

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

**ANALISIS DE LA RESPUESTA HORMONAL EN DISTINTOS  
ESTADIOS DE DIFERENCIACION HEPATICA**

Memoria de Tesis para optar al grado de doctor presentada por:

**MARIA JUNCO PETREMENT**

Junio, 1993

Director de Tesis:

Lisardo Boscá Gomar

El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto C.S.I.C.-U.C.M.) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Lisardo Boscá, con ayuda de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

*A Philippe*

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Lisardo Boscá el interés que en todo momento ha puesto en mi formación científica y en la dirección y realización de esta tesis, su continuo apoyo, estímulo y amistad y todo lo que de él he aprendido durante estos años.*

*Deseo expresar también mi agradecimiento a los Profs. Ruiz-Amil y Benito de las Heras por la buena acogida que me brindaron en este departamento, y muy especialmente a la Dra. María Cascales por su acogida y amistad, y al Dr. Angel Giménez por su apoyo y orientación.*

*De forma especial quiero agradecer a mis amigas y compañeras M<sup>a</sup> José Martínez, Paloma Martín, Sonsoles Hortelano, Marta Casado, Mina Díez y Ana Genaro su amistad, apoyo y cooperación en el trabajo diario, así como a Martín, Lola, Adoración y Manolo por su colaboración.*

*También deseo agradecer la amable acogida y colaboración de los Prof. Sten Orrenius del Instituto Karolinska (Estocolmo) y Peter J. Parker de la fundación Imperial Cancer Research (Londres), y de todos los compañeros del laboratorio. Especialmente agradezco a Juan y Shumai su ayuda y amistad.*

*Finalmente, quiero agradecer a todas las personas con las que he compartido este tiempo su amistad y ayuda desinteresada, y su constante estímulo durante estos años de trabajo. A todos, mi más profundo agradecimiento.*

## ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADP	Adenosina 5'-bisfosfato
AMPe	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANG	Angiotensina II
ATP	Adenosina 5'-trisfosfato
BB	Bombesina
C <sub>i</sub>	Curio
DAG	1,2-Diacilglicerol
DEAE	Diethyl-aminoetil-celulosa
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Fura-2AM	Fura-2 penta(acetoximetil) éster
GDP	Guanosina 5'-bisfosfato
GRP	Péptido liberador de gastrina
GTP	Guanosina 5'-trisfosfato
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
kDa	Kilodalton
K <sub>d</sub>	Constante de disociación
PA	Acido fosfatídico
PAP	Fosfatidato fosfohidrolasa
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Técnica de la polimerasa en cadena
PDBu	Forbol 12,13-dibutirato
PI	Fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
R <sub>r</sub>	Movilidad relativa
SDS	Dodecil sulfato sódico
VP	Vasopresina

## INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1. TIPOS DE RECEPTORES DE MEMBRANA.....	2
1.1. Receptores acoplados a protefnas G .....	3
1.2. Canales i3nicos .....	4
1.3. Receptores con actividad catalfca intrfnsca .....	4
2. ESTRUCTURA Y ACTIVACION DE PROTEINAS G.....	5
3. ENZIMAS EFECTORES DE LA MEMBRANA PLASMATICA.....	7
3.1. Adenilato ciclasa .....	8
3.2. Fosfolipasa C especfca de fosfatidilinositol .....	9
3.3. Fosfolipasa C especfca de fosfatidilcolina y fosfolipasa D.....	10
3.4. Fosfolipasa A <sub>2</sub> y esfingomielinasa.....	11
4. SEGUNDOS MENSAJEROS DERIVADOS DE FOSFOLIPIDOS.....	12
4.1. Metabolitos derivados de fosfatidilcolina.....	12
4.2. Metabolitos derivados de fosfatidilinositol .....	14
4.2.1. Inositolfosfatos.....	15
4.2.2. Diacilglicerol.....	17
5. SEÑALES DE CALCIO.....	18
5.1. Homeostasis del calcio.....	18
5.2. Elementos reguladores de la concentraci3n intracelular de Ca <sup>2+</sup> .....	19
6. PROTEINA QUINASA C: ENZIMA ACTIVADO POR SEGUNDOS MENSAJEROS....	20
6.1. Caracterfsticas estructurales .....	21
6.1.1. Distribuci3n isoenzim3tica.....	21
6.1.2. Estructura molecular.....	23
6.2. Mecanismos de activaci3n.....	24
6.2.1. Hidr3lisis de fosfolfpidos .....	24
6.2.2. Activaci3n proteolftica y "down-regulation".....	25
6.3. Implicaciones fisiol3gicas. Modulaci3n de las vfas de sefializaci3n.....	26
2. OBJETIVOS .....	28
3. MATERIAL Y METODOS.....	29

## MATERIALES

1. APARATOS.....	29
2. REACTIVOS.....	30
3. MATERIAL BIOL3GICO.....	31
3.1. Obtenci3n de hepatocitos adultos.....	31
3.1.1. Sistema de perfusi3n.....	31
3.1.2. Medio de perfusi3n .....	33
3.1.3. Procedimiento quir3rgico.....	33
3.1.4. Aislamiento de hepatocitos adultos.....	35

3.1.5. Viabilidad de los hepatocitos adultos.....	36
3.2. Obtención de los hepatocitos fetales.....	36
3.2.1. Medios de digestión.....	36
3.2.2. Procedimiento quirúrgico.....	36
3.2.3. Aislamiento de los hepatocitos fetales.....	37
3.2.4. Viabilidad de los hepatocitos fetales.....	37

## METODOS

1. PREPARACION DE LOS HEPATOCITOS.....	37
2. CULTIVO DE HEPATOCITOS.....	38
2.1. Preparación de las placas de cultivo.....	38
2.2. Siembra de los hepatocitos .....	39
3. DETERMINACION DE $Ca^{2+}$ INTRACELULAR.....	39
3.1. Determinación de la concentración intracelular de $Ca^{2+}$ en hepatocitos aislados.....	39
3.1.1. Incubación de los hepatocitos con el indicador fluorescente.....	39
3.1.2. Medida de la concentración de $Ca^{2+}$ .....	40
3.2. Determinación de la concentración de $Ca^{2+}$ en retículo endoplásmico aislado.....	41
3.2.1. Aislamiento de la fracción microsomal.....	41
3.2.2. Medida de la liberación de $Ca^{2+}$ .....	41
4. DETERMINACION DE INOSITOL 1,4,5-TRISFOSFATO.....	42
5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA.....	43
6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOGENO FOSFORILASA a.....	44
7. DETERMINACION DE GLICEROLIPIDOS Y METABOLITOS DERIVADOS.....	45
7.1. Determinación de <i>sn</i> -1,2-diacilglicerol total.....	45
7.2. Determinación de metabolitos formados a partir de glicerol y colina por cromatografía en capa fina.....	46
7.3. Determinación de metabolitos derivados de la fosfatidilcolina por cromatografía de intercambio iónico.....	47
8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA C.....	48
8.1. Fraccionamiento subcelular.....	48
8.2. Aislamiento del enzima.....	49
8.3. Determinación de la actividad enzimática.....	49
9. AISLAMIENTO DE RNA Y AMPLIFICACION DE DNA.....	50
9.1. Obtención del RNA total.....	50
9.2. Análisis de DNA por PCR.....	51
10. METODOS ELECTROFORETICOS.....	52
10.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	52
10.2. Análisis de proteínas por Western blot.....	53

10.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	54
11. CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE RECEPTORES.....	55
12. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	56
13. METODOS ESTADISTICOS.....	56
4. RESULTADOS.....	57
1. COMPONENTES IMPLICADOS EN LA REGULACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE CALCIO.....	57
1.1. Efecto de distintos compuestos sobre la concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup> en hepatocitos aislados.....	57
1.1.1. Movilización de Ca <sup>2+</sup> en presencia de Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	58
1.1.2. Movilización de Ca <sup>2+</sup> en ausencia de Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	61
1.2. Efecto de los ésteres de forbol sobre la movilización de Ca <sup>2+</sup> .....	61
1.3. Localización y cuantificación de las etapas que controlan la concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup> libre.....	64
1.4. Liberación de calcio del retículo endoplásmico por IP <sub>3</sub> .....	68
2. GENERACION DE INOSITOL 1,4,5-TRISFOSFATO A PARTIR DE FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO.....	70
3. GENERACION DE GLICEROLIPIDOS Y METABOLITOS DERIVADOS.....	73
3.1. Producción de <i>sn</i> -1,2-diacilglicerol a tiempos cortos.....	73
3.2. Producción de diacilglicerol a tiempos largos.....	75
3.3. Formación de fosfatidilcolina y metabolitos derivados.....	79
4. ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA.....	81
5. ACTIVACION DE LA GLUCOGENO FOSFORILASA a.....	85
6. CARACTERIZACION DE SUBESPECIES DE PROTEINA QUINASA C EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. DISTRIBUCION SUBCELULAR POR EFECTO DE HORMONAS <i>in vivo</i> .....	88
6.1. Aislamiento y distribución de PKC en hepatocitos estimulados con distintos ligandos.....	88
6.2. Caracterización de las subespecies de PKC expresadas en hepatocitos fetales y adultos a nivel del RNA mensajero.....	94
6.2.1. Análisis de las isoformas de PKC por PCR.....	94
6.3. Identificación de isoenzimas de PKC con anticuerpos específicos.....	97
7. CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA.....	99
7.1. Análisis de la saturación y afinidad de los receptores de vasopresina, GRP y angiotensina II.....	100
7.2. Análisis de la saturación y afinidad de receptores purinérgicos por ATP y ADPβS. ....	104
7.3. Modulación alternativa de receptores por señales heterólogas.....	108
7.4. Efecto del PDBu sobre la formación del complejo ligando receptor.....	111



5.DISCUSION.....	115
1. MOVILIZACION DE CALCIO.....	115
2. PRODUCCION DE SEGUNDOS MENSAJEROS: INOSITOL TRISFOSFATO Y DIACILGLICEROL.....	118
3. ACITVACION DE ENZIMAS EPENDIENTES DE CALCIO.....	122
4. CARACTERIZACION DE RECEPTORES.....	126
6. CONCLUSIONES.....	131
7. BIBLIOGRAFIA.....	134

## **1. INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

La comunicación celular y la transmisión de información del exterior al interior de la célula constituyen dos aspectos fundamentales en el campo de la biología celular, en el que se han realizado importantes avances en la caracterización de los eventos tempranos que siguen a la formación del complejo ligando-receptor.

La transducción de señales representa el grupo de procesos específicamente implicados en la internalización de determinados estímulos extracelulares para su conversión en acciones intracelulares programadas. Para percibir tales estímulos, las células expresan receptores en su membrana. La naturaleza de la respuesta dependerá de la expresión de un tipo de receptor concreto dentro de la gran diversidad de familias de receptores existente (17,162,38).

Sin embargo, la amplia variedad de receptores contrasta con un inesperado bajo número de diferentes vías de transducción de la señal resultante de la formación del complejo ligando-receptor a nivel de la membrana plasmática (46,63).

Un gran número de receptores de membrana se halla acoplado a proteínas de la membrana plasmática (transductores), denominadas proteínas G por su capacidad para unir GTP. Dichas proteínas constituyen el nexo de unión con los sistemas efectores responsables de la generación de segundos mensajeros. La producción o destrucción de segundos mensajeros representa el segundo paso catalítico en este proceso, siendo la activación de las proteínas G por los receptores el primero. Ambos pasos producen una amplificación significativa de la señal primaria.

Una vez generados, los mensajeros actúan sobre sus proteínas diana modificando su actividad catalítica, lo cual se traduce en una serie de cambios en el comportamiento celular. Frecuentemente, estas dianas intracelulares son proteínas

multifuncionales que pueden actuar directa o indirectamente sobre otros enzimas alterando procesos tales como la secreción hormonal, metabolismo celular o expresión génica.

## 1. TIPOS DE RECEPTORES DE MEMBRANA

La mayoría de los factores extrínsecos implicados en la regulación de funciones celulares no son permeables a la membrana plasmática. Por ello, las células expresan receptores de naturaleza glicoproteica en su superficie a los cuales se unen específicamente los ligandos para transmitir su información.

<u>Receptores</u>	<u>Ligandos</u>
1. Receptores acoplados a proteínas G	
- grupo 7N : siete dominios transmembrana hidrofóbicos	neuropéptidos, citoquinas, eicosanoides factor activador de las plaquetas (PAF)
- superfamilias con distinta homología	secretina, calcitonina, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)
2. Canales iónicos	
- activados extracelularmente	acetilcolina, glutamato, glicina, GABAa, ATP ( $P_{2x}$ )
- activados intracelularmente	AMPC, GMPC, $IP_3$
3. Receptores con actividad catalítica intrínseca	
- proteína tirosina quinasa	Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), insulina, c-neu
- proteína tirosina fosfatasa	CD45, LAR
- guanilato ciclasa	citoquinas, factores neurotróficos

Existe un gran número de receptores que han sido clasificados por criterios farmacológicos, estructurales y funcionales. Farmacológicamente los receptores se diferencian de acuerdo con el tipo de ligandos que unen; pero para nuestros estudios es más conveniente una clasificación estructural y funcional. Atendiendo a estos criterios cabe destacar tres grandes grupos: asociados a proteínas G, canales iónicos y los que poseen actividad catalítica intrínseca. Dentro de cada grupo puede hacerse una subclasificación como se muestra en el esquema 1.

### 1.1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G.

Este tipo de receptores transducen la señal al citoplasma por interacción directa con proteínas G ancladas en la membrana plasmática, y así denominadas por su capacidad de unir GTP (53). A este grupo pertenecen el receptor de rodopsina, el  $\beta$ -adrenérgico y receptores de neuropéptidos como vasopresina o bombesina, entre otros (146).

Una de las familias mejor caracterizada es la denominada 7N. El receptor consta de siete segmentos hidrofóbicos transmembrana muy conservados y unidos entre sí por tres dominios externos y tres citoplasmáticos. El tercer dominio citoplasmático y la parte carboxilo terminal son variables entre los miembros de esta familia de receptores y son responsables de las interacciones específicas con proteínas G. El extremo amino terminal posee residuos glicosilados mientras que el carboxilo terminal posee sitios susceptibles de fosforilación por numerosas proteína quinasas (161).

Cuando un agonista se une a su receptor se origina un cambio conformacional que permite la activación de las proteínas G. Esta se produce debido a un aumento de afinidad por GTP, el cual se une a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G en sustitución del GDP. El complejo ternario resultante es normalmente transitorio porque rápidamente la afinidad por el nucleótido de guanina (GTP) disminuye y se produce la disociación. La unión de un antagonista estabiliza la forma inactiva de las proteínas G (101).

## 1.2. CANALES IONICOS

Se han identificado diversos receptores, con estructura análoga al grupo 7N, que funcionan como canales iónicos activados por ligandos. Los cambios en las concentraciones iónicas citoplasmáticas en las cuales están implicados tienen un papel fundamental en la regulación del pH intracelular (antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) (5) o en la activación de enzimas dependientes de calcio, entre otros.

A este grupo pertenecen el receptor nicotínico de acetilcolina y el receptor de GABA<sub>A</sub>, que es un canal de cloro. También puede incluirse el receptor para  $\text{IP}_3$  del retículo endoplásmico que funciona como un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (156).

## 1.3. RECEPTORES CON ACTIVIDAD CATALITICA INTRINSECA

Muchos polipéptidos como factores de crecimiento, factores de diferenciación y hormonas median sus acciones pleiotrópicas por unión y activación de receptores con actividad catalítica intrínseca como actividad tirosina quinasa, tirosina fosfatasa o guanilato ciclasa.

Los receptores con actividad tirosina quinasa constan de un largo dominio extracelular glicosilado al que se une el ligando, una sola región hidrofóbica transmembrana y un dominio citoplásmico que contiene la actividad catalítica tirosina quinasa intrínseca (60,140).

En función de algunas diferencias estructurales, principalmente en el dominio extracelular, este grupo de receptores puede dividirse en tres subclases. La subclase I, con dos secuencias ricas en cisteína en el dominio extracelular (EGFR, c-neu) (94); subclase II, compuestos por estructuras heterotetraméricas unidas por puentes disulfuro y con secuencias ricas en cisteína análogas a la clase anterior (receptor de insulina, IGF-1R) (41); subclase III, con tres o cinco dominios repetidos de estructura similar a las inmunoglobulinas (FGFR, PDGFR) (80).

La unión del ligando y la subsiguiente alteración conformacional del dominio extracelular inducen la oligomerización del receptor y la activación de la función catalítica quinasa. Esta actividad se produce tanto a nivel de fosforilación de sustratos exógenos como del propio receptor, hecho fundamental en su actividad catalítica. Como sustratos de potencial importancia biológica caben destacar la fosfolipasa  $C\gamma$ , la fosfatidilinositol-3-quinasa, GAP (proteína activadora de la actividad GTPasa de ras) y raf. Una característica común de estos sustratos es la presencia de una región denominada  $SH_2$ , la cual reconoce a la secuencia fosfotirosina del receptor y es susceptible de fosforilación. Frecuentemente, estas proteínas poseen otra región,  $SH_3$ , implicada en la regulación de las interacciones entre proteínas en la transducción de señales (129).

La reciente secuenciación y aislamiento de una proteína tirosina fosfatasa de linfocitos T y su homóloga con secuencias citoplasmáticas de CD45 y LAR, ha llevado a la consideración de un nuevo grupo de receptores con actividad tirosina fosfatasa intrínseca. La expresión de CD45 parece necesaria para la activación de células T por antígenos (132). El papel de LAR no es bien conocido, pero podría estar implicado en interacciones intercelulares.

## 2. ESTRUCTURA Y ACTIVACION DE PROTEINAS G

En todos los organismos eucarióticos la familia de las proteínas G, heterotrómeros con capacidad de unir e hidrolizar GTP, juega un papel esencial en la transducción de señales desde el complejo extracelular ligando-receptor a las proteínas efectoras de la membrana plasmática (64,154).

Las proteínas G están compuestas por tres subunidades distintas:  $\alpha$  (39-46 kDa),  $\beta$  (37 kDa) y  $\gamma$  (8 kDa). La subunidad  $\alpha$  se considera normalmente para definir cada tipo de proteína G, ya que constituyen una gran familia (esquema 2). Dicha subunidad posee un único sitio de alta afinidad para nucleótidos de guanina (GDP o

GTP). La unión de GDP confiere estabilidad al heterotrímero permaneciendo en su estado inactivo, mientras que el GTP, facilita la disociación en la forma  $\alpha$ -GTP y  $\beta\gamma$ . El  $\text{AlF}_4^-$ , junto con  $\text{Mg}^{2+}$ , pueden interaccionar con la subunidad  $\alpha$  y activarla de la misma manera que lo hace el GTP (31,1).

Familia subunidad	Tamaño (kDa $\times 10^{-3}$ )	% Identidad	Toxina	Distribución en tejidos	Efector
$G_s$					
$\alpha_{s(s)}$	44.2	100	CTX	universal	$\uparrow$ Adenilato ciclasa
$\alpha_{s(i)}$	45.7	-	CTX	universal	$\uparrow$ Canales de $\text{Ca}^{2+}$ $\downarrow$ Canales de $\text{Na}^+$
$\alpha_{OH}$	44.7	88	CTX	neuroepitelio olfatorio	$\uparrow$ Adenilato ciclasa
$G_i$					
$\alpha_{i1}$	40.3	100	PTX	casi universal	$\uparrow$ Canales de $\text{K}^+$
$\alpha_{i2}$	40.5	88	PTX	universal	$\downarrow$ Canales de $\text{Ca}^{2+}$
$\alpha_{i3}$	40.5	94	PTX	casi universal	$\downarrow$ Adenilato ciclasa $\uparrow$ Fosfolipasa C ?
$\alpha_{i0A}$	40.0	73	PTX	cerebro, otros	$\uparrow$ Fosfolipasa $\text{A}_2$ ?
$\alpha_{i0B}$	40.1	73	PTX	cerebro, otros	$\uparrow$ Fosfolipasa $\text{A}_2$ ?
$\alpha_{i1}$	40	68	CTX,PTX	bastones de la retina	$\uparrow$ rodopsinasa
$\alpha_{i2}$	40.1	68	CTX,PTX	conos de la retina	especifica de cGMP
$\alpha_i$	40.5	67	CTX (?), PTX	glándulas gustativas	?
$\alpha_i$	40.9	60		cerebro, plaquetas	$\downarrow$ Adenilato ciclasa ?
$G_q$					
$\alpha_q$	42	100		casi universal	$\uparrow$ Fosfolipasa $\text{C-}\beta_1$
$\alpha_{i1}$	42	88		casi universal	$\beta_2, \beta_3$ ?
$\alpha_{i4}$	41.5	79		pulmón, riñón, hígado	?
$\alpha_{i5}$	43	57		células B células mieloides	?
$\alpha_{i6}$	43.5	58		células T células mieloides	$\uparrow$ Fosfolipasa $\text{C-}\beta_1$ $\beta_2, \beta_3$
$G_{12}$					
$\alpha_{12}$	44	100		universal	?
$\alpha_{13}$	44	67		universal	?

(CTX) Toxina colérica (PTX) Toxina pertúsica

ESQUEMA 2. Clasificación de las proteínas G en función de la subunidad  $\alpha$



Todas las subunidades  $\alpha$  poseen actividad catalítica intrínseca para hidrolizar el GTP produciendo GDP y fosfato. En algunos casos también tienen residuos específicos que pueden ser covalentemente modificados por toxinas bacterianas mediante la transferencia de un residuo de ADP-ribosa, bloqueando su capacidad para responder a otros estímulos. La toxina colérica activa constitutivamente estas proteínas por inhibición de su actividad GTPasa, mientras que la toxina pertúsica previene su activación al impedir la unión de GTP (53,139).

Los mecanismos moleculares de las interacciones entre proteínas G y sus efectores están muy poco establecidos. Sin embargo, se conocen numerosos ejemplos de enzimas regulados por la subunidad  $\alpha$  unida a GTP, entre los que se incluyen la adenilato ciclasa, varias fosfolipasas, (PLC, PLA<sub>2</sub>), fosfodiesterasa dependiente de cGMP, transportadores de Mg<sup>2+</sup> y probablemente glucosa y canales iónicos de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>.

El papel del dímero  $\beta\gamma$  había sido asociado hasta ahora con su capacidad para unir el trímero a la membrana plasmática a través de la subunidad  $\gamma$ , pero actualmente también se le atribuyen funciones reguladoras como en la adenilato ciclasa (153) o en la estimulación de la PLC $\beta$  (27,29).

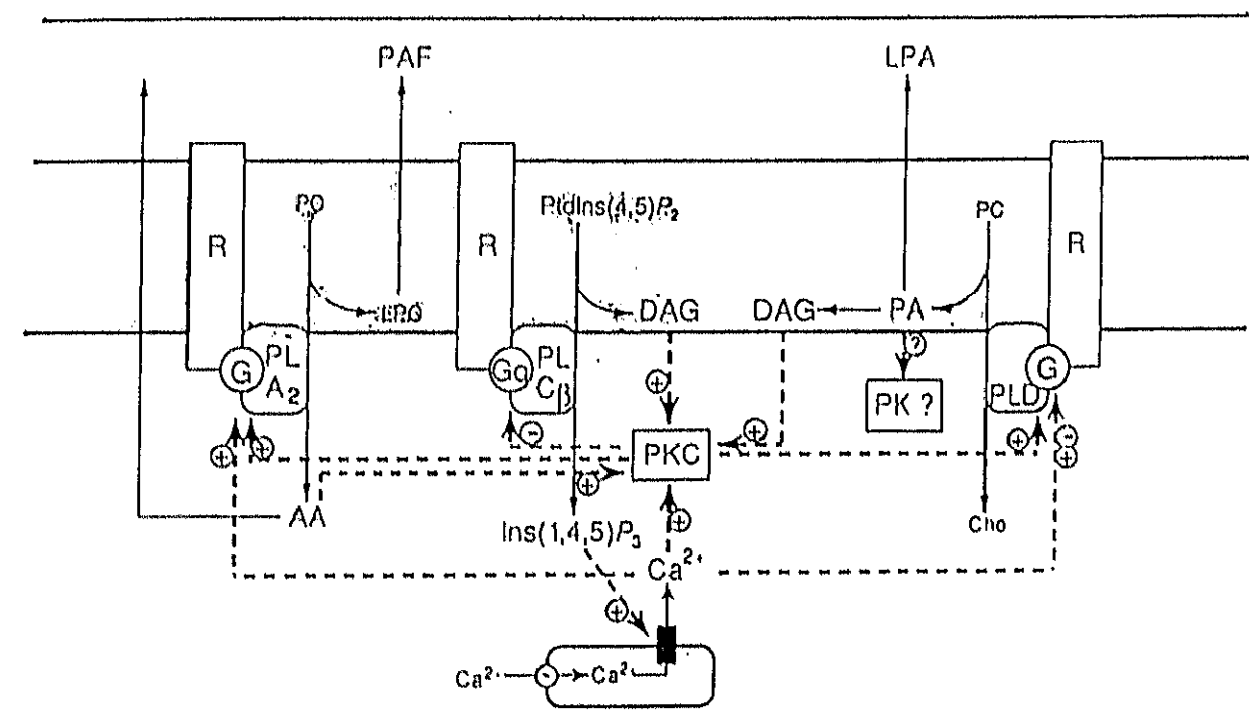
### 3. ENZIMAS EFECTORES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Los efectores son los enzimas responsables de la generación de segundos mensajeros intracelulares (esquema 3). En su mayoría se encuentran acoplados a proteínas G, aunque en el caso de los receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca reciben la señal directamente desde el receptor (110).

Entre los diversos efectores que comparten un mecanismo de activación común a través de proteínas G se incluyen: adenilato ciclasa (AC), fosfodiesterasa dependiente de cGMP y un gran número de fosfolipasas entre las que se cuentan

PLA<sub>2</sub>, PLD, PLC específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) y PLC específica de fosfatidilcolina (PC-PLC).

El hecho de que frecuentemente un mismo agonista active varios efectores en un tipo concreto de célula, sugiere una interconexión entre ellos. La interacción entre dos elementos distintos puede darse a nivel de modulación de un efector sobre otro o en la interconversión de mensajeros de distintas vías (128).



ESQUEMA 3. Transducción de señales extracelulares a través de distintos sistemas efectores

### 3.1. ADENILATO CICLASA

La adenilato ciclasa (AC) es una glicoproteína intrínseca de la membrana plasmática de la que actualmente se conocen cuatro isoformas distintas (108). Estructuralmente es similar a canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, con doce segmentos hidrofóbicos

transmembrana en  $\alpha$ -hélice. La AC cataliza la formación de un segundo mensajero, AMPc, procedente de la hidrólisis de ATP (42). El AMPc activa un enzima citosólico, la proteína quinasa A, que fosforila varios enzimas implicados en la regulación del metabolismo celular.

Se han encontrado varias proteínas G que regulan la actividad de la AC dependiendo del tejido y del tipo de receptor al que éstas se encuentren acopladas. La denominada  $G_s$  media el efecto de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y glucagón, activa la AC y es sensible a la toxina colérica (146); otra  $G_s$  distinta, pero de características muy similares a la anterior en cuanto a activación, se encuentra en los cilios olfatorios. Sin embargo, la proteína inhibidora de AC,  $G_i$ , está acoplada al receptor adrenérgico  $\alpha_2$  y es sensible a la toxina pertúsica (166).

### 3.2. FOSFOLIPASA C DE FOSFATIDILINOSITOL

Los fosfoinosítidos constituyen aproximadamente el 1% de los glicerolípidos de la membrana plasmática celular. La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato por una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositoles (PI-PLC) emergió como una nueva vía de transducción de señales para agonistas movilizadores de  $Ca^{2+}$  desde su descubrimiento a principios de los años ochenta por el grupo de Berridge (8). La importancia de este hecho radica en la producción de dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ), que participan en la regulación de numerosos enzimas implicados en el metabolismo, diferenciación y proliferación celular (11,115,117).

Hasta ahora, han sido identificados al menos 16 isoenzimas de PI-PLC clasificados en tres familias, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , procedentes de distintos cDNAs (148). Todos los miembros comparten dos dominios conservados implicados en la acción catalítica. Las regiones variables confieren probablemente propiedades reguladoras individuales (137).

La regulación de las PI-PLC todavía no es bien conocida en la mayoría de los casos. Sin embargo se sabe que la  $PLC\beta_1$  se activa por proteínas G ( $G_q$ ) insensibles a la toxina pertúsica (155), pero recientemente se ha comprobado la activación de  $PLC\beta_2$  por dímeros  $\beta\gamma$  sensibles a dicha toxina (93). Por el contrario, la  $PLC\gamma_1$  es activada por fosforilación en residuos de tirosina en el caso del receptor de EGF, a través del propio receptor o como consecuencia de quinasas citoplasmáticas previamente fosforiladas por éste (165).

### 3.3. FOSFOLIPASA C DE FOSFATIDILCOLINA Y FOSFOLIPASA D

La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante de la membrana plasmática celular de los mamíferos, constituyendo un 50% del total. En 1985, el grupo de Exton proporcionó la primera información sobre la estimulación de su hidrólisis por hormonas (15). Los estudios preliminares se desarrollaron al comprobar la acumulación de DAG de distinta composición que el procedente de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles.

La hidrólisis del enlace fosfodiéster puede producirse por dos tipos de fosfolipasas, PLC y PLD, que rinden DAG y fosfocolina, o ácido fosfático y colina, respectivamente. La interconversión por acción enzimática de los derivados lipídicos generados dificulta la asignación de la participación de PLC o PLD en un proceso determinado (141). En cuanto a su localización dentro del sistema de transducción de señales, con el uso de análogos no hidrolizables de GTP, se considera probable el acoplamiento al receptor a través de proteínas G, sensibles a la toxina pertúsica, como el receptor purinérgico o insensibles como el receptor de vasopresina en hepatocitos (16,51).

Todavía no se tiene mucha información sobre el mecanismo de activación de la PLC, aunque se tienen datos distintos según el tipo de célula y agonista. Así, una activación directa se produciría con las citoquinas, mientras que en la mayoría de los casos (vasopresina, bombesina, epinefrina) estaría mediada por la activación de la PI-

PLC o PLD (12).

La PLD fue detectada por primera vez en mamíferos en 1975, y aunque se conoce la existencia de varias isoformas ninguna de ellas ha sido clonada ni purificada a homogeneidad hasta ahora. Se encuentra en la fracción particulada de varias células, pero se ha localizado también una forma citosólica en tejidos bovinos. La fosfatidilcolina es el sustrato preferido de la PLD, pero en ciertas condiciones también puede degradar fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina (4).

Sobre la activación de la PLD se tienen más datos que en el caso de la PLC, pero son igualmente variados según el sistema estudiado (87). Por ejemplo en hepatocitos requiere  $Ca^{2+}$ , pero presentan considerable actividad a concentraciones menores de  $1 \mu M$ . Numerosos experimentos constatan la activación de la fosfolipasa D por ésteres de forbol, lo cual sugiere un importante papel de regulación para la proteína quinasa C (68,70).

### 3.4. FOSFOLIPASA $A_2$ Y ESFINGOMIELINASA

La fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) hidroliza fosfolípidos como fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina liberando ácido araquidónico y los respectivos lisofosfolípidos; ambas especies intervienen en multitud de procesos de señalización intracelular. Recientemente, se ha visto que su secuencia contiene un dominio de unión de  $Ca^{2+}$  y fosfolípidos homólogo al  $C_2$  de los isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de proteína quinasa C; pero, contrariamente a lo que podría pensarse, la  $PLA$  no depende de  $Ca^{2+}$  o proteína quinasa C para su activación (45). Sin embargo, se ha comprobado la implicación de proteínas G en su acoplamiento a receptores.

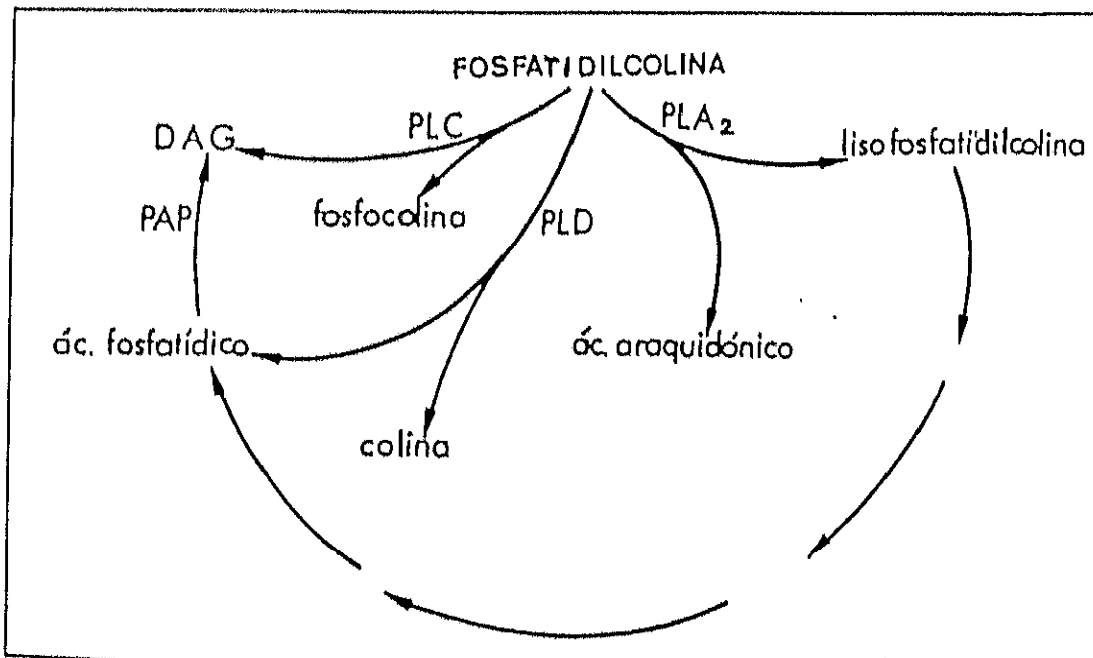
Otro enzima que hidroliza fosfolípidos de membrana es la esfingomielinasa, que a partir de esfingomielina produce fosfocolina y ceramida. La ceramida se incluye actualmente como mensajero, ya que las especies derivadas de su metabolismo afectan a la actividad de proteínas quinasas (proteína quinasa C) y proteínas fosfatasas (47).

#### 4. SEGUNDOS MENSAJEROS DERIVADOS DE FOSFOLIPIDOS

Está comúnmente aceptado que el término "segundo mensajero" implica su acción sobre proteínas diana intracelulares específicas. La generación y destrucción de segundos mensajeros debe estar finamente regulada, ya que de ello dependen múltiples cambios en el metabolismo celular.

##### 4.1. METABOLITOS DERIVADOS DE LA FOSFATIDILCOLINA

La fosfatidilcolina (PC) es un fosfolípido que, en la mayoría de las células de mamíferos, consiste en 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina. Los residuos que esterifican los carbonos son normalmente ácidos grasos saturados (mirístico) en el C<sub>1</sub> e insaturados (oleico y linoleico) en el C<sub>2</sub>. Sin embargo en células de origen mielóide es muy abundante el ácido araquidónico. Dependiendo del tipo de fosfodiesterasa que actúe sobre la PC pueden generarse una gran variedad de derivados lipídicos, como diacilglicerol, o moléculas con colina (12) (esquema 4).



ESQUEMA 4. Metabolismo de la fosfatidilcolina

La PLD participa en el proceso conocido como transfosfatidilación, consistente en la transferencia de parte de la molécula de PC (el ácido fosfatídico) a nucleósidos, fosfatidilinositoles y otras proteínas (12,70); estas nuevas especies podrían actuar como potenciales segundos mensajeros en el proceso de transmisión de señales intracelulares.

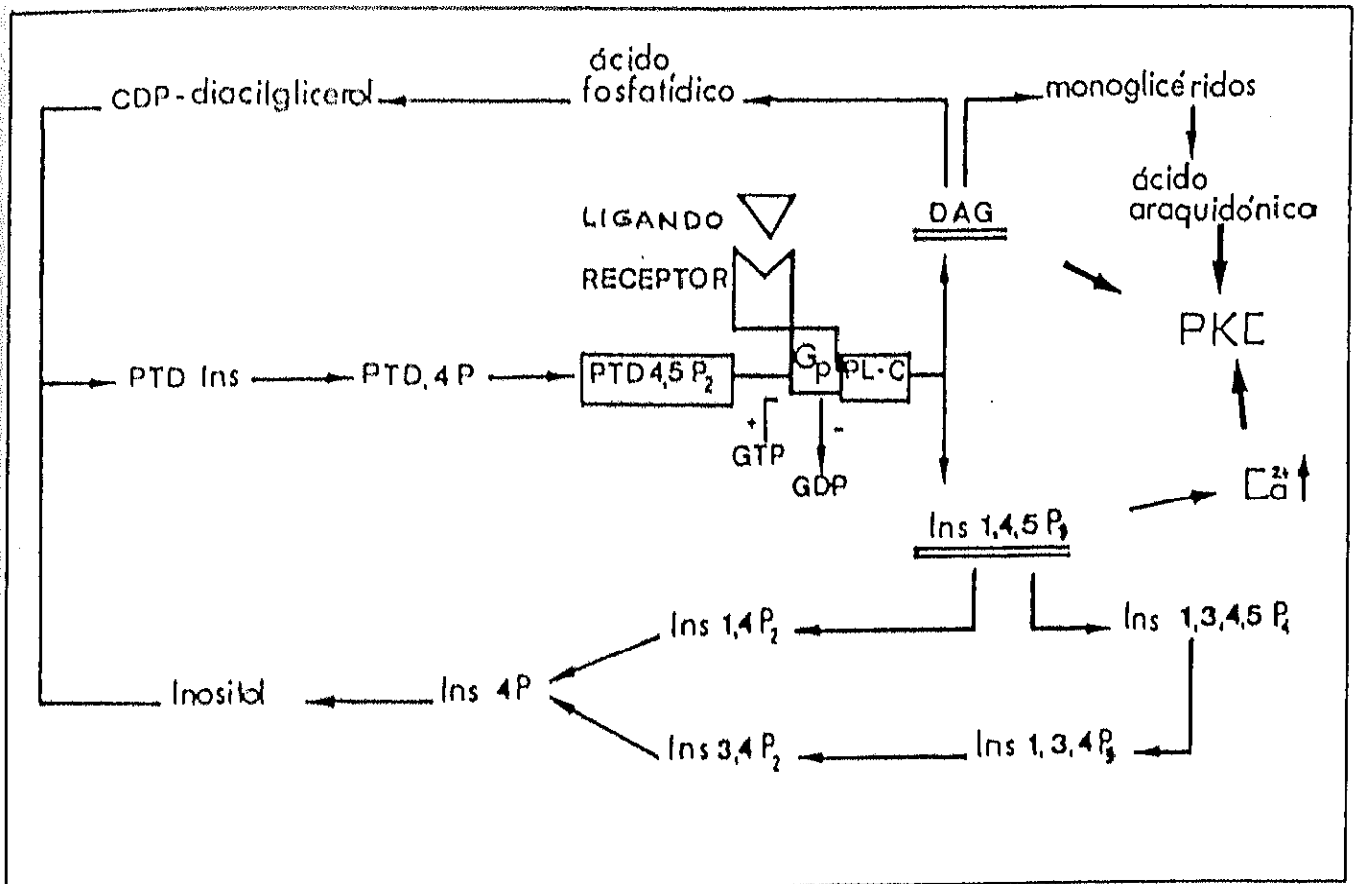
La PLD genera colina y ácido fosfatídico (PA), el cual mediante el enzima fosfatidato fosfohidrolasa se transforma en DAG (22,112). Sin embargo, es probable que el PA tenga otras funciones como segundo mensajero y en el metabolismo celular. Algunos estudios muestran que el PA promueve la entrada de  $Ca^{2+}$  en las células o lo moviliza de reservorios intracelulares. También se ha visto que inhibe la adenilato ciclasa, estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y se le asocia con procesos de secreción (91). Como muchas hormonas y factores de crecimiento producen la hidrólisis de PC, la transformación de células por ciertos oncogenes se ha relacionado con este hecho. En hepatocitos, vasopresina, bombesina, ATP y EGF producen gran acumulación de ácido fosfatídico mediada por PLD asociada a proteínas G (16).

