

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA  
BIOLOGIA



REDISTRIBUCION INTRACELULAR DEL RECEPTOR DE INSULINA  
DURANTE LA REGENERACION HEPATICA POST INTOXICA-  
CION CON TETRACLORURO DE CARBONO EN RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

ISMAEL LEDESMA MATEOS

LOS REYES IZTACALA

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A todos aquellos que sepan  
que lo merecen.

"Quien dice 'instante' dice 'instante fatal': el instante es el involucramiento recíproco y contradictorio del antes por el después; se es todavía lo que se va a dejar de ser y ya se es lo que se va a ser; se vive su muerte, se muere su vida; se siente uno mismo y otro, lo eterno está presente en un átomo de duración; en el seno de la vida más plena se presiente que no se hará más que sobrevivir, se teme al porvenir."

Jean Paul Sartre

" Todas las relaciones fijas, estancadas, con su antigua y venerable sucesión de prejuicios y opiniones, se desechan, y todas las recién formadas pierden actualidad antes de cosificarse. Todo lo que es sólido se evapora en el aire todo lo que es sagrado se profana, y los hombres, al final, tienen que enfrentarse a las condiciones reales de sus vidas y sus relaciones con sus semejantes."

Karl Marx

Este trabajo fué desarrollado en el laboratorio N° 27 del departamento de Bioquímica del CINVESTAV del IPN, durante el año de 1983 bajo la dirección del M. en C. Jaime Ricardo Flores Riveros y la asesoría del Dr. Boanerges Rubalcava Esparza, a quienes manifiesto mi más sincero agradecimiento.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION _____	1
ANTECEDENTES _____	7
MATERIAL Y METODOS _____	12
RESULTADOS _____	23
DISCUSION _____	45
REFERENCIAS _____	52

## INTRODUCCION

Uno de los problemas fundamentales de la Biología actual, es el de la comprensión y manipulación de los procesos que controlan la proliferación celular y particularmente en los sistemas eucarióticos. Dicha cuestión reviste importancia, tanto, desde un punto de vista teórico, como desde una perspectiva - aplicativa.

Desde un enfoque básico el conocimiento de los procesos - que desencadenan y controlan la proliferación de las células, la identificación de las moléculas y células que participan en ello, y la manera como ocurre, resulta a todas luces fundamental y en última instancia puede permitirnos entender un poco - más los fenómenos de crecimiento, desarrollo y continuidad de la vida. Desde un punto de vista aplicado, la importancia de este conocimiento es enorme, puesto que abre la perspectiva de control y manipulación de todos aquellos procesos mencionados, los cuales son de gran interés para la vida del hombre.

Sin embargo, el abordar este problema, tiene como condición, el contar con un adecuado sistema de estudio, de fácil acceso, que permita apreciar los elementos que participan en - el proceso.

El hígado de rata durante la regeneración ha resultado - ser un sistema útil para el abordaje experimental del problema. Gran número de modelos interesantes han sido empleados en este

terreno, los cuales incluyen al riñon hipertrofiado, al hígado embrionario o fetal y en regeneración. Este último, tiene un gran número de ventajas que lo hacen deseable para la investigación:

1. Porque el método de preparación del modelo es relativamente simple, pudiendo producirse por una Hepatectomía parcial o bien por una intoxicación aguda con tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ).
2. La cantidad de tejido que puede ser obtenido para un estudio es de varios gramos por rata y por tanto es conveniente para varios ensayos.
3. En el caso de la hepatectomía parcial, ésta es seguida por un período de sincronización de los hepatocitos, siendo posible que aproximadamente el 60% del total de las células parenquimatosas entren en mitosis (1), dándose desde una hasta un promedio de 213 mitosis por cada 10,000 células - al cabo de 24 horas después de extirpar el 75% del órgano, ritmo que disminuye al alcanzar el 110% del tamaño original (2).

Para el caso del  $CCl_4$ , es sabido que es un potente hepatotóxico, de forma tal que una dosis intragástrica de dicho compuesto puede generar un profundo daño hepático el cual se manifiesta en graves alteraciones estructurales del retículo endo-

plasmático concomitantes con cambios en la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana de ese organelo y en una disminución de la incorporación de glicina radiactiva a proteína (3) (4) (5), necrosis de células centrolobulares (6) y acumulación intracelular de lípidos (7) entre otros efectos. En consecuencia de ellos se da una rápida proliferación de las células sobrevivientes, con incremento en la síntesis tanto de DNA como de RNA; alcanzándose la mayor tasa de regeneración entre las 36 a 72 horas posteriores a la administración del tóxico (8).

