagón) por sus agonistas (glucagón) provocada, por los mismos agonistas, y por la presencia de activadores de la proteína quinasa C, como es el caso del EGF (Iizuka y col., 1991).

De acuerdo con estos datos y los expuestos anteriormente para la expresión de la G6PD, los hepatocitos fetales en los que se ha inducido la proliferación por EGF, muestran una elevada expresión de la G6PD mientras que la expresión de la PEPCK se ve drásticamente reducida, lo cual indica que probablemente la maquinaria celular está envuelta en mantener la proliferación celular. Por tanto, en estas condiciones experimentales, se observa una relación inversa entre la expresión de la G6PD y de la PEPCK en los hepatocitos proliferantes.

Sin embargo, la presencia de EGF junto con IBMX y forskolina produjo una actividad específica (tabla 5) y un contenido de RNAm (fig. 17, a y b) de la PEPCK altos en comparación con las células cultivadas en presencia de EGF y glucagón (tabla 5, fig. 17, a y b). Al parecer, en presencia de activadores de la

proteín quinasa C, la forskolina induce una acumulación de AMPc intracelular adicional, de mayor grado cuanto mayor sea la acumulación de AMPc inicial (Iizuka y col., 1991). En estas condiciones, la elevación de los niveles de AMPc producida por IBMX y forskolina en presencia de EGF, actúa de manera negativa sobre la inducción de la proliferación y de la expresión de la G6PD producida por el EGF en los hepatocitos, mientras que favorece el mantenimiento de unos altos niveles de expresión de la PEPCK. Luego se observa de nuevo una relación inversa entre la expresión de la G6PD y la PEPCK, pero esta vez, en hepatocitos quiescentes.

#### 4.3.3 Expresión de la EM

En los hepatocitos de rata adulta en cultivo primario, la inducción de la actividad específica EM producida por insulina y  $T_3$ , se ve fuertemente suprimida por la presencia de EGF (Yoshimoto y col., 1983a).

Para estudiar el efecto del EGF en la expresión del gen de la EM en hepatocitos fetales, se cultivaron los hepatocitos durante 64 horas en presencia de  $T_3$ , dexametasona e insulina, en un medio sin suero suplementado con glucosa 5 mM.

En estas condiciones, la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en las cuatro últimas horas de cultivo es 2,5 veces superior en presencia de EGF (tabla 6) con respecto a muestras control mantenidas en ausencia de EGF (tabla 6). La presencia adicional de insulina no modifica significativamente este resultado (tabla 6).

Sin embargo, la presencia de EGF en el medio de cultivo, suprime la acumulación del RNAm de la EM inducido por  $T_3$  y dexametasona, independientemente de la presencia de insulina en el medio (fig. 18, panel superior e inferior). Este efecto

<u>Adición</u>	<u>Incorporación de <sup>3</sup>H-timidina</u> (porcentaje)	
		EGF (3,3 nM)
Dexametasona + T <sub>3</sub> .....	100	243 ± 15
Dexametasona + T <sub>3</sub> + Insulina .....	108 ± 30	256 ± 22

Tabla 6: Efecto del EGF sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en hepatocitos fetales de rata en cultivo primario en condiciones de inducción de la EM. Las células se cultivaron durante 64 horas en medio con glucosa 5 mM suplementado con dexametasona (100 nM) y T<sub>3</sub> (1 μM) en presencia o ausencia de insulina (40 nM). La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina se midió en las 4 últimas horas de cultivo. Los resultados son las medias ± SEM (n=4) y están expresados como porcentaje de la incorporación en las células control en ausencia de EGF e insulina.