Hasta el momento no se ha encontrado ningún papel a la colina en la transmisión de señales, pero sí se conoce un acoplamiento entre la hidrólisis de PC y la síntesis de acetilcolina en el cerebro, donde la PLD es muy abundante.

Otra vía en el metabolismo de la PC es la hidrólisis por PLC, dando origen a fosfocolina y DAG. El papel fundamental del DAG (de distinta composición que el procedente de los fosfatidilinositoles) es la activación de la proteína quinasa C, aunque también puede afectar a otros enzimas como diacilglicerol quinasa, citidiltransferasa y PLD (13,117). La principal característica del DAG sobre la proteína quinasa C es su activación a largo plazo. La generación sostenida de DAG podría jugar un papel fundamental en procesos de proliferación (164).

## 4.2. METABOLITOS DERIVADOS DE FOSFATIDILINOSITOL

Los fosfoinosítidos son un pequeño grupo de fosfolípidos de membrana, cuyo grupo mio-inositol puede ser fosforilado en múltiples sitios. Constituyen un componente minoritario, alrededor del 8%, en la mayoría de las células eucarióticas en las que se presentan tres especies más abundantes: fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4-monofosfato y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. Estas formas son interconvertibles *in vivo* por la acción de quinasas y fosfatasas específicas (11,85).



ESQUEMA 5. Proceso de señalización a través de la hidrólisis de fosfatidilinosítoles



Como la mayoría de los glicerofosfolípidos, los fosfoinosítidos constan de un esqueleto de *sn*-1,2-diacilglicerol, esterificado por un ácido graso saturado (normalmente esteárico) en la posición 1 e insaturado (araquidónico) en la posición 2. El resto mio-inositol se une en la posición 3 por un enlace éster (136).

En respuesta a diversos estímulos, como neurotransmisores, hormonas o factores de crecimiento, se produce la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato por una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC). La importancia de este hecho radica en la generación de dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ), y precursores de mensajeros, con acciones de especial trascendencia en el funcionamiento celular (esquema 5).

El  $IP_3$  liberado en el citoplasma moviliza  $Ca^{2+}$  de reservorios internos, mientras el DAG activa la proteína quinasa C. Este sistema mensajero de dos vías opera durante todo el ciclo vital de una célula, empezando con la gametogénesis, fertilización, proliferación y desarrollo temprano y continuando con la diferenciación para llevar a cabo funciones de control muy precisas en una gran cantidad de células especializadas en el mundo eucariótico. (9,115).

#### 4.2.1. Inositolfosfatos.

El  $IP_3$  generado directamente por la PI-PLC puede seguir dos rutas metabólicas. En la primera, participan fosfatasa específicas que dan lugar a inositol 1,3- $P_2$ , inositol 1- $P$  y finalmente inositol (6,10). En la segunda ruta se genera inositol 1,3,4,5- $P_4$ , que a su vez por la acción de fosfatasa produce inositol, o por la acción de quinasas se convierte en inositol 1,3,4,6- $P_4$ , inositol 1,3,4,5,6- $P_5$  e inositol- $P_6$ .

Recientemente se está investigando el papel de  $IP_5$  e  $IP_6$  en la transmisión de señales intracelulares a corto plazo, pero los resultados no demuestran ninguna función. La síntesis de novo de estos compuestos es muy lenta (varios días hasta alcanzar el equilibrio) y se sugiere una función pasiva como reservorios de inositol y/o de fosfato (119).

El papel fundamental de  $IP_3$  e  $IP_4$ , demostrado por el grupo de Berridge en 1982, es la elevación de  $Ca^{2+}$  citosólico (147). Este efecto se produce por la unión de  $IP_3$  a receptores específicos de depósitos intracelulares de calcio, clonados recientemente. Pero en su mecanismo de acción también parece estar implicada una estimulación de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular.

Los receptores intracelulares de  $IP_3$  comparten numerosas analogías estructurales y funcionales con los receptores de rianodine. El rianodine es un alcaloide que produce elevación del  $Ca^{2+}$  citosólico mediante la unión a receptores localizados en reservorios intracelulares de calcio, principalmente en tejido muscular esquelético y cardíaco (2).

Tanto el receptor de  $IP_3$  como el de rianodine son estructuras homotetraméricas dispuestas formando un poro central, posiblemente el canal de  $Ca^{2+}$ . Constan de los típicos dominios transmembrana en la región carboxilo terminal, cuatro de los cuales se combinan para formar el canal. El largo dominio amino terminal queda libre en el citoplasma con el sitio de unión de  $IP_3$  en su extremo, muy alejado del canal de salida de  $Ca^{2+}$  (152). En la zona intermedia del receptor se localizan sitios que modulan los efectos de  $IP_3$ . La fosforilación por la proteína quinasa A de dos residuos de serina desacopla la unión de  $IP_3$ . La unión de nucleótidos de adenina, como ATP, puede tener efectos estimulatorios o inhibitorios dependiendo de la concentración de ligando. Asimismo, el propio  $Ca^{2+}$  también modula la apertura del canal, pero los sitios de unión todavía no han sido identificados (156).

Según el tejido considerado, y como resultado de distintos acoplamientos entre los receptores intracelulares y canales de calcio extracelulares, se han encontrado varios modelos en el control de la liberación de  $Ca^{2+}$ . En el músculo esquelético el receptor de dihidropiridina dependiente de voltaje controla la apertura del receptor de rianodine del retículo sarcoplásmico. En el músculo cardíaco, la entrada de una pequeña cantidad de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje activa el receptor de rianodine (156). Sin embargo, en el caso de la generación de  $IP_3$  a través de

receptores de membrana acoplados a proteínas G, es este segundo mensajero el que, mediante su unión a receptores de depósitos intracelulares, estimularía la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior de la célula (74).

Un modelo propuesto en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior de la célula también implica al inositol 1,3,4,5- $\text{P}_4$  (69). Según estudios realizados por el grupo de Irvine, el control de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estaría regulada indirectamente por la capacidad de  $\text{IP}_3$  de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. La acción de  $\text{IP}_4$  requiere la presencia simultánea de  $\text{IP}_3$ , lo cual sugiere que  $\text{IP}_4$  podría regular la transferencia de calcio entre dos reservorios distintos: uno sobre el que directamente actúa el  $\text{IP}_3$  y otro que serviría para rellenar el anterior cuando se produjera la liberación de calcio en respuesta a un estímulo (75).

#### 4.2.2. Diacilglicerol

El diacilglicerol (DAG), conocido desde hace tiempo como un intermediario de la síntesis y degradación de glicerolípidos, es además un segundo mensajero activador de la proteína quinasa C, reconocido por primera vez por Nishizuka (115). El *sn*-1,2-DAG aumenta la afinidad de la proteína quinasa C por  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfatidilserina, causando la activación del enzima con niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  basales. Sin embargo, dicha activación a concentraciones subóptimas de DAG, puede ser incrementada por elevaciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (30).

A diferencia del DAG procedente de la fosfatidilcolina, el *sn*-1,2-DAG de los fosfatidilinosítoles de membrana se halla esterificado mayoritariamente por ácido esteárico y ácido araquidónico en las posiciones 1 y 2, respectivamente. Se han realizado numerosos estudios sobre las características estructurales del DAG necesarias para activar a la proteína quinasa C (107). De ellos se deduce que es fundamental el grupo hidroxilo en la posición 3 y el grupo éster en la posición 1, para presentar actividad. Tampoco son activos diacilgliceroles sustituidos en 1,3 ó 2,3.

El DAG que forma parte de la molécula de los fosfatidilinosítoles es producido

a tiempos muy cortos, en los primeros segundos tras la estimulación de los agonistas. También su degradación es muy rápida, así como sus efectos sobre translocación y activación de la proteína quinasa C (6,136).

## 5. SEÑALES DE CALCIO

La importancia del calcio para el normal funcionamiento y supervivencia de la célula animal es conocida desde hace más de un siglo. Actualmente, se conoce una amplia variedad de funciones en las que interviene el calcio. Entre ellas cabe destacar: funciones estructurales (citoesqueleto), cofactor de proteínas (proteína quinasa C, PLA<sub>2</sub>, calpafnas), regulación de procesos intracelulares (regulación hormonal, metabolismo glucídico y lipídico), transmisión del impulso eléctrico.

### 5.1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO

La mayoría del calcio en los vertebrados está inmovilizado en el esqueleto en forma de hidroxapatito, y sólo alrededor del 1% se encuentra en fluidos intra y extracelulares, donde se alcanzan concentraciones aproximadas de 1,6 mM (en hepatocitos) y 3 mM respectivamente. La concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en condiciones basales en el citosol de la célula hepática se mantiene entre 0,1 y 0,2 μM. Como consecuencia, entre el exterior y el interior celular, hay una diferencia en la concentración de Ca<sup>2+</sup> de cuatro órdenes de magnitud, que se mantiene gracias a distintos sistemas de control (28).

Los sistemas que mantienen la homeostasis del calcio están principalmente localizados a cuatro niveles: membrana plasmática, retículo endoplásmico, mitocondria y núcleo. Los dos primeros juegan el papel fundamental en las variaciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico en respuesta a estímulos extracelulares. La regulación de calcio por el núcleo no está bien establecida, pero se supone un sistema de captación asociado a los poros de su membrana y un sistema de salida de calcio dependiente de IP<sub>3</sub> (114).

## 5.2. ELEMENTOS REGULADORES DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE CALCIO

El nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico está regulado por múltiples canales, bombas e intercambiadores localizados en la membrana plasmática o en depósitos intracelulares. La presencia de estos sistemas depende del tipo de célula considerado.

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática permiten la entrada de dicho ion y pueden ser dependientes de voltaje, operados a través de segundos mensajeros y asociados a receptor (59,78). La salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , contra gradiente, se produce por medio de una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  con actividad ATPasa, y de un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Estudios en los últimos años han permitido la caracterización de dos reservorios intracelulares implicados en las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tras la estimulación celular; uno de ellos, el retículo endoplásmico, es sensible a  $\text{IP}_3$ , y posee además una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP para rellenar el retículo tras su vaciado (185).

En hepatocitos, como en otros tipos de células, las hormonas movilizadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  producen variaciones en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  por mecanismos de entrada y salida a través de la membrana plasmática y por la liberación de depósitos intracelulares dependientes de  $\text{IP}_3$  (62,134). Las distintas etapas de estas variaciones han sido ampliamente estudiadas, pero por su complejidad se han propuesto diferentes modelos para su interpretación.

Estudios recientes en poblaciones de hepatocitos proponen un doble papel para  $\text{IP}_3$  en el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Por una parte, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico por unión directa a su receptor específico. El otro componente es una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior condicionada por el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo. Otra tercera vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior depende de la ocupación del receptor por el agonista y parece requerir un segundo mensajero (inositolfosfatos) para su activación (96). Tras el aumento rápido y transitorio del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, la

caída de la señal se debe a una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula regulada por la propia hormona (102).

A diferencia de lo que se aprecia en poblaciones celulares, el estudio de las variaciones de calcio sobre una sola célula ha puesto de manifiesto la existencia de oscilaciones en la señal de calcio tras un único estímulo (79,105). Las técnicas fluorescentes introducidas por Tsien, han supuesto un avance espectacular en la caracterización del patrón espacio-temporal de las variaciones de calcio (57).

Las oscilaciones de calcio en una célula aislada mediadas por la generación de  $\text{IP}_3$ , pueden explicarse según el modelo conocido como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR). Según este modelo, una de las funciones del estímulo externo es promover la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior, frecuentemente mediada por  $\text{IP}_3$ , para llenar los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es el propio  $\text{Ca}^{2+}$  el responsable de su liberación de reservorios sensibles a  $\text{IP}_3$ , en la siguiente etapa. El  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como un segundo mensajero que propaga la señal a los reservorios vecinos. Finalmente, el  $\text{Ca}^{2+}$  es transportado al exterior de la célula por bombas, como control negativo, quedando preparada la célula para empezar un nuevo ciclo.

## 6. PROTEINA QUINASA C: ENZIMA ACTIVADO POR SEGUNDOS MENSAJEROS

La proteína quinasa C comprende una familia de serina y treonina quinasas específicas que han sido identificadas funcionalmente por propiedades enzimáticas, como unión a ésteres de forbol o actividad catalítica dependiente de fosfolípidos, o por características estructurales comunes (117,127).

La actividad enzimática de la proteína quinasa C fue inicialmente identificada en cerebro de rata por el grupo de Nishizuka como un nuevo tipo de serina/treonina proteína quinasa citoplásmica que podía ser activada proteolíticamente (150,151). Sin

embargo, poco después se vio que el enzima podía ser reversiblemente activado *in vitro* por DAG en presencia de fosfolípidos ácidos como fosfatidilserina. Esta observación proporcionó la primera posible relación entre la hidrólisis de fosfatidilinositoles mediada por receptor y la fosforilación de proteínas (115).

Los efectos activadores del DAG pueden ser reproducidos por los ésteres de forbol, conocidos promotores tumorales, lo cual sugiere un papel de la proteína quinasa C en el proceso neoplásico (30).

Las implicaciones fisiológicas de la proteína quinasa C como respuesta a un estímulo celular son muchas y muy variadas. El enzima participa en la regulación de numerosas funciones que incluyen desde transmisión sináptica, transporte a través de membrana, modulación de canales iónicos, contracción muscular y secreción, hasta procesos a largo plazo como proliferación y diferenciación celular (77,115).

## 6.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

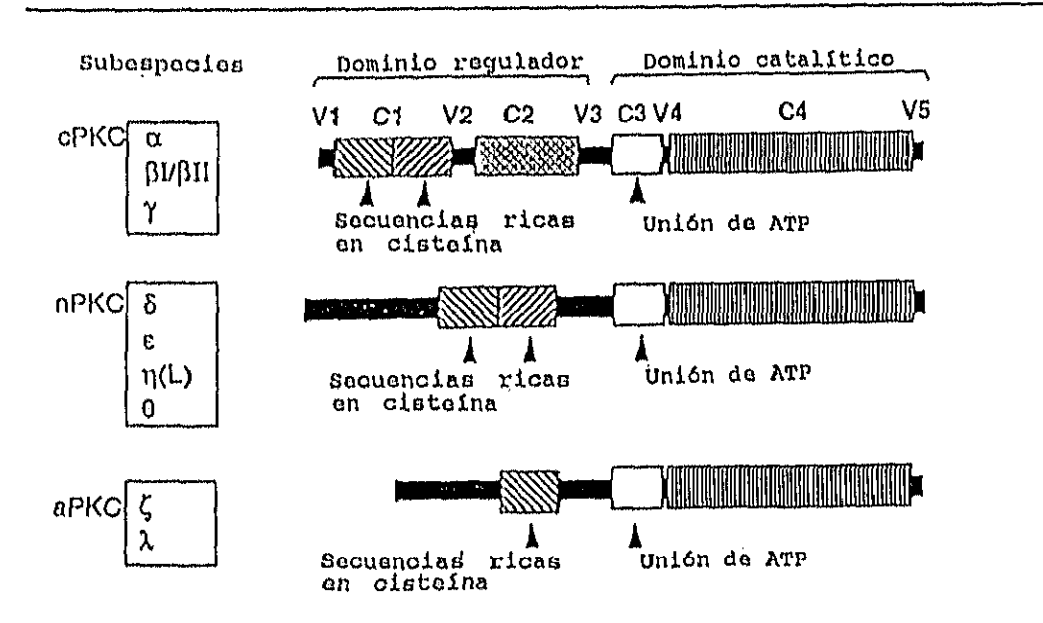
La unión de ésteres de forbol al enzima y la activación de la actividad quinasa de la proteína quinasa C por estos compuestos, se ha empleado para purificar polipéptidos de proteína quinasa C de un gran número de tejidos. Basándose en la secuencia de péptidos de proteínas purificadas a homogeneidad, se han aislado muchos clones de cDNA que codifican por proteína quinasa C (126,122) (esquema 6).

### 6.1.1. Distribución isoenzimática

Según su organización estructural pueden considerarse dos grandes grupos en la familia de isoenzimas de proteína quinasa C: el grupo A que comprende  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  y  $\gamma$  (117), que son dependientes de  $Ca^{2+}$ , y el grupo B que comprende  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  (95). Recientemente, se han aislado dos subespecies más,  $\theta$  y  $\lambda$ , pero todavía no se conocen sus requerimientos de activación.

ESQUEMA 6. Clasificación isoenzimática de la proteína quinasa C

Subespecies	Residuos de aminoácidos	Tamaño molecular (kDa)	Activadoras	Expresión en tejidos
<b>Grupo A: PKCs clásicas (cPKC)</b>				
$\alpha$	672	76,799	PS, Ca <sup>2+</sup> , DG, FFA, LysoPC	universal
$\beta$ I	671	76,790	PS, Ca <sup>2+</sup> , DG, FFA, LysoPC	algunos tejidos
$\beta$ II	673	76,933	PS, Ca <sup>2+</sup> , DG, FFA, LysoPC	mayoría de los tejidos
$\gamma$	697	78,366	PS, Ca <sup>2+</sup> , DG, FFA, LysoPC	tejidos neurales
<b>Grupo B: nuevas PKCs (nPKC)</b>				
$\delta$	673	77,517	PS, DG	universal
$\epsilon$	737	83,474	PS, DG, FFA	tejidos neurales
$\eta$ (L)	683	77,972	?	pulmón, piel,
$\theta$	707	81,571	?	corazón músculo esquelético
<b>Grupo C: PKCs atípicas (aPKC)</b>				
$\zeta$	592	67,740	PS, FFA	universal
$\lambda$	586	67,200	?	órganos sexuales





En cuanto a su distribución, todos los isoenzimas se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, excepto  $\gamma$  que es exclusivo de sistema nervioso central y  $\eta$  muy abundante en piel y pulmón (117). Esta expresión diferencial podría estar relacionada con la función de distintos isoenzimas en distintos tipos de células: así, el isoenzima  $\alpha$ , distribuido en todos los tejidos, podría estar implicado en funciones generales, mientras otros mayoritarios en un tejido, podrían tener papeles más específicos.

#### 6.1.2. Estructura molecular

La comparación de la secuencia de aminoácidos, según estudios de los cDNAs, muestra un alto grado de homología entre distintos isoenzimas de proteína quinasa C, aunque no todos presentan cada una de las regiones que se describen a continuación. Existen cuatro regiones muy conservadas,  $C_1$ - $C_4$ , separadas por cinco regiones de homología variable,  $V_1$ - $V_5$ . La región  $V_3$  se encuentra entre el dominio regulador (N terminal) y el catalítico (C terminal) (39,130).

En el extremo del dominio N terminal se encuentra una secuencia denominada pseudosustrato, por la analogía estructural que presenta con los verdaderos sustratos fisiológicos de la proteína quinasa C a los que impide el acceso cuando el enzima presenta una conformación inactiva (131). La unión de activadores en el dominio regulador supone el cambio conformacional que deja libre el sitio catalítico, permitiendo la entrada del sustrato y su consiguiente fosforilación (19,120).

Dentro del dominio regulador se incluye la región  $C_1$ , cuyos residuos de cisteína forman una estructura similar a los llamados dedos de zinc (125); esta conformación se considera esencial para la unión de los ésteres de forbol y análogamente para el DAG, hecho relacionado con las interacciones proteína quinasa C-membrana. La secuencia de la región  $C_2$  es similar a la de muchas otras proteínas y podría estar implicada en la activación dependiente de  $Ca^{2+}$  de la proteína quinasa C (72).

El dominio carboxilo terminal contiene las regiones C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> esenciales para la actividad catalítica, ya que concretamente en C<sub>3</sub> se ha localizado el sitio de unión del ATP (60).

## 6.2. MECANISMOS DE ACTIVACION

### 6.2.1. Hidrólisis de fosfolípidos

El primer mecanismo conocido para la activación de la proteína quinasa C fue la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, descubierto por el grupo de Nishizuka a principios de la década de los ochenta. Desde entonces, numerosos estudios han puesto de manifiesto la participación de otras vías en este proceso (8).

La proteína quinasa C fue inicialmente considerada como un enzima dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos para su activación (80). Sin embargo, aunque todos los isoenzimas requieren fosfolípidos y DAG, las necesidades de Ca<sup>2+</sup> son muy diferentes entre los miembros de distintas familias. El Ca<sup>2+</sup> aumenta la afinidad del enzima por los fosfolípidos y algunos autores le consideran el componente fundamental en la interacción de la proteína quinasa C con las membranas (6). Este aspecto podría tener consecuencias fisiológicas importantes en cuanto a una activación selectiva de isoformas dependientes o no de calcio.

El DAG, concretamente el *sn*-1,2-DAG necesario para la activación de proteína quinasa C, puede tener distinto origen. En respuesta a agonistas, el DAG producido inicialmente procede de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, que también genera IP<sub>3</sub>, y es rápidamente metabolizado en los primeros minutos tras la estimulación (10,115). En una segunda fase más tardía, la formación de DAG es el resultado de la hidrólisis de la fosfatidilcolina por la activación de una PC-PLC específica (3,13,112). Sin embargo, diversos estudios proponen a la PLD como otro enzima cuya acción sobre fosfatidilcolina genera ácido fosfatídico, que como sustrato de la fosfatidato fosfohidrolasa produce a su vez DAG (16).

Además, la proteína quinasa C puede ser activada por ácidos grasos cis-insaturados como oleico, linoleico o araquidónico, que pueden proceder de fosfolípidos de membrana por la acción de fosfolipasa A<sub>2</sub>, o acceder a la célula desde el exterior (44).

#### 6.2.2. Activación proteolítica y "down-regulation"

La proteína quinasa C fue originalmente detectada como un enzima proteolíticamente activado por la acción de calpaínas (150). De hecho, la proteólisis limitada genera un fragmento catalíticamente activo en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos, denominado proteína quinasa M (86,113). La proteína quinasa M presenta distintas características en cuanto a especificidad de sustrato e inhibición (76), y aunque su papel fisiológico no está bien establecido, podría constituir un modo de activación persistente de la proteína quinasa C (103).

Estudios desarrollados por el grupo de Castagna, pusieron de manifiesto la activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol, de los cuales se le considera el principal receptor biológico. El parecido estructural de estos agentes tumorales con el DAG, hace que le sustituyan como activador de la quinasa tanto *in vivo* como *in vitro* (30,115), pero su acción es más potente y prolongada. Además, sólo los isómeros  $\beta$  de los forboles activan la proteína quinasa C, mientras que los  $\alpha$  no presentan efecto.

Los ésteres de forbol producen la translocación de la proteína quinasa C a la membrana con su consiguiente activación, pero en determinadas condiciones de tiempo y concentración producen el fenómeno conocido como "down-regulation", o desaparición del enzima de la membrana con la consiguiente pérdida de actividad (113,169). Actualmente se ha comprobado que no todos los isoenzimas de proteína quinasa C responden de la misma manera al tratamiento con ésteres de forbol, ya que por ejemplo la isoforma  $\zeta$  no parece ser afectada (121,167).

### 6.3. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS. MODULACION DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION

La proteína quinasa C no puede ser solamente considerada como uno de los pasos bioquímicos en el proceso de transducción de señales (estímulo-efecto), ya que juega un papel fundamental en la modulación de los elementos de las vías de señalización.

La fosforilación de proteínas es uno de los principales mecanismos reguladores que tienen lugar en las células eucarióticas. Aunque en un principio las proteínas citosólicas fueron las únicas reconocidas como sustratos de fosforilación, los conocimientos actuales demuestran la importancia fisiológica de la fosforilación de proteínas de membrana. Entre estas últimas se incluyen receptores, proteínas G y efectores, pertenecientes a cualquiera de las vías de transducción de señales (142).

El uso de los ésteres de forbol como activadores de la proteína quinasa C ha sido de gran ayuda a la hora de establecer las posibles implicaciones de la quinasa en los procesos de modulación, aunque resulta complicado debido a la multiplicidad de los efectos y la variabilidad celular (30). En el sistema de los fosfatidilinosítoles, la activación de la proteína quinasa C por ésteres de forbol conduce a un bloqueo de las acciones mediadas por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico debido a su fosforilación (51); asimismo, en el receptor muscarínico de acetilcolina se produce un aumento de la internalización y degradación. Otros sustratos de la proteína quinasa C son las proteínas G<sub>i</sub> (24) y probablemente el receptor de IP<sub>3</sub> del retículo endoplásmico.

En la vía de transducción acoplada al enzima adenilato ciclasa, el tratamiento con ésteres de forbol afecta a varios niveles. El receptor  $\beta$ -adrenérgico es desensibilizado por fosforilación en eritrocitos de ave; sin embargo, en macrófagos o eritrocitos de anfibio se produce estimulación de la adenilato ciclasa mediada por la fosforilación de la subunidad catalítica (168). Por el contrario, en otras células como hepatocitos, alteraciones a nivel de la proteína G<sub>i</sub> conducen a una desensibilización del

sistema (26); otros experimentos demuestran la modificación de la proteína  $G_i$  por fosforilación (65).

En cuanto a los receptores con actividad catalítica intrínseca, se ha comprobado que su fosforilación conduce a una disminución de su actividad tirosina quinasa, como es el caso del receptor de EGF o de insulina (142). También los canales iónicos de la membrana plasmática se ven afectados por la activación de la proteína quinasa C: mientras en células de aorta se inhiben los canales de calcio dependientes de voltaje, en células cardíacas es estimulada la entrada de calcio. De la misma manera, efectos contrarios se observan en los transportadores de ferritina o glucosa, cuya actividad se ve aumentada o disminuida por fosforilación, respectivamente.

Todos los estudios realizados conceden un papel de primera importancia a la proteína quinasa C en la regulación de las distintas vías de transducción de señales extracelulares, así como en la modulación de funciones de membrana. La multiplicidad de efectos y la variabilidad celular ofrecen un amplio campo de investigación. En este sentido, cabría la posibilidad de que algunas isoformas de proteína quinasa C actuaran selectivamente sobre sustratos específicos, produciendo la diversidad de las respuestas observada en diferentes sistemas.

## **2. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Se propone estudiar los elementos que controlan etapas de transducción de señales a través de la membrana:

1. Analizar las etapas que contribuyen a la generación de segundos mensajeros dentro del proceso de transmisión de la señal hormonal.

2. Determinar la capacidad máxima de respuesta de cada una de las etapas de señalización, mediante el uso de activadores e inhibidores que actúen específicamente sobre un elemento de la vía, alterando la secuencia de reacciones inducida por la formación del complejo ligando-receptor.

3. Analizar la posible existencia de variaciones cuantitativas en las respuestas biológicas producidas por distintas hormonas, moduladas por la cantidad de segundos mensajeros generados. En este punto se propone el estudio de la actividad de enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, así como la evolución temporal de la concentración de 1,2-diacilglicerol.

4. Caracterizar los receptores de membrana de diferentes hormonas como primer paso en la vía de transducción y su posible modulación por otras señales.

5. Averiguar si el mecanismo de regulación de las señales tempranas se mantiene a lo largo de la diferenciación tisular, mediante la utilización de distintas poblaciones de hepatocitos a lo largo del desarrollo.

### **3. MATERIAL Y METODOS**



## MATERIALES

### 1. APARATOS

Se utilizaron balanzas de precisión y granatarios de Sartorius, modelos 1203 MP y 1207 MP-2, y pHmetros de Radiometer Copenhagen, modelo 52.

El hígado se perfundió con una bomba de perfusión Miniplus-2 de Gilson. El medio de perfusión se oxigenó con un pulmón oxigenador de vidrio de Afora, modelo U-80622. La termostatación del medio se realizó con un baño Heto-Denmark. La observación de las células se realizó en un microscopio óptico Wild-Herbrugg. Las células se incubaron en un baño termostaticado con agitación Unitronic 320 OR.

La manipulación y siembra de hepatocitos para cultivo se realizó bajo campana de flujo laminar Telstar modelo PV-100. Para la observación de las células sembradas sobre las placas se utilizó un microscopio de platina invertida Nikon/TMS. Las células fueron incubadas en un incubador de células Heraeus con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Las centrifugaciones hasta 2000g se realizaron a 4°C en una centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Minifuge T. Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada Kontron, modelo Centrikon H-401, y en una microcentrífuga Eppendorf, modelo 5414, así como en una ultracentrífuga Centricon T-2080 de Kontron.

La radiación beta de los compuestos marcados con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C y <sup>35</sup>S se midió en un contador de centelleo líquido Kontron, modelo Betamatic.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un lector de placas Atom, modelo 340 ATC.

Las electroforesis se realizaron con fuentes de Bio-Rad, modelo 400.

Las medidas de calcio intracelular se realizaron en un fluorómetro Perkin-Elmer, modelo LS 50.

Para la amplificación del DNA se utilizó un aparato PCR modelo Coy tempocycler. La visualización de los geles de DNA se realizó en un transiluminador TDI para luz UV.

## 2. REACTIVOS

La fosfatidilserina, la histona H1, la protamina, la proteína básica de mielina, el  $\beta$ -forbol 12,13-dibutirato, el  $\beta$ -forbol 12-miristato 13-acetato, el  $\alpha$ -forbol 12,13-didecanoato, el oleil-acetilglicerol y el ATP fueron suministrados por Sigma, al igual que la vasopresina, la bombesina, la angiotensina II, la ionomicina, el Fura-2-AM y el ionóforo de calcio A23187. El plurónico fue suministrado por Molecular Probes y la diacilglicerol quinasa por Calbiochem.

Los productos radiactivos ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )ATP, (tiroxil- $^3\text{H}$ )vasopresina(arg), ( $^{35}\text{S}$ )ADP $\beta\text{S}$ , (metil- $^3\text{H}$ )colina clorhidrato y ( $^3\text{H}$ )forboldibutirato fueron suministrados por Amersham Ibérica. El ( $^{125}\text{I}$ )GRP y la ( $^{125}\text{I}$ )angiotensina II, por NEN Dupont. Los líquidos de centelleo Betamax y Ecolite(+) fueron de ICN Radiochemicals.

La dietil-aminoetil-celulosa fue de Whatman (DEAE-52) y el hidroxilapatito de Bio-Rad. El resto de productos químicos fueron de Sigma, Merck o Boehringer.

Para retener las macromoléculas desnaturalizadas en medio ácido se utilizaron filtros de fibra de vidrio GF/C de Whatman.

Todos los productos utilizados para las electroforesis, incluida la tinción de geles, fueron de Bio-Rad.

### 3. MATERIAL BIOLÓGICO

En la mayoría de los experimentos se utilizaron suspensiones de hepatocitos aislados de rata y células en cultivo, tanto de animales adultos como de fetos de 22 días de gestación.

Las ratas fueron machos de la raza Wistar (200-300 g de peso), para la obtención de hepatocitos adultos. En el caso de los hepatocitos fetales se utilizaron hembras preñadas (300-350 g), de las que se obtuvieron los fetos a término por operación cesárea.

#### 3.1. OBTENCIÓN DE LOS HEPATOCITOS ADULTOS

Los hepatocitos se obtuvieron por perfusión in situ de hígado de rata, con un medio que contenía colagenasa, según el método descrito por Krebs y cols. (88), con las modificaciones introducidas por Hue y cols. (73), que permite el aislamiento de hepatocitos con un alto grado de viabilidad.

##### 3.1.1. Sistema de perfusión

El sistema utilizado, representado en el esquema 7, constó de:

A : un depósito colector del medio.

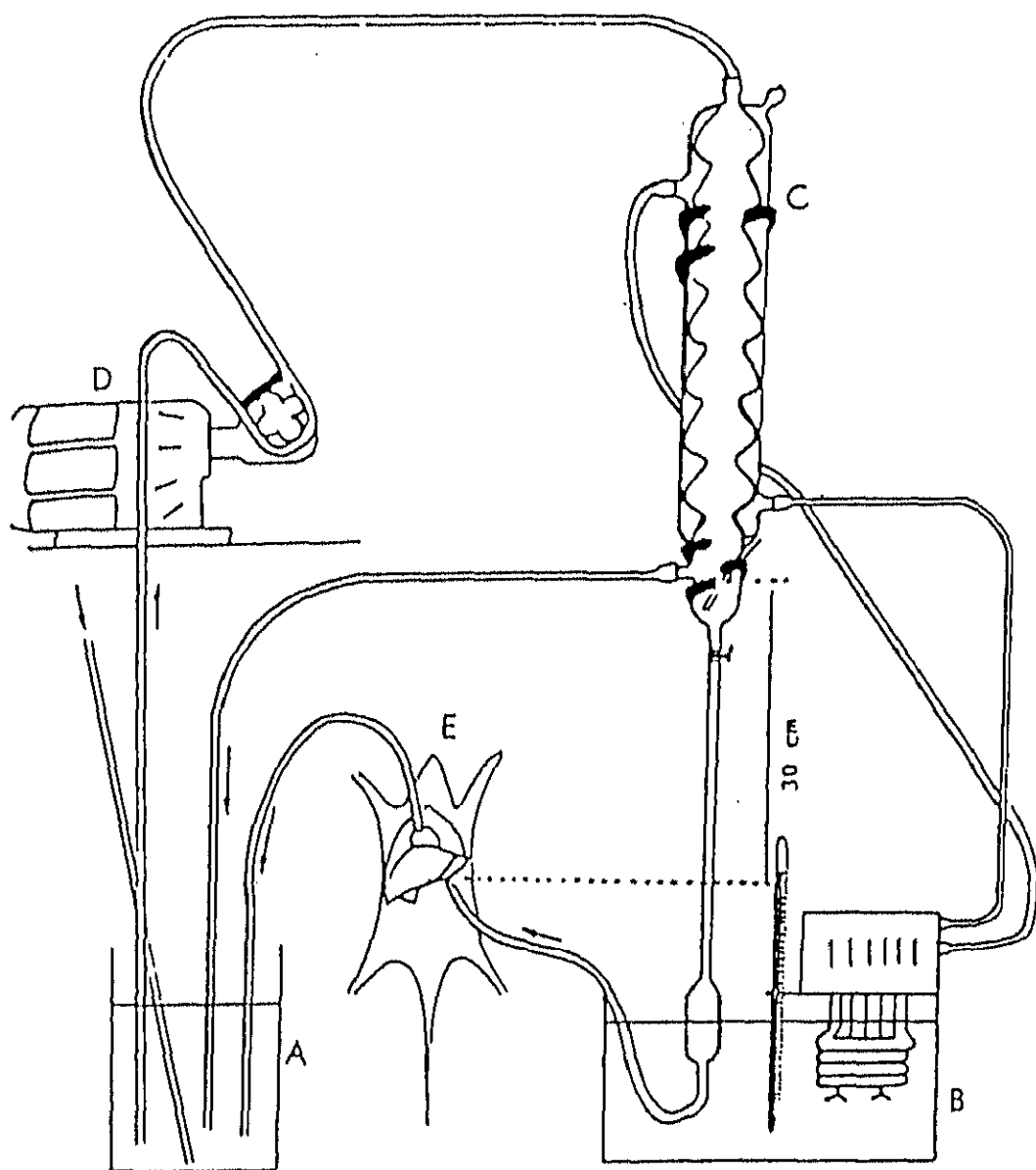
B : un baño termostático con circuito externo de recirculación de agua

C : un oxigenador de vidrio que se mantuvo a 38°C por medio del baño termostático.

D : una bomba de perfusión.

E : una plataforma sobre la que se colocó el animal.

La bomba elevaba el medio de perfusión desde el depósito colector hasta el oxigenador. Para conseguir que el nivel de líquido se mantuviera constante, el



ESQUEMA 7. Sistema de perfusión

- (A) Depósito colector; (B) Baño termostático; (C) Pulmón oxigenador;  
 (D) Bomba peristáltica; (E) Plataforma

oxigenador poseía un reservorio provisto de un rebosadero que devolvía el exceso de medio al depósito colector. Tanto en dicho depósito como en el oxigenador, el medio de perfusión se gaseó constantemente con  $O_2$  y  $CO_2$ , ya que se hacía burbujear una mezcla de dichos gases (95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ ), previamente lavada y saturada de vapor de agua a su paso a través de un frasco lavador que contenía agua destilada.