Por todo lo dicho, el hígado regenerante es particularmente conveniente para el estudio de uno de los más profundos problemas de la biología celular de hoy, que sería el del conocimiento de los factores responsables del mantenimiento del tamaño relativo de los órganos más o menos constante durante el crecimiento y desarrollo (1) y la respuesta a la pregunta de ¿Cómo se controla la proliferación celular, de la que de una forma u otra depende la morfogénesis?.

Por otro lado, es sabido que las poblaciones celulares de los animales adultos pueden clasificarse, en términos de su capacidad para proliferar, en tres categorías :

- a. Intermitóticas vegetativas, en las que las mitosis son frecuentes en condiciones fisiológicas: Epitelio intestinal, médula ósea y células de la capa basal de la piel.

- b. Postmitóticas reversibles como son las células del hígado y el riñón en las que las mitosis son excesivamente raras, pero que se pueden incrementar marcadamente si el tejido es estimulado para que crezca.
- c. Postmitóticas estables, como las neuronas, leucocitos polimorfonucleares y células queratinizadas de la epidermis en las cuales las mitosis no se observan (9).

Es claro que las células del tejido hepático corresponden a la segunda categoría, pudiéndonos preguntar ¿Qué hace que dicho tejido no prolifere normalmente en el adulto, y que sí lo haga bajo cierta estimulación? ¿Cuáles son las características de esta estimulación y cuál es su mecanismo?.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el control de la proliferación en tejidos adultos, entre ellas estarían las que sugieren la presencia de factores estimuladores (10) (11) (12), las que proponen una sustancia con actividad inhibitoria (13) (14) (15) y las que plantean mecanismos combinados de estimulación e inhibición (16).

En cuanto a la regeneración hepática, aunque, este fenómeno posterior a una remoción parcial del órgano fue estudiado desde 1880, no fue descrito de manera formal hasta 1931 por Higgins y Anderson (17) y a pesar de los numerosos estudios que acerca de la bioquímica de este proceso se han realizado, es hasta cierto punto desconocida la identidad y modo de acción

específico de los estímulos para el rápido crecimiento regenerativo.

Muchos factores como un exceso de presión sanguínea en los lóbulos hepáticos remanentes a la resección, exceso de carga metabólica en el remanente, baja en la concentración de un supuesto inhibidor del crecimiento presente en el hígado intacto o una influencia presente en la sangre (factor humoral) han sido evocados como posibles iniciadores del proceso (18).

La posibilidad de un control humoral se ha visto fortalecida a partir de experimentos de circulación cruzada (19) (20) (21) y numerosos reportes de experimentos de transfusión, en los cuales el hígado de un animal normal es estimulado para síntesis de DNA por la sangre de ratas hepatectomizadas.

Por otro lado, el efecto del suero de animales hepatectomizados in vitro ha sido demostrado en varios trabajos con cultivos de hepatocitos (22) (16).

Todos estos elementos, llevaron en los últimos años a la obtención de una visión cada vez más elaborada del fenómeno mencionado, que ha sido denominada por algunos como la "Teoría Endócrina de la Regeneración Hepática" (16). Esta teoría sostiene como hipótesis de trabajo la interacción entre hormonas, nutrientes, factores lipoprotéicos y nucleotídicos sobre múltiples sitios regulatorios (23) lo cual resulta en una alternativa razonable en el contexto de la controversia en torno a los factores hepatotróficos.

En forma somera, podríamos decir que esta teoría postula - que la regeneración hepática es controlada por 6 ó 7 hormonas, 5 de ellas peptídicas: Insulina, Glucagon Calcitonina, Paratohormona y EGF (Factor de crecimiento epidérmico, uno de los péptidos no suprimibles ligados a insulina, químicamente idéntico a la urogastrona (24) ) y dos no peptídicas:  $T_3$  ó  $T_4$  y Glucocorticoides; en donde tres de ellas son los principales reguladores por su acción directa : INSULINA, GLUCAGON Y EGF y siendo - su papel posible solo en condiciones nutricionales adecuadas tales como la presencia de ciertos aminoácidos y determinadas - cantidades de iones (16) .