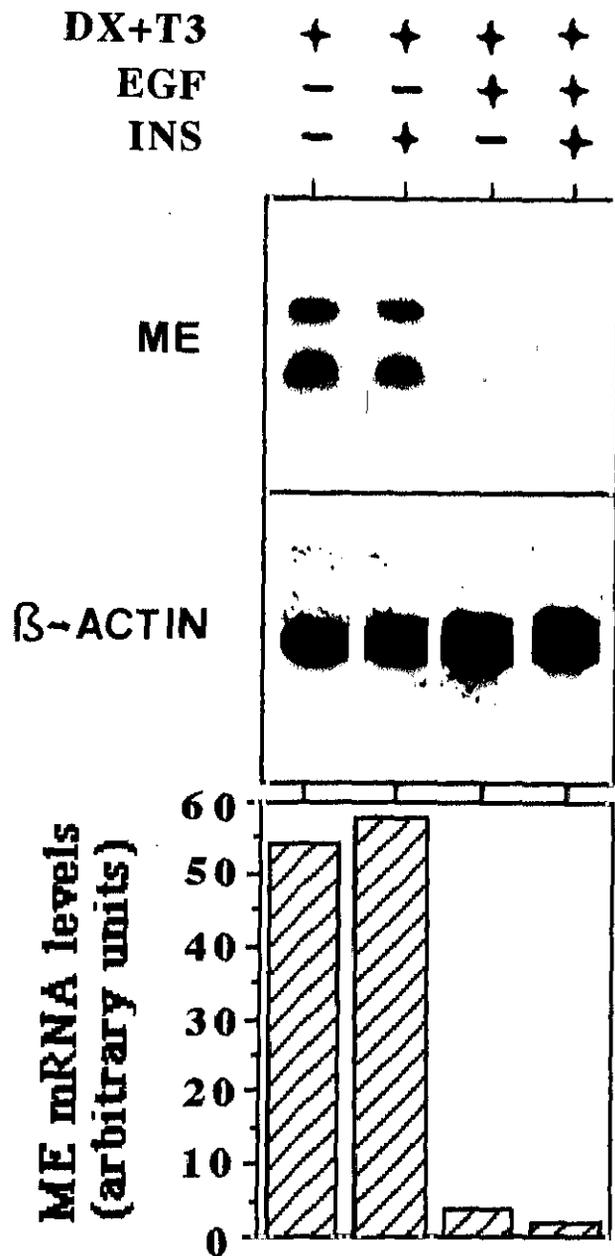


Fig. 18: Efecto del EGF sobre la expresión del gen de la enzima mállica en hepatocitos fetales en cultivo primario. Las células se cultivaron durante 64 horas en medio 199 con glucosa 5 mM en presencia de dexametasona (DX 100 nM) y triiodotironina ( $T_3$  1 $\mu$ M), y en ausencia o presencia de EGF (3,3 nM) e insulina (INS 40 nM), como se indica en la figura. El RNA total (20  $\mu$ g) se sometió a análisis por Northern-blot y se hibridó con dos  $^{32}$ P-cDNA específicos para la EM (panel superior) y para la  $\beta$ -actina (panel central) respectivamente. En el panel inferior se muestra la valoración densitométrica de la autorradiografía de la EM.

negativo del EGF sobre la expresión génica de la EM es específico, puesto que la expresión del gen de la  $\beta$ -actina prácticamente no varía en ninguna de las condiciones estudiadas (fig. 18, panel central), y se asemeja, al que produce este mismo factor sobre la inducción del RNAm de la PEPCK por glucagón y dexametasona descrito anteriormente, reforzando la idea de que la proliferación y la diferenciación son procesos regulados de una manera inversa.

## DISCUSION FINAL

Todos los resultados descritos demuestran que los cultivos primarios de hepatocitos fetales de rata de 20 días de gestación son un valioso sistema para el estudio "in vitro" de la regulación de la proliferación y la diferenciación celular.

Como se ha visto, los hepatocitos fetales son unas células capaces de proliferar en cultivo primario en respuesta a factores de crecimiento y al suero fetal. Cuando se encuentran a bajas densidades celulares en presencia de EGF en el medio, las células abandonan la fase  $G_0/G_1$  y se incorporan al ciclo celular. En este momento, la célula requiere un aumento del aporte de pentosas fosfato para la síntesis de DNA, lo cual provoca una inducción de la expresión de la enzima limitante de su proceso de síntesis, la G6PD.

Por otro lado, también se ha mostrado como los hepatocitos fetales pueden diferenciarse en el cultivo adquiriendo capacidades funcionales propias de las células de hígado de organismos adultos maduros. Tal es el caso de las enzimas PEPCK y EM, dos enzimas de aparición postnatal cuya puesta en marcha es fundamental para la supervivencia del neonato, la PEPCK como

enzima limitante de la gluconeogénesis y la EM como enzima generadora de poder reductor para la síntesis de ácidos grasos. Así, cuando se cultivan los hepatocitos fetales a altas densidades celulares en presencia de ciertas hormonas y sustratos, éstos permanecen en la fase  $G_0$  del ciclo celular y se diferencian en el cultivo induciéndose la expresión de dichas enzimas. La presencia conjunta de agentes que aumentan los niveles de AMPc y de dexametasona, produce la acumulación del RNAm de la PEPCK, alcanzándose niveles de expresión génica del orden de los encontrados en hígado de rata adulta ayunada. Por su parte, la expresión de la EM se induce por la presencia en el cultivo de  $T_3$ , insulina y dexametasona en un medio suplementado con glucosa, alcanzándose niveles de RNAm de la EM similares a los encontrados en hígado de neonatos tras el destete. En este sentido, la expresión de la G6PD, aumenta en presencia de  $T_3$  e insulina. En estas condiciones, se ve favorecida la lipogénesis hepática, y en respuesta al aumento del requerimiento de equivalentes reductores para la síntesis de ácidos grasos, aumenta la expresión tanto de la G6PD como de la EM.

Finalmente, en los hepatocitos fetales que han abandonado la fase  $G_0/G_1$  y proliferan en respuesta al EGF, las hormonas y los sustratos no son capaces de producir la expresión precoz de la PEPCK y la EM. Por tanto, genes como la PEPCK o la EM, que pueden ser expresados precózmamente en hepatocitos fetales quiescentes por estímulos específicos, no se expresan en células que proliferan en respuesta a EGF, siendo la G6PD la única que se expresa en ambas condiciones por su papel dual en la proliferación y en funciones características hepáticas.