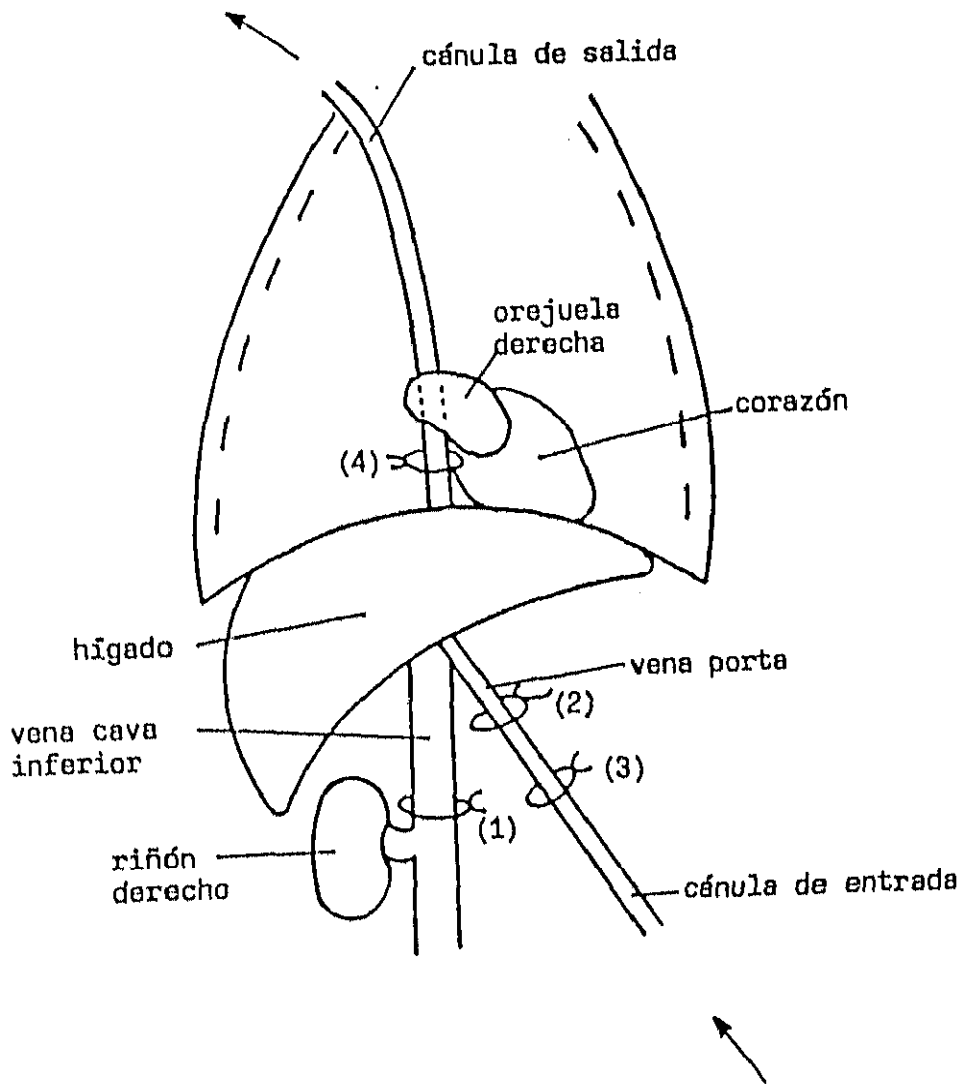
En el reservorio había una llave que permitía controlar el flujo del medio, que se mantuvo constante a 35 ml/min. Del reservorio salía un catéter que llevaba el medio de perfusión al hígado, y que tenía intercalado un atrapa-burbujas sumergido en el baño termostático a 38°C, de manera que se conseguía que el medio llegara al hígado a 36°C. Tras atravesar el hígado el medio era recuperado por otro catéter que lo devolvía al depósito colector. El depósito se colocó 15 cm por debajo del nivel del hígado, con objeto de facilitar el drenaje del órgano por un efecto sifón.

### 3.1.2. Medio de perfusión

El hígado se perfundió con 300 ml de medio Krebs-Henseleit sin calcio (89), constituido por NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM,  $KH_2PO_4$  1,18 mM,  $MgSO_4$  1,18 mM, y  $NaHCO_3$  25 mM, con glucosa 10 mM. Este medio se gaseó constantemente con una mezcla de  $O_2/CO_2$  (95%/5%), de manera que el pH se mantuvo constante a 7,4. Posteriormente se añadió colagenasa y  $CaCl_2$  5 mM, cuya finalidad fue digerir la trama de colágeno del sistema conjuntivo. La ausencia de calcio del medio sin colagenasa y su posterior adición al medio de digestión, facilitó la ruptura de las uniones intercelulares.

### 3.1.3. Procedimiento quirúrgico

Las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de Nembutal a la dosis de 7 mg/100 g de peso. Una vez dormido, el animal se colocó sobre la plataforma y se le inyectaron 0,5 ml de heparina (Leo) al 1% en la vena femoral, para evitar la coagulación sanguínea y facilitar el lavado del hígado de su contenido hemático.



ESQUEMA 8. Procedimiento quirúrgico

Las anotaciones (1), (2), (3) y (4) corresponden a las ligaduras

Seguidamente se abrió la pared intestinal y se pusieron al descubierto la vena porta y el hilio hepático, retirando hacia un lado las asas intestinales. En la vena porta se introdujo una cánula de plástico (Braunula 1-G16, Braun Melsungen, RFA) que se sujetó y afianzó por medio de dos ligaduras (ver esquema 8). La cánula se conectó al catéter que conducía el medio desde el oxigenador, de manera que empezó a perfundir el hígado con medio Krebs-Henseleit sin calcio, todavía sin colagenasa, para lavar el órgano de sangre. Para facilitar el drenaje se abrió una salida provisional en la vena cava inferior por debajo de la desembocadura de las venas renales.

Rápidamente se abrió la cavidad torácica y se seccionaron los dos nervios frénicos, con objeto de evitar posibles espasmos en el diafragma que pudieran obstruir el flujo de salida a nivel de la vena suprahepática. A continuación se abrió un orificio en la orejuela derecha del corazón, por el cual se introdujo un catéter de plástico en la porción torácica de la vena cava inferior. Posteriormente se cerró la salida provisional abierta antes en la porción abdominal de la vena cava inferior. Tras esto el catéter recogía todo el flujo de salida procedente del hígado.

Los primeros 200 ml de medio de lavado hepático se desecharon, mientras que a los restantes 100 ml se les agregaron 65 mg de colagenasa (0,27 U/mg de Boehringer), y se cerró el circuito. Trascorridos 5 minutos a partir de la adición de la colagenasa, el medio de perfusión comenzó a rezumar a través de la superficie del hígado. La perfusión, desde el momento en que se añadió la colagenasa, duró de 10 a 15 minutos.

#### 3.1.4. Aislamiento de los hepatocitos adultos

Tras la perfusión en presencia de colagenasa se procedió a la disección del hígado, llevándolo a una placa Petri con medio de perfusión donde se separó la cápsula de Glisson, y se disgregó el tejido hepático. A continuación se pasó el hígado a un vaso de precipitados donde se continuó la disgregación mecánicamente, mediante agitación suave con una espátula roma. Esta suspensión se filtró a través de varias capas de gasas, para eliminar los trozos de hígado no digeridos y los restos de trama

conjuntiva, a continuación se centrifugó durante 2 minutos a 50g. El sedimento de células se resuspendió en medio Krebs-Henseleit sin colagenasa, y se centrifugó otras dos veces para eliminar los restos de membranas. El sedimento de células final se resuspendió en 10-40 ml de Krebs-Henseleit con  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Todo el proceso de lavado y centrifugación de los hepatocitos se realizó a temperatura ambiente.

### 3.1.5. Viabilidad de los hepatocitos

La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante el ensayo de tinción con el colorante Azul de Tripán. En una mezcla en proporción 1:1 de la suspensión de hepatocitos y de Azul de Tripán al 0,2% en medio Krebs-Ringer-fosfato, las células muertas o con la membrana plasmática dañada aparecen teñidas al observarlas al microscopio óptico, mientras que las que mantienen su membrana íntegra aparecen sin teñir. El conteo de los hepatocitos se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró como buena cuando fue superior al 90%.

## 3.2. OBTENCION DE LOS HEPATOCITOS FETALES

Los hepatocitos se obtuvieron a partir de un homogeneizado de hígado de fetos de 22 días de gestación, sin perfusión, según el método descrito por Martín-Sanz (99).

### 3.2.1. Medios de digestión

El homogeneizado se incubó con medio Krebs-Henseleit con la misma composición que en el caso de los adultos, en proporción (1:5), añadiendo además EGTA 0,5 mM en la primera incubación. Para la digestión se añadieron colagenasa y  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM.

### 3.2.2. Procedimiento quirúrgico

Las hembras preñadas, en la mañana del día 22 de gestación, confirmado por criterio standard, fueron sacrificadas por dislocación cervical y los fetos extraídos por operación cesárea y sacrificados por decapitación.



### 3.2.3. Aislamiento de los hepatocitos fetales

Los hígados fetales fueron disgregados mecánicamente y resuspendidos en 5 volúmenes de medio Krebs-Henseleit con EGTA 0,5 mM. Posteriormente se incubaron en matraces, lavados con BSA al 1%, en baño a 37°C con gaseo de carbógeno y agitación constantes.

Transcurridos 30 minutos, se centrifugaron los homogeneizados durante 2 minutos a 50g. El sedimento de células se resuspendió en Krebs con colagenasa a una concentración de 0,5 mg/ml y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y fue incubado en las condiciones anteriores durante 60 minutos para su digestión. La suspensión de células se pasó a través de un colador de red metálica y se centrifugó a 35g durante 4 minutos.

Eliminado el sobrenadante, en el que quedan las células sanguíneas y todo tipo de fragmentos subcelulares, el sedimento fue resuspendido en 2 volúmenes de Krebs y centrifugado de nuevo como anteriormente a fin de conseguir una suspensión de hepatocitos fetales limpia de cualquier otro residuo. Así, después de cada lavado, la suspensión fue filtrada a través de mallas de nylon con tamaño de poro de 200, 100 y 60 nm, siguiendo el mismo proceso.

### 3.2.4. Viabilidad de los hepatocitos fetales

La viabilidad de los hepatocitos fetales fue determinada por el mismo procedimiento que los adultos. En todos los casos la viabilidad fue superior al 95%.

## METODOS

### 1. PREPARACION DE LOS HEPATOCITOS

Una vez obtenidas las células y comprobada su viabilidad, tanto los hepatocitos adultos como los fetales, fueron resuspendidos en medio Krebs-Henseleit con CaCl<sub>2</sub> 1 mM, y preincubados en un baño termostatzado a 37°C con agitación (50 ciclos/min) y gaseo con carbógeno (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%).

Las disoluciones de los ligandos también fueron preparadas en Krebs con  $\text{CaCl}_2$  1 mM a las concentraciones requeridas, y atemperadas para comenzar la incubación. Esta se llevó a cabo dispensando alícuotas de la suspensión de hepatocitos sobre las soluciones de ligandos.

Dependiendo del tipo de enzima o metabolito a determinar, las células fueron incubadas a distintos tiempos y densidades celulares según las condiciones más adecuadas en cada caso. Asimismo, para finalizar la incubación también se procedió de manera diferente en función del tratamiento posterior que requiriera la muestra para su procesamiento.

## 2. CULTIVO DE HEPATOCITOS

Tanto la preparación de los medios como la manipulación de las células y material utilizado en el cultivo, se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, trabajando bajo campana de flujo laminar.

### 2.1. PREPARACION DE LAS PLACAS DE CULTIVO

Para el cultivo de los hepatocitos, tanto fetales como adultos, se utilizaron placas Costar estériles de 24 pocillos. El día anterior a la obtención de las células, se cubrieron las placas con una suspensión de colágeno a 1 mg/ml en HCl 0,01 M, aspirándolo después con una pipeta y dejándolas secar en la campana un mínimo de 4 horas para asegurar que el colágeno quede bien pegado.

Después se lavaron las placas con 1 ml de solución salina por pocillo, compuesta por NaCl 4,4 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6,5 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5 mM y finalmente con 2 ml de agua, dejándolas secar en condiciones estériles hasta el día siguiente.

## 2.2. SIEMBRA DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos obtenidos por el procedimiento anteriormente descrito, fueron resuspendidos en medio Dulbecco modificado (DMEM) con antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina a una concentración de 50 mg/l) suplementado con un 2% de suero fetal de bovino, a una densidad de  $0,5-1 \times 10^6$  células/ml. En cada pocillo se sembró 1 ml de la suspensión y se mantuvo en el incubador a 37°C en atmósfera de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5).

Transcurrido un mínimo de 4 horas para que las células quedaran bien adheridas, se cambió el medio anterior por 1 ml de DMEM con 5 mg/ml de albúmina bovina con el fin de evitar que el suero fetal pudiera interferir en la respuesta hormonal. Las células se dejaron en el incubador hasta el día siguiente o se procesaron en el mismo día dependiendo de las condiciones del experimento a realizar.

## 3. DETERMINACION DE CALCIO INTRACELULAR

### 3.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE Ca<sup>2+</sup> EN HEPATOCITOS AISLADOS

#### 3.1.1. Incubación de los hepatocitos con el indicador fluorescente

Para determinar la concentración intracelular de calcio los hepatocitos aislados fueron preincubados en un medio salino PBS cuya composición fue NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, glucosa 5 mM y BSA 5 mg/ml, a pH 7,4.

Después de centrifugar las células a 50g durante 2 minutos, se llevaron a una concentración de  $5 \times 10^6$ /ml en PBS con 1 mg/ml de BSA y se incubaron en presencia del indicador fluorescente Fura-2-AM y del detergente aniónico plurónico F-127, en concentraciones finales de 5 μM y 20 μg/ml respectivamente.

Las células se mantuvieron en baño termostatzado a 37°C y con agitación de 50 ciclos/min durante 15-20 min, se centrifugaron a 50g durante 2 min, y después de eliminar el sobrenadante se hicieron 2 lavados sucesivos con el mismo PBS de la preincubación, a fin de evitar la presencia de Fura-2 en la solución.

Los hepatocitos fueron resuspendidos en PBS a una densidad de  $0,5-1 \times 10^6/\text{ml}$  y mantenidos a temperatura ambiente para la posterior determinación del calcio intracelular.

### 3.1.2. Medida de la concentración intracelular de $\text{Ca}^{2+}$

Según describe el grupo de Tsien (57), para cuantificar el calcio intracelular es necesaria la formación del complejo fluorescente Fura- $\text{Ca}^{2+}$ , para lo cual se requiere la hidrólisis del enlace acetoximetil-éster del Fura-2-AM por las esterasas intracelulares; este grupo éster confiere al Fura la neutralidad necesaria para que dicho compuesto entre en la célula, ya que de otro modo no le sería posible atravesar la membrana plasmática.

La formación del complejo Fura- $\text{Ca}^{2+}$  da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registró a una longitud de onda de 510 nm, usando dos longitudes de onda de 340 y 380 nm respectivamente como fuente de excitación dual.

De la suspensión anterior de hepatocitos se llevaron alícuotas de 2 ml a cubetas de cuarzo, que fueron atemperadas a 37°C mediante un sistema de termostatzación y agitación que lleva acoplado el fluorímetro, durante los 5 minutos previos al comienzo de la reacción.

El efecto de los distintos compuestos sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se determinó mediante la adición de los ligandos en volúmenes tales que no afectaran al total de la cubeta, previa estabilización de la línea base. El máximo y mínimo de fluorescencia se obtuvieron añadiendo SDS a una concentración final del 1% y una solución de EGTA 3 mM/Tris 0,5 mM pH 9,0, respectivamente.

El cálculo de la concentración de calcio a un tiempo  $t$  y asumiendo una constante de disociación para el complejo Fura- $\text{Ca}^{2+}$  de 224 nM, fue realizado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(\text{Ca}^{2+}, \text{nM})_t = 224 (F_t - F_{\min}) F_{\min} 380 / (F_{\max} - F_t) F_{\max} 380 \quad (35)$$

### 3.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO EN RETICULO ENDOPLASMICO AISLADO DE HEPATOCITOS

#### 3.2.1. Aislamiento de la fracción microsomal

Tanto los hepatocitos adultos como los fetales se homogeneizaron en una relación (1:5) peso/volumen en el mismo medio y condiciones que en el caso de la proteína quinasa C, siguiendo el método utilizado por Díaz-Guerra (43). Las muestras se centrifugaron a 40.000g durante 15 min a 4°C, resultando una fracción particulada con núcleos, fragmentos de membrana plasmática y mitocondrias y un sobrenadante que fue centrifugado posteriormente a 100.000g, cuyo sedimento contenía la fracción microsomal separada así del resto de orgánulos celulares.

La fracción microsomal se resuspendió en un medio cuya composición fue KCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, DTT 1 mM, sacarosa 250 mM y Hepes 20 mM pH 7,4, a una concentración de proteína de 10-20 mg/ml.

#### 3.2.2. Medida de la liberación de calcio

El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el retículo endoplásmico se cuantificó mediante su unión al Fura-2 como queda descrito en el apartado anterior. Las muestras contenían 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína.

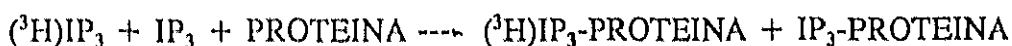
En la cubeta del fluorímetro se añadió Fura-2 1  $\mu\text{M}$  y se registró la fluorescencia. Posteriormente se calibró dicha emisión mediante la adición de concentraciones de calcio conocidas.

El calcio acumulado en el retículo endoplásmico se determinó añadiendo cantidades sucesivas de IP<sub>3</sub> hasta la saturación de los receptores específicos que los microsomas poseen para dicho ligando. La unión del IP<sub>3</sub> a su receptor conduce a la apertura de canales de calcio, resultando el calcio liberado proporcional a la concentración de IP<sub>3</sub> adicionado a la muestra.

#### 4. DETERMINACION DE INOSITOL 1,4,5-TRISFOSFATO

Para la medida de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) se utilizó un ensayo de Amersham específico para la determinación de D-mio-inositol 1,4,5-trisfosfato. El ensayo se basa en la competencia que se produce entre el IP<sub>3</sub> de la muestra y una cantidad establecida de IP<sub>3</sub> marcado con tritio, por un número limitado de sitios de unión específicos.

Para una cantidad de proteína de unión y de ligando marcado determinadas, la cantidad de radiactividad unida a la proteína es inversamente proporcional a la concentración de ligando no marcado presente en la reacción :



La reacción cruzada con otros inositolfosfatos es menor del 7%, según ha sido determinado por la casa comercial Amersham.

Las muestras de hepatocitos en suspensión, previamente incubadas con LiCl 10 mM durante 10 minutos y posteriormente con los distintos ligandos, contenían 200.000 células a las que se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de HClO<sub>4</sub> en baño de hielo, quedando al 5% en el volumen final, para acabar la incubación.

Para la extracción de IP<sub>3</sub>, las muestras fueron centrifugadas a 2000g a 4°C, se tomó el sobrenadante que fue neutralizado con una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M y 100 mM Hepes pH 7,4 volviendo a centrifugar éste durante 15 minutos y tomando la nueva fase soluble para comenzar el ensayo.

Alícuotas de estos sobrenadantes neutralizados se ensayaron paralelamente a una curva patrón realizada sin extracto pero con cantidades establecidas de IP<sub>3</sub> no marcado, según las indicaciones del método para la reacción de unión específica a la proteína. Las cantidades de IP<sub>3</sub> de los extractos se obtuvieron por interpolación en la curva patrón.

## 5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA

La actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa se determinó por la producción de (<sup>3</sup>H)diacilglicerol a partir de (<sup>3</sup>H)ácido fosfatídico, según el método descrito por Brindley y cols. (100).

Las células para la determinación de la actividad del enzima (incubación de los hepatocitos y parada de las reacciones) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento que con la proteína quinasa C. Se tomaron 2x10<sup>6</sup> células.

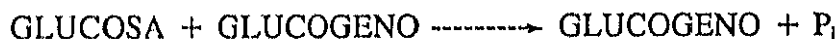
Las muestras se homogeneizaron en 0,5 ml de un medio cuya composición fue sacarosa 250 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,2 mM y Hepes 20 mM pH 7,4 (medio A) y se centrifugaron a 100.000g a 4°C durante 30 min. El precipitado se resuspendió en 0,2 ml de medio A. Se tomaron 0,2 ml, tanto de la fracción soluble como particulada, a los que se añadieron 50 µl de N-etil maleimida 10 mM con Triton X-100 al 2%. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 37°C durante 10 min. La presencia de N-etil-maleimida, un inhibidor del enzima fosfatidato fosfohidrolasa del retículo endoplásmico, asegura que la actividad medida en el ensayo corresponde sólo a la

fosfolipasa de la membrana plasmática o citosólica.

Para medir la actividad del enzima la composición final de la mezcla de reacción fue: Tris maleato 100 mM pH 6,5, DTT 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0,2 mM, albúmina libre de ácidos grasos 2 mg/ml y (<sup>3</sup>H)ácido fosfatídico 0,5 mM (5  $\mu$ Ci/ml). Las reacciones se incubaron durante 30 min, y se pararon con 2 ml de cloroformo:metanol (19:1, v:v) con 0,08% de aceite de oliva. A la mezcla se añadió 1 g de óxido de aluminio seco y se agitó fuertemente durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 1000g durante 5 min. Se tomaron muestras de 1 ml del solvente, se secaron en viales de centelleo, y se determinó el (<sup>3</sup>H)diacilglicerol producido.

## 6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOGENO FOSFORILASA

La valoración de la actividad glucógeno fosforilasa se llevó a cabo por el método descrito por Stalmans y Hers (144) midiendo la liberación de fosfato inorgánico según la reacción:



La incubación de los hepatocitos, así como el proceso hasta la congelación de las muestras en N<sub>2</sub> líquido, se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que con la proteína quinasa C. Cada muestra contenía 1x10<sup>6</sup> células.

El sedimento de células congelado se homogeneizó en 310  $\mu$ l de un medio compuesto por NaF 100 mM, EDTA 10 mM, Hepes 10 mM y 5% de glucógeno a pH 7,4. Un volumen de 100  $\mu$ l del homogeneizado se incubó con 100  $\mu$ l de la mezcla de ensayo por glucosa-1-fosfato 50 mM, NaF 100 mM, glucógeno al 1%, cafeína 0,5 mM y Pipes 10 mM pH 6,1, para minimizar interferencias de la fosfoglucomutasa.

Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, y se añadió



a continuación 0,5 ml de ácido tricloroacético al 10% frío para detener la reacción. La mezcla se centrifugó en frío durante 15 min a 2000g para eliminar el precipitado insoluble. En los sobrenadantes se valoró la cantidad de  $P_i$  formado. Las basales se determinaron en controles a los que se adicionó antes el ácido tricloroacético que la muestra.

El  $P_i$  formado durante la incubación se determinó colorimétricamente según el método descrito por Fiske y Subbarow (138). A 25  $\mu$ l de muestra se añadieron 100  $\mu$ l de molibdato amónico al 2,5% en  $H_2SO_4$  (cromógeno oxidado) y 100  $\mu$ l de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (agente reductor), tras lo cual se dejaron incubar durante 5 min a temperatura ambiente con objeto de que la reacción colorimétrica se completase (el molibdato amónico pasa a su forma reducida coloreada). La lectura de absorbancia se realizó a 660 nm en un lector de placas. La cantidad de  $P_i$  de las muestras se determinó por interpolación de los valores en una curva patrón.

## 7. DETERMINACION DE METABOLITOS DERIVADOS DE GLICEROLIPIDOS

### 7.1. DETERMINACION DE *sn*-1,2-DIACILGLICEROL TOTAL

La cantidad de *sn*-1,2-diacilglicerol total se determinó mediante el enzima diacilglicerol quinasa de *E. coli*, según describen Walsh y Bell (160). Este ensayo se basa en la incorporación de ( $\gamma$ - $^{32}P$ )ATP en el ácido fosfatídico.

Las muestras, que contenían  $1 \times 10^6$  células en 0,5 ml, se incubaron con los distintos ligandos (en las mismas condiciones que en el caso de la proteína quinasa C) y se añadieron 0,5 ml de cloroformo:metanol (95:5) a 4°C para finalizar la reacción.

Las muestras se centrifugaron en la centrífuga Eppendorf durante 5 min a 4°C, se separó la fase orgánica en la que quedarán solubilizadas las moléculas con componente lipídico, se eliminó el solvente a 50°C, y el residuo se resuspendió en 100

$\mu\text{l}$  de un medio cuya composición fue: NaCl 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM, Nonidet P-40 1%, fosfatidilserina 2,2 mg/ml, ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )ATP 50  $\mu\text{M}$  (0,2  $\mu\text{Ci}$ ) y diacilglicerol quinasa 0,34 unidades/ml. La incubación se realizó en baño a 30°C durante 60 min y se finalizó añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de una solución compuesta por ácido perclórico al 5%, ATP 10 mM y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 mM.

La extracción del diacilglicerol se realizó con 700  $\mu\text{l}$  de cloroformo:metanol (95:5), agitando vigorosamente. La fase orgánica se separó, se lavó dos veces con  $\text{H}_2\text{O}$  y metanol para eliminar los compuestos más polares y se secó en viales para contar la radiactividad incorporada. La cantidad de diacilglicerol presente en las muestras se determinó mediante la interpolación de los valores en una curva patrón.

## 7.2. DETERMINACION DE METABOLITOS FORMADOS A PARTIR DE ( $^{14}\text{C}$ )GLICEROL Y ( $^3\text{H}$ )COLINA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Los hepatocitos en las placas de cultivo, obtenidos en las condiciones anteriormente descritas, fueron tratados con ( $^{14}\text{C}$ )glicerol y ( $^3\text{H}$ )colina (0,5  $\mu\text{Ci}$ /pocillo) durante al menos 2 horas en incubador a 37°C, tras lo cual se eliminó el medio y se lavaron varias veces con DMEM. A continuación se incubaron en 300  $\mu\text{l}$  con diversos ligandos, recogiendo muestras a diferentes tiempos.

La toma de muestras se realizó eliminando previamente el DMEM, que se centrifugó a máxima velocidad en centrífuga Eppendorf y la radiactividad del sobrenadante se determinó en cada caso para normalizar los resultados. Las células se recogieron en 300  $\mu\text{l}$  de metanol a 4°C, manteniéndose congeladas a -80°C.

La extracción de los glicerolípidos se llevó a cabo por adición de 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_3\text{CH}$  y centrifugación a 2700g durante 2 minutos. Se tomó el sobrenadante al que se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , se agitó la mezcla vigorosamente y se centrifugó a 4000g 5 minutos. La fase acuosa fue desechada y la fase orgánica, en la que quedaron solubilizados los glicerolípidos, se mantuvo a -80°C para su posterior

procesamiento por cromatografía en capa fina.

Alícuotas de 100  $\mu$ l de las fracciones clorofórmicas se aplicaron a una placa de sílica gel para resolver los distintos componentes de la muestra. Como patrón de DAG se utilizó el oleil-acetilglicerol. La cromatografía se desarrolló en un solvente compuesto por  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{metanol}:\text{NH}_4\text{OH}$  25% (65:25:5) y se reveló por exposición a vapores de yodo, fijándose éste a los lípidos.

Las placas de sílica gel se cortaron en varias tiras y fueron introducidas en viales de centelleo para determinar su radiactividad. Considerando el  $R_f$  y la radiactividad de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  incorporada se valoró la cantidad de fosfatidilcolina y diacilglicerol presente en la muestra.

### 7.3. DETERMINACION DE METABOLITOS DERIVADOS DE ( $^3\text{H}$ )COLINA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (DOWEX-50W)

Los hepatocitos utilizados para esta determinación se procesaron como en el apartado anterior (excepto la incubación en presencia de ( $^{14}\text{C}$ )glicerol) hasta la recogida de células en la fase metanólica.

Para separar aquellas moléculas que contengan colina se utilizaron columnas de Dowex-50W (forma  $\text{H}^+$ ) siguiendo el método descrito por el grupo de Wakelam (37). El Dowex-50W es un gel de intercambio iónico que retiene las moléculas en función de su carga y polaridad. Antes de empaquetar dicho gel en la columna, se mantuvo en  $\text{HCl}$  1 M y se lavó varias veces con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta pH 6,0. Se utilizaron pipetas pasteur y 0,5 ml de gel para 200  $\mu$ l de fase metanólica, que fue diluida hasta 4 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  para ser aplicada en la columna.

Los 4 ml de eluato de la muestra contendrán la fosfatidilcolina que se pega a la columna; después se recogieron 3 fracciones de 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , donde aparece la fosfocolina. Finalmente, la colina unida más fuertemente a la matriz del gel eluyó con

HCl 1 M en 2 fracciones de 2 ml. Alícuotas de 200  $\mu$ l se llevaron al contador de centelleo para hacer un estudio comparativo de la radiactividad presente en cada muestra.

## 8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA C

La actividad protefna quinasa C se determinó en extracto soluble parcialmente purificado de hepatocitos adultos y fetales.

Los hepatocitos fueron incubados con diferentes ligandos en las condiciones descritas en el apartado 2.1 de métodos. Cada muestra contenía  $3 \times 10^6$  células en un volumen de 0,5 ml. A los tiempos establecidos para acabar la incubación, se centrifugaron los tubos en centrífuga Eppendorf durante 5 segundos, se eliminó el sobrenadante y se congeló la fracción particulada inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenando las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 8.1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Siguiendo el método descrito por Marais y Parker (98), las muestras se homogeneizaron en 0,5 ml de un medio cuya composición fue EGTA 4 mM, EDTA 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y Pipes 20 mM a un pH 6,6. El medio de homogeneización se suplementó con PMSF 1 mM y leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que son inhibidores de proteasas. Todo el proceso se realizó a  $4^{\circ}\text{C}$  en baño de hielo, utilizando una varilla de vidrio para la total homogeneización de las células.

Para poder medir la actividad protefna quinasa C en la fracción soluble y particulada independientemente, las muestras fueron centrifugadas a 100.000g durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , lo cual suponía la separación entre el citosol y un sedimento que contenía orgánulos citoplasmáticos (núcleos y mitocondrias) y restos de membranas (plasmáticas y microsomales).

El sobrenadante se mantuvo a 4°C y el precipitado se resuspendió en 0,25 ml del medio de homogeneización con un 0,2% del detergente no iónico, nonidet P-40, para extraer el enzima de las membranas (56). Esta fracción se mantuvo en hielo durante 30 min y después de añadir 0,25 ml más de medio sin detergente, se procedió a la centrifugación en las condiciones anteriores. En el sobrenadante se encontraría la proteína quinasa C correspondiente a la fracción particulada.

## 8.2. AISLAMIENTO DEL ENZIMA

Tanto el extracto de la fracción soluble como particulada se purificaron parcialmente por columnas de DEAE-celulosa para eliminar el detergente e inhibidores de la actividad enzimática.

El gel se preparó en agua, y una vez empaquetada la columna, se equilibró con 5 volúmenes de tampón de lavado (medio B) cuya composición fue  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 20 mM y Hepes 10 mM pH 7,4. Las muestras se pasaron a través de la columna y se lavaron con 6 ml de medio B. La proteína quinasa C se eluyó con 2 ml de tampón 120 mM NaCl (medio C). En algunos casos también se procedió al aislamiento de la proteína quinasa M (76); para ello, las columnas se lavaron con 4 ml más de medio C y finalmente se eluyeron con 1 ml de tampón 350 mM NaCl (medio D).

## 8.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA C

La actividad proteína quinasa C se siguió por su capacidad de fosforilación de la histona H1, siguiendo el procedimiento descrito por el grupo de Nishizuka (85). Los ensayos se realizaron en presencia de calcio, fosfolípidos y diacilgliceroles, y la fosforilación basal se realizó en ausencia de lípidos y en presencia de EGTA para complejar el calcio presente.

Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min, aunque el proceso fue

lineal hasta 60 min. El volumen de reacción fue normalmente de 85  $\mu$ l y contenía ATP 150  $\mu$ M (0,2  $\mu$ Ci), MgAc<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, 25  $\mu$ g de histona H1, Hepes 20 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 0,6 mM, 10  $\mu$ g/ml de fosfatidilserina, y 2  $\mu$ g/ml de oleil-acetilglicerol. Para las fosforilaciones basales la composición del medio fue similar, salvo que contenía EGTA 2 mM en vez de lípidos y CaCl<sub>2</sub>.

La fosfatidilserina y el oleil-acetilglicerol se mantuvieron disueltos en una mezcla cloroformo/metanol (95:5, v:v). Alícuotas se secaron a 4°C en atmósfera de N<sub>2</sub> y se sonicaron en la mezcla de reacción.

Las reacciones se pararon con 3 ml de ácido tricloroacético al 5% con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, y la histona se recogió sobre filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman), que se lavaron tres veces con 3 ml de ácido tricloroacético. Los filtros se secaron y se contaron en viales con 2 ml de líquido de centelleo.

La actividad protefna quinasa M se determinó según el ensayo general establecido para la protefna quinasa C. La diferenciación entre ambas se estableció por la dependencia e independencia de activación en presencia y ausencia de calcio y fosfolípidos, y por su elución caracterfstica en columnas de DEAE-celulosa (24).

## 9. AISLAMIENTO DE RNA

### 9.1. OBTENCION DEL RNA TOTAL

El RNA total se obtuvo a partir de hepatocitos aislados mediante el método de Chirgwin (34). Cada muestra, tanto de hepatocitos adultos como fetales, contenía 4x10<sup>6</sup> células y una vez sedimentadas se homogeneizaron a 4°C en una solución que contenía 1 ml de un tampón cuya composición fue tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7,0, sarcosil al 0,5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M, 100  $\mu$ l de NaAc 2 M y 1  $\mu$ l de fenol bidestilado. En esta solución quedan desnaturalizadas las

proteínas, para evitar que las RNAsas puedan degradar el RNA.

El volumen anterior se repartió en tubos Eppendorf y por cada ml se añadieron 100  $\mu$ l de mezcla de Chisam (cloroformo:ácido isoamílico, 50:1) y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos para solubilizar el RNA. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron en centrífuga Eppendorf durante 15 min a 4°C. La fase superior se llevó a otro tubo Eppendorf al que se añadió un volumen de isopropanol manteniéndolo a -20°C durante 1 hora como mínimo para precipitar el RNA.

Las muestras se centrifugaron en las condiciones anteriores, se descartó completamente el sobrenadante, y el precipitado, que contenía el RNA, se lavó con 450  $\mu$ l de etanol al 75% a -20°C. Se centrifugó de nuevo durante 10 minutos y se repitió el ciclo de lavado 3 veces, guardando finalmente las muestras a -20°C.

Para determinar la cantidad y calidad del RNA se eliminó el etanol y el precipitado se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DPC) y 1 mM EDTA. La muestra se llevó al espectrofotómetro y se midió su absorbancia a 260, 280 y 310 nm cuyos valores corresponden a la cantidad de RNA, proteínas e impurezas respectivamente.

La concentración de RNA en  $\mu$ g/ml se calculó multiplicando el valor de 260 por el factor de absorbancia 40. La relación entre 260/280 es un índice de la calidad del RNA y se considera bueno el comprendido entre 1,9 y 2.

## 9.2. ANALISIS DE DNA POR PCR

Para determinar la presencia de las distintas isoformas de PKC se utilizó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) o reacción en cadena de la polimerasa (111). Mediante este sistema se consigue una amplificación del cDNA a partir de oligonucleótidos específicos de su secuencia.

Utilizando un kit para síntesis de cDNA de Boehringer, se tomaron 5  $\mu$ g de RNA y se incubaron a 42°C durante 1 hora en presencia de transcriptasa inversa para obtener el cDNA. La reacción se paró calentando a 92°C durante 10 minutos. La PCR se llevó a cabo en 50  $\mu$ l de un medio de reacción y 0,5  $\mu$ g de cDNA, como indica el kit de Perkin Elmer Cetus, en presencia de taq polimerasa y 25 pmol de cada nucleótido primer específico para:

PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$

(5' CTT CTG CAG CCA CTG CAC CGA C 3'),

(5' GGA TCC CAT GAA GTC ATT CC 3');

PKC  $\delta$

(5' TAA GCT CCA GCT TCA GCC TCG G 3'),

(5' GGC ATT TGT GGT GCA CAT TCA T 3');

PKC  $\epsilon$

(5' ATC AAA ATC TGC GAG GCC GTG A 3'),

(5' ACT GTT GGT GAT TTT GTC C 3').

Las muestras fueron amplificadas durante 30 ciclos (1 min a 92°C, 2 min a 55°C y 3 min a 72°C) y se tomó un 25% del DNA para su resolución en gel de agarosa.

## 10. METODOS ELECTROFORETICOS

### 10.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para comprobar la pureza y determinar el peso molecular de la PKC y sus diferentes isoenzimas, se hicieron geles de poliacrilamida al 10% según el método de Laemmli (90).

Tanto el gel de separación de proteínas (running gel) como el gel de



empaquetamiento (stacking gel) se prepararon degaseando el medio cuya composición fue: 10% acrilamida, 0,3% bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,06% persulfato amónico, 0,006% Temed y 0,45 M Tris pH 8,8 (running) ó 0,15 M Tris pH 6,6 (stacking). El medio de la cubeta de electroforesis era un tampón de Tris 25 mM pH 6,8, glicina 0,19 M y SDS 0,1%.

Previamente a su aplicación en los geles, las muestras se cocieron durante 5 minutos a 80°C en el tampón de Laemmli, en proporción (1:5), compuesto por Tris-HCl 63 mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,001% azul de bromofenol, tras lo cual las proteínas quedan totalmente desnaturalizadas.

Los patrones de peso molecular utilizados fueron: albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) y  $\beta$ -lactoalbúmina (14,2 kDa). La estimación de los pesos moleculares se realizó interpolando la recta obtenida al representar el peso molecular de los patrones (ordenadas) frente al logaritmo de su distancia relativa de migración (abscisas).