En cultivo de Hepatocitos se ha demostrado que la Insulina y el Glucagón son necesarios a pocas horas pero no inmediatamente a la iniciación de la regeneración (25), evaluándose el tiempo necesario para su acción inicial a las 10-12 horas de realizarse la lesión. Este hecho, ha llevado a pensar en la existencia de dos programas secuenciales, idea fortalecida por la evidencia de que la acción de la Insulina, Glucagón y EGF no es estimuladora en cultivo de Hepatocitos si es que no se realiza - un cambio de medio, con exceso de nutrientes y iones, condición en la cual sí se da la estimulación de síntesis de DNA, siendo solo necesaria la presencia de EGF y medio rico para que ésta - se inicie, aunque a las ocho horas a partir del cambio, la presencia de Insulina y Glucagón es fundamental.

Todo ello lleva a pensar que el EGF promueve el efecto del

exceso de nutrientes por una interacción de vida corta (1er. programa), siendo estas interacciones estabilizadas y potenciadas por la Insulina y Glucagón (2º programa) (16).

El papel fundamental de las hormonas pancreáticas en el proceso hepatoproliferativo se fortalece por la evidencia de que la pancreatectomía suprime la síntesis de DNA en el hígado de rata después de la ablación del 70% del órgano, pero no en el caso de que dichos animales reciban infusión periférica de insulina y glucagón (25); aunado al hecho de que suero Anti-insulina inhibe la síntesis de DNA hepática después de la hepatectomía (26).

Adicionalmente, en el estado regenerante hepático hay una alteración en el nivel de hormonas pancreáticas circulantes, donde se da un descenso en la concentración de Insulina y un incremento en la de Glucagón antes de la iniciación de la síntesis de DNA y en proporción a la magnitud de la lesión (14) (23).

#### ANTECEDENTES

Los cambios señalados van en relación inversa con el número de receptores para dichas hormonas en las membranas de los hepatocitos: Hay un incremento en el número de receptores para Insulina y al mismo tiempo un decremento en el número de receptores para Glucagón (16) (23). Así a las 4 horas después de la lesión, el nivel de receptores de Insulina presente en -

la membrana plasmática empieza a aumentar hasta alcanzar un 60% sobre el valor control, mientras que los receptores de Glucagón caen por debajo del control al mismo tiempo, recuperándose los valores normales de los receptores hasta 6 días después de la hepatectomía y a su vez, la capacidad de insulina fría para acelerar la velocidad de disociación de insulina marcada con  $^{125}\text{I}$  unida a membrana plasmática de hígado regenerante, también se encuentra disminuida (16). Todo ello indica que en el estado regenerante, la sensibilidad del hígado ante insulina se encuentra aumentada.

En el sistema de intoxicación por tetracloruro de carbono, la capacidad de enlace de insulina por membranas plasmáticas provenientes de los hepatocitos, comienza a aumentar a los 3 días posteriores a la administración del tóxico y permanece 3 veces por encima del valor control por los siguientes 7 días, para después regresar a los valores que se encuentran en los animales no intoxicados. En un trabajo anterior, se encontró que este incremento se debe a un cambio en el número de sitios de unión (receptores) y no a la afinidad de estos hacia la insulina (27).

Los receptores de insulina son glicoproteínas integradas a la membrana, formadas por dos tipos de subunidades llamadas alfa y beta, en un número de dos por cada una. La subunidad alfa es la de mayor tamaño, con un peso molecular de 135 kd, en la cual se encuentra el sitio de unión para la hormona, y la -

subunidad beta tiene un peso molecular de 95 Kd y presenta un sitio de unión para ATP que se encuentra orientado hacia el citoplasma y que se piensa, tiene actividad de tirosina-cinasa sobre si misma y sobre sustratos exógenos. Ambas subunidades tienen una orientación asimétrica transmembranal, con residuos de oligósacaridos expuestos al exterior, y se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro así como uniones no covalentes de carácter hidrofóbico en el seno de la membrana celular (28) (29) (30).

Como toda glicoproteína en su proceso de maduración hasta llegar a su forma activa en la membrana celular, sufre un proceso de glicosilación en el aparato de Golgi, entre este momento de modificación química final y el de su externalización, puede plantearse la existencia de una poza latente de receptores, donde su transporte hasta la membrana requiere la modificación por N-Glicosilación, que se constituye como un factor limitante de la externalización y una plausible forma de regulación (31) (32).