## V. -CONCLUSIONES

- 1) Los hepatocitos fetales de 20 días cultivados a baja densidad celular proliferan en respuesta al EGF y al suero fetal produciéndose un aumento en la síntesis de DNA y en la proporción de células en fase S del ciclo celular.
- 2) Los hepatocitos fetales cultivados a alta densidad celular, son capaces de expresar precózmemente genes característicos del estadio adulto como la PEPCK y la EM en respuesta a estímulos hormonales específicos.
- 3) La expresión del RNAm de la PEPCK en los hepatocitos fetales puede inducirse a corto plazo en presencia de IBMX y forskolina, y a largo plazo, por la combinación de glucagón y dexametasona. La insulina presenta un ligero efecto inhibitor sobre dicha inducción.
- 4) El cultivo de los hepatocitos en presencia de  $T_3$ , insulina y dexametasona en un medio suplementado con glucosa 5 mM, produce la expresión precoz del RNAm de la EM siendo la  $T_3$  el principal inductor. Esta inducción es paralela a un incremento en el contenido de proteína y actividad específica EM.
- 5) La glucosa, y otras fuentes de carbono como el lactato-piruvato y la dihidroxiacetona, pueden inducir la expresión génica de la EM en ausencia de hormonas.

- 6) La insulina y la  $T_3$  individualmente son importantes inductores de la expresión del RNAm de la G6PD en los hepatocitos fetales, y al combinarlas, presentan un efecto sinérgico sobre dicha inducción. Este efecto se ve fuertemente reducido en presencia de dexametasona.
- 7) La presencia de glucagón, y en mayor medida de dibutiril-AMPc, reprime la inducción de la expresión del RNAm y la actividad específica EM y G6PD.
- 8) Los hepatocitos que proliferan en respuesta al EGF muestran un alto nivel de expresión génica de la G6PD, mientras que la inducción hormonal de la expresión de la PEPCK y la EM se ve fuertemente reprimida en estas condiciones.

## **VI . -BIBLIOGRAFIA**

-Amasino, R. M. (1986) "Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol" *An. Bioch.* 152, 304-307.

-Anklesaria, P., Teixidó, J., Laiho, M., Pierce, J. H., Greenberger, J. S. y Massagué, J. (1990) "Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor  $\alpha$  to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3289-3293.

-Back, D. W., Wilson, S. B., Morris, S. M. Jr. y Goodridge, A. G. (1986) "Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture" *J. Biol. Chem.* 261, 12555-12561.

-Ballard, F. J. y Hanson, R. W. (1967a) "Changes in lipid synthesis in rat liver during development" *Biochem. J.* 102, 952-958.

-Ballard, F. J. y Hanson, R. W. (1967b) "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver" *Biochem. J.* 104, 866-871.

-Batenburg, J. J. y Whitsett, J. A. (1989) "Levels of mRNAs coding for lipogenic enzymes in rat lung upon fasting and refeeding and during perinatal development" *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 329-324.

-Beale, E. G., Chrapkiewicz, N. B., Scoble, H. A., Metz, R. J., Quick, D. P., Noble, R. L., Donelson, J. E., Biemann, K. y Granner, D. K. (1985) "Rat hepatic cytosolic

phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Structures of the protein, messenger RNA, and gene" *J. Biol. Chem.* 260, 10748-10760.

-Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M.-L., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F., Aaronson, S. A. (1991) "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the  $\sigma$ -met proto-oncogene product" *Science* 251, 802-804.

-Bradford, M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

-Brown, P. I., Lam, R., Lakshmanan, J. y Fisher, D. A. (1990) "Transforming growth factor alpha in developing rats" *Am. J. Physiol.* 259 (Endocrinol. Metab. 22), E256-E260.

-Bulanyi, G. S., Steele, J. G., McGrath, M. C., Yeoh, G. C. T. y Oliver, I. T. (1979) "Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured foetal hepatocytes from the rat " *Eur. J. Biochem.* 102, 93-100.

-Carpenter, G. y Cohen, S. (1979) "Epidermal growth factor" *Ann. Rev. Biochem.* 48, 193-216.

-Carpenter, G. y Cohen, S. (1990) "Epidermal growth factor" *J. Biol. Chem.* 265, 7709-7712.

-Chomczynski, K. y Sacchi, N. (1987) "Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

-Christ, B., Nath, A., Bastian, H. y Jungermann, K. (1988) "Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes by glucagon and insulin" *Eur. J. Biochem.* 178, 373-379.

-Christ, B., Nath, A. y Jungermann, K. (1990) "Mechanism of the inhibition by insulin of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocyte cultures. Action on gene transcription, mRNA level and stability as well as hysteresis effect" *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 395-402.

-Darling, D. S., Beebe, J. S., Burnside, J., Winslow, E. R. y Chin, W. W. (1991) "3,5,3'Triiodothyronine receptor auxiliary protein (TRAP) binds DNA and forms heterodimers with the T<sub>3</sub> receptor" *Mol. Endocrinol.* 5, 73-84.

-Davis, B. B., Magge, S., Mucenski, C. G. y Drake, R. L. (1988) "Insulin-mediated post-transcriptional regulation of hepatic malic enzyme and albumin mRNAs" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 1081-1087.

-Diamant, S., Gorin, E. y Shafrir, E. (1972) "Enzyme activities related to fatty-acid synthesis in liver and adipose tissue of rats treated with triiodothyronine" *Eur. J. Biochem.* 26, 553-559.

-Dozin, B., Magnuson, M. A. y Nikodem, V. M. (1985) "Tissue-specific regulation of two functional malic enzyme mRNAs by triiodothyronine" *Biochemistry* 24, 5581-5586.

-Dozin, B., Rall, J. E. y Nikodem, V. M. (1986) "Tissue

specific control of rat malic enzyme activity and messenger RNA levels by a high carbohydrate diet" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4705-4709.