Los geles se tñeron con una solución de 20% metanol, 10% ácido acético y colorante Coomassie G al 0,1%. Las bandas de proteína se visualizaron al destañir los geles en una solución como la anterior, pero sin el colorante.

Cuando la tinción con Coomassie no fue suficientemente sensible, se utilizó el método descrito por Switzer (149) para la tinción con plata.

## 10.2. ANALISIS DE PROTEINAS POR WESTERN BLOT

El Western blot se basa en el reconocimiento de una proteína por su anticuerpo específico, lo cual permite su identificación.

Una vez desarrollada la electroforesis, el gel se llevó a una cubeta para realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La composición del medio de transferencia fue Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3 y 20% metanol.

Después de un tiempo mínimo de 12 h a 4°C, la nitrocelulosa se mantuvo en una solución de gelatina al 3% en Tris 20 mM pH 7,5 y NaCl 0,5 M (TBS), para saturar los puntos de unión inespecíficos y se lavó con TBS y 0,05% Tween 20 (TTBS). El primer anticuerpo, obtenido de conejo, es específico contra PKC y se utilizó a una dilución (1:200); el segundo (1:2000), antiinmunoglobulina, va acoplado a peroxidasa y se unirá al complejo anterior. Tanto las incubaciones con los anticuerpos como los lavados con TTBS entre ambas se hicieron con agitación constante y a temperatura ambiente.

Para detectar la formación del complejo antígeno-anticuerpo, se desarrolló una reacción coloreada incubando la nitrocelulosa en presencia de una solución de PBS con 3,3'-diaminobenzidina (sustrato) y 0,0004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo hace posible la aparición de color que identifica la posición de la PKC.

### 10.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para comprobar la existencia de DNA se utilizaron geles de agarosa al 1%, que permiten la separación e identificación de los fragmentos en función de su carga y número de kbases.

El medio de electroforesis era un tampón de 0,04 M Tris pH 8,5 y 2 mM EDTA, que llevaba incorporado 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. La composición del gel fue la misma, pero con un 1% de agarosa.

Las muestras de DNA se diluyeron (1:10) con un medio compuesto por 1 mM EDTA pH 8,0, 50% glicerol y 0,25% azul de bromofenol y se calentaron a 65°C durante 5 minutos. Como control se llevó la  $\beta$ -actina. El marcador de peso molecular

fue el fago  $\lambda$  digerido con *Eco* RI, con fragmentos comprendidos entre 23.130 y 125 pares de bases.

El bromuro de etidio permite la visualización de las bandas de DNA por exposición del gel en un transiluminador con luz UV a 312 nM.

## 11. CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE RECEPTORES

Para la caracterización y cuantificación de los receptores se utilizaron ligandos radiactivos. Las células se prepararon en cultivo y fueron mantenidas en el incubador según el procedimiento descrito en el apartado 2. de métodos.

Una vez eliminado el medio DMEM, los pocillos conteniendo los hepatocitos fueron lavados con 2 ml de PBS con 5 mg/ml de BSA e incubados posteriormente con 250  $\mu$ l del mismo medio en presencia de los siguientes compuestos radiactivos: ( $^3$ H)vasopresina, ( $^{125}$ I)GRP, ( $^{125}$ I)angiotensina II, ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP y ( $^{35}$ S)ADP $\beta$ S, según el receptor a identificar. Para descartar las uniones inespecíficas, las células se incubaron además con una concentración  $10^3$  veces superior de ligando no marcado.

Las placas se mantuvieron a 4°C durante 5 min y tras eliminar el medio se lavaron con 6 ml de PBS/pocillo con 2,5 mg/ml de BSA a 4°C para finalizar la reacción. Las células se despegaron de los pocillos con 200  $\mu$ l de NaOH 10 mM y nonidet P-40 al 0,2%. El volumen se transfirió a viales con 2 ml de líquido de centelleo para cuantificar en el contador la radiactividad incorporada.

La unión específica del ligando al receptor se calculó sustrayendo el valor de la unión inespecífica del valor total de radiactividad obtenido sin añadir en las incubaciones el exceso de ligando frío. La cuantificación de la formación del complejo ligando-receptor se realizó mediante la representación de Scatchard.

## 12. DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteína se realizó según el método descrito por Bradford (20), usando albúmina de suero bovino como patrón. Los cambios de absorción a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

## 13. METODOS ESTADISTICOS

Los valores presentados son la media  $\pm$  el error standard de la media (SEM) de los resultados obtenidos en ensayos valorados por duplicado o triplicado de un número variable de experimentos que se especifica en cada caso.

La significación estadística de las diferencias entre distintos valores de determinados experimentos se realizó mediante la t de Student (test paramétrico), el test de Wilcoxon (test no paramétrico) y el test de la U de Mann-Whitney, según se consideren datos entre distintas condiciones o en distintos tipos de células. Todos los test han sido calculados "doble cola" y la significación ha sido considerada a  $P < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1. COMPONENTES IMPLICADOS EN LA REGULACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE CALCIO

La concentración de calcio intracelular determina la activación de un gran número de enzimas implicados en procesos fundamentales para el metabolismo celular y para su comunicación con otras células. Por ello, se ha elegido el hígado como tejido de gran actividad metabólica para analizar las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico producido por diferentes hormonas, así como la procedencia de dicho ion. El estudio de la respuesta tras la estimulación celular se ha llevado a cabo tanto en hepatocitos fetales como adultos, lo cual permite comparar la transducción de señales extracelulares desde un punto de vista morfogénico, así como la regulación de la vía a distintos niveles durante la diferenciación hepática.

#### 1.1. EFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS SOBRE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE $\text{Ca}^{2+}$ EN HEPATOCITOS AISLADOS

Los cambios en la concentración de calcio intracelular tras la adición de diferentes compuestos, se estudiaron en hepatocitos adultos y fetales aislados. Las células fueron previamente incubadas con el indicador fluorescente Fura-2-AM en presencia del detergente iónico plurónico para facilitar su entrada en la célula.

La intensidad de emisión fluorescente es proporcional a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (35). En las variaciones de los niveles de calcio pueden participar los depósitos intracelulares, fundamentalmente el retículo endoplásmico, y canales iónicos y transportadores de la membrana plasmática (11).

Para estudiar la procedencia del calcio que se cuantifica en el citosol, las células se mantuvieron en un medio con y sin calcio extracelular, ya que si ciertos

compuestos produjeran distintos efectos en los dos medios podría deducirse la participación del calcio extracelular como elemento de la vía de señalización.

Los agonistas utilizados fueron fundamentalmente vasopresina, bombesina o GRP (péptido liberador de gastrina), angiotensina II y ATP a concentraciones saturantes previamente establecidas en cada caso. La bombesina es un tetradecapéptido purificado de anfibio y el GRP es un equivalente en mamíferos; ambos compuestos se unen al mismo receptor en hepatocitos produciendo las mismas respuestas, por lo que pueden ser utilizados indistintamente (38,143).

#### 1.1.1. Movilización de $Ca^{2+}$ en presencia de $Ca^{2+}$ extracelular

En presencia de  $CaCl_2$  1 mM en el medio extracelular, todos los compuestos produjeron un aumento transitorio en la concentración de  $Ca^{2+}$  libre, aunque de distinta intensidad según la hormona y el tipo de célula considerado. Como se muestra en la figura 1, tanto en hepatocitos adultos como fetales la máxima respuesta se produjo con ATP o con angiotensina, con aumentos de calcio entre 400 y 700 nM sobre niveles basales. La vasopresina fue la tercera en importancia en el caso de los adultos (500 nM de aumento neto), mientras que en los fetales lo fue la bombesina o GRP indistintamente (300 nM).

Después de un rápido aumento en la fluorescencia en una primera fase, ésta se mantiene aproximadamente 1 minuto y va disminuyendo progresivamente hasta recuperar los niveles basales debido a una salida de  $Ca^{2+}$  a través de canales de membrana, proceso bastante bien caracterizado (48).

Cuando la señal de fluorescencia queda estabilizada después de la adición de vasopresina o bombesina, la célula es capaz de responder a otro ligando liberando de nuevo calcio (figura 2). Este efecto es menor si el primer ligando fue ATP o angiotensina. La diferencia podría deberse a que en el primer caso todavía queda reservorio de calcio intracelular, mientras que en el segundo (angiotensina, ATP), la

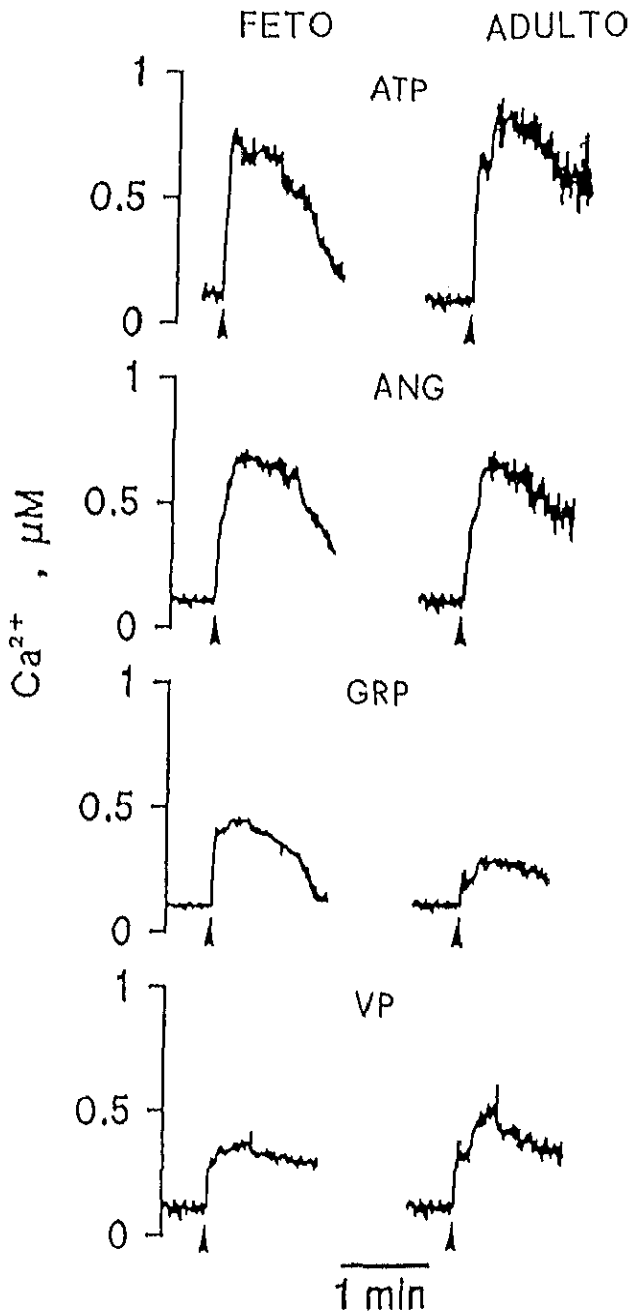


FIGURA 1. MOVILIZACION DE  $\text{Ca}^{2+}$  POR HORMONAS EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Las células ( $1 \times 10^6$ ) se incubaron con Fura-2AM ( $5 \mu\text{M}$ ) y plurónico F-127 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) en medio PBS y tras sucesivos lavados con el mismo medio y  $1 \text{ mg/ml}$  de BSA se mantuvieron en una cubeta espectrofluorimétrica termostatzada a  $37^\circ\text{C}$ , previa a la adición de los ligandos y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mM}$ . A los tiempos indicados (flechas), los hepatocitos fueron estimulados con VP ( $50 \text{ nM}$ ), GRP ( $50 \text{ nM}$ ), ANG ( $50 \text{ nM}$ ) o ATP ( $50 \mu\text{M}$ ). Los resultados corresponden a un experimento representativo de seis realizados y el análisis estadístico del incremento máximo de  $\text{Ca}^{2+}$  se refleja en la tabla 1.



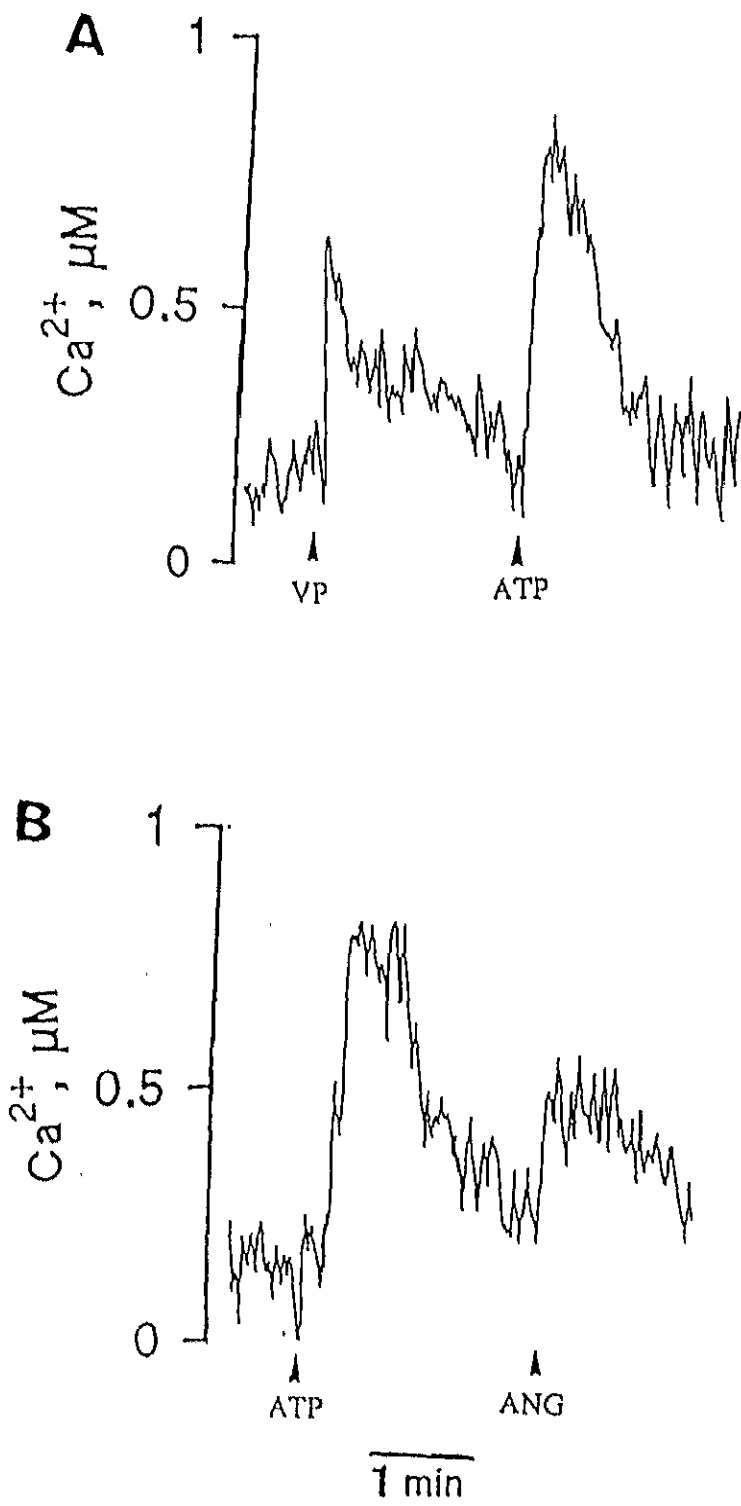


FIGURA 2. MOVILIZACION SECUENCIAL DE  $Ca^{2+}$  POR HORMONAS EN HEPATOCITOS FETALES. Las células se incubaron como se indica en la figura 1. A los tiempos indicados (flechas), los hepatocitos fueron estimulados con VP (50 nM) y ATP (50  $\mu M$ ) (A) o ATP (50  $\mu M$ ) y ANG (50 nM) (B). Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres realizados.

deplección inicial es mayor y los depósitos no habrían recuperado los niveles de calcio necesarios para producir otra liberación tan intensa.

### 1.1.2. Movilización de $\text{Ca}^{2+}$ en ausencia de $\text{Ca}^{2+}$ extracelular

Si las adiciones de los ligandos se efectúan en ausencia de calcio extracelular como muestra la figura 3, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es menor en intensidad y duración. Estos efectos podrían ser debidos en parte, a una salida de calcio de la célula que no sería contrarrestada por una entrada desde el exterior.

El mecanismo más probable apunta a una entrada de calcio en la célula proporcional al vaciamiento de los depósitos intracelulares. Cuando existe calcio fuera, el aumento de calcio citosólico es mayor. En caso contrario, la fuente de calcio extracelular no puede contribuir a la intensidad de la señal, que sólo se debería a una movilización de calcio del retículo endoplásmico. En cualquier caso, se pone de manifiesto la participación del calcio extracelular en el aumento de calcio citosólico.

## 1.2. EFECTO DE LOS ESTERES DE FORBOL SOBRE LA MOVILIZACION DE $\text{Ca}^{2+}$

Como respuesta a diversos agonistas, se produce la activación de enzimas que modulan la vía de transducción de la señal actuando a distintos niveles de la misma por fosforilación de sustrato. Una de las quinasas implicadas es la proteína quinasa C, receptor biológico de los ésteres de forbol (30,36,135). Con el fin de ver si la proteína quinasa C participa en la vía de señalización del calcio, los hepatocitos (preincubados con Fura como en el apartado anterior) se incubaron con 100 ng/ml de forbol dibutirato (PDBu) durante 10 minutos previa a la adición de los ligandos en presencia de calcio extracelular 1 mM.

En las condiciones indicadas y según muestra la tabla 1, la respuesta de los ligandos se vio drásticamente disminuida en todos los casos cuando las células fueron

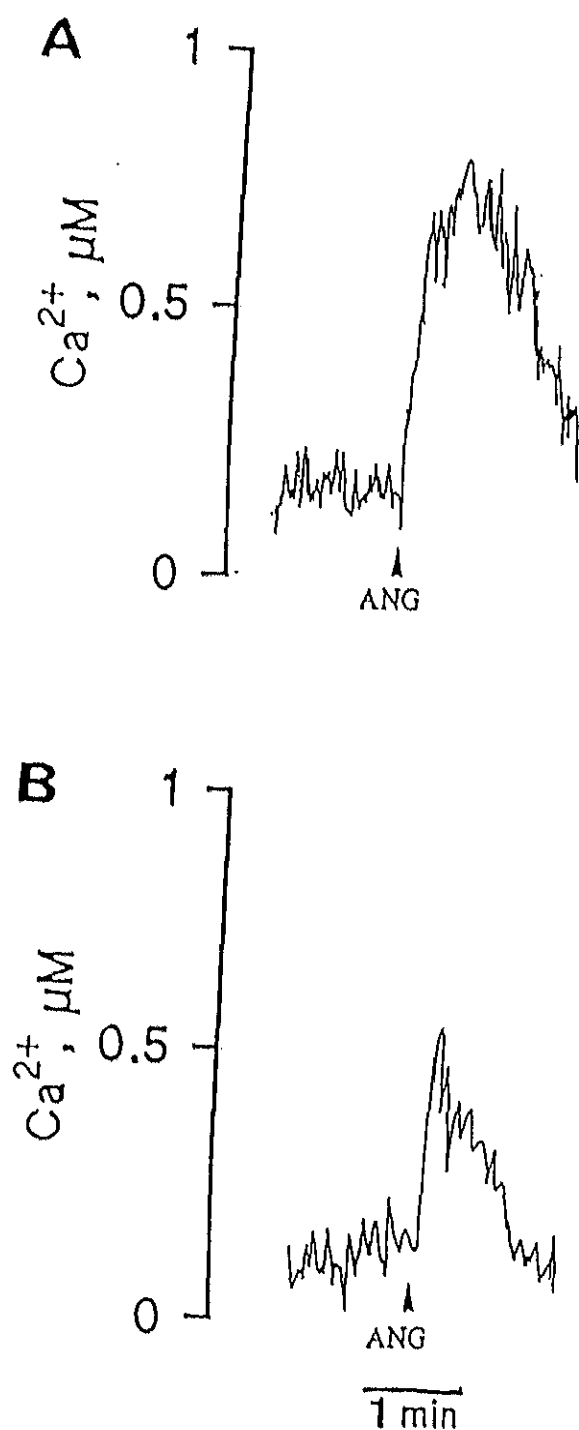


FIGURA 3. EFECTO DEL  $\text{Ca}^{2+}$  EXTRACELULAR SOBRE LA MOVILIZACION DE  $\text{Ca}^{2+}$  EN HEPATOCITOS FETALES. Las células se procesaron como se indica en la figura 1. A los tiempos indicados (flechas), los hepatocitos fueron estimulados con ANG (50 nM) en presencia (A) y ausencia (B) de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular el medio contenía EGTA 200  $\mu\text{M}$  (pH 7,4). Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres realizados.

Ligando	PDBu	Ca <sup>2+</sup> (nM)	
		Fetal	Adulto
Ninguno	-	187 ± 20	165 ± 19
	+	199 ± 27	201 ± 28
Vasopresina 50 nM	-	427 ± 26 <sup>a,b</sup>	657 ± 27 <sup>a,b</sup>
	+	230 ± 39	225 ± 38
GRP 50 nM	-	492 ± 27 <sup>a,b</sup>	317 ± 22 <sup>a,b</sup>
	+	190 ± 28	201 ± 27
Angiotensina 50 nM	-	671 ± 28 <sup>a</sup>	715 ± 34 <sup>a</sup>
	+	305 ± 54	342 ± 44
ATP 50 μM	-	773 ± 33 <sup>a,b</sup>	854 ± 39 <sup>a,b</sup>
	+	367 ± 71	457 ± 63

TABLA 1. EFECTO DE HORMONAS Y ESTERES DE FORBOL SOBRE LA MOVILIZACION DE Ca<sup>2+</sup> EN HEPATOCITOS AISLADOS FETALES Y ADULTOS. Las células (2x10<sup>6</sup>) preincubadas con Fura-2AM se incubaron en PBS con PDBu (100 ng/ml) a 37°C durante 10 minutos. Tras tres lavados con PBS y 5 mg/ml de BSA se estimularon con VP, GRP, ANG o ATP. Paralelamente, células tratadas en las mismas condiciones, pero sin estimulación previa con el forbol, también fueron estimuladas con las citadas hormonas. La concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> se registró durante cinco minutos por métodos espectrofluorimétricos como se detalla en la sección 3.1.2. de métodos. Los resultados son la media ± SEM de tres o seis experimentos en células preincubadas con o sin PDBu, respectivamente.

<sup>a</sup>P < 0,05, adición de hormona vs no.

<sup>b</sup>P < 0,05, fetal vs adulto en cada condición.

preincubadas con ésteres de forbol. Este comportamiento en hepatocitos presenta las mismas características que lo observado por otros grupos en células de músculo liso (32,145).

Los valores de calcio intracelular basales (sin estimulación posterior con hormonas) y tras incubación con ésteres de forbol no presentan diferencias significativas. Asimismo, la concentración intracelular de calcio en células preincubadas con PDBu y estimuladas después con vasopresina o GRP, se mantuvo en el mismo rango que los valores control (células no estimuladas), alrededor de 200 nM.

Tanto en hepatocitos adultos como fetales preincubados con PDBu, angiotensina y ATP producen un ligero aumento de calcio respecto a las basales, 100 nM, pero éste es cuatro o cinco veces menor que en células sin incubación previa con el forbol, donde se alcanzan incrementos netos de hasta 600 nM.

A la vista de estos resultados puede deducirse un papel de control negativo de los ésteres de forbol en el aumento de calcio intracelular tras la estimulación hormonal. Este hecho estaría mediado por la activación de la proteína quinasa C. El mecanismo de este control negativo podría situarse a nivel del receptor, por desensibilización o por su desacoplamiento con las proteínas G a las que puede estar asociado (135).

### 1.3. LOCALIZACION Y CUANTIFICACION DE LAS ETAPAS QUE CONTROLAN LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE $Ca^{2+}$ LIBRE

Con el fin de tener una aproximación relativa a la capacidad de las hormonas para aumentar el calcio citosólico, las células fueron estimuladas con tres compuestos que actúan en diferentes niveles del sistema de transducción de señales extracelulares. El estudio se realizó con mastoparén, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol e hidroquinona, en presencia de  $CaCl_2$  1 mM.

El mastoparén es un tetradecapéptido aislado de veneno avispa que posee acciones mitogénicas. Los efectos del mastoparén sobre la hidrólisis de fosfatidilinositoles y la movilización de calcio de reservorios intracelulares no implica la unión a receptores específicos de la membrana plasmática (158). Su mecanismo es por acción directa sobre proteínas G estimulando la unión e hidrólisis de GTP de modo similar a lo que sucede en la formación del complejo ligando-receptor. Muchos de los efectos moleculares y celulares del mastoparén pueden bloquearse por la toxina pertúsica (inactiva  $G_i$  y  $G_o$ ) (66,67).

El siguiente paso en el proceso de transducción de señales después de proteínas G es el efector. Para actuar sobre la vía a este nivel se utilizó la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), procedente de *Bacillus cereus*, para estimular las células (97).

La 2,5-di(t-butil)-1,4-benzohidroquinona es un inhibidor específico de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico, con lo cual queda bloqueada la recaptación de calcio. Sin embargo, y según demuestra el grupo de Orrenius, no se ven afectados los flujos de calcio de la mitocondria o la ATPasa de la membrana plasmática (78,109).

La respuesta de las células a estos tres compuestos fue sostenida en el tiempo y de igual o mayor intensidad que la presentada por cualquiera de los ligandos anteriores como se muestra en la figura 4. En todos los casos se produce un aumento de  $Ca^{2+}$  rápido hasta niveles de 800 nM (hidroquinona y PI-PLC) en hepatocitos adultos y fetales, manteniéndose sin variación alguna por periodos de tiempo registrados hasta cinco minutos, a diferencia de los ligandos que actúan vía receptor, ya que éstos estimulan una salida de calcio de la célula. El mastoparén produce una elevación de  $Ca^{2+}$  algo menor, de acuerdo con lo observado por el grupo de García-Sáinz (52).

Estabilizada la señal de fluorescencia por mastoparén, PI-PLC o hidroquinona,

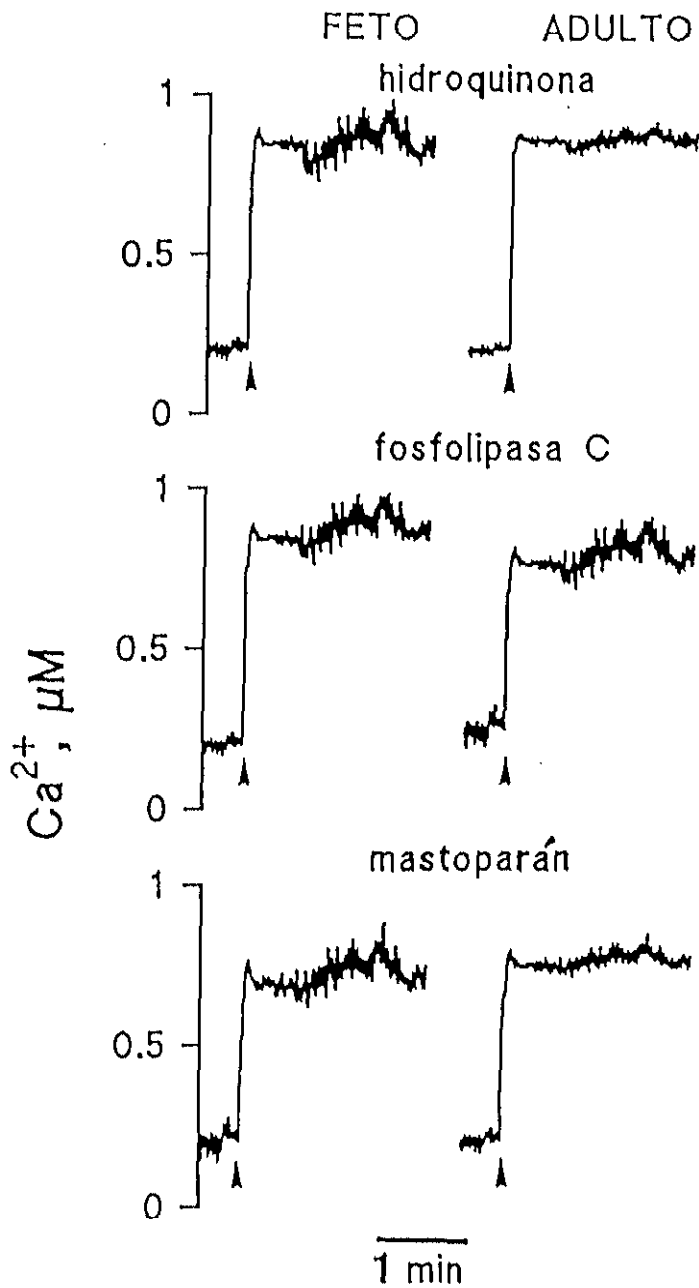


FIGURA 4. MOVILIZACION DE  $\text{Ca}^{2+}$  POR SUSTANCIAS QUE AFECTAN LA RESPUESTA CELULAR EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Las células se procesaron como se indica en la figura 1. A los tiempos indicados (flechas), las células fueron estimuladas con hidroquinona ( $20 \mu\text{M}$ ), PLC de fosfatidilinositol ( $0,5 \text{ U}$ ) o mastoparán ( $50 \mu\text{M}$ ). Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres realizados con distintas preparaciones de células.

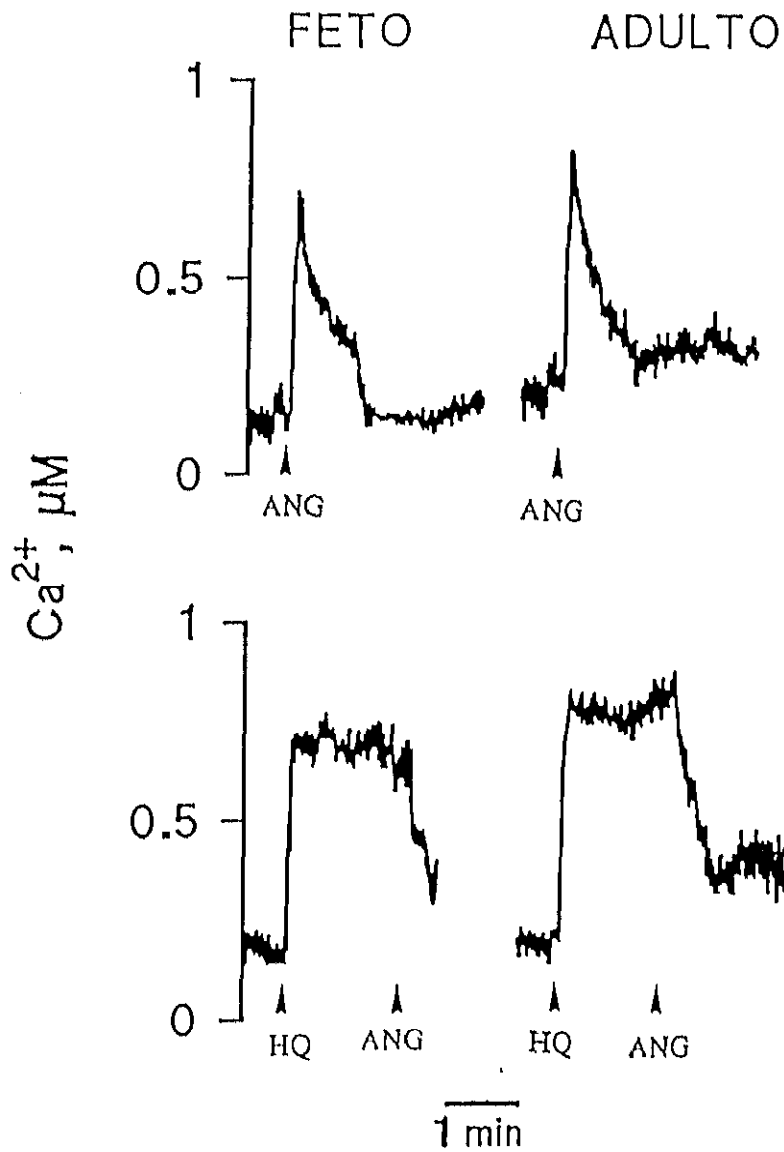


FIGURA 5. MOVILIZACION DE  $\text{Ca}^{2+}$  POR ADICION SUCESIVA DE LIGANDOS EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Las células se procesaron como se indica en la figura 1. A los tiempos indicados (flechas), las células se estimularon con ANG (50 nM) o HQ (20  $\mu\text{M}$ ) previa a la adición de ANG. Los experimentos son representativos de tres realizados con distintas preparaciones de células.



las células se estimularon de nuevo con vasopresina, bombesina, angiotensina o ATP. Un ejemplo representativo de cualquiera de los casos se muestra en la figura 5 donde se compara el efecto de una hormona, angiotensina, con el producido previa estimulación con hidroquinona.

Como se ha visto anteriormente, y coincidiendo con lo descrito en hepatocitos adultos por Kass y cols. (78), el aumento de  $Ca^{2+}$  por angiotensina es rápido y transitorio, pero en células previamente estimuladas con hidroquinona y tras alcanzar niveles máximos en la concentración de calcio intracelular, la angiotensina produjo una disminución drástica de la señal. La caída de la fluorescencia podría corresponder a una apertura de los canales de la membrana permitiendo la salida de calcio de la célula.

#### 1.4. LIBERACION DE CALCIO DE RETICULO ENDOPLASMICO POR $IP_3$

El calcio procedente de orgánulos intracelulares, fundamentalmente no mitocondriales, constituye una fuente importante en el aumento de calcio citosólico tras estimulación celular (10). La apertura de canales de calcio del retículo endoplásmico se produce por la unión de  $IP_3$  a los receptores específicos que éste posee (11,156).

Algunas de las diferencias entre hepatocitos adultos y fetales relativas al efecto de ciertas hormonas podría deberse a una diferencia cuantitativa en el número de receptores para  $IP_3$  o en el contenido de calcio del retículo endoplásmico. Con el fin de estudiar este hecho se utilizaron preparaciones microsomales de ambos tipos celulares obtenidas mediante centrifugaciones diferenciales según se describe en el apartado 3.2.1. de métodos.

El calcio contenido en el retículo endoplásmico fue cuantificado por el aumento de fluorescencia que presentaron las muestras en presencia de Fura-2  $1 \mu M$ , pero sin calcio en el medio. La hidrofobicidad de este compuesto fluorescente impide que

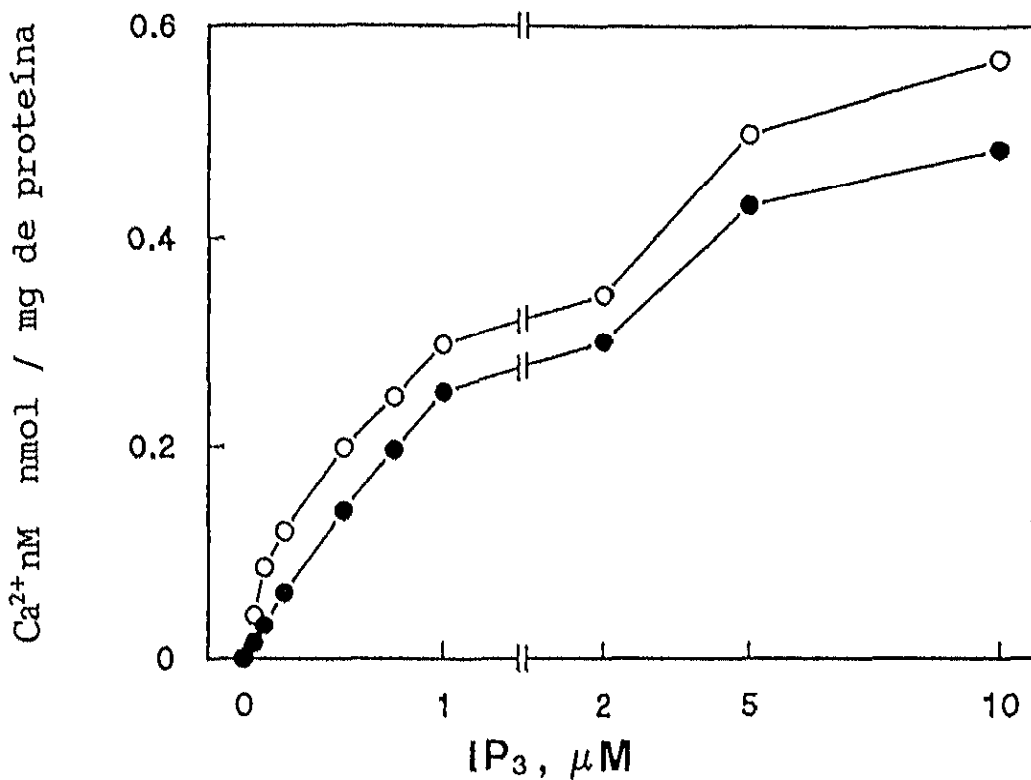


FIGURA 6. MOVILIZACION DE Ca<sup>2+</sup> EN PREPARACIONES MICROSOMALES DE HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. La fracción microsomal se preparó por centrifugación diferencial según se detalla en la sección 3.2.1. de métodos y se ensayó a una concentración de proteína de 1 μg/ml en hepatocitos fetales (●) y adultos (○). Los resultados son la media de dos preparaciones microsomales distintas.

atraviase la membrana del retículo endoplásmico (35), por tanto, sólo se verá un aumento en la señal cuando salga calcio del retículo.

En la figura 6 se observa la cinética de liberación de calcio de los microsomas por adición de cantidades sucesivas de  $IP_3$  hasta la saturación de los receptores del retículo endoplásmico. A igualdad de proteína, la cantidad de calcio liberada fue la misma para el caso de los hepatocitos fetales y adultos, alcanzándose valores de 0,5 nmol/mg de proteína.

La liberación de calcio obedece a una cinética de primer orden. La  $K_m$  fue 1  $\mu M$  en los dos tipos de células. A concentraciones de  $IP_3$  de 5  $\mu M$  el sistema queda prácticamente saturado, quedando estabilizada la respuesta a 10  $\mu M$ . Estos datos muestran un comportamiento idéntico en hepatocitos fetales y adultos relativo al número y características de los receptores de  $IP_3$  del retículo endoplásmico.