Dado que en trabajos anteriores donde se estudia la dinámica de la interacción Insulina receptor, por su importancia en el proceso hepatoproliferativo, se ha planteado que lo que ocurre en el estado regenerante es un incremento en la síntesis de el receptor de insulina con base en la evidencia del abatimiento en el incremento de la capacidad de unión de la hormona con su receptor, posterior a la administración de la

mitomicina C (un inhibidor de la síntesis proteica) a las ratas intoxicadas con  $\text{CCl}_4$ ; nosotros nos planteamos las interrogantes siguientes:

¿Hasta dónde lo que se da en es estado regenerante es un incremento en la síntesis del receptor? ¿Acaso no será más bien un cambio en la exposición, esto es en la redistribución entre la poza latente del aparato de Golgi y la membrana plasmática? y ¿Lo que se evidencia bajo la acción de la mitomicina C no podría ser la inhibición de la síntesis de proteínas, que participan en el proceso de maduración o exposición en la membrana?

Es por todo ello, dada la importancia del conocimiento preciso de todos los eventos que participan en la regulación del estado hepatoregenerativo y a la importancia de la interacción entre la insulina y su receptor, que el presente proyecto de trabajo tuvo como OBJETIVOS:

- A. Cuantificar el número de sitios de unión y afinidad a insulina presentes en las membranas plasmáticas de hepatocitos altamente purificados, tanto de ratas normales, como de ratas en diferentes días posteriores a la intoxicación aguda con  $\text{CCl}_4$ .
- B. Cuantificar el número de sitios de unión y afinidad para insulina en las membranas del aparato de Golgi, tanto de ratas normales como de ratas en diferentes días posteriores a la intoxicación aguda con  $\text{CCl}_4$ .

- C. Cuantificar el número de receptores extraídos en forma soluble de las membranas plasmáticas, utilizando el detergente Triton X-100.
  
- D. Comparar los valores obtenidos en cada caso, con miras a clarificar nuestras preguntas.

## MATERIAL Y METODOS

### Material

Para la realización de este trabajo, fueron utilizados los siguientes reactivos:

Tetracloruro de carbono (J.T. Baker),  $\text{Na}^{125}\text{I}$  y filtros de oxido (Amersham), Insulina porcina (la cual fue donada por Eli Lilly &Co.), Triton X-100, Polietilenglicol 6,000, Azul de Coomassie G-250, Albúmina Sérica Bovina,  $\gamma$ -globulina fracción II de Cohn, Reactivo fenólico de Folín-Cicalteau (Sigma Chemical Co.), Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals), Sacarosa (Schwarz/Mann), Nitrato de Plata (Merck), Acrilamida, Bis Acrilamida, TEMED, - Persulfato de Amonio, Dodecilsulfato de sodio y Glicina (Bio-Rad Laboratories), Marcadores de peso molecular (Boehringer Mann - heim).

Para la caracterización electroforética de la insulina marcada se utilizó película X-omat K sensible a rayos X (Eastman - Kodak).

Cualquier otra sustancia mencionada fue de uso común en - el laboratorio y de grado analítico.

En todos los procedimientos experimentales que a continuación se describiran fueron utilizadas ratas Wistar macho, con - peso corporal entre 180 y 250 g, alimentadas con una dieta de - Purina Chow ad libitum, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del CINVESTAV.

## Métodos

### -Intoxicación aguda con $\text{CCl}_4$

Todas las ratas fueron sometidas a la administración por vía intragástrica de una única dosis de  $\text{CCl}_4$ , mezclado con aceite de maíz en proporción 1:1, a razón de 0.5 ml por cada 100 g de peso corporal. Los animales considerados como control, recibieron una dosis intragástrica única de 0.25 ml de aceite de maíz por cada 100 g de peso corporal.