-Dunphy, W. G. y Kumagai, A. (1991) "The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity" *Cell* 67, 189-196.

-Dussault, J. H. y Labrie, F. (1975) "Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the neonatal rat" *Endocrinology* 97, 1321-1324.

-Fabregat, I., Lorenzo, M. y Benito, M. (1989) "Precocious induction of malic enzyme by nutritional and hormonal factors in rat foetal hepatocyte primary cultures" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 1028-1034.

-Fitch, W. M. y Chaikoff, I. L. (1960) "Extent and patterns of adaptation of enzyme activities in livers of normal rats fed diets of glucose and fructose" *J. Biol. Chem.* 235, 554-557.

-Fritz, R. S., Stumpo, D. J. y Kletzien, R. F. (1986) "Glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA sequence abundance in primary cultures of rat hepatocytes. Effect of insulin and dexametasone" *Biochem. J.* 237, 617-619.

-Fukuda, H. e Iritani, N. (1987) "Effects of amino-acid composition of the medium and addition of fatty-acid derivatives on the induction of lipogenic enzymes in cultured hepatocytes" *Biochim. Biophys. Acta* 920, 56-61.

-Gandino, L., Munaron, L., Naldini, L., Ferracini, R., Magni, M. y Comoglio, P. M. (1991) "Intracellular calcium regulates

- the tyrosine kinase receptor encoded by the MET oncogene" *J. Biol. Chem.* 266, 16098-16104.
- García-Ruiz, J. P., Ingram, R. y Hanson, R. W. (1978) "Changes in hepatic messenger RNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) during development" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4189-4193.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. y Kirschner, M. W. (1991) "cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34<sup>cdc2</sup>" *Cell* 67, 197-211.
- Gibson, D. M., Lyons, R. T., Scott, D. F. y Muto, Y. (1972) "Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver" *Adv. Enzyme Regul.* 10, 187-204.
- Giralt, M., Park, E. A., Gurney, A L., Liu, J., Hakimi, P. y Hanson, R. W. (1991) "Identification of a thyroid hormone response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene. Evidence for synergistic interaction between thyroid hormone and cAMP cis-regulatory elements" *J. Biol. Chem.* 21991-21996.
- Goodridge, A. G. y Adelman, T. G. (1976) "Regulation of malic enzyme synthesis by insulin, triiodothyronine, and glucagon in liver cells in culture" *J. Biol. Chem.* 251, 3027-3032.
- Gruppuso, P. A. (1989) "Expression of hepatic transforming growth factor receptors during late gestation in the fetal rat" *Endocrinology* 125, 3037-3043.
- Gruppuso, P. A., Boylan, J. M., Carter, P. A., Madden, J. A. y

Raven, T. (1992) "Hepatic insulin and EGF receptor phosphorylation and dephosphorylation in fetal rats" *Am. J. Physiol.* 262 (Endocrinol. Metab. 25), E6-E13.

-Hanson, R. W. y Garber, A. J. (1972) "Phosphoenolpyruvate carboxykinase. 1. Its role in gluconeogenesis" *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1010-1021.

-Hanson, R. W., Reshef, L. y Ballard, F. J. (1975) "Hormonal regulation of hepatic P-enolpyruvate carboxykinase (GTP) during development" *Federation Proc.* 34, 166-171.

-Hoffmann, B., Piasecki, A. y Paul, D. (1989) "Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture" *J. Cell. Physiol.* 139, 654-662.

-Höppner, W., Süßmuth, W., O'Brien, C. and Seitz, H. J. (1986) "Cooperative effect of thyroid and glucocorticoid hormones on the induction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase *in vivo* and in cultured hepatocytes" *Eur. J. Biochem.* 159, 399-405.

-Houck, K. A. y Michalopoulos, G. K. (1985) "Proline is required for the stimulation of DNA synthesis in hepatocyte cultures by EGF" *In Vitro* 21, 121-124.

-Hurwitz, D. R., Emanuel, S. L., Nathan, M. H., Sarver, N., Ullrich, A., Felder, S., Lax, I. y Schlessinger, J. (1991) "EGF induces increased ligand binding affinity and dimerization of soluble epidermal growth factor (EGF) receptor extracellular domain" *J. Biol. Chem.* 266, 22035-22043.

-Igawa, T., Kanda, S., Kanetake, H., Saitoh, Y., Ichihara, A.,

Tomita, Y. y Nakamura, T. (1991) "Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 831-838.

-Iizuka, H., Asano, K., Ito, F., Tamura, T., Takahashi, H. y Tautsui, M. (1991) "Desensitization of the epidermal adenylate cyclase system: agonists and phorbol esters desensitize by independent mechanisms" *Biochim. Biophys. Acta* 1093, 95-101.

-Imai, E., Stromstedt, P.-E., Quinn, P. G., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-A. y Granner, D. K. (1990) "Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene" *Mol. Cell. Biol.* 10, 4712-4719.

-Issad, T., Coupé, C., Pastor-Anglada, M., Ferré, P. y Girard, J. (1988) "Development of insulin-sensitivity at weaning in the rat. Role of the nutritional transition" *Biochem. J.* 251, 685-690.

-Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H. Noguchi, T. y Tanaka, T. (1986) "Effects of dietary nutrients on lipogenic enzyme and mRNA activities in rat liver during induction" *Biochim. Biophys. Acta* 877, 350-358.

-Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H. Noguchi, T. y Tanaka, T. (1987) "Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver" *Eur. J. Biochem.* 168, 487-491.

-Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H. Noguchi, T. y Tanaka, T. (1988) "Transcriptional and posttranscriptional regulation

of malic enzyme synthesis by insulin and triiodothyronine"  
*Biochim. Biophys. Acta* 950, 113-117.

-Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Matsumura, Y.,  
Noguchi, T. y Tanaka, T. (1989) "Effects of nutrients and  
insulin on transcriptional and post-transcriptional regulation  
of glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis in rat liver"  
*Biochim. Biophys. Acta* 1006, 104-110.

-Kim, M.-H., Nakayama, R. y Holten, D. (1990) "Quantitation of  
glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA by solution  
hybridization: correlation with rates of synthesis" *Biochim.  
Biophys. Acta* 1049, 177-181.

-Kletzien, R. F., Prostko, C. R., Stumpo, D. J., McClung, J. K.  
y Dreher, K. L. (1985) "Molecular cloning of DNA sequences  
complementary to rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase  
mRNA" *J. Biol. Chem.* 260, 5621-5624.

-Konishi, T., Takehara, T., Tsuji, T., Ohsato, K., Matsumoto,  
K. y Nakamura, T. (1991) "Scatter factor from human embryonic  
lung fibroblasts is probably identical to hepatocyte growth  
factor" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 765-773.

-Krebs, H., A. y Henseleit, K. (1932) "Studies about urea  
formation in animals (Untersuchungen über die Harnstoffbildung  
in tierkörper)" *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 210, 33.

-Kubin, T., Yanagida, M., Mori, S., Hayashi, Y., Gohda E. y  
Yamamoto, I. (1990) "Inhibition of DNA synthesis of adult rat  
hepatocytes in primary culture by dibutyryloytidine 3', 5'  
-cyclic monophosphate" *Cell Biol. Int. Rep.* 13, 907-917.

- Kumar, S., Das, D. K., Dorfman, A. E. y Asato, N. (1977) "Stimulation of the synthesis of hepatic fatty acid synthesizing enzymes of hypophysectomized rats by 3,5,3'-L-triiodothyronine" *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 507-516.
- Kumatori, A., Nakamura, T. y Ichinara, A. (1991) "Cell-density dependent expression of the *c-myc* gene in primary cultured rat hepatocytes" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 480-485.
- Labaroa, C. y Paigen, K. (1980) "A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure" *Anal. Biochem.* 102, 1028-1034.
- Lane, M. D., Chang, H. C. y Miller, R. S. (1969) "Phosphoenolpyruvate carboxykinase from pig liver mitochondria" *Meth. Enzymol.* 13, 270-277.
- Leffert, H. L. y Paul, D. (1972) "Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells" *J. Cell Biol.* 52, 559-568.
- Liu, J., Park, E. A., Gurney, A. L., Roesler, W. J. y Hanson, R. W. (1991) "Cyclic AMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription es mediated by multiple promoter elements" *J. Biol. Chem.* 266, 19095-19102.
- Lockwood, E. A., Bailey, E. y Taylor, C. B. (1970) "Factors involved in changes in hepatic lipogenesis during development of the rat" *Biochem. J.* 118, 155-162.
- Lorenzo, M. y Benito, M. (1985) "Rates of lipogenesis in isolated hepatocytes during late gestation in the rat" *Biochem. Soc. Trans.* 13, 865.

- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. y Beach, D. (1991) "mik1 and weel cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2" *Cell* 64, 1111-1122.
- Lyonnet, S., Coupè, C., Girard, J., Kahn, A. y Munnich, A. (1988) "In vivo regulation of glycolytic and gluconeogenic enzyme gene expression in newborn rat liver" *J. Clin. Invest.* 81, 1682-1689.
- Mann, D. J. y Bailey, E. (1991) "Pre-translational control of hepatic malic enzyme expression during the development of the rat" *Biochem. J.* 279, 407-412.
- Manos, P., Nakayama, R. y Holten, D. (1991) "Regulation of glucose-6-fosphate dehydrogenase synthesis and mRNA abundance in cultured rat hepatocytes" *Biochem. J.* 276, 245-250.
- Mariash, C. N., Kaiser, F. E. y Oppenheimer, J. H. (1980a) "Comparison of the response characteristics of four lipogenic enzymes to triiodothyronine administration: evidence for variable degrees of amplification of the nuclear-T3 signal" *Endocrinology* 106, 22-27.
- Mariash, C. N., Kaiser, F. E., Schwartz, H. L., Towle, H. C. y Oppenheimer, J. H. (1980b) "Synergism of thyroid hormone and high carbohydrate diet in the induction of lipogenic enzymes in the rat" *J. Clin. Invest.* 65, 1126-1134.
- Mariash, C. N., McSwigan, C. R., Towle, H. C., Schwartz, H. L. y Oppenheimer, J. H. (1981) "Glucose and triiodothyronine both induce malic enzyme in the rat hepatocyte culture. Evidence

that triiodothyronine multiplies a primary glucose-generated signal" *J. Clin. Invest.* 68, 1485-1490.