## 2. GENERACION DE INOSITOL 1,4,5-TRISFOSFATO A PARTIR DE FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO

El  $IP_3$  generado a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato constituye una señal temprana en la cascada de acontecimientos que tienen lugar desde la unión de un ligando a su receptor (147). La cuantificación de este metabolito tras la estimulación celular da información sobre la vía de transducción utilizada por diferentes compuestos.

Para la determinación de  $IP_3$  las células fueron preincubadas con LiCl durante 10 minutos previos a la estimulación para prevenir la acción de las inositol fosfato o inositol bisfosfato fosfatasas (11). Las células fueron incubadas con los ligandos a saturación a tiempos muy cortos, entre 30 y 90 segundos debido a la gran rapidez en la generación y la desaparición de  $IP_3$  por la acción enzimática de quinasas y fosfatasas (25); de hecho a los 30 segundos ya se consiguió el máximo efecto.

La valoración de  $IP_3$  en las muestras se basó en el desplazamiento de  $(^3H)IP_3$  unido específicamente a su receptor como queda detallado en la sección 4. de métodos. Cuanto menor valor de radiactividad se obtenga, mayor habrá sido la generación de  $IP_3$  en la muestra y mayor por ello el  $(^3H)IP_3$  desplazado del sistema.

Todos los compuestos utilizados, excepto la hidroquinona, produjeron un aumento en los niveles de  $IP_3$ , como se observa en la tabla 2. Con la hidroquinona, de acuerdo con su mecanismo de acción exclusivamente a nivel del retículo endoplásmico, no se vieron variaciones significativas respecto a valores basales: entre 2 y 3 nmol  $IP_3$ /mg de proteína.

El mayor incremento en los dos tipos de células se observó en presencia de mastoparín, con el que se alcanzaron valores de 18 nmol/mg proteína, siete veces superiores a muestras control. Algo menor, pero el siguiente en magnitud, fue el efecto de la PI-PLC en ambos casos.

Una diferencia importante entre hepatocitos adultos y fetales y de acuerdo con el aumento en la concentración de calcio intracelular, se manifestó con la vasopresina y el GRP o la bombesina. La primera, en hepatocitos adultos, genera niveles de  $IP_3$  próximos a los observados en células tratadas con PLC, mientras que con bombesina quedan prácticamente en los niveles basales. El caso contrario se observa en los hepatocitos fetales con un valor de  $IP_3$  mayor con bombesina que con vasopresina, aunque esta última también produce una respuesta significativa.

Respecto a angiotensina y ATP, en ambos tipos de células hepáticas se superan los niveles del control al menos cuatro veces, aunque sin alcanzar los valores del mastoparín o PI-PLC, que actúan sobre eventos distales respecto al receptor de membrana. El hecho de que estos compuestos produzcan el mismo aumento en la concentración intracelular de calcio pero que existan diferencias significativas en la producción de  $IP_3$ , puede interpretarse como una saturación en la liberación de calcio del retículo endoplásmico con los niveles de  $IP_3$  alcanzados por angiotensina o ATP

Ligando	IP <sub>3</sub> (nmol/mg proteína)	
	Fetal	Adulto
Ninguno	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Vasopresina 50 nM	6,7 ± 1,1 <sup>a,b</sup>	10,9 ± 2,0 <sup>a,b</sup>
GRP 50 nM	10,5 ± 1,8 <sup>a,b</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>b,c</sup>
Angiotensina 50 nM	12,8 ± 1,9 <sup>a,b</sup>	7,8 ± 1,0 <sup>a,b</sup>
ATP 50 μM	11,2 ± 2,6 <sup>a</sup>	8,5 ± 1,3 <sup>a</sup>
PI-PLC 0,5 U	14,7 ± 2,4 <sup>a</sup>	10,2 ± 1,8 <sup>a</sup>
Mastoparán 50 μM	18,8 ± 2,3 <sup>a</sup>	18,3 ± 2,3 <sup>a</sup>
Hidroquinona 20 μM	3,4 ± 0,5	2,4 ± 0,4

TABLA 2. EFECTO DE DISTINTAS SUSTANCIAS SOBRE LA PRODUCCION DE IP<sub>3</sub> EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Las células (2x10<sup>5</sup>), preincubadas con LiCl durante 10 minutos, se incubaron en medio PBS con las sustancias indicadas durante 30 segundos, tras lo cual se añadió HClO<sub>4</sub> a 4°C para finalizar la reacción. Las muestras se centrifugaron y se tomó la fase soluble para la determinación de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), mediante un ensayo de competencia con (<sup>3</sup>H)IP<sub>3</sub> por un número limitado de sitios de unión como se detalla en la sección 4. de métodos. Los resultados son la media ± SEM de tres experimentos ensayados por duplicado o triplicado.

<sup>a</sup>P < 0,01, adición de sustancia vs no.

<sup>b</sup>P < 0,05, fetal vs adulto en cada condición.

<sup>c</sup>P < 0,05, adición de sustancia vs no.

del orden de 10  $\mu$ M.

A la vista de esta generación de  $IP_3$ , podría implicarse a la vía de los inositoles en la transmisión de señales extracelulares con los compuestos utilizados. Estos resultados también están de acuerdo con que el aumento de calcio citosólico procede mayoritariamente de la liberación del retículo endoplásmico, en relación directa con el  $IP_3$  producido.

### 3. GENERACION DE GLICEROLIPIDOS Y METABOLITOS DERIVADOS

Con objeto de analizar uno de los pasos principales en la vía de transmisión de señales extracelulares se estudiaron diversos glicerolípidos y otras moléculas derivadas del glicerol, generadas en respuesta a distintos estímulos hormonales.

#### 3.1. PRODUCCION DE *sn*-1,2-DAG A TIEMPOS CORTOS

A través de los compuestos que utilizan la vía de la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) se generan  $IP_3$  y DAG, ambos procedentes de la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (9). El DAG detectado a tiempos cortos, en los dos primeros minutos después del estímulo, debe ser proporcional al  $IP_3$ , ya que ambos proceden de la misma molécula. Pequeñas diferencias entre ambos pueden ser debidas a la presencia de otro DAG residual de la membrana plasmática o del retículo endoplásmico (3,43).

Las células se incubaron durante 90 segundos con los ligandos a saturación y el DAG de la muestra extraído en fase clorofórmica se valoró con la diacilglicerol quinasa específica de *sn*-1,2-DAG, que incorpora ( $^{32}P$ ) $P_i$  del ( $\gamma$ - $^{32}P$ )ATP en el DAG (160).

Para determinar la cantidad de DAG presente en los extractos se ensayaron

Ligando	1,2-DAG (nmol/mg proteína)	
	Fetal	Adulto
Ninguno	5,1 ± 0,7	4,3 ± 0,5
Vasopresina 50 nM	10,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,9 ± 1,2 <sup>a</sup>
GRP 50 nM	11,7 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	7,5 ± 1,1 <sup>b,c</sup>
Angiotensina 50 nM	9,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	10,6 ± 1,9 <sup>a</sup>
ATP 50 μM	11,2 ± 1,9 <sup>a</sup>	13,1 ± 2,3 <sup>a</sup>
PI-PLC 0,5 U	14,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	16,3 ± 2,5 <sup>a</sup>
Mastoparín 50 μM	8,4 ± 1,2 <sup>c</sup>	12,0 ± 2,2 <sup>a</sup>
Hidroquinona 20 μM	6,9 ± 1,4	5,9 ± 0,7

TABLA 3. EFECTO DE DISTINTAS SUSTANCIAS SOBRE LA PRODUCCION DE *sn*-1,2-DAG EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Las células ( $1 \times 10^6$ ) se incubaron en medio PBS durante 90 segundos con las sustancias indicadas, tras lo cual se añadió un volumen de cloroformo:metanol (95:5) para finalizar la reacción. Las muestras se centrifugaron y el contenido de *sn*-1,2-DAG solubilizado en la fase orgánica se determinó mediante el enzima diacilglicerol quinasa como se detalla en la sección 7.1. de métodos. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos.

<sup>a</sup>P < 0,01, adición de sustancia vs no.

<sup>b</sup>P < 0,05, fetal vs adulto en cada condición.

<sup>c</sup>P < 0,05, adición de sustancia vs no.

distintas concentraciones conocidas de didecanoilglicerol puro para construir una curva patrón y calcular los valores correspondientes a cada muestra.

En la tabla 3 se muestran los datos de *sn*-1,2-DAG donde se observa que de todos los compuestos utilizados, sólo la hidroquinona dio un valor próximo al control, alrededor de 5 nmol/mg de proteína. En los demás casos se aprecian diferencias claras respecto al valor basal y hasta tres veces superiores con la PI-PLC y ATP en ambos tipos de hepatocitos.

Con vasopresina, angiotensina y mastoparín también se detecta producción de DAG superior a los valores basales, pero cuantitativamente no hay diferencias muy acusadas entre células adultas y fetales. El GRP, en hepatocitos fetales, es de los ligandos que mayor cantidad de DAG produce, mientras que en los adultos su efecto es mucho menor.

Los resultados conjuntos de DAG e IP<sub>3</sub> podrían apuntar a una utilización de la vía de los fosfatidilinosítoles a través de la PI-PLC en todos los compuestos estudiados, exceptuando la hidroquinona, que una vez más, confirma su acción exclusivamente a nivel del retículo endoplásmico.

### 3.2. PRODUCCION DE DIACILGLICEROL A TIEMPOS LARGOS

Para estudiar la posible generación de DAG a partir de glicerolípidos diferentes de los fosfatidilinosítoles, se estudió el DAG producido a tiempos largos, entre 2 y 90 minutos. El DAG puede proceder de la hidrólisis de la fosfatidilcolina, fosfolípido muy abundante de la membrana plasmática, por la acción de dos fosfolipasas: la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) que produce fosfocolina y DAG directamente, mientras que la fosfolipasa D (PLD) da lugar a colina y ácido fosfatídico, el cual es fosforilado por la fosfatidato fosfohidrolasa generando también DAG (49,133).



El estudio de la producción de DAG se realizó en hepatocitos fetales en cultivo incubados con ( $^{14}\text{C}$ )glicerol y ( $^3\text{H}$ )colina y estimulados a distintos tiempos con vasopresina, bombesina, angiotensina y ATP. Los glicerolípidos se extrajeron con  $\text{Cl}_3\text{CH}$  tras sucesivos lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  y metanol, como se detalla en la sección 7.2. de métodos. Las muestras se aplicaron en una placa de silicagel para su separación y análisis por cromatografía en capa fina (TLC).

Tomando como referencia la posición del DAG patrón en la placa revelada con vapores de yodo, que se fija temporalmente a los lípidos, pudieron visualizarse las manchas de las muestras. Asimismo, se valoraron la formación de fosfatidilcolina y de DAG considerando la radiactividad de las placas en aquellas posiciones donde coincidieran  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  o sólo  $^{14}\text{C}$ , respectivamente.

La posición de la fosfatidilcolina, deducida por valores de radiactividad, se vio retrasada respecto al DAG, pero con los datos obtenidos no pudieron apreciarse diferencias entre las distintas condiciones, por lo cual la fosfatidilcolina fue valorada por otros procedimientos.

Visualizado por las manchas de yodo, el  $R_f$  del dioctanoilglicerol patrón en las condiciones de la cromatografía descritas fue 0,60. Así, para valorar el conjunto de los diacilgliceroles de las muestras se consideraron las áreas comprendidas entre 0,50 y 0,75 de  $R_f$ , donde además se detectan los incrementos de radiactividad, como se ve en la figura 7.

Las manchas más intensas de DAG correspondieron a la vasopresina entre 2 y 30 minutos y a la bombesina hasta los 90 minutos. Con angiotensina y ATP se vieron menores efectos.

Para obtener una relación cuantitativa del diacilglicerol producido en cada condición respecto al control (figura 8A) y de su evolución a través del tiempo (figura 8B), se midió la radiactividad del  $^{14}\text{C}$  en las áreas correspondientes a dicho

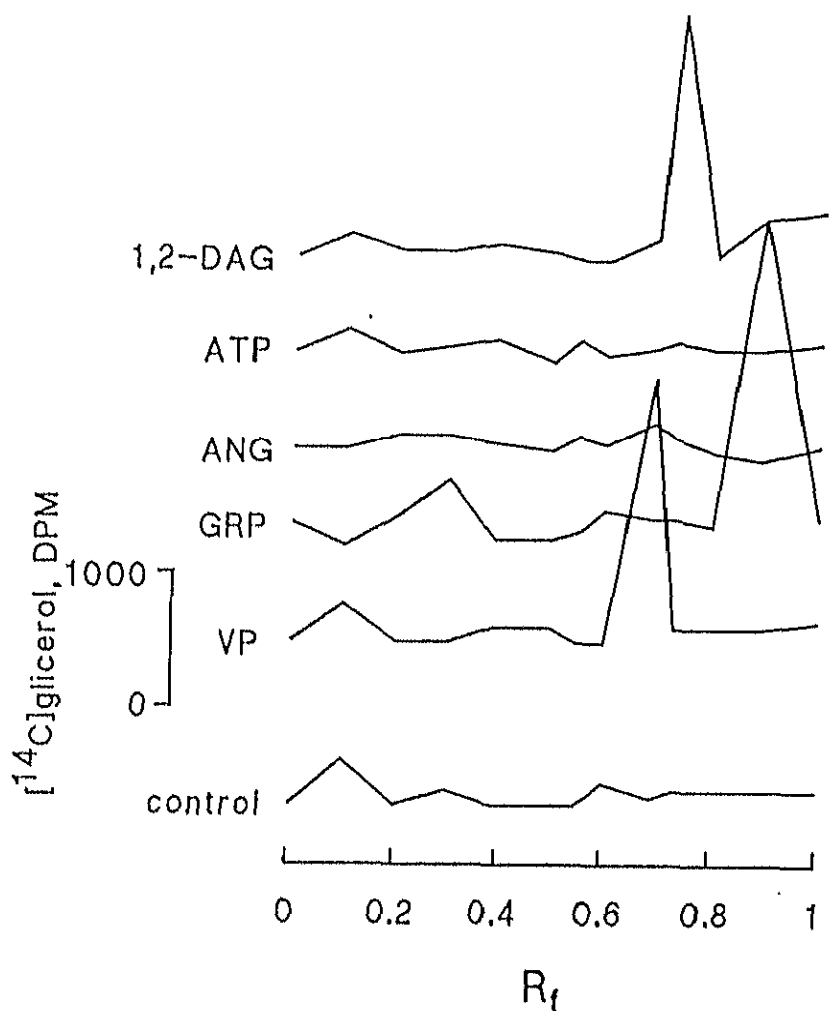


FIGURA 7. EFECTO DE HORMONAS EN LA PRODUCCION DE DIACILGLICEROL EN HEPATOCITOS FETALES A TIEMPOS CORTOS. Las células en cultivo ( $0,5 \times 10^6$ ) se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con  $(^{14}\text{C})$ glicerol y  $(^3\text{H})$ colina ( $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ ) en medio DMEM durante 2 horas. Tras sucesivos lavados con DMEM se incubaron con VP ( $50 \text{ nM}$ ), GRP ( $50 \text{ nM}$ ), ANG ( $50 \text{ nM}$ ) o ATP ( $50 \mu\text{M}$ ). Las muestras se recogieron a los 2 minutos como se detalla en la sección 7.2. de métodos. La extracción de los glicerolípidos de las células se realizó con cloroformo y las muestras se resolvieron por cromatografía en capa fina (TLC). Las placas se cortaron en tiras en las que se determinó el  $R_f$  y la radiactividad correspondiente al  $^{14}\text{C}$ . Los resultados representan un experimento de dos realizados con las muestras procesadas por duplicado.

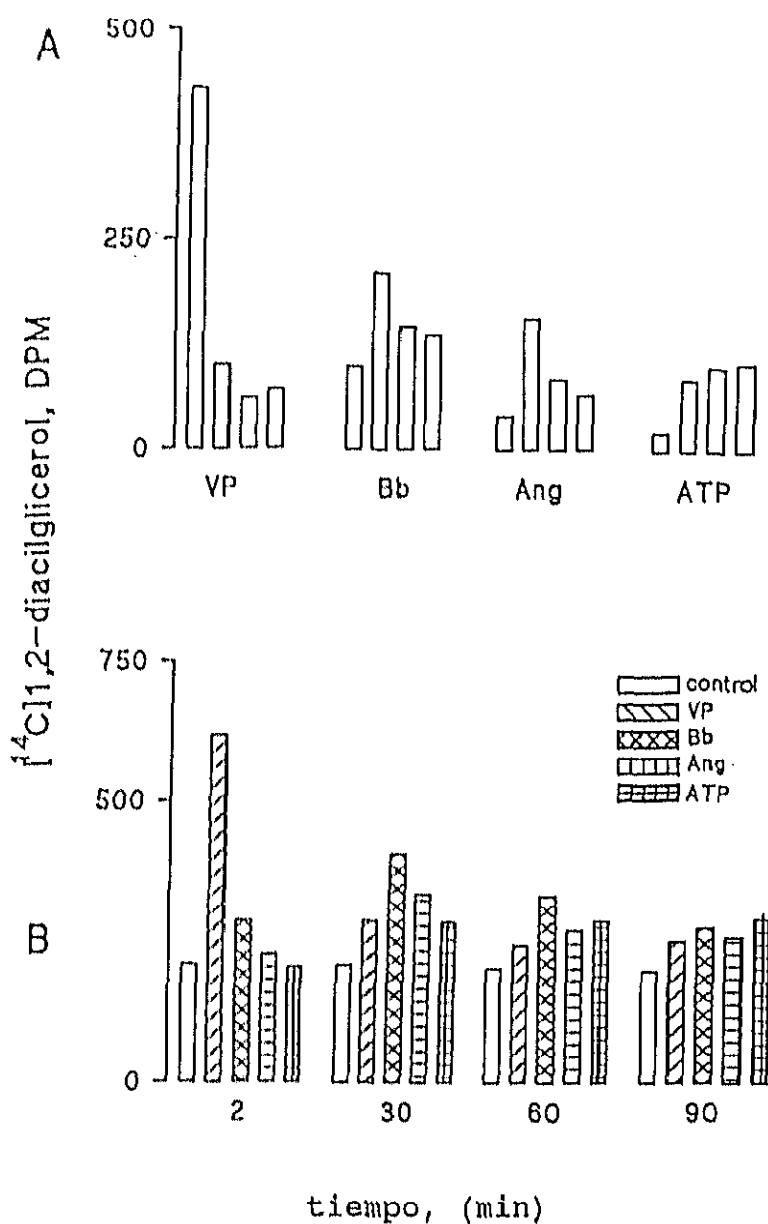


FIGURA 8. EFECTO DE HORMONAS SOBRE LA FORMACION DE DIACILGLICEROL EN HEPATOCITOS FETALES A TIEMPOS LARGOS. Las células se procesaron como se detalla en la figura 7. Las muestras se recogieron a tiempos 0, 2, 30, 60 y 90 minutos y se resolvieron por TLC. Los resultados de las figuras corresponden al área comprendida entre 0,50 y 0,75 de  $R_f$ . Los valores de radiactividad se han calculado como incrementos netos respecto al control (células sin estimular) y quedan representados en función de la hormona considerada (A) o del tiempo de incubación en cada condición (B).

glicerolípido, ya que el glicerol va marcado con este isótopo.

La vasopresina fue la hormona con mayor efecto en los dos primeros minutos, con un aumento del DAG tres veces superior al control. A partir de los 30 minutos ya se vieron pocas diferencias. También destaca la acción de la bombesina durante todo el proceso, ya que sus efectos son más retardados y sostenidos, produciéndose el mayor incremento a los 30 minutos pero manteniendo diferencias significativas hasta los 90 minutos.

El perfil de la producción de DAG en células estimuladas con angiotensina fue parecida a la bombesina, pero cuantitativamente menor. El ATP prácticamente no tuvo efecto en los primeros minutos, pero desde los 30 minutos los niveles de DAG se mantuvieron hasta el final de la incubación.

### 3.3. FORMACION DE FOSFATIDILCOLINA Y METABOLITOS DERIVADOS

La detección de metabolitos derivados de colina (fosfatidilcolina, fosfocolina y colina) sintetizados en la célula puede relacionarse con la participación de distintas fosfolipasas en la transmisión de señales extracelulares, como se describe en el apartado anterior. La detección de altos niveles de colina en las muestras apuntaría a una participación de la PLD.

Según queda descrito en el apartado 7.3. de métodos, la fosfatidilcolina, fosfocolina y colina se determinaron en hepatocitos fetales incubados con ( $^3\text{H}$ )colina y recogidos sobre fase metanólica, en la cual son muy solubles todas aquellas moléculas que contengan colina.

Las muestras se aplicaron en columnas de Dowex-50W, que permiten una separación de los compuestos en función del pH del medio utilizado para su elución. La fosfatidilcolina no quedará unida a la columna ya que la parte lipofílica del DAG (ácidos grasos) no interacciona con el gel equilibrado con agua, pero sí lo harán la

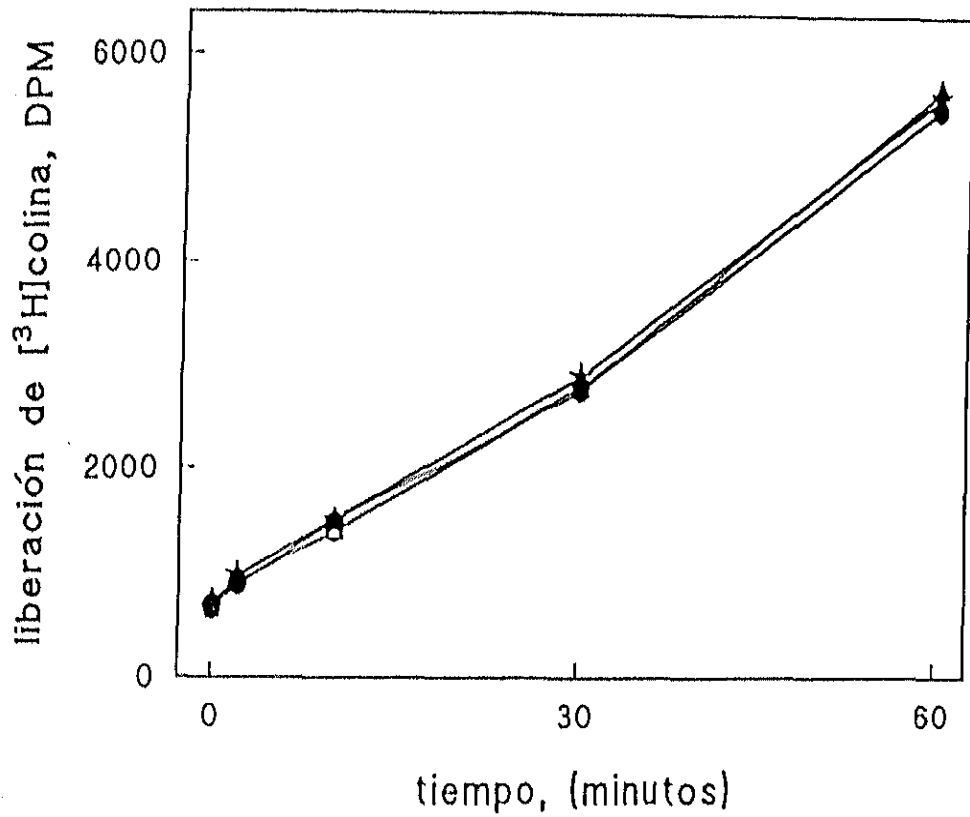


FIGURA 9. LIBERACION DE COLINA AL MEDIO EN HEPATOCITOS FETALES. Las células en cultivo ( $0,5 \times 10^6$ ), fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con  $(^3\text{H})$ colina ( $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ ) en medio DMEM durante 2 horas. Tras eliminar el medio, se incubaron con VP ( $50 \text{ nM}$ ) (●), Bombesina ( $50 \text{ nM}$ ) (▲), ANG ( $50 \text{ nM}$ ) (○) y ATP ( $50 \mu\text{M}$ ) (★). A los tiempos establecidos se cuantificó la radiactividad del sobrenadante. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM de dos experimentos distintos.

fosfocolina y la colina. Estos metabolitos, mucho más hidrofílicos que el anterior, quedarán retenidos; la fosfocolina eluirá con agua y la colina lo hará con HCl (37).

Los hepatocitos fetales fueron estimulados durante 2, 10, 30 y 60 minutos en presencia de vasopresina, bombesina, angiotensina y ATP para comparar los niveles de fosfatidilcolina, fosfocolina o colina generados en cada caso. A los tiempos citados se transfirió el medio DMEM a viales con líquido de centelleo, cuya radiactividad permite cuantificar la liberación de colina al medio. La figura 9 representa la liberación de colina, donde no se aprecian diferencias con los distintos ligandos.

En el extracto metanólico de las muestras procesadas por las columnas, la radiactividad incorporada es proporcional a la cantidad de metabolito. En la fosfatidilcolina recogida directamente al pasar la muestra por la columna, ya que no queda retenida, no se apreciaron diferencias entre células incubadas con bombesina, angiotensina o ATP respecto a las células sin tratar; sin embargo con vasopresina se vio una disminución importante hasta los 10 minutos. Los resultados fueron los mismos en el caso de la fosfocolina. Respecto a la colina, una vez más, sólo la vasopresina produjo un aumento, lo cual estaría de acuerdo con la disminución de las otras dos especies a los tiempos considerados. Entre los 10 y los 60 minutos ya no se apreciaron efectos en ningún caso.

#### 4. ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA

Como enzima implicado en el metabolismo del ácido fosfatídico, se estudió la contribución de la fosfatidato fosfohidrolasa en la transducción de señales extracelulares. La medida de la actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa se llevó a cabo valorando la producción de DAG a partir de ácido fosfatídico. El enzima se ensayó en muestras procedentes de hepatocitos adultos y fetales, tanto en la fracción soluble como en la correspondiente a la membrana plasmática como se describe en la sección 5. de métodos.

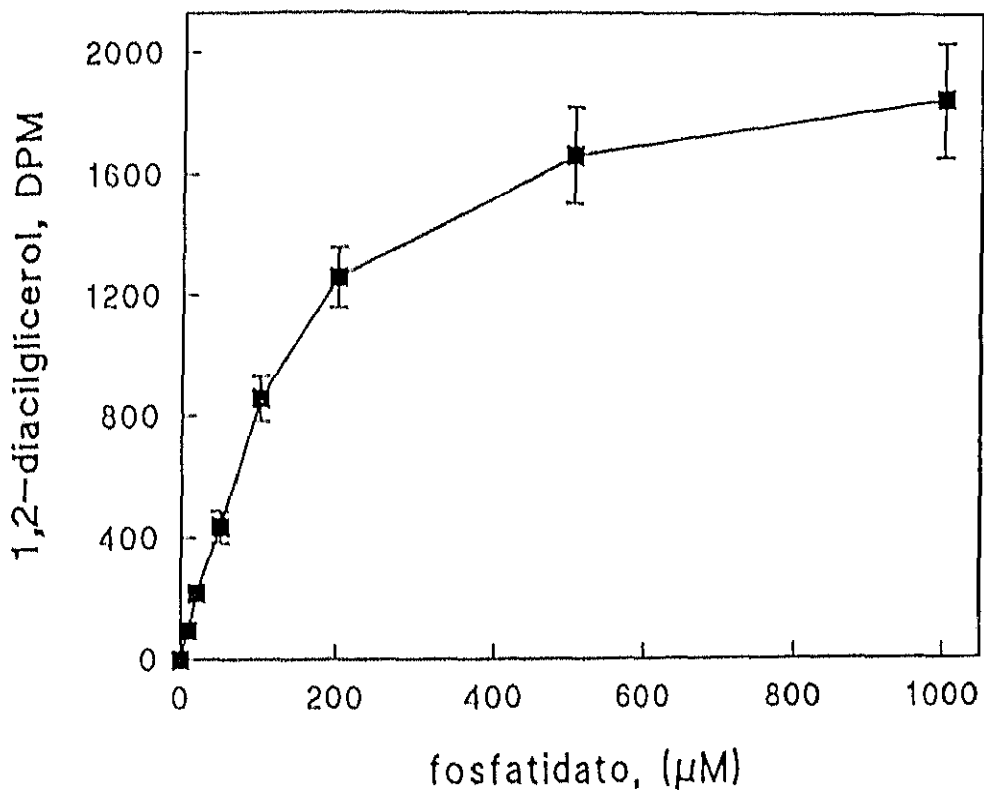


FIGURA 10. PRODUCCION DE DIACILGLICEROL A PARTIR DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACIDO FOSFATIDICO POR LA ACTIVIDAD FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA HEPATICA. La actividad fosfatidato fosfohidrolasa de enzima procedente de membrana de hepatocitos adultos se valoró mediante la producción de ( $^3\text{H}$ )DAG a partir de ( $^3\text{H}$ )ácido fosfatídico, según se detalla en la sección 5. de métodos. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos.

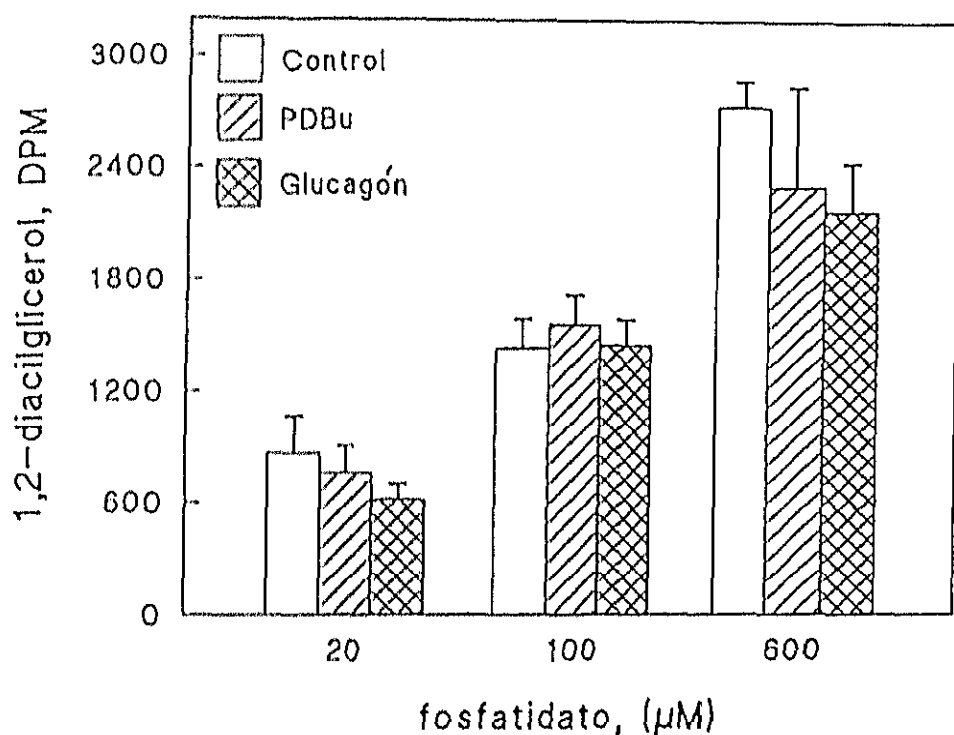


FIGURA 11. EFECTO DE PDBu Y GLUCAGON SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA. Los hepaticos ( $5 \times 10^6$ ) se incubaron en medio PBS con glucagón (100 nM) o PDBu (100 nM) a 37°C durante 10 minutos. Tras purificar las membranas plasmáticas, se midió la actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa a distintas concentraciones de sustrato, como se detalla en la sección 5. de métodos. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos distintos.



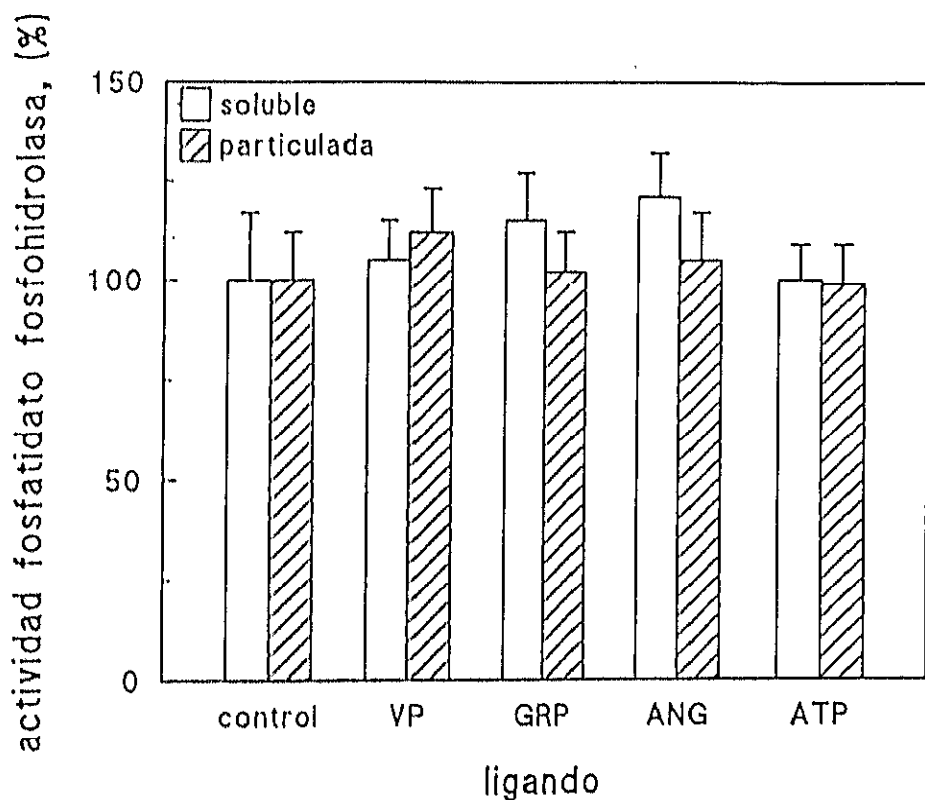


FIGURA 12. EFECTO DE DISTINTAS HORMONAS EN LA DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA FOSFATIDATO FOSFOHIDROLASA EN HEPATOCITOS. Las células ( $2 \times 10^6$ ) se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos en medio PBS en presencia de VP (50 nM), GRP (50 nM), ANG (50 nM) o ATP (50  $\mu\text{M}$ ). La actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa en la fracción soluble (barras abiertas) y particulada (barras rayadas) se determinó por la formación de ( $^3\text{H}$ )DAG a partir de ( $^3\text{H}$ )ácido fosfatídico como se detalla en la sección 5. de métodos. Los valores de actividad en citosol y membrana se representan normalizados en porcentaje. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos.

De acuerdo con lo descrito por el grupo de Brindley (151), la actividad residió en un 95% en la membrana plasmática, excluyendo el enzima asociado al retículo endoplásmico en presencia de N-etil-maleimida. Así, se consideró solamente esta fracción particulada para la mayoría de los ensayos de actividad en las distintas condiciones.

Para establecer las condiciones óptimas del ensayo, se estudió primero la constante de afinidad del enzima purificado de membrana de hepatocitos adultos. La figura 10 muestra la producción de (<sup>3</sup>H)DAG ensayando con concentraciones crecientes de (<sup>3</sup>H)ácido fosfatídico hasta 1 mM. La saturación se alcanza a 500 μM.

Para estudiar la posible modificación de la actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa, por proteína quinasa C y proteína quinasa A, hepatocitos adultos fueron incubados durante 10 minutos con PDBu (activador de proteína quinasa C) o con glucagón (activador de proteína quinasa A), a distintas concentraciones de ácido fosfatídico. Como muestra la figura 11 la activación de las quinasas no presentó diferencias respecto a las células sin tratar.

La actividad enzimática en fracción soluble y particulada se ensayó en hepatocitos fetales tras 10 minutos de incubación con vasopresina, bombesina, angiotensina y ATP. En ningún caso la actividad se vio afectada como se aprecia en la figura 12, donde ha sido normalizada al 100% la actividad de ambas fracciones en el control. Los resultados en hepatocitos adultos resultaron similares a los obtenidos en células fetales.

## 5. ACTIVACION DE LA GLUCOGENO FOSFORILASA a

La glucógeno fosforilasa a es un enzima citosólico que *in vivo* cataliza la degradación del glucógeno, pero *in vitro*, en presencia de un gran exceso de glucosa-1-P permite la reacción contraria. Para la activación del enzima es suficiente

una concentración de calcio por debajo de 400 nM, por lo cual constituye un buen sensor para detectar pequeñas variaciones intracelulares en dicho ion (157).

La actividad de la glucógeno fosforilasa se determinó en la fracción soluble de homogeneizados celulares mediante la valoración del fosfato liberado al incorporarse glucosa-1-P en el polímero de glucógeno. Las incubaciones con los distintos compuestos se realizaron a tiempos cortos dentro de los primeros minutos, ya que después la actividad del enzima cae prácticamente hasta niveles basales.

La máxima activación de la glucógeno fosforilasa se consideró la alcanzada con el ionóforo A23187 5  $\mu$ M. Los resultados del estudio comparativo entre hepatocitos adultos y fetales están de acuerdo con el aumento en la concentración de calcio intracelular en ambos tipos de células.

En hepatocitos adultos (figura 13B) la máxima activación, tres veces superior al control, se consiguió con vasopresina, angiotensina y ATP en el primer minuto. Estos tres compuestos producen un aumento de calcio intracelular suficiente para la activación del enzima. Sin embargo, el efecto de la bombesina o el GRP fue sólo de un 50%, lo cual concuerda con una concentración citosólica de calcio por debajo de 300 nM. La actividad de la fosforilasa fue disminuyendo con el tiempo hasta alcanzar valores próximos a las basales. Esto sucedió a los cinco minutos en todos los casos, excepto con vasopresina, que mantuvo la actividad del 200% durante ese tiempo, de acuerdo con lo observado por otros grupos (43).

Por el contrario, en hepatocitos fetales (figura 13A) se vieron activaciones cercanas al 300% con angiotensina y ATP y algo menores con las otras dos hormonas, pero en el caso de la vasopresina el efecto fue menor en intensidad y duración que con la bombesina. Al igual que con hepatocitos adultos, a partir del primer minuto se observó una disminución progresiva de la actividad. Este hecho podría relacionarse con la evolución de los niveles de calcio citosólico.