-Mariash, C. N. y Oppenheimer, J. H. (1983) "Stimulation of malic enzyme formation in hepatocyte culture by metabolites: Evidence favoring a nonglycolytic metabolite as the proximate induction signal" *Metabolism* 33, 545-552.

-Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. y Todaro, G. J. (1984) "Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor" *Science* 223, 1079-1082.

-Massagué, J. (1983) "Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells" *J. Biol. Chem.* 258, 13614-13620.

-McGowan, J. A., Strain, A. J. y Bucher, N. L. R. (1981) "DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon and cyclic-AMP" *J. Cell. Physiol.* 108, 353-363.

-McGrane, M. M., de Vente, J., Yun, J., Bloom, J., Park, E., Wynshaw-Boris, A., Wagner, T., Rottman, F. M. y Hanson, R. W. (1988) "Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice" *J. Biol. Chem.* 263, 11443-11451.

-Mead, J. E. y Fausto, N. (1989) "Transforming growth factor  $\alpha$  may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86,

1558-1562.

-Menuelle, P. y Plas, C. (1991) "Variations in the antagonistic effects of insulin and glucagon on glycogen metabolism in cultured foetal hepatocytes" *Biochem. J.* 277, 111-117.

-Michalopoulos, G., Houck, K., Dolan, M. y Novicki, D. L. (1983) "Control of proliferation of hepatocytes by two serum hepatopietins" *Fed. Proc.* 42, 1023.

-Michalopoulos, G. K. (1990) "Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control" *FASEB J.* 4, 176-187.

-Miksicek, R. J. and Towle, H. (1982) "Changes in the rates of synthesis and messenger RNA levels of hepatic glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases following induction by diet or thyroid hormone" *J. Biol. Chem.* 257, 11829-11835.

-Millar, J. B. A. y Russell, P (1992) "The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase" *Cell* 68, 407-410.

-Mine, T., Kojima, I., Ogata, E. y Nakamura, T. (1991) "Comparison of effects of HGF and EGF on cellular calcium in rat hepatocytes" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1173-1180.

-Mitaka, T., Sattler, G. L. y Pitot, H. (1991) "Amino acid-rich medium (Leibovitz L-15) enhances and prolongs proliferation of primary cultured rat hepatocytes in the absence of serum" *J. Cell. Physiol.* 147, 495-504.

- Molero, C., Valverde, A. M., Benito, M y Lorenzo, M.(1992) "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in fetal hepatocyte primary cultures under proliferative conditions" *Exp. Cell Res.* 200, 295-300.
- Mooney, D., Hansen, L., Vacanti, J., Langer, R., Farmer, S. y Ingber, D. (1992) "Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix" *J. Cell. Physiol.* 151, 497-505.
- Moreno, S. (1992) "Así comienza la mitosis" *Investigación y ciencia* 187, 62-69.
- Morgan, J. F., Morton, H. J. y Parker, R. C. (1950) "Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 1.
- Morioka, H., Magnuson, M. A., Mitsuhashi, T., Song, M.-K. H., Rall, J. E. y Nikodem, V. M. (1989) "Structural characterization of the rat malic enzyme gene" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4912-4916.
- Mosley, S. T., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Flack, J. R. y Anderson, R. G. W. (1981) "Targeted killing of cultured cells by receptor dependent photosensitization" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5717-5721.
- Nakamura, T., Yoshimoto, K., Aoyama, K. e Ichihara, A. (1982) "Hormonal regulations of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes" *J. Biochem.* 91, 681-693).

- Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y. e Ichihara (1983) "Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7229-7233.
- Nakamura, T., Teramoto, H., Tomita, Y. e Ichihara, A. (1984) "L-proline is an essential amino acid for hepatocyte growth in culture" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 884-891.
- Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, H., Kaise, N. y Nishino, T. (1987) "Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets" *FEBS Lett.* 224, 311-316.
- Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Sedi, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. y Shimizu, S. (1989) "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor" *Nature* 342, 440-443.
- Nielsen, H. C., Kirk, W. O., Swezey, N. y Torday, J. S. (1990) "Coordination of growth and differentiation in the fetal lung" *Exp. Cell Res.* 188, 89-96.
- O'Brien, R. M., Lucas, P. C., Forest, C. D., Magnuson, M. A. y Granner, D. K. (1990) "Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription" *Science* 249, 533-537.
- O'Brien, R. M., Bonovich, M. T., Forest, C. D. y Granner, D. K. (1991) "Signal transduction convergence: phorbol esters and insulin inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription through the same 10-base-pair sequence" *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6580-6584.

-Ochoa, S., Mehler, A. H. y Kornberg, A. (1948) "Biosynthesis of dicarboxylic acids by dioxide fixation" *J. Biol. Chem.* 174, 979-1000.

-Park, E. A., Roesler, W. J., Liu, J., Klemm, D. J., Gurney, A. L., Thatcher, J. D., Shuman, J. Friedman, A. y Hanson, R. W. (1990) "The role of the CCAAT/enhancer binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)" *Mol. Cell. Biol.* 10, 6264-6272.

-Perez-Castillo, A., Schwartz, H. L. y Oppenheimer, J. H. (1987) "Rat hepatic mRNA-S14 and lipogenic enzymes during weaning: role of S14 in lipogenesis" *Am. J. Physiol.* 253, E536-E542.