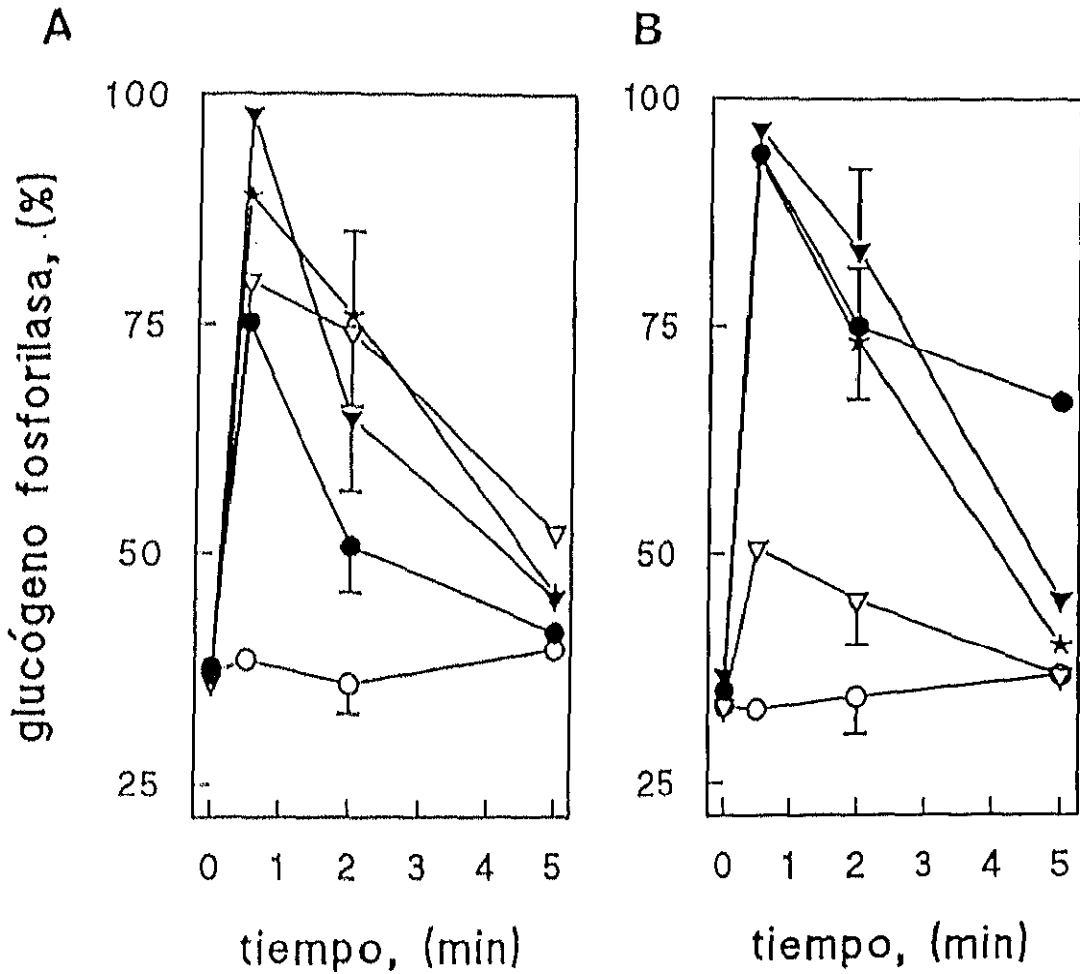


FIGURA 13. ACTIVACION DE LA GLUCOGENO FOSFORILASA POR DIFERENTES HORMONAS EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Los hepatocitos ( $1 \times 10^6$ ) fetales (A) y adultos (B) se incubaron en medio Krebs-Henseleit con  $\text{CaCl}_2$  1 mM a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 minutos en presencia o ausencia (○) de VP (50 nM) (●), GRP (50 nM) (▽), ANG (50 nM) (▼) o ATP (50  $\mu\text{M}$ ) (\*). La actividad de la glucógeno fosforilasa se determinó por la liberación de fosfato inorgánico mediante métodos espectrofotométricos, como se detalla en la sección 6. de métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de activación respecto a células incubadas con el ionóforo A23187 (5  $\mu\text{M}$ ) y corresponden a la media  $\pm$  SEM de cuatro preparaciones distintas. Las actividades basales fueron de  $14 \pm 2$  y  $22 \pm 3$  nmol/min/mg de proteína en hepatocitos adultos y fetales, respectivamente.

## 6. CARACTERIZACION DE SUBESPECIES DE PROTEINA QUINASA C EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. DISTRIBUCION SUBCELULAR POR EFECTO DE HORMONAS *in vivo*

Ampliamente estudiada durante más de una década, la proteína quinasa C, distribuida en todos los tejidos del organismo, se caracteriza por ser un enzima dependiente de calcio y fosfolípidos para su activación. Se encuentra tanto en la fracción soluble como particulada de la célula, pero *in vivo* requiere la translocación a la membrana para ser catalíticamente activa. Esta se produce por un aumento de los niveles de calcio intracelular y la presencia de los diacilgliceroles de la membrana (85).

Se han identificado al menos nueve isoenzimas que difieren en cuanto a los requerimientos de cofactores para su activación (84). La presencia de distintos isoenzimas de proteína quinasa C en hepatocitos fetales y adultos se estudió a tres niveles: actividad enzimática, detección de proteína y análisis de RNA.

### 6.1. AISLAMIENTO Y DISTRIBUCION DE PKC EN HEPATOCITOS INCUBADOS CON DISTINTOS LIGANDOS

Los hepatocitos fetales y adultos aislados fueron incubados con distintos ligandos: vasopresina, bombesina o GRP, angiotensina II y ATP a saturación, y las muestras recogidas como se indica en la sección 1. de métodos. La purificación de la proteína quinasa C se realizó a partir de los extractos solubles procedentes de citosol y membrana celular de hepatocitos, extraída de esta última por tratamiento con el detergente no iónico nonidet P-40.

Las muestras se aplicaron a una columna de DEAE-52. En este gel de intercambio iónico la proteína quinasa C y todos los derivados del fragmento catalítico, quedan retenidos por las interacciones iónicas del enzima. El perfil de elución de la quinasa fue previamente caracterizado con enzima procedente de hígado

en gradiente de NaCl de 20 a 500 mM.

El enzima se eluyó con un medio con NaCl 120 mM. El fragmento proteolítico de la proteína quinasa C correspondiente al dominio catalítico, proteína quinasa M, eluye a una concentración superior a 280 mM y se utilizó una concentración de 350 mM para su aislamiento.

La actividad se valoró por la incorporación de  $(^{32}\text{P})\text{P}_i$  del  $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$  en histona H1, tanto en presencia como en ausencia de calcio y fosfolípidos a sobresaturación. La proteína quinasa C es un enzima dependiente de calcio y fosfolípidos para su activación, lo cual permite su diferenciación de otros enzimas así como de la proteína quinasa M ya que al carecer este enzima del dominio regulador es activo en ausencia de los dos cofactores.

La actividad enzimática de la proteína quinasa C resultó diferente en cuanto a su distribución en la fracción soluble o particulada, en función del tipo de célula. En hepatocitos adultos, a igualdad de proteína, la actividad residió en un 50-60% en el citosol, mientras que en los fetales fue entre 70-80%. Los niveles de proteína quinasa M resultaron ligeramente superiores en hepatocitos fetales.

El efecto de las hormonas en la activación y translocación del enzima en ambos tipos de células se muestra en la tabla 4, en la cual se considera la actividad correspondiente a los 2 minutos.

En hepatocitos adultos no se observó translocación con ninguno de los ligandos utilizados (vasopresina, bombesina, angiotensina, ATP), ya que la relación actividad soluble/actividad particulada no presentó diferencias respecto al control, como puede también observarse en la figura 15 y de acuerdo con lo descrito por Díaz-Guerra y cols. (43).

En el caso de los hepatocitos fetales se apreciaron diferencias significativas

Ligando	Actividad PKC (%)	
	Fetal	Adulto
Vasopresina 50 nM	138 ± 11	108 ± 12
GRP 50 nM	158 ± 14	95 ± 13
Angiotensina 50 nM	187 ± 21	111 ± 11
ATP 50 μM	191 ± 19	115 ± 9
Hidroquinona 20 μM	94 ± 7	99 ± 8

TABLA 4. EFECTO DE DIFERENTES LIGANDOS SOBRE LA DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA PROTEINA QUINASA C EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Las células ( $3 \times 10^6$ ) se incubaron a 37°C en medio Krebs-Henseleit con  $\text{CaCl}_2$  1 mM en presencia o ausencia de VP (50 nM), GRP (50 nM), ANG (50 nM), ATP (50 μM) e HQ (20 μM), a los tiempos indicados. Tras homogeneización de las células, la actividad PKC se determinó en la fracción soluble y particulada separadas por centrifugación y parcialmente purificadas por DE-52, como se detalla en la sección 8.2. de métodos. Los datos corresponden a la actividad de PKC en la fracción particulada expresados en porcentaje respecto al control (células sin estimular). La actividad total en el control fue de  $12,3 \pm 1,8$  y  $7,5 \pm 0,9$  U/mg de proteína en hepatocitos fetales y adultos, respectivamente. Los resultados son la media ± SEM de cinco experimentos.

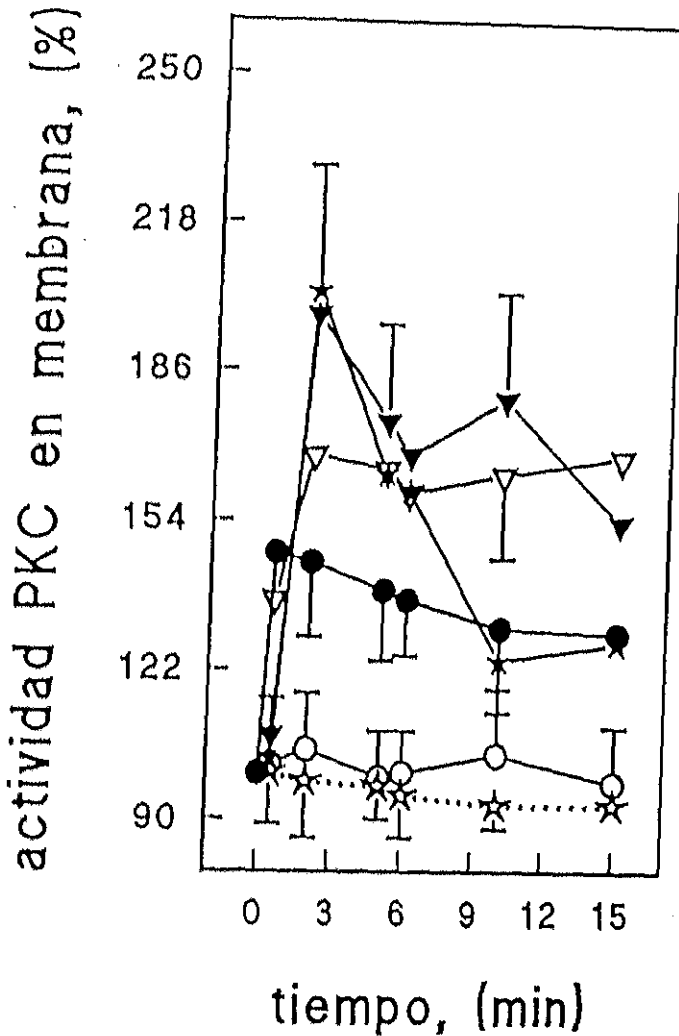


FIGURA 14. EFECTO DE DISTINTOS LIGANDOS SOBRE LA DISTRIBUCION DE PROTEINA QUINASA C EN HEPATOCITOS FETALES. Las células ( $3 \times 10^6$ ) se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en medio Krebs-Henseleit con  $\text{CaCl}_2$  1 mM en presencia o ausencia (○) de VP (50 nM) (●), GRP (50 nM) (▽), ANG (50 nM) (▼), ATP (50  $\mu\text{M}$ ) (★) e HQ (20  $\mu\text{M}$ ) (☆), a los tiempos indicados. Tras homogeneización de las células, la actividad PKC se determinó en la fracción soluble y particulada separadas por centrifugación y parcialmente purificadas por DE-52, como se detalla en la sección 8.2. de métodos. Los datos de actividad de PKC corresponden al porcentaje de actividad enzimática de la fracción particulada respecto al control. La actividad total de PKC en el control fue de  $12,3 \pm 1,8$  U/mg de proteína. Los resultados son media  $\pm$  SEM de cinco preparaciones de células distintas. (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ , hormona vs control).



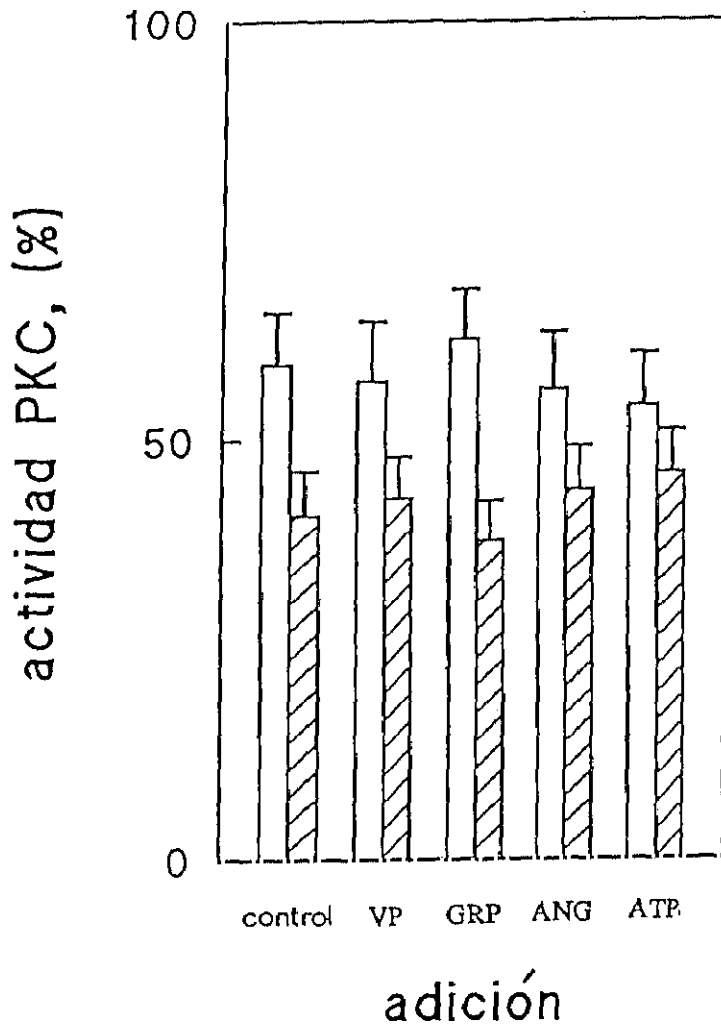


FIGURA 15. EFECTO DE DISTINTOS LIGANDOS SOBRE LA DISTRIBUCION DE PROTEINA QUINASA C EN HEPATOCITOS ADULTOS. Las células se procesaron como se detalla en la figura 14. Los datos de actividad en la fracción soluble (barras abiertas) y particulada (barras rayadas) se expresan como porcentaje de la actividad total en cada condición. La actividad total en el control fue de  $7,5 \pm 0,9$  U/mg de proteína. Los resultados son media  $\pm$  SEM de cuatro preparaciones de células distintas.

entre los distintos ligandos, tanto en la intensidad como en la duración del efecto. Esto puede observarse en una curva con muestras tomadas a distintos tiempos, hasta los 15 minutos de incubación, como refleja la figura 14.

Con angiotensina y ATP la actividad del enzima en la membrana fue doble a la del control. La bombesina aumentó en un 60% y en un 40% la vasopresina. El efecto máximo se produjo en todos los casos en los primeros minutos, pero éste se mantuvo sin apenas disminución con bombesina y angiotensina, mientras que con vasopresina y ATP sí sucedió en los minutos siguientes. El efecto sostenido de bombesina y angiotensina estaría de acuerdo con la producción sostenida de DAG.

Para que se produzca la translocación a la membrana se requiere un cambio conformacional del enzima, que puede producirse en presencia de fosfolípidos con concentraciones de calcio en el rango de 1  $\mu\text{M}$  o bien por el efecto de los ésteres de forbol durante periodos de tiempo alrededor de los 10 minutos (19,56). La diferencia entre estos dos efectores radica en que los forboles producen una activación y unión a la membrana permanentes, mientras que en el primer caso, a concentraciones de calcio fisiológicas, se requieren sinérgicamente niveles de diacilglicerol para la estabilización del enzima.

El hecho de que no se produzca translocación del enzima adulto, a diferencia del fetal, podría deberse en parte al grado de distribución del enzima entre la fracción soluble y particulada. Una posible explicación es que en hepatocitos adultos, al detectarse una mayor proporción de enzima particulado que en los fetales, la movilización de la forma soluble podría requerir señales más intensas para su translocación a la membrana.

Por otra parte, la diferencia también podría radicar en una desigual proporción de isoenzimas en los tejidos, pudiendo ser uno de ellos responsable mayoritario del proceso de translocación. Teniendo esto en cuenta se analizó la presencia de distintas subespecies de proteína quinasa C en ambos tipos de células.

## 6.2. CARACTERIZACION DE LAS SUBESPECIES DE PKC EXPRESADAS EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS A NIVEL DEL RNA MENSAJERO

El estudio de las subespecies de proteína quinasa C presentes en hepatocitos fetales y adultos, se realizó partiendo del aislamiento del RNA con el fin de analizar sus posibles diferencias en ambos tipos de células. A partir del RNA, que da información sobre los isoenzimas de proteína quinasa C que se expresan en la célula, es posible la obtención del cDNA *in vitro* y su amplificación y análisis en geles de agarosa.

Con el fin de analizar el RNA, se recurrió a la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), mediante la cual se consiguen un gran número de copias de cDNA a partir de oligonucleótidos específicos cuya secuencia es complementaria de la molécula de DNA que se quiera amplificar (111). Para ello es necesario el DNA patrón o bien el RNA a partir del cual se obtendrá el cDNA por la transcriptasa inversa.

### 6.2.1. Análisis de las isoformas de proteína quinasa C por PCR.

El aislamiento del RNA total se llevó a cabo partiendo de hepatocitos adultos y fetales aislados como se describe en la sección 9.1. de métodos. Las células se homogeneizaron en un medio con inhibidores de RNAsas para evitar la degradación del RNA.

Para amplificar el DNA específico de las distintas subespecies de proteína quinasa C por PCR, con el fin de evidenciar su presencia o no en células adultas y fetales, es necesario conocer previamente su secuencia para disponer de los oligonucleótidos necesarios en cada caso (122,126).

Una vez obtenido el RNA total de las muestras y disponiendo de oligonucleótidos específicos para los isoenzimas  $\alpha/\beta/\gamma$  (secuencia común),  $\delta$ , y  $\epsilon$ , el

proceso de amplificación se desarrolló como se describe en la sección 9.2. de métodos. También se llevó un control positivo con oligonucleótidos de  $\beta$ -actina para asegurar que el proceso había funcionado correctamente.

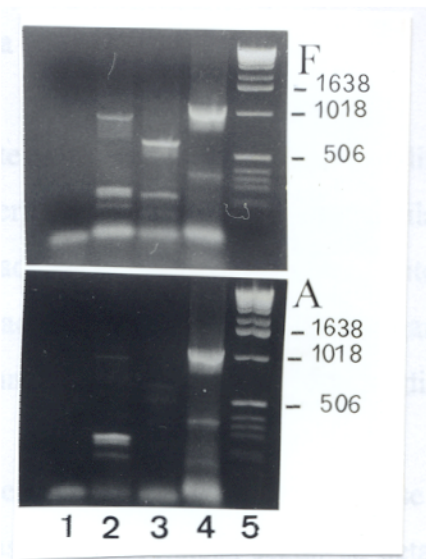
Las muestras de DNA se analizaron sobre geles de agarosa al 1%. El DNA amplificado correspondiente a los isoenzimas  $\alpha/\beta/\gamma$  se analizó en un mismo carril. En carriles separados se analizaron el isoenzima  $\delta$  y  $\epsilon$ . Como marcador se usó el fago  $\lambda$  1 Kb.

La visualización de las bandas del gel al UV como se aprecia en la figura 16, puso de manifiesto la presencia de isoenzimas de la primera familia ( $\alpha/\beta/\gamma$ ), así como  $\delta$  en ambos tipos de células. Sin embargo el  $\epsilon$ , de acuerdo con lo comprobado por Western blot (descrito en el siguiente apartado 6.3.), no apareció en ningún caso.

Estas observaciones están de acuerdo con numerosos estudios relativos a la distribución de distintos isoenzimas en distintos tejidos. Los isoenzimas  $\alpha$  y  $\delta$  están representados en todo el organismo (117),  $\beta I/\beta II$  en la mayoría de las células, mientras que el isoenzima  $\gamma$  es exclusivo de tejidos neurales. La isoforma  $\epsilon$  aparece mayoritariamente en cerebro (123).

El tamaño esperado de las bandas, según los oligonucleótidos elegidos, fue de 970 pares de bases para el isoenzima  $\epsilon$  (carril 1), 900 pares de bases para el  $\delta$  (carril 2) y 600 pares de bases para los isoenzimas de la primera familia  $\alpha$ ,  $\beta I/\beta II$  y  $\gamma$  (carril 3).

En el caso de los isoenzimas  $\alpha/\beta/\gamma$  y  $\delta$  se observa la banda correspondiente al tamaño esperado aunque también aparecen algunas de menor tamaño. La aparición de otras bandas se debe al proceso de amplificación, ya que la presencia de cantidades de DNA contaminante del orden de pg puede dar origen a la amplificación de DNA inespecífico.



**FIGURA 16. ANALISIS DE SUBESPECIES DE PROTEINA QUINASA C EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS PARTIENDO DEL AISLAMIENTO DE RNA.** El DNA se obtuvo por transcripción inversa partiendo del aislamiento del RNA y fue amplificado mediante el uso de oligonucleótidos específicos por la técnica de PCR, como se describe en la sección 9.2. de métodos. La fotografía muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% con el DNA correspondiente al isoenzima  $\epsilon$  (1),  $\delta$  (2) y  $\alpha$ ,  $\beta I/\beta II$  y  $\gamma$  (3) de PKC procedente de hepatocitos fetales (F) y adultos (A). El tamaño esperado de los fragmentos amplificados fue 970, 900 y 600 pares de bases, respectivamente. La amplificación con oligonucleótidos específicos de  $\beta$ -actina (4) se usó como control y el fago  $\lambda$  1 Kb (5) como marcador. El experimento es representativo de dos realizados obteniendo los mismos resultados.

### 6.3. IDENTIFICACION DE ISOENZIMAS DE PKC CON ANTICUERPOS ESPECIFICOS

Otro método para identificar los distintos isoenzimas de proteína quinasa C es el reconocimiento de la proteína por anticuerpos específicos. El enzima procedente de la fracción citosólica y particulada de hepatocitos adultos y fetales ( $10 \times 10^6$ ), se purificó parcialmente por una columna de DEAE-celulosa y se determinó su actividad como queda descrito en la sección 8. de métodos.

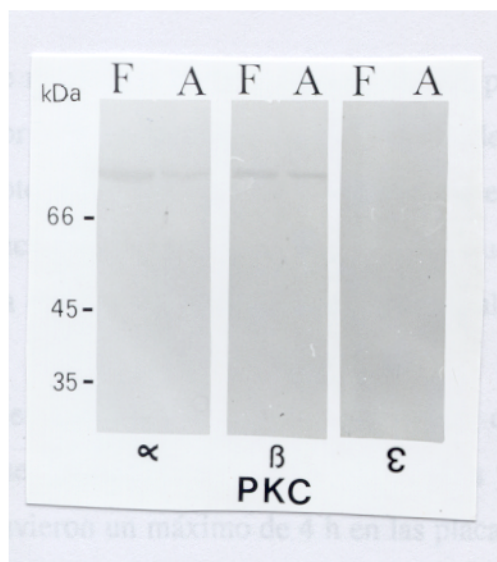
A igualdad de proteína, las muestras se desnaturalizaron a  $80^\circ\text{C}$  con medio de muestras Laemmli para ser aplicadas a un gel de poliacrilamida al 10% en el cual se incluyeron también marcadores de peso molecular. Tanto las muestras de proteína quinasa C de hepatocitos adultos como de fetales se cargaron en el gel por triplicado para incubar luego cada una de ellas con un anticuerpo distinto.

Cuando se hubo desarrollado la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa según se detalla en la sección 10.2. de métodos. La banda de los marcadores se tiñó con una solución de azul de Coomassie para visualizar las bandas de proteína.

La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpos específicos para las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$  (primer anticuerpo) y a continuación con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, que permitirá la visualización del complejo antígeno-anticuerpo cuando en presencia de un cromóforo se desarrolle la reacción coloreada.

El Western blot (figura 17) reveló la existencia de isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , tanto en el estado fetal como en el adulto. La forma  $\epsilon$ , muy abundante en tejidos neurales, no se presentó en ningún caso. Estos resultados coinciden con los obtenidos por PCR.

A la vista de los resultados referentes a la composición isoenzimática de la



**FIGURA 17. ANALISIS DE SUBESPECIES DE PROTEINA QUINASA C DE HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS POR WESTERN BLOT.** La PKC procedente de la fracción soluble y particulada de hepatocitos fetales (F) y adultos (A) ( $5-10 \times 10^6$ ) fue extraída y parcialmente purificada por DE-52, según se detalla en la sección 8.2. de métodos. Las fracciones con actividad se purificaron por centrifugación y se procesaron para su análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. La fotografía muestra el análisis por Western blot desarrollado con anticuerpos específicos para los isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$  de PKC hepática. El experimento es representativo de dos realizados obteniendo los mismos resultados.

proteína quinasa C puede deducirse un paralelismo en ambos tipos de células en cuanto a la distribución de las isoformas, aunque las correspondientes a la primera familia ( $\alpha$  y  $\beta I/\beta II$ ) parecen ser más abundantes en el estado fetal.

## 7. CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA

La presencia de receptores en la superficie celular permite la transmisión de señales desde el exterior al interior de la célula por unión de ligandos específicos. El número y tipo de receptores de los ligandos estudiados en este trabajo podría ser un paso limitante y diferenciador entre la etapa fetal y adulta que permitiría elaborar una posible explicación a la distinta respuesta que presentan a algunas hormonas.

Los estudios de caracterización y cuantificación de los receptores de la membrana plasmática se realizaron en hepatocitos adultos y fetales en cultivo. Las células fetales se mantuvieron un máximo de 4 h en las placas después de la siembra, pero las adultas requirieron al menos 18 h para asegurar una buena adhesión. Todos los experimentos se realizaron en paralelo en células adultas y fetales sometidas al mismo proceso.

La identificación de los distintos tipos de receptores se llevó a cabo mediante la incubación de las células con el ligando radiactivo específico del receptor a caracterizar. Las uniones inespecíficas pueden descartarse cuando el ligando sin marcar está presente en una concentración muy superior al radiactivo.

Tras incubar los hepatocitos durante 5 minutos a 37°C con los ligandos marcados correspondientes y eliminar el medio por sucesivos lavados, como se detalla en la sección 11. de métodos, la radiactividad se determinó en las células una vez despegadas de los pocillos, transfiriendo las muestras a viales con líquido de centelleo para su cuantificación.



## 7.1. ANALISIS DE LA SATURACION Y AFINIDAD DE LOS RECEPTORES DE VASOPRESINA, GRP Y ANGIOTENSINA II

Para la caracterización de los receptores de la membrana plasmática, las células se incubaron con (<sup>3</sup>H)vasopresina, (<sup>125</sup>I)GRP y (<sup>125</sup>I)angiotensina en un rango de concentraciones de 0,5 nM a 100 nM para la representación de la curva de saturación y el cálculo de la constante de afinidad de cada ligando.

Además de la unión específica a su receptor, los ligandos pueden unirse inespecíficamente a otros elementos celulares; este tipo de interacciones distorsionan el estudio de la cinética y por ello se han realizado paralelamente incubaciones de las características anteriores pero en presencia de un gran exceso de ligando no marcado, de 10<sup>3</sup> veces superior a la concentración del ligando radiactivo.

El exceso de ligando frío desplazará de los sitios inespecíficos al marcado, con lo cual la radiactividad obtenida de la diferencia entre ambos corresponderá solamente a la unión específica. Los valores utilizados para construir la curva de saturación son los pmoles de ligando unidos al receptor (unión específica) considerando la misma cantidad de proteína en hepatocitos adultos y fetales.

El análisis de los resultados se ha realizado desde dos puntos de vista: por una parte, se han analizado las diferencias entre las tres hormonas consideradas en un mismo tipo de célula. Por otra parte se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre hepatocitos adultos y fetales respecto a cada hormona y su relación con el resto de los elementos que participan en la vía de transducción de señales.

Como se observa en las figuras 18, 19 y 20 la saturación de los receptores de las tres hormonas estudiadas se consigue a concentraciones inferiores a 10 nM. La reacción sigue una cinética de primer orden como se deduce de la gráfica hiperbólica al hacer una representación directa de la concentración de ligando utilizado frente a la cantidad incorporada.

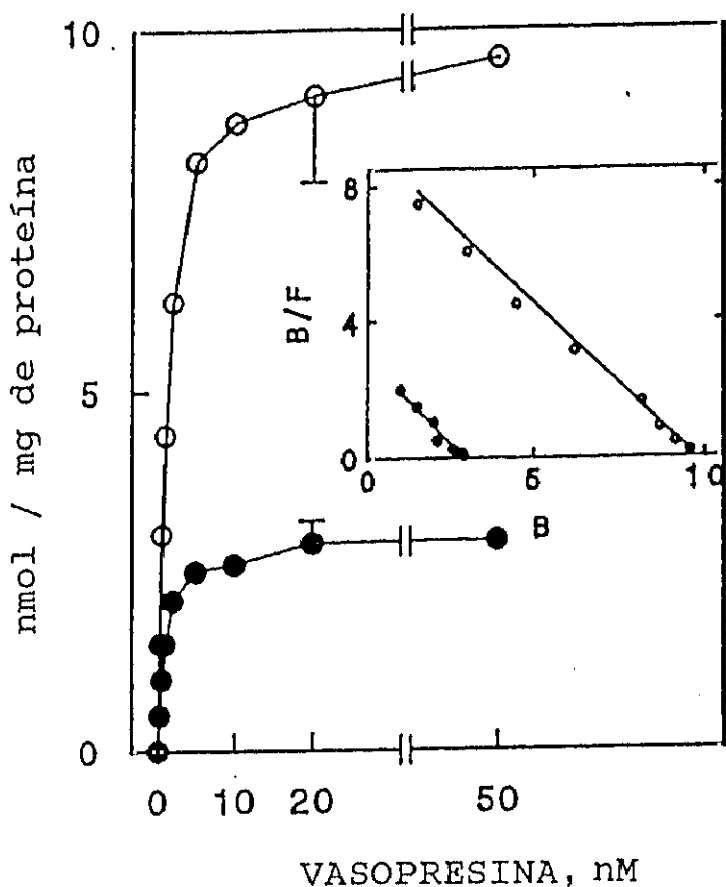


FIGURA 18. CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES DE VASOPRESINA. Cultivos primarios de hepatocitos fetales (●) y adultos (○) se incubaron durante cinco minutos a 37°C en medio DMEM con diferentes concentraciones de (<sup>3</sup>H)VP y las muestras se procesaron como se describe en la sección 11. de métodos. La unión específica fue calculada como la diferencia entre la unión total y la inespecífica. A concentraciones saturantes de ligando se representa el valor ± SEM. Cada punto es el valor medio de tres experimentos distintos procesados por duplicado.

En el análisis de Scatchard (dentro de la figura) las rectas se ajustaron mediante el programa de optimización Biosoft P (Fig P).

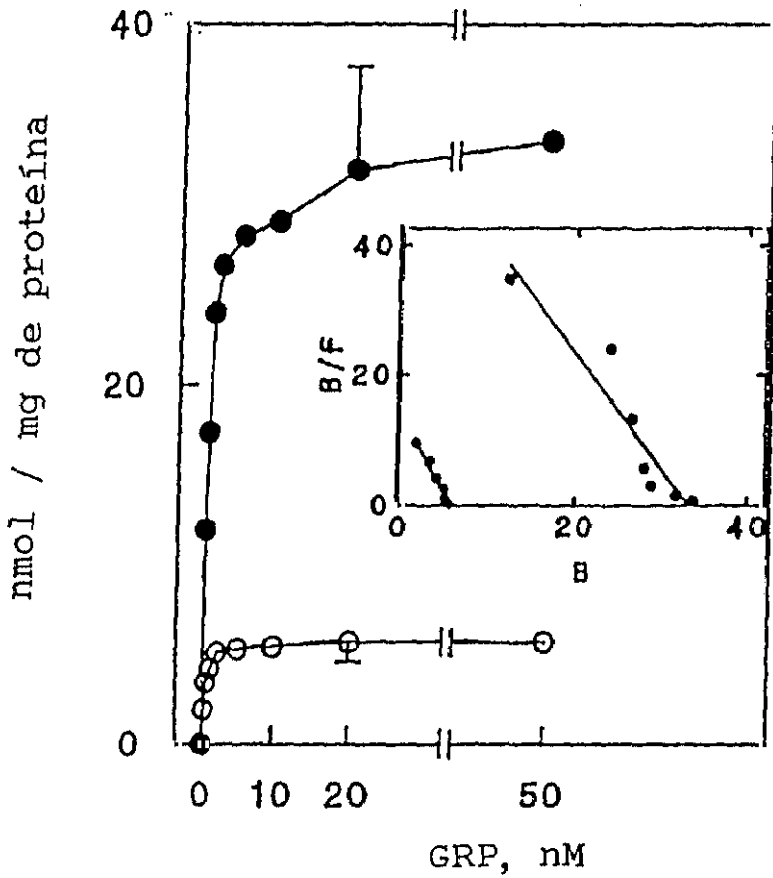


FIGURA 19. CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES DE GRP. Las células se incubaron con  $(^{125}\text{I})\text{GRP}$  en las condiciones descritas en la figura 18, así como el procesamiento de las muestras y la representación de los resultados.

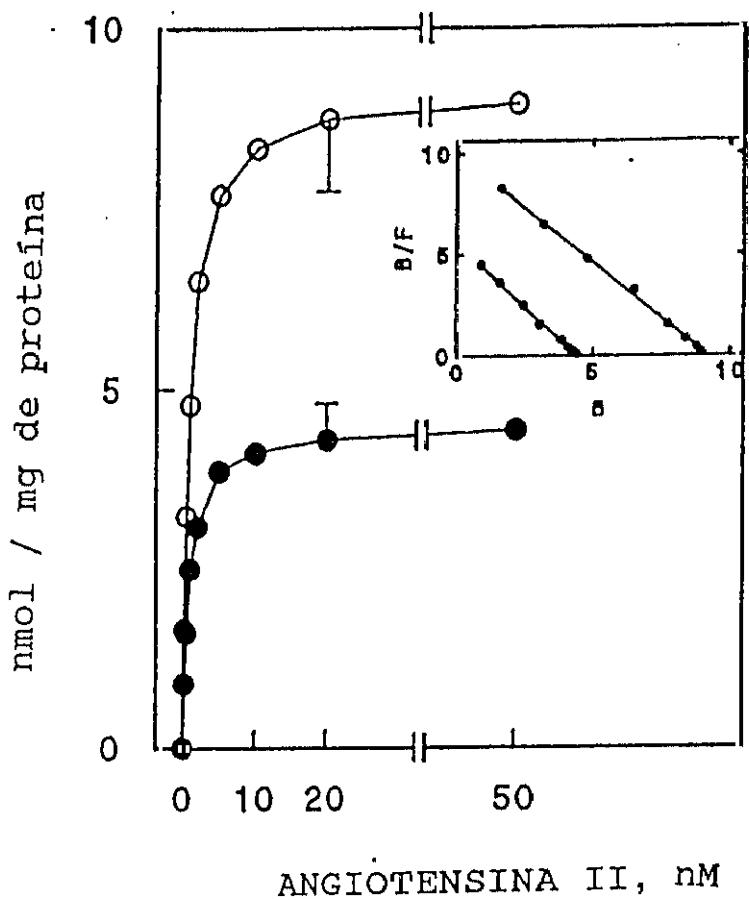


FIGURA 20. CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES DE ANGIOTENSINA. Las células se incubaron con  $(^{125}\text{I})\text{ANG}$  en las condiciones descritas en la figura 18, así como el procesamiento de las muestras y la representación de los resultados.

Según los datos de la constante de disociación y la unión máxima del ligando a su receptor, reflejados en la tabla 5, en hepatocitos adultos la constante de disociación de los receptores de vasopresina y angiotensina está en torno a 1 nM, mientras que la de GRP es 2,5 nM. También esta similitud entre los dos péptidos vasoactivos (vasopresina y angiotensina) se observa en la velocidad máxima y por consiguiente en el número de receptores, que asimismo resulta menor en GRP. Otros grupos han obtenido valores similares con preparaciones de membranas de hepatocitos incubadas con vasopresina (40,71).

En el caso de las células fetales los resultados referentes a las constantes de disociación están en la misma línea que los adultos. Sin embargo hay una drástica diferencia en cuanto al número de receptores ya que en el caso del GRP resulta 10 veces mayor que en los otros dos ligandos.

Para estudiar la posible existencia de más de un tipo de sitios de unión de los ligandos a sus receptores se realizó la representación de Scatchard, como muestran las figuras 18, 19 y 20. En todos los casos el ajuste de los puntos a una sola recta reveló la existencia de un único sitio de alta afinidad. Con vasopresina y angiotensina se observa un total paralelismo entre células adultas y fetales, siendo ligeramente distinto con GRP.

Todos los resultados referentes a la caracterización y cuantificación de receptores están de acuerdo con los obtenidos en la generación de segundos mensajeros, movilización de calcio y activación de enzimas, deduciéndose una vez más que de los compuestos estudiados, el GRP es el péptido de mayor relevancia en el estado fetal.