-Petty, K. J., Desvergne, B., Mitsuhashi, T. y Nikodem, V. M. (1990) "Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene" *J. Biol. Chem.* 265, 7395-7400.

-Pike, L. J., Marquardt, H., Todaro, G. J., Gallis, B., Casnellie, J. E., Bornstein, P. y Krebs, E. G. (1982) "Transforming growth factor and epidermal growth factor stimulate the phosphorylation of a synthetic, tyrosine-containing peptide in a similar manner" *J. Biol. Chem.* 257, 14628-14631.

-Prostko, C. R., Fritz, R. S. y Kletzien, R. F. (1989) "Nutritional regulation of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase. Transient activation of transcription" *Biochem. J.* 258, 295-299.

- Rhee, S. G., Pann-Ghill, S., Ryu, S-H. y Lee, S. Y. (1989) "Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C" *Science* 244, 546-550.
- Roesler, W. J., Vandenbark, G. R. y Hanson, R. W. (1989) "Identification of multiple protein binding domains in the promoter-regulatory region of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene" *J. Biol. Chem.* 264, 9657-9664.
- Roncari, D. A. K. y Murthy, V. K. (1975) "Effects of thyroid hormones on enzymes involved in fatty acid and glycerolipid synthesis: Evidence for tissue specificity" *J. Biol. Chem.* 250, 4134-4138.
- Roncero, C. (1987) "Regulación del metabolismo lipídico en hepatocitos y adipocitos marrones de feto de rata" *Memoria de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias (U.A.M.)*.
- Roncero, C., Lorenzo, M., Fabregat, I. y Benito, M. (1989) "Rates of lipogenesis in fetal hepatocytes in suspension and in primary culture: hormonal effects" *Biochim. Biophys. Acta* 1012, 320-324.
- Roncero, C. y Goodridge, A. G. (1992) "Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick-embryo hepatocytes in culture. Corticosterone and carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine" *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 258-267.
- Roon, M. A. Zonneveld, D., Charles, R. y Lamers, W. H. (1988) "Accumulation of carbamoylphosphate-synthetase and phosphoenolpyruvate-carboxykinase mRNA in embryonic rat

- hepatocytes" *Eur. J. Biochem.* 178, 191-196.
- Rothrock, R., Lee, K.-L., Isham, K. R. y Kenney, F T. (1988) "Changes in hepatic differentiation following treatment of rat fetuses with 5-azacytidine" *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 237-244.
- Runge, D., Schmidt, H., Christ, B. y Jungermann, D. (1991) "Mechanism of the permissive action of dexamethasone on the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes" *Eur. J. Biochem.* 198, 641-649.
- Salati, L. M., Ma, X.-J., McCormick, C. C., Stapleton, S. R. y Goodridge, A. G. (1991) "Triiodothyronine stimulates and cyclic AMP inhibits transcription of the gene for malic enzyme in chick embryo hepatocytes in culture" *J. Biol. Chem.* 266, 4010-4016.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning. A laboratory manual" *Cold Spring Harbour Laboratory Press.*, Cold Spring Harbour, New York.
- Sapag-Hagar, M., Lagunas, R. y Sols, A. (1973) "Apparent unbalance between the activities of 6-phosphogluconate and glucose 6-phosphate dehydrogenase in rat liver" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 179-185.
- Schneider, C., Gustinovich, S. y Del Sal, G. (1991) "The complexity of cell proliferation control in mammalian cells" *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 276-281.

- Seglen, P. O. (1972) "Preparation of rat liver cells. I. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver" *Exp. Cell Res.* 74, 450-454.
- Seglen, P. O. (1976) "Preparation of isolated rat liver cells" *Methods in Cell Biology* 13, 29-83.
- Shelly, L. L. y Yeoh, G. C. T. (1991) "Effects of dexamethasone and cAMP on tyrosine aminotransferase expression in cultured fetal rat hepatocytes" *Eur. J. Biochem.* 199, 475-481.
- Schneider, C., Gustinich, S. y Del Sal, G. (1991) "The complexity of cell proliferation control in mammalian cells" *Curr Opin Cell Biol* 3, 276-281.
- Shreve, D. S. y Levy, H. R. (1977) "On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 1369-1375.
- Song, M.-K. H., Dozin, B., Grieco, D., Rall, J. E. y Nikodem, V. M. (1988) "Transcriptional activation and stabilization of malic enzyme mRNA precursor by thyroid hormone" *J. Biol. Chem.* 263, 17970-17974.
- Sorkin, A. y Carpenter, G. (1991) "Dimerization of internalized epidermal growth factor receptors" *J. Biol. Chem.* 266, 23453-23460.
- Spence, J. T. y Pitot, H. C. (1982) "Induction of lipogenic enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. Relationship between lipogenesis and carbohydrate metabolism" *Eur. J.*

*Biochem.* 128, 15-20.

-Sporn, M. B. y Todaro, G. J. (1980) "Autocrine secretion and malignant transformation of cells" *N. Engl. J. Med.* 303, 878-880.

-Stanton, R. C., Seifter, J. L., Boxer, D. C., Zimmerman, E. y Cantley, L. C. (1991) "Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity" *J. Cell Biol.* 266, 12442-12448.