## 7.2. ANALISIS DE LA SATURACION Y AFINIDAD DE RECEPTORES PURINERGICOS POR ATP Y ADP $\beta$ S

Para el estudio de los receptores purinérgicos se utilizaron ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP y

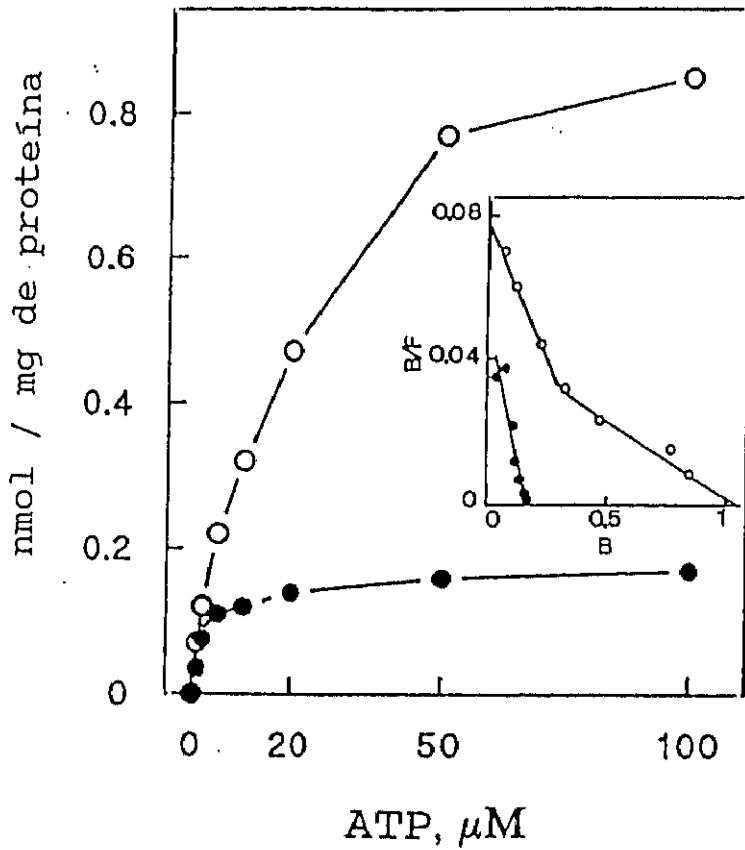


FIGURA 21. CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES DE ATP. Las células se incubaron con ( $^{32}\text{P}$ )ATP en las condiciones descritas en la figura 18, así como el procesamiento de las muestras y la representación de los resultados.

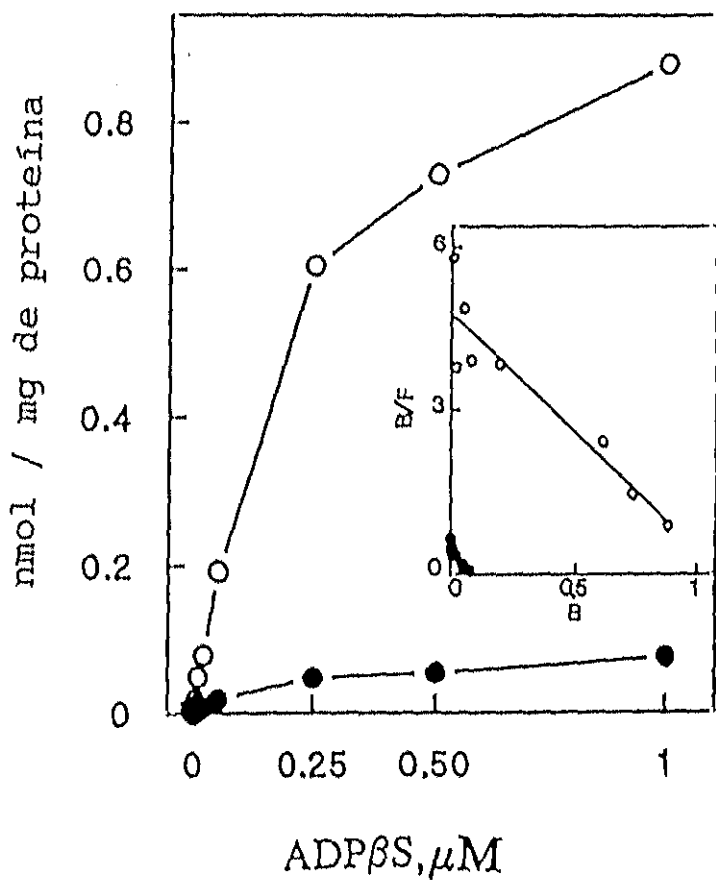


FIGURA 22. CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES DE ADP $\beta$ S. Las células se incubaron con ( $^{35}\text{S}$ )ADP $\beta$ S en las condiciones descritas en la figura 18, así como el procesamiento de las muestras y la representación de los resultados.

Ligando	Fetal		Adulto	
	$K_d$ (nM)	$B_{max}$	$K_d$ (nM)	$B_{max}$
Vasopresina	0,9	3,1	0,9	9,7
GRP	1,4	33,5	2,5	6,5
Angiotensina	1,3	4,5	1,1	9,3
ATP	$0,3 \times 10^3$	160	$0,2 \times 10^3$	510
ADP $\beta$ S	$7,4 \times 10^3$	102	$4,6 \times 10^3$	490
			$1010$	

TABLA 5. ANALISIS DE SATURACION Y AFINIDAD DE RECEPTORES. Los datos corresponden a los valores obtenidos de las curvas de saturación representadas en las figuras 18 a 22.



$(^{35}\text{S})\text{ADP}\beta\text{S}$ , siendo este último un ligando más específico del receptor  $\text{P}_{2\text{Y}}$  (83). Las ectonucleotidasas existentes en cada tipo de célula fueron previamente valoradas para evitar que posibles diferencias en cuanto a concentración pudieran interferir en la interpretación de resultados (159). Las concentraciones de ATP estaban comprendidas entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ , mientras que el  $\text{ADP}\beta\text{S}$  iba de 0,1 a 1  $\mu\text{M}$ . Las figuras 21 y 22 muestran la curva de saturación de ambos ligandos.

Haciendo la representación de Scatchard (figura 21), para el ATP encontramos una buena linealidad entre los puntos correspondientes a los hepatocitos fetales deduciendo la existencia de un solo sitio de unión del ligando; el valor de la constante de disociación del complejo resultó  $0,3 \times 10^3$  nM. Pero en el caso de los adultos, la gráfica se ajustaría mejor con dos líneas de distinta pendiente, lo cual se interpreta como la existencia de dos sitios de unión de diferente afinidad: uno de alta afinidad semejante a los fetales y otro de menor afinidad cuyas constantes tienen valores de  $0,1 \times 10^3$  y  $0,2 \times 10^3$  nM respectivamente. En cuanto a la velocidad máxima también se encuentran diferencias entre los dos tipos celulares. El número de receptores de ATP es casi seis veces mayor en hepatocitos adultos que en fetales.

Según se aprecia también en la figura 22, la cinética de saturación es similar en hepatocitos adultos y fetales en el caso de los receptores de  $\text{ADP}\beta\text{S}$ . La constante de afinidad es mayor en células adultas, en las cuales el número de receptores es diez veces superior. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurría con el ATP, con  $\text{ADP}\beta\text{S}$  se deduce un solo tipo de unión ligando-receptor en ambos casos.

### 7.3. MODULACION ALTERNATIVA DE RECEPTORES POR SEÑALES HETEROLOGAS

Con el propósito de ver si la unión de un ligando a su receptor afectaba de alguna manera la unión de otros ligandos distintos a sus receptores correspondientes, las células se incubaron con compuestos no marcados durante 2 minutos, previa a la adición del ligando radiactivo sobre cuyo receptor se quiera estudiar el efecto.

Tratamiento previo	% unión ATP		% unión ADP $\beta$ S	
	Fetal	Adulto	Fetal	Adulto
Vasopresina 100 nM	116	108	100	122
GRP 100 nM			109	152
Angiotensina 100 nM	100	97	106	176
EGF 10 nM			115	211

TABLA 6. MODULACION HETEROLOGA DE RECEPTORES PURINERGICOS. Cultivos primarios de hepatocitos fetales y adultos ( $0,5-1 \times 10^6$ ) se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en medio DMEM en presencia o ausencia de las hormonas o factores de crecimiento indicados. A los 2 minutos se añadió ( $^{32}\text{P}$ )ATP ( $50 \mu\text{M}$ ) o ( $^{35}\text{S}$ )ADP $\beta$ S ( $25 \text{nM}$ ) y las muestras se procesaron de acuerdo con lo descrito en la sección 11. de métodos. Los valores se expresan como porcentaje de la radiactividad incorporada por las muestras tratadas con hormonas respecto al control. Los resultados son la media de dos experimentos procesados por duplicado.

Ligando		% unión ATP	
		Fetal	Adulto
Ap <sub>4</sub> A	100 nM	138	106
AMP	100 nM	99	115
Adenosina	100 nM	33	95
GTP	100 nM	40	98

TABLA 7. ESPECIFICIDAD DEL RECEPTOR DE ATP EN HEPATOCITOS FETALES Y ADULTOS. Cultivos primarios de hepatocitos fetales y adultos ( $0,5-1 \times 10^6$ ) se incubaron a 37°C en medio DMEM en presencia o ausencia de los análogos de ATP indicados. A los dos minutos se añadió ( $^{32}\text{P}$ )ATP ( $50 \mu\text{M}$ ) y las muestras se procesaron de acuerdo con lo descrito en la sección 11. de métodos. Los valores se expresan como porcentaje de la radiactividad incorporada por las muestras tratadas con hormonas respecto al control. Los resultados son la media de dos experimentos procesados por duplicado.

Hepatocitos adultos y fetales fueron incubados durante 2 minutos con vasopresina y angiotensina, ambas a concentración de 100 nM. Después se añadió ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )ATP a una concentración saturante de 50  $\mu\text{M}$ , llevando paralelamente un control de este compuesto para poder compararlo con las células previamente tratadas.

Haciendo una valoración de la radiactividad incorporada como refleja la tabla 6, no se apreciaron diferencias significativas en ningún tipo de células respecto a los controles. Por este dato podría deducirse que la unión del ATP a su receptor no se ve afectada por las hormonas anteriores en las condiciones consideradas. El grupo de De Wulf ha descrito desensibilización heteróloga del receptor purinérgico  $\text{P}_2$  por incubación más prolongada con vasopresina, midiendo el efecto sobre la activación de la glucógeno fosforilasa (82).

El mismo estudio se realizó sobre el receptor de  $\text{ADP}\beta\text{S}$  incubando en este caso con vasopresina, GRP y angiotensina 100 nM y EGF 10 nM durante 2 minutos, previa a la adición de ( $^{35}\text{S}$ ) $\text{ADP}\beta\text{S}$  25 nM. En hepatocitos fetales no se observó ningún efecto. Sin embargo, la unión del  $\text{ADP}\beta\text{S}$  en células adultas se vio incrementada en todos los casos, apreciándose la mayor diferencia con angiotensina y EGF como queda reflejado en la tabla 6.

También se probó un grupo de análogos de la propia molécula como son  $\text{Ap}_4\text{A}$ , adenosina, AMP y GTP 100 nM para estudiar la especificidad del receptor (tabla 7). La concentración de ( $^{35}\text{S}$ ) $\text{ADP}\beta\text{S}$  fue 25 nM. Contrariamente a la situación anterior, los hepatocitos adultos no se vieron afectados. Con adenosina y GTP se produjo una importante disminución del número de sitios de unión del receptor de  $\text{ADP}\beta\text{S}$  en los hepatocitos fetales.

#### 7.4. EFECTO DEL $\text{PDBu}$ SOBRE LA FORMACION DEL COMPLEJO LIGANDO-RECEPTOR

En numerosos casos se ha comprobado que los ésteres de forbol, cuyo receptor

biológico es la proteína quinasa C, producen desensibilización de receptores. Para ver si el PDBu afecta en algún sentido a los receptores que han sido caracterizados, se realizaron incubaciones con este forbol a distintas concentraciones y tiempos.

Las células fueron incubadas en presencia de PDBu a una concentración de 100 ng/ml, 10 y 30 minutos antes de añadir el ligando radiactivo sobre cuyo receptor se trataba de ver el efecto. Los receptores estudiados fueron vasopresina, GRP y angiotensina; estos compuestos se añadieron en concentraciones de 5 y 50 nM.

Las diferencias con el control no resultaron significativas en hepatocitos fetales. En células adultas tampoco se vio afectada la afinidad, y apenas la velocidad máxima. Se deduce así que en la primera media hora la unión de los ligandos anteriores a su receptor no se ve afectada por los ésteres de forbol.

Para estudiar un posible efecto a largo plazo se forzaron las condiciones anteriores: se aumentó la concentración de PDBu a 400 ng/ml y se mantuvo durante 3 horas. En este caso las incubaciones se realizaron con vasopresina, ATP y ADP $\beta$ S marcados radiactivamente a concentraciones saturantes.

Tanto en hepatocitos adultos como en fetales se produjo un aumento en la unión al receptor previo tratamiento con PDBu, excepto para el ATP que no presentó diferencias con el control. El efecto más importante se vio sobre el receptor de vasopresina, ya que en células adultas el incremento en las incorporaciones fue de tres veces sobre las muestras sin tratar, como queda reflejado en la tabla 8.

Por el contrario, estudios en hepatocitos adultos sobre el receptor de EGF demuestran que el tratamiento con TPA (forbol miristato acetato) produce una disminución del número de receptores de alta afinidad, pero una potenciación de los efectos de EGF (55). En líneas celulares como MDA468 (carcinoma de pecho humano), una exposición rápida a TPA produce una disminución de los sitios de unión, contrariamente a lo que sucede durante una incubación a tiempos largos con

Receptor	% unión ligando	
	Fetal	Adulto
Vasopresina	137	370
ATP	91	125
ADP $\beta$ S	128	174

TABLA 8. EFECTO DE LA INCUBACION CON PDBu SOBRE LOS RECEPTORES DE VASOPRESINA, ATP Y ADP $\beta$ S. Cultivos primarios de hepatocitos fetales y adultos ( $0,5 \cdot 10^6$ ) se incubaron a 37°C en medio DMEM en presencia o ausencia de PDBu (400 ng/ml). Transcurridas 3 horas se añadió ( $^3\text{H}$ )VP, ( $^{32}\text{P}$ )ATP o ( $^{35}\text{S}$ )ADP $\beta$ S y las muestras se procesaron como se describe en la sección 11. de métodos. Los valores se expresan como porcentaje de la radiactividad incorporada por las muestras tratadas con hormonas respecto al control. Los resultados son la media de dos experimentos procesados por duplicado.

el forbol (14).

A la vista de estos resultados, el incremento en la unión de algunos compuestos a su receptor después de una exposición prolongada a ésteres de forbol, podría interpretarse como un aumento en el número de receptores de la membrana que aunque sin ser funcionales, serviría para suplir el desacoplamiento de la señal producido por el PDBu.

## **5. DISCUSSION**



## DISCUSION

La caracterización de las vías de transducción de señales extracelulares presentada por distintos agonistas tras la estimulación celular constituye una línea de enorme interés en el campo de la biología celular.

La gran variedad de receptores a nivel de la membrana plasmática contrasta con el reducido número de sistemas utilizados por las células para transmitir la información de los estímulos externos. Por tanto, es probable que la intensidad de las señales generadas juegue un papel importante en la producción de la respuesta celular.

Aunque existen numerosos trabajos sobre la identificación del mecanismo de transmisión de señales intracelulares en diversos sistemas celulares, consideramos importante la realización de un estudio para analizar la contribución cuantitativa de los distintos elementos implicados en la regulación final de la respuesta.

Además de la utilización de ligandos con estructuras y funciones muy diferentes, el uso de hepatocitos fetales y adultos como células diana nos permite comparar respuestas celulares en dos estados de diferenciación hepática bien definidos y en este sentido establecer la versatilidad del sistema.

### 1. MOVILIZACION DE CALCIO.

Con el fin de estudiar si hormonas que comparten la vía de señalización del fosfatidilinositol como mecanismo común en la transmisión de señales extracelulares pueden generar respuestas intracelulares tempranas cuantitativamente diferentes, se analizaron los cambios en la concentración de calcio citosólico. El nivel de  $Ca^{2+}$  libre está regulado por canales e intercambiadores iónicos localizados en la membrana plasmática o en orgánulos intracelulares (11,28).

El tipo de respuesta a ligandos que actúan por unión a receptores de la membrana plasmática (vasopresina (VP), bombesina o GRP, angiotensina II (ANG) y ATP) en cuanto a la movilización de calcio, resultó cualitativamente similar en hepatocitos adultos y fetales, pero cuantitativamente distinta (figura 1), y se produjo en los primeros segundos tras la estimulación hormonal. A concentraciones fisiológicas de calcio extracelular, mientras que con angiotensina y ATP se alcanzan los mayores aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (hasta 700 nM), en ambos tipos de células, el efecto de la vasopresina resulta mayor en adultos. La bombesina o su análogo en mamíferos, el péptido liberador de gastrina (GRP), han sido utilizados indistintamente ya que producen los mismos efectos, habiéndose comprobado en fibroblastos que actúan a través del mismo receptor (143); ambos ligandos incrementan el calcio citosólico en mayor medida en células fetales que en adultas.

El retículo endoplásmico es una de las fuentes que participan en el aumento de calcio citosólico producido por compuestos que utilizan la vía de los fosfatidilinositoles (11,134). En nuestro sistema, además de la movilización de calcio de reservorios intracelulares (de acuerdo con los datos de producción de  $\text{IP}_3$ ), se ven implicados canales de la membrana plasmática, ya que la presencia de quelantes de calcio en el medio extracelular produce una señal menos intensa (figura 3). Este hecho podría explicarse como una entrada de calcio en la célula proporcional al vaciamiento de los depósitos intracelulares tras la estimulación hormonal, lo cual no sucede en ausencia de calcio en el medio extracelular.

Un hecho claramente reconocido es la interacción sinérgica entre la proteína quinasa C y el  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares (11,117). Muchas de las funciones fisiológicas de la proteína quinasa C están relacionadas con la modulación de canales iónicos y otras vías de señalización que implican  $\text{Ca}^{2+}$  (26,142). La activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol (promotores tumorales que se unen y activan directamente la quinasa) (30) conduce al bloqueo de las acciones mediadas por varios tipos de receptores (135,145). A este nivel, resulta interesante el estudio de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en células

estimuladas con forbol.

Un punto común en el mecanismo de transducción de VP, GRP, ANG y ATP en hepatocitos fetales y adultos es la drástica disminución de la señal de calcio en células preincubadas con PDBu (tabla 1). Aunque con agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos se ha comprobado que el control negativo se produce por fosforilación de su receptor, en la mayoría de los casos no hay suficientes evidencias en este sentido y el bloqueo podría producirse a nivel de proteínas G o de receptores específicos de  $IP_3$  (142). Además de esta respuesta coordinada en células fetales y adultas al PDBu, la cinética de liberación de calcio del retículo endoplásmico (analizado en preparaciones microsomales, como muestra la figura 6) también presentó un perfil equivalente en ambos estados de desarrollo; de ello se deduce que la movilización de calcio del retículo endoplásmico no se ve afectada tras la diferenciación hepática.

Dadas las diferencias cuantitativas en la movilización de calcio presentadas por las hormonas en hepatocitos fetales y adultos, consideramos importante la determinación del aumento de calcio producido tras estimulación máxima de la vía de los fosfatidilinosítoles, mediante sustancias que actúen directamente sobre uno de los elementos del sistema.

El uso de mastoparén (activador de proteínas G), fosfolipasa C específica de fosfatidilinosítoles procedente de *Bacillus cereus* y 2,5-di(t-butil)-1,4-benzohidroquinona (bloqueante de la ATPasa que libera calcio del retículo endoplásmico) nos ha permitido la saturación de la vía de señalización a nivel de proteínas G, fosfolipasa C y retículo endoplásmico (67,97,109). Como muestra la figura 4, la movilización de calcio con estos compuestos presenta distintas características a la producida por ligandos que actúen vía receptor de membrana (aumento de calcio transitorio), ya que es sostenida en el tiempo. La concentración de calcio con fosfolipasa C e hidroquinona es del mismo rango que la alcanzada con ANG o ATP, y algo menor en el caso del mastoparén. Estos resultados apuntan a que uno de los principales elementos de control en la producción de segundos mensajeros debe estar situado en los primeros

pasos de la vía de transducción de señales.

Otra ventaja de la hidroquinona es que nos ha permitido diferenciar el origen del calcio movilizado tras la estimulación hormonal, ya que la señal de calcio sostenida producida por este compuesto sufre una caída inmediata al añadir una hormona (figura 5). Estas observaciones sugieren que las hormonas, además de una movilización de calcio del retículo endoplásmico mediada por  $IP_3$  (11), también afectan a canales de calcio de la membrana plasmática provocando una salida de dicho ion de la célula.

## 2. PRODUCCION DE SEGUNDOS MENSAJEROS: INOSITOL TRISFOSFATO Y DIACILGLICEROL

El inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) y el diacilglicerol procedentes de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de la membrana plasmática tras la estimulación celular, constituyen dos segundos mensajeros implicados en la regulación de una amplia variedad de procesos metabólicos y funcionales (9).

El  $IP_3$  generado a partir de los fosfolípidos de membrana constituye una señal temprana en la cascada de acontecimientos que tienen lugar desde la unión de un ligando a su receptor (9,147). El papel fundamental del  $IP_3$ , demostrado inicialmente por el grupo de Berridge (8), es la elevación del calcio citosólico procedente del retículo endoplásmico a través de la unión a los receptores específicos de  $IP_3$  que éste posee (11). La determinación de este metabolito en células tratadas con distintas sustancias permite establecer una relación entre la cantidad de  $IP_3$  generado y la liberación de calcio de depósitos intracelulares (tabla 2).

Los niveles de  $IP_3$  alcanzados con vasopresina y GRP en hepatocitos fetales y adultos es proporcional al aumento de  $Ca^{2+}$  observado en ambos. De acuerdo con su mecanismo de acción, la hidroquinona no produce variaciones significativas. Sin

embargo, el  $IP_3$  producido por el mastoparén y por la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol es muy superior cuando se compara con cualquiera de las hormonas. Esta observación resulta sorprendente ya que el calcio movilizado por mastoparén, fosfolipasa C, angiotensina II o ATP es similar, lo cual sugiere que la liberación de calcio del retículo dependiente de  $IP_3$  ya está saturada con los niveles de  $IP_3$  generados por los citados ligandos.

Las altas concentraciones de  $IP_3$  detectadas en hepatocitos estimulados con mastoparén sobrepasan la capacidad del retículo para liberar calcio, hecho que permite sugerir papeles adicionales a este segundo mensajero. El  $IP_3$ , además de funcionar como ligando de los receptores del retículo, es sustrato de numerosos enzimas que participan en el metabolismo de los fosfatidilinositales (11), cuyos metabolitos, como el inositol 1,3,4,5-tetrafosfato, están probablemente implicados en el control de la homeostasis del calcio (46,61).

El diacilglicerol (DAG) producido en la célula tras la llegada de un estímulo puede proceder de distintos fosfolípidos según el sistema implicado en la transducción de la señal. Las dos fuentes mayoritarias son el fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina, que por medio de fosfolipasas específicas dan lugar a moléculas de DAG de diferente composición y producidas a distintos tiempos.

El aumento de DAG detectado en los primeros minutos tras la unión de un ligando a su receptor, proviene de la hidrólisis de los fosfatidilinositales de la membrana plasmática y deberá ser proporcional al  $IP_3$  producido, ya que ambos proceden de la misma molécula. Sin embargo, como muestra la tabla 3, aunque existe una relación cualitativa entre  $IP_3$  y DAG, los niveles de este último son más elevados en algunos casos. La ausencia de un completo paralelismo entre ambos mensajeros puede ser debida tanto a la presencia de DAG en otros depósitos intracelulares (principalmente el retículo endoplásmico), indistinguible mediante nuestra técnica de ensayo del procedente del recambio de los fosfatidilinositales, como a la activación de otras fosfolipasas o enzimas del metabolismo de glicerolípidos.

Los resultados conjuntos de  $IP_3$  y diacilglicerol apuntan a la utilización de la vía de los fosfatidilinosítoles por todos los compuestos estudiados (VP, GRP, ANG, ATP y mastoparín), tanto en hepatocitos adultos como fetales, a excepción de la hidroquinona, confirmando su acción exclusivamente a nivel del retículo endoplásmico.

Extensos estudios que analizan la composición de ácidos grasos, indican que la formación de DAG en una fase tardía de la estimulación celular procede de la hidrólisis de fosfatidilcolina en varios tipos de células, incluidos hepatocitos, neutrófilos o algunas líneas celulares (12,13). La fosfatidiletanolamina parece una fuente minoritaria. El aumento sostenido de DAG ocurre en respuesta a varios mitógenos, factores de crecimiento o ésteres de forbol, que además activan la proteína quinasa C. Así, la estimulación de células Swiss 3T3 con bombesina produce efectos mediados por la proteína quinasa C a largo plazo, pero esto no sucede en fibroblastos incubados con  $\alpha$ -trombina (127).

En nuestro sistema de hepatocitos fetales, tratamos de estudiar por cromatografía en capa fina los metabolitos derivados de la hidrólisis de la fosfatidilcolina como otra de las posibles vías implicadas en la transducción de señales. La valoración del DAG producido hasta los 90 minutos por VP, GRP, ANG y ATP no presentó diferencias muy marcadas con los niveles encontrados en células no estimuladas (figura 8). La VP produjo un notable y rápido aumento en los primeros minutos, pero no fue sostenido en el tiempo; esta observación coincide con los valores de DAG analizados con la DAG quinasa, donde los niveles de DAG en el primer minuto exceden a los de  $IP_3$ . Sin embargo, otros trabajos demuestran que en hepatocitos adultos tratados con VP la fuente más importante de DAG (excepto en los primeros momentos) es la fosfatidilcolina (15,49). También con GRP se detectaron aumentos de DAG, mayores a partir de los 30 minutos, mantenidos hasta el final de la estimulación.

Una posible causa de los pequeños incrementos de DAG detectados a tiempos

largos es la existencia de un sistema rápido y específico que controla la producción y degradación de esta molécula de muy corta vida media (6). En plaquetas, el DAG es rápidamente transformado en ácido fosfatídico por una DAG quinasa (77), mientras que en linfocitos T es hidrolizado por DAG lipasa y otras esterasas inespecíficas. Como se comentará más adelante, también se analizó la activación de la fosfatidato fosfohidrolasa, que produce DAG a partir de ácido fosfatídico, como posible enzima implicado en el mecanismo de acción de algunos agonistas (22).

Además de DAG, en la hidrólisis de fosfatidilcolina también se producen fosfocolina (por acción de una fosfolipasa C específica) y colina (por acción de la fosfolipasa D) (49,133). A partir de la incorporación de ( $^3\text{H}$ )colina en la célula, se analizaron la formación de fosfatidilcolina, fosfocolina y colina en hepatocitos fetales estimulados con VP, GRP, ANG y ATP, mediante cromatografía de intercambio iónico. A diferencia de lo observado por otros grupos en fibroblastos estimulados con factores de crecimiento, mitógenos y ésteres de forbol (37), nosotros sólo detectamos variaciones en los niveles de los metabolitos analizados en células tratadas con VP; en este caso, y sólo hasta los 10 minutos, se apreciaron menores niveles de fosfatidilcolina y un consecuente aumento en la cantidad de colina respecto al control. La implicación de una fosfolipasa C ó D en este proceso no resulta precisa, ya que las distintas especies generadas por su acción son fácilmente interconvertibles por la participación de otros enzimas, como fosfatidato fosfohidrolasa o DAG quinasa (22,164).

La activación del enzima fosfatidato fosfohidrolasa de la membrana plasmática (diferente del caracterizado en retículo endoplásmico) por distintas hormonas se estudió como posible fuente en la generación de DAG a partir de ácido fosfatídico. Trabajos realizados por el grupo de Brindley (22,100) demuestran la activación por ácidos grasos insaturados y ésteres de forbol del enzima presente en retículo endoplásmico. Sin embargo, en nuestros experimentos con hepatocitos adultos y fetales estimulados por VP, GRP, ANG y ATP, no se ve afectada la actividad o distribución subcelular del enzima (figura 12).

La participación de proteínas quinasas en la regulación de la fosfatidato fosfohidrolasa se estudió mediante la estimulación con glucagón o ésteres de forbol, activadores de la proteína quinasa A y proteína quinasa C, respectivamente (figura 11). Tampoco en estas condiciones se apreciaron variaciones respecto a la situación control. Estudios en neutrófilos señalan una inhibición de la actividad catalítica del enzima por mecanismos independientes de proteína quinasa C (112). A la vista de estos resultados no parece probable la participación de la fosfatidato fosfohidrolasa en la vía de transducción utilizada por los ligandos estudiados, al menos en las etapas tempranas de la señalización.

### 3. ACTIVACION DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE CALCIO

La actividad de la glucógeno fosforilasa y la distribución subcelular de la proteína quinasa C pueden considerarse como dianas sensibles para determinar los efectos de las variaciones de calcio citosólico sobre enzimas intracelulares.

La glucógeno fosforilasa es un enzima transitoriamente activado a concentraciones de calcio entre 200 y 500 nM (43,157), siendo por tanto una actividad enzimática muy sensible para la cuantificación de pequeños cambios en el  $Ca^{2+}$  citosólico. Lo contrario ocurre con la redistribución subcelular de la proteína quinasa C, que es afectada por un amplio rango de concentraciones de  $Ca^{2+}$  dependiendo del tipo de célula estudiado (11,84), y concretamente en hígado adulto requiere niveles superiores a los necesarios para activar la glucógeno fosforilasa (43).

La activación de la glucógeno fosforilasa por vasopresina, GRP, angiotensina y ATP está de acuerdo con la movilización de calcio producida tanto en hepatocitos fetales como adultos, ya que las concentraciones de  $Ca^{2+}$  alcanzadas en todos los casos están por encima de 300 nM. En los primeros (figura 13A), todas las hormonas presentan un mismo patrón de activación, pero el efecto de la VP es menor en intensidad y duración. Por el contrario, en hepatocitos adultos (figura 13B) la



activación producida por GRP corresponde a menos del 50% del máximo conseguido por los otros ligandos; de hecho, esta hormona resulta menos eficaz en cuanto al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Los trabajos realizados con oleato en hepatocitos adultos (44) muestran una movilización de calcio inferior a 300 nM, que concuerda con una muy pequeña activación de la glucógeno fosforilasa.

Estos resultados permiten relacionar el aumento alcanzado en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico con la activación de la glucógeno fosforilasa, pero la actividad del enzima también podría ser modulada por otros mecanismos tales como fosforilación por proteína quinasa C o por proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. La contribución de la proteína quinasa C no es fácilmente evaluable, ya que los ésteres de forbol activan en cierta medida la fosforilasa, pero el papel de la proteína quinasa A no parece ser relevante en este proceso considerando la vía de transducción de señales utilizada por los agonistas estudiados.

La proteína quinasa C es un enzima ampliamente distribuido en todos los tejidos (21,118,167). Se encuentra presente tanto en la fracción citosólica como unido a las membranas de la célula, en proporción variable según el tejido considerado (116). Sin embargo, requiere su translocación a la membrana para ser activa, ya que es en esta estructura donde se encuentran los factores necesarios para su activación (6,115). La proteína quinasa C fue inicialmente caracterizada por Nishizuka en 1977 (150) como un enzima dependiente de calcio y fosfolípidos para su activación. Sin embargo, actualmente se conocen hasta nueve isoenzimas que difieren en cuanto a las necesidades de  $\text{Ca}^{2+}$  u otros cofactores para ser activos (115,123).

Dependiendo de la función y el metabolismo que presenten las células, se han observado distintos porcentajes de distribución subcelular. Así, en células quiescentes o con reducida actividad metabólica, como fibroblastos o linfocitos, la quinasa se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble y es translocada a la membrana tras estimulación con diversos ligandos (50,163). En otros tejidos con mayor actividad funcional, como el nervioso, el enzima unido a la fracción particulada es

significativamente mayor (54).

En cuanto a la distribución subcelular de la quinasa en el hígado, encontramos variaciones según el grado de diferenciación hepática (tabla 4). En condiciones basales, la proporción de enzima citosólico en hepatocitos fetales es del 75% frente a un 60% en adultos. Cuando las células son estimuladas con VP, GRP, ANG y ATP, se observan claras diferencias entre ambos tipos de células. En el estado adulto no se producen variaciones en el grado de distribución enzimática respecto a los valores control (figura 14). Esta situación había sido previamente descrita para la VP (43), donde se demostró que sólo con niveles de DAG y  $Ca^{2+}$  muy superiores a los producidos fisiológicamente por la hormona, se incrementa la fracción de enzima unido a membranas.

El comportamiento del hepatocito fetal tras la estimulación con los citados agonistas resultó diferente al adulto (figura 15). Se aprecia un aumento del contenido en enzima en la membrana dependiente del tiempo y relacionado con el nivel de  $Ca^{2+}$  citosólico alcanzado tras la estimulación. Con ATP y GRP se produjo el efecto máximo, que resulta doble en magnitud comparado con VP. Es interesante observar que la hidroquinona, que actúa inhibiendo la recaptación de calcio en el retículo endoplásmico (78), carece de efecto sobre la translocación de la quinasa a pesar de producir los máximos aumentos en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico. Este hecho sugiere la necesidad de componentes adicionales generados tras la unión de un ligando a receptores de la membrana plasmática para promover la translocación (probablemente diacilglicerol).

Una posible causa de la diferencia entre hepatocitos fetales y adultos respecto a la movilización de la proteína quinasa C, podría encontrarse en una desigual proporción de formas isoenzimáticas en ambos (7,84). Los isoenzimas presentan distintas características catalíticas y expresión diferencial en tejidos, así como localización intracelular específica (117).

Hasta ahora, las técnicas de clonaje y análisis bioquímicos han puesto de manifiesto la existencia de al menos nueve subespecies clasificadas en tres familias. La primera comprende  $\alpha$ ,  $\beta I/\beta II$  y  $\gamma$ ; requieren  $Ca^{2+}$  y DAG para su activación, que se ve aumentada por ácidos grasos cis-insaturados y lisofosfatidilcolina (117). A la segunda familia pertenecen  $\delta$  y  $\epsilon$  (independientes de  $Ca^{2+}$ , pero responden bien a ésteres de forbol, al igual que la primera familia),  $\eta$  y  $\theta$ , cuyos cofactores de activación se desconocen (95). El tercer grupo,  $\zeta$  y  $\lambda$ , ha sido recientemente identificado y tiene características atípicas (117).

A pesar de los extensos estudios realizados, no se conoce mucho acerca de las funciones específicas de cada subespecie. Sin embargo, es evidente que los miembros de esta gran familia no responden de la misma manera a  $Ca^{2+}$ , DAG u otros productos de la degradación de fosfolípidos, presentando distintos patrones de activación respecto a la extensión y duración de la respuesta, y quizás respecto a su localización intracelular (39,116). Es probable que cada subespecie esté presente en el compartimento adecuado en el tiempo adecuado y con sus sustratos específicos accesibles. Tales aspectos espacio-temporales de la degradación de fosfolípidos y activación de las subespecies de proteína quinasa C en la célula es un campo que requiere todavía mucha investigación.

Todos estos aspectos nos llevaron a estudiar los isoenzimas de proteína quinasa C existentes en hepatocitos fetales y adultos. El análisis de ambas poblaciones de células por Western blot (figura 17), mediante el uso de anticuerpos específicos para las formas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ , reveló un patrón de distribución análogo, estando ausente la forma  $\epsilon$ . Estas observaciones coinciden con lo descrito sobre la existencia de los isoenzimas  $\alpha$  y  $\delta$  en todos los tejidos del organismo (117), y la presencia mayoritaria de  $\epsilon$  en tejidos neurales (123).

Resultados similares se obtuvieron tras el aislamiento y posterior amplificación del RNA de hepatocitos por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante el uso de oligonucleótidos específicos para las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta I/\beta II$

y  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Como se ve en los geles de agarosa de la figura 16, la amplificación de DNA (procedente del RNA por transcripción inversa) resultó positiva para el isoenzima  $\delta$  y los pertenecientes a la primera familia, pero de nuevo ausente para la forma  $\epsilon$ , que sin embargo presenta características catalíticas y reguladoras muy similares a la  $\delta$  (106). Todos los experimentos de PCR se hicieron en paralelo, resultando menos abundantes los isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en el estado adulto. Aunque la amplificación por PCR no puede considerarse una técnica cuantitativa para la evaluación del contenido de RNAm, las diferencias detectadas en la amplificación de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  están de acuerdo con la cantidad de proteína inmunodetectada por Western blot. Estos resultados muestran que la expresión de las subespecies de proteína quinasa C analizadas es similar en el hígado fetal y adulto.

La presencia de los isoenzimas  $\eta$  y  $\zeta$  no ha sido estudiada, pero no parecen ser responsables de la diferente distribución subcelular de la proteína quinasa C en ambos tipos de hepatocitos, ya que por lo que se sabe hasta ahora, la segunda familia de isoenzimas es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (7), y las formas aisladas en hígado son en gran medida dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . En conclusión, estos resultados podrían reflejar la existencia de una cantidad de enzima unido permanentemente a la membrana en hepatocitos adultos (6), aunque se desconoce la trascendencia funcional de esta distribución. En otros tejidos también se han descrito situaciones parecidas (18,54,77).

#### 4. CARACTERIZACION DE RECEPTORES

Las diferencias cuantitativas en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  presentadas por los agonistas estudiados en este trabajo, y la observación de que la generación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$  con los ligandos a saturación es menor que la producida por la activación máxima de los elementos implicados en el sistema de transducción (proteínas G, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol,  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del retículo endoplásmico), nos llevó a estudiar si la respuesta hormonal podría estar relacionada con la abundancia de receptores de la membrana plasmática.

La vasopresina es un neuropéptido con efectos vasopresores y antidiuréticos, que como otras muchas hormonas y neurotransmisores ejerce sus acciones a través de distintos tipos de receptores. En hígado adulto se une al denominado por criterios farmacológicos  $V_{1a}$ , acoplado a la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositoles a través de proteínas G (10), mientras que en otros órganos los receptores  $V_2$  están acoplados al sistema adenilato ciclasa. El receptor de la bombesina, tetradecapéptido purificado de anfibio, o su homólogo en mamíferos el péptido liberador de gastrina (GRP) (143), ha sido caracterizado en células Swiss 3T3 como perteneciente al grupo de receptores con siete dominios transmembrana asociados a proteínas G; en otras células, como carcinoma humano de pulmón, se expresan dos subtipos de receptores (38). En fibroblastos estimulados con VP o bombesina se produce fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, pero este efecto no está mediado a través de receptores con actividad tirosina quinasa (170,171). La angiotensina es un octapéptido con acciones a nivel vascular, neuronal y regulador del transporte de electrolitos (92). En el hígado, el receptor está acoplado a dos sistemas de transducción, por una parte estimulando la vía de los fosfatidilinositoles y por otra inhibiendo el sistema adenilato ciclasa.

Los nucleótidos púricos, ATP y ADP, implicados en procesos biológicos tan diversos como agregación plaquetaria, contracción muscular, función cardiaca o glucogenolisis, ejercen sus funciones a través de receptores de membrana y son rápidamente degradados por ectonucleotidasas (159). En el hígado se unen a los llamados receptores del tipo  $P_{2Y}$  que transducen la señal a través de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles (33,81,82), al igual que otras hormonas glucogenolíticas como vasopresina y angiotensina II.

El análisis de receptores de vasopresina, GRP y angiotensina II en hepatocitos fetales y adultos demuestra que la cantidad de receptores por célula varía apreciablemente durante el desarrollo, aunque la afinidad es similar (tabla 5). En hepatocitos adultos el número de receptores de ANG o VP es dos y tres veces mayor que en células fetales, pero lo contrario sucede con receptores de GRP (seis veces

superior en el estado fetal) (figuras 18-20). Los resultados obtenidos en cuanto a movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y segundos mensajeros por VP y GRP, guardan paralelismo con la abundancia relativa de receptores en ambos tipos de células, lo cual indica que el GRP es una hormona con papel preponderante en el estado fetal.

Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos con el receptor purinérgico resulta más complejo. La saturación de la curva para ATP o para  $\text{ADP}\beta\text{S}$ , agonista más específico del receptor  $\text{P}_{2Y}$  (figuras 21 y 22), presenta enormes diferencias en la cantidad de receptores entre hepatocitos fetales y adultos, resultando hasta siete veces superior en estos últimos. La afinidad es similar en ambos tipos de células y queda en el rango de la concentración de ATP requerida para observar los efectos máximos en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ . A pesar de la diferencia en el número de receptores purinérgicos, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico o la activación de la glucógeno fosforilasa es equivalente en hepatocitos fetales y adultos, lo cual sugiere que presumiblemente la vía de transducción está siendo utilizada a niveles máximos de actividad incluso en células fetales.

Otros estudios realizados sobre receptores purinérgicos incluyen modulación heteróloga y análisis de la especificidad del receptor. La desensibilización es un mecanismo fundamental en la regulación de respuestas celulares ante estímulos externos producidos por la propia hormona (desensibilización homóloga) o por ligandos estructuralmente diferentes (heteróloga). En células de músculo liso los receptores de VP están modulados de las dos maneras (58); en este caso, el tiempo de exposición al agonista es un factor diferenciador entre ambos comportamientos. La VP produce desensibilización heteróloga de receptores de bombesina (104) y de ATP (81) en distintos tipos celulares.

Los experimentos de modulación heteróloga (tabla 6) realizados sobre el receptor de ATP y  $\text{ADP}\beta\text{S}$  con VP, GRP, ANG o EGF, no afectan al número de sitios de unión de su propio agonista en hepatocitos fetales. Por el contrario, se ha detectado un incremento en la unión del  $\text{ADP}\beta\text{S}$  a su receptor en hepatocitos adultos,

más acusado con ANG y EGF.

La especificidad del receptor purinérgico  $P_{2Y}$  frente a adenosina,  $Ap_4A$  (diadenosina tetrafosfato), GTP y AMP, no se ve afectada en células adultas (tabla 7). Esto está de acuerdo con lo observado en hígado adulto por el grupo de De Wulf, donde muestran que adenosina y AMP se unen a receptores acoplados a la vía adenilato ciclasa denominados  $P_1$  (33). Sin embargo, en nuestro sistema de hepatocitos fetales, adenosina y GTP producen una notable disminución en la unión de ATP a su receptor. Estos resultados muestran una diferencia entre células fetales y adultas respecto a la especificidad del receptor  $P_{2Y}$ .

Los ésteres de forbol, a través de la activación de la proteína quinasa C, su receptor biológico, son capaces de modular los efectos producidos por diversos ligandos, por actuación a distintos niveles de la vía de transducción de señales utilizada por éstos. Estudios realizados en hepatocitos sobre el receptor de EGF, demuestran una disminución de la unión de este factor de crecimiento a su receptor por incubación previa con ésteres de forbol (55). Efectos similares se han observado en fibroblastos debido a una disminución de la afinidad del receptor de EGF de alta afinidad, inducida por su fosforilación por proteína quinasa C (23).

En nuestro sistema de hepatocitos, la unión de VP, ATP o  $ADP\beta S$  a sus receptores correspondientes no se ve afectada por los ésteres de forbol en los 30 primeros minutos de la incubación de las células. El efecto es distinto forzando las condiciones de tiempo y concentración (400 ng/ml PDBu durante 3 horas) (tabla 8); en este caso se produce un aumento de tres veces en la unión de la VP a su receptor en células adultas, resultando asimismo significativo, aunque mucho menor en células fetales. Resultados de características similares se obtuvieron en el receptor de  $ADP\beta S$ , pero el de ATP no se vio afectado. Una interpretación del incremento de la unión de un ligando a su receptor tras incubación prolongada con ésteres de forbol (en condiciones tales que se produce inactivación de la proteína quinasa C), es el aumento del número de receptores en la membrana plasmática, para suplir el posible

desacoplamiento de la señal producido por el forbol.

Como conclusión del análisis detallado del proceso de transducción puede señalarse que algunos agonistas utilizan la vía a su máximo nivel de estimulación. En otros casos, el elemento limitante puede situarse en la abundancia relativa de receptores de membrana funcionalmente activos, el cual confiere características diferenciales entre distintas hormonas así como entre distintas etapas del desarrollo celular.



## **6. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Se han estudiado tanto las fuentes implicadas en las variaciones de calcio citosólico en respuesta a agonistas, como la intensidad de la señal producida respecto a una estimulación máxima de la vía de transducción.

a) El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tras estimulación con vasopresina, bombesina o GRP, angiotensina II y ATP procede de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico mediada por inositol trisfosfato y de una entrada del exterior a través de canales de la membrana plasmática. La respuesta es cualitativamente similar en hepatocitos fetales y adultos, pero cuantitativamente resultan más importante la vasopresina en el estado adulto y el GRP en el fetal.

b) Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular alcanzadas con mastoparén, fosfolipasa C de fosfatidilinositol exógena e hidroquinona, compuestos que actúan específicamente sobre distintos elementos de la vía de transducción, son equivalentes al  $\text{Ca}^{2+}$  movilizado por ATP o angiotensina. Sin embargo, a diferencia de las hormonas, la señal de calcio es sostenida en el tiempo. La estimulación posterior con otros agonistas produce una caída de la señal.

2. La generación de inositol 1,4,5-trisfosfato procedente de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, concuerda cualitativamente con la respuesta de calcio observada. Sin embargo, la cantidad de inositol trisfosfato producido por mastoparén y fosfolipasa C es significativamente mayor que la obtenida tras estimulación hormonal, lo cual sugiere un paso limitante para la liberación de calcio del retículo a nivel de los receptores de inositol trisfosfato que éste posee.

3. El DAG producido hasta las dos horas fue de mayor intensidad y duración con GRP en hepatocitos fetales, mientras que en los primeros minutos tras la estimulación hormonal la vasopresina tuvo importantes efectos en ambos tipos de células.

4. La actividad de la glucógeno fosforilasa, alcanza los máximos valores con ATP y angiotensina en los dos tipos de células estudiados, y de acuerdo con las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico observadas. Por el contrario, el efecto del GRP es doble en hepatocitos fetales que en adultos, resultando más importante la activación por vasopresina en éstos últimos.

5. Se ha realizado un estudio comparativo en hepatocitos fetales y adultos en cuanto a la distribución subcelular y perfil isoenzimático de la proteína quinasa C.

a) la proteína quinasa C se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble de la célula fetal, frente a una distribución equilibrada entre fracción soluble y particulada en la célula adulta. Esta diferencia en función de las distintas etapas del desarrollo, puede estar relacionada con el aumento de actividad del enzima en la membrana del hepatocito fetal en presencia de hormonas, hecho que no se produce en el estado adulto.

b) los isoenzimas de proteína quinasa C expresados en células adultas y fetales analizados a nivel de proteína y de la expresión del RNA mensajero, no presentan diferencias en ningún caso. Se ha comprobado la presencia de isoenzimas correspondientes a la primera familia ( $\alpha$  y  $\beta$ ), así como la forma  $\delta$ , pero no se expresa la forma  $\epsilon$ .

6. Existen apreciables diferencias en la modulación y número de receptores de vasopresina, GRP, angiotensina II, ATP y  $\text{ADP}\beta\text{S}$ , en cuanto a los receptores entre sí y entre el estado adulto y el fetal, aunque las afinidades resultan similares.

a) El número de receptores de vasopresina y angiotensina en células adultas es dos y tres veces superior que en fetales. Por el contrario, los receptores de GRP son seis veces más abundantes en el estado fetal. En todos los casos se observa un solo sitio de unión para estas hormonas.

b) El número de receptores purinérgicos de ATP y ADP $\beta$ S es entre siete y diez veces mayor en células adultas, presentando el ATP dos sitios de unión de diferente afinidad en estas células. La modulación por otras hormonas y la especificidad del receptor purinérgico P<sub>2Y</sub> también resultó diferente.

c) La incubación prolongada de las células con ésteres de forbol conduce a un aumento en la unión de vasopresina y ADP $\beta$ S a sus receptores, comparativamente mayor en hepatocitos adultos, mientras que el de ATP no parece ser afectado.

7. El análisis detallado del mecanismo de transducción de señales extracelulares de vasopresina, GRP, angiotensina y ATP revela que el principal elemento de control del proceso es la abundancia relativa del número de receptores de membrana funcionalmente activos, pudiéndose alcanzar en algunas condiciones, la saturación en la movilización de calcio intracelular.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, N.G., Kilgour, E., and Sturgill, T.W. (1991): Activation of mitogen-activated protein kinase in BC3H1 myocytes by fluoroaluminate. *J. Biol. Chem.* 266, 10131-10135.
2. Anderson, K., Lai, F.A., Liu, Q-Y, Rousseau, E., Erickson, H.P., and Meissner, G. (1989): Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor-Ca<sup>2+</sup> release channel complex. *J. Biol. Chem.* 264, 1329-1335.
3. Augert, G., Bocckino, S.B., Blackmore, P.F., and Exton, J.H. (1989): Hormonal stimulation of diacylglycerol formation in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 21689-21698.
4. Balsinde, J., Díez, E., and Mollinedo, F. (1988): Phosphatidylinositol-specific phospholipase D: a pathway for generation of a second messenger. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 502-508.
5. Barber, D.L. (1991): Mechanisms of receptor-mediated regulation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Cell. Signal.* 3, 387-397.
6. Bell, R.M. (1986): Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45, 631-632.
7. Bell, R.M., and Burns, D.S. (1991): Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266, 4661-4664.
8. Berridge, M.J. (1981): Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. *Mol. Cell Endocrinol.* 24, 115-140.

9. Berridge, M.J. (1984): Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220, 345-360.
10. Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.
11. Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1989): Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
12. Billah, M.M., and Anthes, J.C. (1990): The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem. J.* 269, 281-291.
13. Billah, M.M., Pai, J.K., Mullmann, T.J., Egan R.W., and Siegel, M.I. (1989): Regulation of phospholipase D in HL-60 granulocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 9069-9076.
14. Bjorge, J.D., and Kudlow, J.E. (1987): Epidermal growth factor receptor synthesis is stimulated by phorbol esters and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 262, 6615-6622.
15. Bocckino, S.B., Blackmore, P.F., and Exton, J.H. (1985): Stimulation of 1,2-diacylglycerol accumulation in hepatocytes by vasopressin, epinephrine, and angiotensin II. *J. Biol. Chem.* 260, 14201-14207.
16. Bocckino, S.B., Blackmore, P.F., Wilson, P.B., and Exton, J.H. (1987): Phosphatidate accumulation in hormone treated hepatocytes via PLD mechanism. *J. Biol. Chem.* 262, 21689-21698.
17. Bönner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C., and Brann, M.R. (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237, 527-532.

18. Boscá, L., Márquez, C., and Martínez, A.C. (1989): Lack of correlation between translocation and biological effects mediated by protein kinase C: an appraisal. *Immunol. Today*. 7, 223-224.
19. Boscá, L. and Morán, F. (1993): Circular dichroism analysis of ligand-induced conformational changes in protein kinase C. *Biochem. J.* 290, 827-832.
20. Bradford, M.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.
21. Brand, S.J., Niedel, J.E., Bell, R., and Young, W.S. (1987): Distinct patterns of expression of protein kinase C mRNAs in rat tissues. *Cell* 49, 57-63.
22. Brindley, D.N. (1984): Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog. Lipid Res.* 23, 115-133.
23. Brown, K.D., Blakeley, D.M., Hamon, M.H., Laurie, M.S., and Corps, A.N. (1987): PKC-mediated negative-feedback inhibition of unstimulated and bombesin-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in Swiss-mouse 3T3 cells. *Biochem. J.* 245, 631-639.
24. Buday, L., Seprödi, J., Farkas, G., Mészáros, G., and Farago, A. (1987): Proteolytic activation of protein kinase C in the extracts of cells treated for a short time with phorbol esters. *FEBS Lett.* 223, 15-19.
25. Burgess, G.M., McKinney, J.S., Irvine, R.F., and Putney, J.W. (1985): Inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4-trisphosphate formation in calcium-mobilization hormone-activation cells. *Biochem. J.* 232, 237-243.



26. Bushfield, M., Murphy, G.J., Lavan, B.E., Parker, P.J., Hruby, V.J., Milligan, G., and Houslay, M.D. (1990): Hormonal regulation of Gi2  $\alpha$ -subunit phosphorylation in intact hepatocytes. *Biochem. J.* 268, 449-457.
27. Camps, M., Hou, C., Sidiropoulos, D., Stock, J.B., Jakobs, K.H., and Gierschik, P. (1992): Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein  $\beta\gamma$  subunits. *Eur. J. Biochem.* 206, 821-831.
28. Carafoli, E. (1987): Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 5113-5117.
29. Carozzi, A., Camps, M., Gierschik, P., and Parker, P.J. (1993): Activation of phosphatidyl inositol lipid-specific PLC- $\beta_3$  by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *FEBS Lett.* 315, 340-342.
30. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982): Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
31. Chabre, M. (1990): Aluminofluoride and beryllofluoride complexes: new phosphate analoges in enzymology. *Trends Biochem. Sci.* 15, 6-10.
32. Chardonens, D., Lang, U., Rossier, M.F., Capponi, A.M., and Valloton, M.B. (1990): Inhibitory and stimulatory effects of phorbol esters on vasopressin-induced cellular responses in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 265, 10451-10457.
33. Charest, R., Blackmore, P.F., and Exton, J.H. (1985): Characterization of responses of isolated rat hepatocytes to ATP and ADP. *J. Biol. Chem.* 260, 15789-15794.

34. Chirgwin, J.J., Przbyla, A.E., MacDonlad, R.J., and Rutter, W.J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5300.
35. Cobbold, P.H. and Rink, T.J. (1987): Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* 248, 313-328.
36. Cochet, C., Souvignet, C., Keramidas, M., and Chanbaz, E.M. (1986): Altered catalytic properties of protein kinase C in phorbol esters treated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 1031-1037.
37. Cook, S.J. and Wakelam, J.O. (1989): Analysis of the water-soluble products of phosphatidylcholine breakdown by ion-exchange chromatography. *Biochem. J.* 263, 581-587.
38. Corjay, M.H., Dobrzanski, D.J., Way, M.J., Viallet, J., Shapira, H., Worland, P., Sausville, E.A., and Battey, J.F. (1991): Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 266, 18771-18779.
39. Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., and Ullrich, A. (1986): Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science* 233, 859-866.
40. Crane, J.K., Campanile, C.P., and Garrison, C.J. (1982): The hepatic angiotensin II receptor. Effect of guanine nucleotides and interaction with cyclic AMP production. *J. Biol. Chem.* 257, 4959-4965.
41. Czech, M.P., Klarlund, J.K., Yagaloff, K.A., Bradford, A.P., and Lewis, R.E. (1988): Insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 263, 11017-11020.

42. Devreotes, P. (1989): *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science* 245, 1054-1058.
43. Díaz-Guerra, M.J.M., and Boscá, L. (1990): Lack of translocation of protein kinase C from the cytosol to the membranes in vasopressin stimulated hepatocytes. *Biochem. J.* 269, 163-168.
44. Díaz-Guerra, M.J.M., Junco, M., and Boscá, L. (1991): Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 23568-23576.
45. Dobrowsky, R.T., and Hannun, Y.A. (1992): Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267, 5048-5051.
46. Downes, C.P., and Michell, R.H. (1985): Inositol phospholipid breakdown as a receptor controlled generator of second messengers. *Molecular mechanisms in cellular regulation. Mol. Aspects Transmembr. Signal.* 4, 3-56.
47. Dressler, K.A., Mathias, S., and Kolesnick, R.N. (1992): Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* 255, 1715-1718.
48. Duddy, S.K., Kass, G.E.N., and Orrenius, S. (1989):  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing hormones stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 20863-20866.
49. Exton, J.H. (1990): Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265, 1-4.
50. Farrar, W.L., and Anderson, W.B. (1985): Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane. *Nature* 315, 233-236.

51. García-Sáinz, J.A. (1987): Pathways of the  $\alpha_1$ -adrenergic action. Comparison with  $V_1$ -vasopressin and  $A_1$ -angiotensin. *Circ. Res.* 61, Suppl. II, 1-5.
52. García-Sáinz, J.A., Macías-Silva, M., and Romero-Avila, M.T. (1991): Effect of okadaic acid in hormone and mastoparan-stimulated phosphoinositide turnover in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 852-858.
53. Gilman, A.G. (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
54. Girard, P.R., Mazzei, G.J., and Kuo, J.F. (1986): Immunological quantitation of phospholipid  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase and its fragments. *J. Biol. Chem.* 261, 370-375.
55. Gladhaug, I.P., Refsnes, M., and Christoffersen, T. (1992): Regulation of surface expression of high-affinity receptors for epidermal growth factor (EGF) in hepatocytes by hormones, differentiating agents, and phorbol esters. *Digestive Diseases and Sci.* 37, 233-239.
56. Gopalakrishna, R., Barsky, S.H., Thomas, T.P., and Anderson, W.P. (1986): Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol esters-induced membrane association of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 261, 16438-16445.
57. Grienkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985): A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
58. Grier III, C.E., Nambi, P., Aiyar, N., and Crooke, S.T. (1989): Molecular mechanisms of homologous and heterologous desensitization mediated by vasopressin in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 264, 5384-5391.

59. Hallam, T.J., and Rink, T.J. (1989): Receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: diversity of function and mechanism. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 8-10.
60. Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
61. Hansen, C.A., Mah, S., and Williamson, J.R. (1986): Formation and metabolism of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in liver. *J. Biol. Chem.* 261, 8100-8103.
62. Hansen, C.A., Yang, L., and Williamson, J.R. (1991): Mechanisms of receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 18573-18579.
63. Haslam, R.J., and Davidson, M.M.L. (1984): Guanine nucleotides decrease in the free  $\text{Ca}^{2+}$  required for secretion of serotonin from permeabilized blood platelets. Evidence of a role of a GTP-binding protein in platelet activation. *FEBS Lett.* 174, 90-95.
64. Hepler, J.R., and Gilman, A.G. (1992): G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
65. Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macías-Silva, M., Plebanski, M., and García-Sáinz, J.A. (1988): Homologous and heterologous desensitization in hepatocytes. Additivity and effect of pertussis toxin. *Biochem. Biophys. Acta.* 972, 311-319.
66. Higashijima, T., Burnier, J., and Ross, E.M. (1990): Regulation of  $G_i$  and  $G_o$  by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.* 265, 14176-14186.
67. Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., and Ross, E.M. (1988): Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding

- regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263, 6491-6494.
68. Hii, C.S.T., Edwards, S.H., and Murray, A.W. (1991): Phorbol ester-stimulated hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine by phospholipase C in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 266, 20238-20243.
69. Hill, T.D., Dean, N.M., and Bonyton, A.L. (1988): Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate induces  $Ca^{2+}$  sequestration in rat liver cells. *Science* 242, 1176-1178.
70. Holbrook, P.G., Pannell, J.K., Murata, Y., and Daly, J.W. (1992): Molecular species analysis of a product of phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* 267, 16834-16840.
71. Howl, J., Ismail, T., Strain, A.J., Kirk, C.J., Anderson, D., and Wheatley, M. (1991): Characterization of the human liver vasopressin receptor. *Biochem. J.* 276, 189-195.
72. Huang, K.P., Huang, F.L., Nakabatashi, A., and Yoshida, Y. (1988): Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 263, 14839-14845.
73. Hue, L., Bontemps, F., and Hers, H.G. (1975): The effect of glucose and of potassium ions in the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and glycogen synthetase in isolated rat liver preparation. *Biochem. J.* 152, 105-114.
74. Irvine, R.F. (1990): 'Quantal'  $Ca^{2+}$  release and the control of  $Ca^{2+}$  entry by inositol phosphates: a positive mechanism. *FEBS Lett.* 263, 5-9.
75. Irvine, R.F., and Moor, R.M. (1986): Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent of external

Ca<sup>2+</sup>. *Biochem. J.* 240, 917-920.

76. Junco, M., Dfáz-Guerra, M.J.M., and Boscá, L. (1990): Substrate-dependent inhibition of protein kinase C by specific inhibitors. *FEBS Lett.* 263, 169-171.

77. Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., and Fujikura, T. (1983): Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J. Biol. Chem.* 258, 6701-6704.

78. Kass, G.E.N., Duddy, S.K., Moore, G.A., and Orrenius, S. (1989): 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. *J. Biol. Chem.* 264, 15192-15198.

79. Kawanishi, T., Blank, L.M., Harootunian, A.T., Smith, M.T., and Tsien, R.Y. (1989): Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by hormonal stimulation of individual Fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 12859-12866.

80. Kazlauskas, A., and Cooper, J.A. (1989): Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* 58, 1121-1132.

81. Keppens, S., and De Wulf, H. (1985): P<sub>2</sub>-purinergic control of liver glycogenolysis. *Biochem. J.* 231, 797-799.

82. Keppens, S., and De Wulf, H. (1986): Characterization of the liver P<sub>2</sub>-purinoreceptor involved in the activation of glycogen phosphorylase. *Biochem. J.* 240, 367-371.

83. Keppens, S., and De Wulf, H. (1991): Characterization of the biological effects of 2-methylthio-ATP on rat hepatocytes: a clear cut-difference with ATP. *Br. J.*

Pharmacol. 104, 301-304.

84. Kikkawa, U., Kishimoto, A., and Nishizuka, Y. (1989): The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 31-44.
85. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., and Nishizuka, Y. (1982): Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 257, 13341-13348.
86. Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M., and Nishizuka, Y. (1983): Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* 258, 1156-1164.
87. Kiss, Z., and Deli, E. (1992): Regulation of phospholipase D by sphingosine involves both protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* 288, 853-858.
88. Krebs, H.A., Cornell, N.E., Lund, P., and Hems, R. (1974): Isolated liver cells as experimental material. *En Regulation of Hepatic Metabolism*, editado por F. Lundquist y N. Tygstrup, Copenhagen, Munksgaard: 726-750.
89. Krebs, H.A., and Henseleit, K. (1932): Untersuchungen über die Harstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem.* 210, 33-38.
90. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227, 680-685.
91. Lapetina, E.G., and Cuatrecasas, P. (1979): Stimulation of phosphatidic acid production in platelets precedes the formation of arachidonate and parallels the release of serotonin. *Biochim. Biophys. Acta.* 573, 394-402.



92. Léan De, A., Ong, H., Gutkowska, J., Schiller, P.W., and McNicoll, N. (1984): Evidence for agonist-induced interaction of angiotensin receptor with a guanine nucleotide-binding protein in bovine adrenal zona glomerulosa. *Mol. Pharmacol.* 26, 498-508.
93. Lee, C.H., Park, D., Wu, D., Rhee, S.G., and Simon, M.I. (1992): Members of the  $G_q$   $\alpha$  subunit gene family activate phospholipase C  $\beta$  isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 16044-16047.
94. Liang, M., and Garrison, J.C. (1991): The Epidermal Growth Factor receptor is coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 13342-13349.
95. Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E., and Stabel, S. (1992): Protein kinase C group B members PKC- $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\zeta$  and PKC-L( $\eta$ ). *Biochem. J.* 283, 781-787.
96. Llopis, J., Kass, G.E.N., Gahm, A., and Orrenius, S. (1992): Evidence for two pathways of receptor-mediated  $Ca^{2+}$  entry in hepatocytes. *Biochem. J.* 284, 243-247.
97. Low, M.G., and Saltiel, A.R. (1988): Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science.* 239, 268-275.
98. Marais, R.M., and Parker, P.J. (1989): Purification and characterisation of bovine brain protein kinase C isotypes  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . *Eur. J. Biochem.* 182, 129-137.
99. Martín-Sanz, P., Cascales, M., and Boscá, L. (1989): Glucagon-induced changes in fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2 kinase in cultured foetal hepatocytes. *Biochem. J.* 257, 795-799.
100. Martín-Sanz, P., Hopewell, R., and Brindley, D.N. (1985): Spermine promotes translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to the microsomal

fraction of rat liver and it enhances the effect of oleate in this respect. FEBS Lett. 179, 262-266.

101. May, D.C., and Ross, E.M. (1988): Rapid binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to an apparent complex of  $\beta$ -adrenergic receptor and the GTP-binding regulatory protein G<sub>i</sub>. *Biochemistry* 27, 4888-4893.

102. McCarthy, S.A., Hallam, T., and Merrit, J.E. (1989): Activation of protein kinase C in human neutrophils attenuates agonist-stimulated rises in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration by inhibiting bivalent-cation influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release in addition to stimulating Ca<sup>2+</sup> efflux. *Biochem. J.* 264, 357-364.

103. Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, S., Sacco, O., Sparatore, B., and Horecker, B.L. (1986): The involvement of calpain in the activation of protein kinase C in neutrophils stimulated by phorbol myristic acid. *J. Biol. Chem.* 261, 4101-4105.

104. Millar, J.B.A., and Rozengurt, E. (1989): Heterologous desensitization of bombesin-induced mitogenesis by prolonged exposure to vasopressin: a postreceptor signal transduction block. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3204-3208.

105. Millard, P.J., Ryan, T.A., Webb, W.W., and Fewtrell, C. (1989): Immunoglobulin E receptor cross-linking induces oscillations in intracellular free ionized calcium in individual tumor mast cells. *J. Biol. Chem.* 264, 19730-19739.

106. Mizuno, K., Kubo, K., Saido, T.C., Akita, Y., Osada, S., Kuroki, T., Ohno, S., and Suzuki, K. (1991): Structure and properties of an ubiquitously expressed protein kinase C  $\delta$ . *Eur. J. Biochem.* 202, 931-940.

107. Molleyres, L.P., and Rando, R.R. (1988): Structural studies on the diglyceride-mediated activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 14832-14838.

108. Mollner, S., and Pfeuffer, T. (1988): Two different adenylyl cyclases in brain distinguished by monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* 171, 265-271.
109. Moore, G.A., McConkey, D.J., Kass, G.E.N., O'Brien, P.J., and Orrenius, S. (1987): 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone- a novel inhibitor of liver microsomal  $Ca^{2+}$  sequestration. *FEBS Lett.* 224, 179-182.
110. Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Escobedo, J.A., Rapp, U.R., Roberts, T.M., and Williams, L.T. (1989): Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf 1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF-receptor. *Cell* 58, 649-657.
111. Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335-350.
112. Mullmann, T.J., Siegel, M.C., Egan, R.W., and Billah, M.M. (1991): Sphingosine inhibits phosphatidate phosphohydrolase in human neutrophils by a protein kinase C independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 266, 2013-2016.
113. Murray, A.W., Fournier, A., and Hardy, S.J. (1987): Proteolytic activation of protein kinase C, a physiological reaction?. *Trends Biochem. Sci.* 12, 53-54.
114. Nicotera, P., McConkey, D.J., Jones, D.P., and Orrenius, S. (1989): ATP stimulates  $Ca^{2+}$  uptake and increases in the free  $Ca^{2+}$  concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 453-457.
115. Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308, 693-698.
116. Nishizuka, Y. (1986): Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.

117. Nishizuka, Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
118. Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., and Suzuki, K. (1987): Tissue-specific expression of the three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature* 325, 161-166.
119. Olivier, K.G., Putney, J.W., Jr. Obie, J.F., and Shears, S.B. (1992): The interconversion of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol tetrakisphosphates in AR4-2J cells. *J. Biol. Chem.* 267, 21528-21534.
120. Olivier, A.R., and Parker, P.J. (1991): Expression and characterization of protein kinase C- $\delta$ . *Eur. J. Biochem.* 200, 805-810.
121. Olivier, A.R., and Parker, P.J. (1992): Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J. Cell. Physiol.* 152, 240-244.
122. Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1987): Identification of three additional members of rat protein kinase C family;  $\delta$ -,  $\epsilon$ -, and  $\zeta$ - subspecies. *FEBS Lett.* 266, 125-128.
123. Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1988): The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 263, 6927-6932.
124. Orellana, S., Solski, P.A., and Brown, H. (1987): Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-dependent inositol triphosphate formation in membranes is inhibited by phorbol ester and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262, 1638-1643.
125. Pan, T., Gierdroc, D.P., and Coleman, J.E. (1989):  $^1\text{NMR}$  studies of  $T_4$  gene 32 protein: effects of zinc removal and reconstitution. *Biochemistry* 28, 8828-8832.

126. Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D., and Ullrich, A. (1986): The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* 233, 853-859.
127. Parker, P.J., Kour, G., Marais, R.M., Mitchell, F., Pears, C., Schaap, D., Stabel, S., and Webster, C. (1989): Protein kinase C- a family affair. *Mol. Cell. Endocrinol.* 65, 1-11.
128. Paulssen, E.J., Paulssen, R.H., Gautvik, K.M., and Gordeladze, J.O. (1992): 'Cross-talk' between phospholipase C and adenylyl cyclase involves regulation of G proteins levels in GH3 rat pituitary cells. *Cell. Signal.* 4, 747-755.
129. Pawson, T., and Gish, G.D. (1992): SH<sub>2</sub> and SH<sub>3</sub> domains: from structure to function. *Cell* 71, 359-362.
130. Pears, C.G., and Parker, P.J. (1991): Domain interactions in protein kinase C. *J. Cell Science.* 100, 683-686.
131. Pearson, R.B., Wettenhall, R.E.M., Means, A.R., Hartshorne, D.J., and Kemp, B.E. (1988): Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science* 241, 970-973.
132. Pingel, J.T., and Thomas, M.L. (1989): Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 58, 1055-1065.
133. Plevin, R., Cook, S.J., Palmer, S., and Wakelam, J.O. (1991): Multiple sources of *sn*-1,2-diacylglycerol in platelet-derived-growth factor-stimulated Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* 279, 559-565.
134. Przywara, D.A., Chowdhury, P.S., Bhave, S.V. Wakade, T.D., and Wakade,

A.R. (1993): Barium-induced exocytosis is due to internal calcium release and block of calcium efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 557-561.

135. Pyne, N.J., Murphy G.J., Milligan, G., and Houslay, M.D. (1989): Treatment of intact hepatocytes with either the phorbol ester TPA or glucagon elicits the phosphorylation and functional inactivation of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein G<sub>i</sub>. *FEBS Lett.* 243, 77-82.

136. Rando, R., and Young, N. (1984): The stereospecific activation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 818-822.

137. Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H., and Lee, S.Y. (1989): Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244, 546-550.

138. Roach, P.J., and Goldman, M. (1983): Modification of glycogen synthase activity in isolated rat hepatocytes by tumor-promoting phorbol esters: evidence for differential regulation of glycogen synthase and phosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 7170-7172.

139. Robishaw, J.D., Smigel, M.D., and Gilman, (1986): Molecular basis for two forms of G protein that stimulates adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 261, 9587-9590.

140. Schlessinger, J. (1988): Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 13, 443-447.

141. Sheiknejad, R.G., and Srivastava, P.N. (1986): Isolation and properties of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C from bull seminal plasma. *J. Biol. Chem.* 261, 7544-7549.

142. Sibley, D.R., Benovic, J.R., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987): Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell* 48, 913-922.

143. Spindel, E.R., Giladi, E., Brehm, P., Goodman, R.H., and Segerson, T.P. (1990): Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Mol. Endo.* 4, 1956-1963.
144. Stalmans, W., and Hers, H.G. (1975): The stimulation of liver phosphorylase by AMP, fluoride and sulfate. *Eur. J. Biochem.* 54, 341-350.
145. Stassen, F.L., Schimidt, D.B., Papadopoulos, M., and Sarau, H.M. (1989): Prolonged incubation with phorbol esters enhanced vasopressin-induced calcium mobilization and polyphosphatidylinositol hydrolysis of vesicular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 264, 4916-4923.
146. Strasser, R.H., Sibley, D.R., and Lefkowitz, R.J. (1986): A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for  $\beta$ -adrenergic receptor phosphorylation in wild type and mutant  $S_{49}$  lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry* 25, 1371-1377.
147. Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983): Release of  $Ca^{2+}$  from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature.* 306, 67-69.
148. Suh, P.G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W., and Rhee, S.G. (1988): Inositol phospholipid-specific phospholipase C complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase related-oncogene products. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85, 5419-5423.
149. Switzer, R., Merrill, C.R., and Shifrin, S. (1979): A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 98, 231-237.

150. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. (1977): Studies in a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* 252, 7603-7609.
151. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y. (1979): Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254, 3692-3695.
152. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., and Numa, S. (1989): Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339, 439-445.
153. Tang, W.J., and Gilman, A.G. (1992): Adenylyl cyclases. *Cell* 70, 869-872.
154. Taylor, C.W. (1990): The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem. J.* 272, 1-13.
155. Taylor, S.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G., and Exton, J.H. (1991): Activation of the  $\beta_1$  isozyme of phospholipase C by  $\alpha$  subunits of the  $G_q$  class of G proteins. *Nature* 350, 516-518.
156. Taylor, C.W., and Marshall, I.C. (1992): Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: a complex relationship. *Trends Biochem. Sci.* 17, 403-407.
157. Thomas, A.P., Alexandre, A., and Williamson, J.R. (1984): Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic  $Ca^{2+}$  induced by vasopressin in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 5574-5584.
158. Tohkin, M., Yagami, T., and Matsubara, T. (1990): Mastoparan, a peptide toxin



from wasp venom, stimulates glycogenolysis mediated by an increase of the cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration but not by an increase of cAMP in rat hepatocytes. FEBS Lett. 260, 179-182.

159. Torres, M., Pintor, J., and Miras-Portugal, M.T. (1990): Presence of ectonucleotidases in cultured chromaffin cells: hydrolysis of extracellular adenine nucleotides. Arch. Biochem. Biophys. 279, 37-44.

160. Walsh, J.P., and Bell, R.M. (1986): *sn*-1,2-diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261, 6239-6247.

161. Wang, H., Lipfert, L., Malbon, C., and Bahouth, S. (1989): Site directed antipeptide antibodies define the topography of the  $\beta$ -adrenergic receptor. J. Biol. Chem. 264, 14424-14431.

162. Williams, M., and Cusack, N.J. (1990): Neuromodulatory roles of purine nucleosides and nucleotides: their receptors and ligands. Neurotransmissions VI 1, 1-7

163. Wrenn, D.S., and Parks, W. (1987): Protein kinase C in fibroblasts. Characteristics of its intracellular location during growth and after exposure to phorbol esters and other mitogens. J. Biol. Chem. 262, 14356-14360.

164. Wright, T.M., Shin, H.S., and Raben, D.M. (1990): Sustained increase in 1,2-diacylglycerol precedes DNA synthesis in epidermal-growth-factor-stimulated fibroblasts. Biochem. J. 267, 501-507.

165. Yang, L., Batty, G., Rhee, S.G., Manning, D., Hansen, C.A., and Williamsom, J.R. (1991): Pertussis toxin-sensitive G<sub>i</sub> involvement in Epidermal Growth Factor-induced activation of PLC- $\gamma$  in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 266, 22451-22458.

166. Yatani, A., Mattera, R., Codina, J., Graf, R., Okabe, K., Padrell, E., Iyengar,

R., Brown, A.M., and Birnbaumer, L. (1988): The G protein gated atrial K<sup>+</sup> channel is stimulated by three distinct G<sub>i</sub>α subunits. *Nature* 336, 680-682.

167. Yoshida, Y., Huang, F.L., and Kuo, H. (1988): Tissue distribution and developmental expression of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 263, 9868-9873.

168. Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1987): Crosstalk between cellular signaling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. *Nature* 327, 67-70.

169. Young, S., Parker, P.J., Ullrich, A., and Stabel, S. (1987): Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244, 775-779.

170. Zachary, I., Gil, J., Lehmann, W., Sinnet-Smith, J., and Rozengurt, E. (1991): Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 4577-4581.

171. Zachary, I., Sinnet-Smith, J., and Rozengurt, E. (1991): Stimulation of tyrosine kinase activity in anti-phosphotyrosine immune complexes of Swiss 3T3 cell lysates occurs rapidly after addition of bombesin, vasopressin, and endothelin to intact cells. *J. Biol. Chem.* 266, 24126-24133.