-Strait, K. A., Kinlaw, W. B., Mariash, C. N. y Oppenheimer, J. H. (1989) "Kinetics of induction by thyroid hormone of the two hepatic mRNAs coding for cytosolic malic enzyme in the hypothyroid and euthyroid states. Evidence against an obligatory role of S14 protein in malic enzyme gene" *J. Biol. Chem.* 264, 19784-19789.

-Sun, J. y Holten, D. (1978) "Levels of rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA" *J. Biol. Chem.* 253, 6832-6836.

-Swierczynski, J., Mitchell, D. A., Reinhold, D. S., Salati, L. M., Stapleton, S. R., Klautky, S. A., Struve, A. E. y Goodridge, A. G. (1991) "Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step" *J. Biol. Chem.* 266, 17459-17466.

-Tajima, H., Matsumoto, K. y Nakamura, T. (1991) "Hepatocyte

growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines" *FEBS Lett.* 291, 229-232.

-Tartare, S., Ballotti, R., Lammers, R., Filloux, C., Chauvel, A., Schlessinger, J., Ullrich, A. y Van Obberghen, E. (1992) "Activation of insulin-epidermal growth factor (EGF) receptor chimerae regulates EGF receptor binding affinity" *J. Cell Biol.* 116, 627-633.

-Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S. y Nakamura, T. (1990) "Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3200-3204.

-Thoresen, G. H., Sand, T.-E., Refsnes, M., Dajani, O. F., Tormod, K. G., Gladhaug, I. P., Killi, A. y Christoffersen, T. (1990) "Dual effects of glucagon and cyclic AMP on DNA synthesis in cultured rat hepatocytes: stimulatory regulation in early G<sub>1</sub> and inhibition shortly before the S phase entry" *J. Cell. Physiol.* 144, 523-530.

-Tomomura, A., Sawada, N., Sattler, G.L., Kleinman, H. K. y Pitot, H. C. (1987) "The control of DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes from adult and young rats: interactions of extracellular matrix components, epidermal growth factor, and the cell cycle" *J. Cell. Physiol.* 130, 221-227.

-Towle, H. C., Mariash, C. N. y Oppenheimer, J. H. (1980) "Changes in the hepatic levels of messenger ribonucleic acid for malic enzyme during induction by thyroid hormone or diet" *Biochemistry* 19, 579-585.

- Towle, H. C., Mariash, C. N., Schwartz, H. L. y Oppenheimer, J. H. (1981) "Quantitation of rat liver messenger ribonucleic acid for malic enzyme during induction by thyroid hormone" *Biochemistry* 20, 3486-3492.
- Tsao, M.-S., Earp, H. S. y Grisham, J. W. (1986) "The effects of epidermal growth factor and the state of confluence on enzymatic activities of cultured rat liver epithelial cells" *J. Cell. Physiol.* 126, 167-173.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D. y Seeburg, P. H. (1984) "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermal carcinoma cells" *Nature* 309, 418-424.
- Valverde, A. M., Benito, M., Lorenzo, M. (1991) "Proliferation of fetal brown adipocyte primary cultures: relationship with the genetic expression of glucose 6 phosphate dehydrogenase" *Exp. Cell Res.* 194, 232-237.
- Valverde, A. M., Benito, M., Lorenzo, M. (1992) "Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate-dehydrogenase expression in fetal brown-adipocyte primary cultures under non-proliferative conditions" *Eur. J. Biochem.* 203, 313-319.
- Vintermyr, O. K. y Doskeland, S. O. (1987) "Cell cycle parameters of adult rat hepatocytes in a defined medium. A note on the timing of nucleolar DNA replication" *J. Cell. Physiol.*

132, 12-21.

-Vintermyr, O. K., Mellgren, G., Boe, R. y Doskeland, S. O. (1989) "Cyclic adenosine monophosphate acts synergistically with dexamethasone to inhibit the entrance of cultured adult rat hepatocytes into S-phase: with a note on the use of nucleolar and extranucleolar <sup>3</sup>H-thymidine labelling patterns to determine rapid changes in the rate of onset of DNA replication" *J. Cell. Physiol.* 141, 371-382.

-Volpe, J. J. y Vagelos, P. R. (1976) "Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids" *Physiol. Rev.* 56, 339-417.

-Wollenberg, G. K., Harris, L., Farber, E. y Hayes, M. A. (1989) "Inverse relationship between epidermal growth factor induced proliferation and expression of high affinity surface epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes" *Lab. Invest.* 60, 254-259.

-Yen, P. M., Darling, D. S. y Chin, W. W. (1991) "Basal and thyroid hormone receptor auxiliary protein-enhanced binding of thyroid hormone receptor isoforms to native thyroid hormone response elements" *Endocrinology* 129, 3331-3336.

-Yoshimoto, K., Nakamura, T. e Ichihara, A. (1983a) "Reciprocal effects of epidermal growth factor on key lipogenic enzymes in primary cultures of adult rat hepatocytes. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase and suppression of malic enzyme and lipogenesis" *J. Biol. Chem.* 258, 12355-12360.

-Yoshimoto, K., Nakamura, T., Niimi, S. e Ichihara, A. (1983b)

"Hormonal regulation of translatable mRNA of glucose-6-phosphate dehydrogenase in primary cultures of adult rat hepatocytes" *Biochim. Biophys. Acta* 741, 143-149.

-Zarnegar, R. y Michalopoulos, G. (1989) "Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes" *Cancer Res.* 49, 3314-3320.