### -Marcaje de Insulina con $\text{Na}^{125}\text{I}$

Se tomaron para tal fin 5  $\mu\text{l}$  de Insulina porcina a una concentración de 1 mg/ml en suspensión con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, los cuales se colocaron en el fondo de un tubo Eppendorf mantenido en hielo en una campaña de extracción. Luego de ello, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de amortiguador de fosfatos 0.25 M pH 7.4, el cual contenía 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  e inmediatamente después se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de Cloramina T con 125  $\mu\text{g/ml}$  (para quedar a una concentración final de 0.161  $\mu\text{M}$ ). El tubo se agitó ligeramente durante 30 segundos y la reacción se paro añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de una solución de metabisulfito de sodio con concentración de 35  $\mu\text{g/ml}$  en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 y posteriormente 100  $\mu\text{l}$  de una solución de KI con 10 mg/ml en el mismo amortiguador. La mezcla se dejó reposar un par de minutos, luego de los cuales se aplico a una columna de 0.5 x 2.5 cm empacada con Sephadex G-10 a -

temperatura ambiente, previamente equilibrada con amortiguador de Tris-HCl 25 mM pH 7.4, BSA al 0.1% poco tiempo antes de usarse. La columna comenzó a lavarse con el mismo amortiguador - frío con detección continua de la radiactividad usando un contador Geiger manual. Las fracciones colectadas fueron de 0.5 ml y las correspondientes al primer pico de radiactividad, se colocaron de inmediato en hielo mientras se continuaba lavando la columna hasta eluir completamente el segundo pico de radiactividad. Para todas las fracciones se prepararon diluciones apropiadas (de 1:100 a 1:10000), cuantificándoles la radiactividad en un contador de emisiones gamma, con alta eficiencia de conteo en las condiciones que se utilizaron. Las preparaciones de  $^{125}\text{I}$ -Insulina se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se les daba uso en un período no mayor de 10 días.

-Precipitación de la  $^{125}\text{I}$ -Insulina con ácido tricloroacético

Para ello se tomó una muestra de la Insulina marcada con iodo radiactivo ( $^{125}\text{I}$ ) con 30,000 cpm aproximadamente, y se mezcló con amortiguador de Tris-HCl 25 mM pH 7.4, albúmina sérica bovina 0.1% y ácido tricloroacético al 25 %, todo en un volumen total de 40  $\mu$ l. La mezcla fue incubada a  $0^{\circ}\text{C}$  por una hora, para a continuación centrifugarse por cinco minutos a la máxima velocidad de una centrífuga de mesa "Eppendorf" en el cuarto - frío. El sobrenadante se aspiró con precaución y se depositó - en otro tubo, al mismo tiempo que la pastilla se dejó en el tubo

Eppendorf original, el cual se colocó en el interior de otro tubo de plástico para a continuación cuantificar la radiactividad en un contador de emisiones gamma.

#### -Obtención de Membranas plasmáticas aisladas

Siguiendo los procedimientos metodológicos descritos por Neville (33) con las modificaciones hechas por Pohl et al (34), fueron obtenidos hígados de ratas, sacrificadas por dislocación cervical, los cuales se cortaron en pequeños trozos y se picaron finamente con tijeras. Por cada 10g de tejido, se añadieron 25 ml de  $\text{NaHCO}_3$  1 mM frío, homogeneizándose con 8 golpes en un homogeneizador Duncce de vidrio y con émbolo flojo, 20 g de tejido así procesado se juntaron y se les agregó 450 ml de  $\text{NaHCO}_3$  frío. La suspensión se agitó tres minutos luego de los cuales fue filtrada, primero a través de una gasa doble, y después a través de una gasa cuádruple. El filtrado se centrifugó a  $1,500 \times g$  por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y las pastillas así obtenidas fueron nuevamente homogeneizadas con tres golpes suaves en el mismo instrumento. Enseguida se añadió sacarosa al 69% llevando esta suspensión a una concentración final de 44% la cual se determinó refractométricamente.

El material así procesado se colocó debajo de un "Colchon" de sacarosa al 43 % y fué centrifugado a 25,000 rpm en un rotor SW-28 (Beckman) por 150 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El material flotante se recogió con una espátula, y se pasó con jeringas a través de

una aguja del número 18 y después a través de una del número 20. Al terminar este paso, se agregó  $\text{NaHCO}_3$  1 mM frío y se centrifugó a 1500 rpm en un rotor SS-34 (Sorvall) por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Las pastillas fueron recogidas y almacenadas en nitrógeno líquido, en porciones de 0.2 ml para su posterior utilización.

#### -Obtención del Complejo de Golgi aislado

Después de una evaluación de las variantes en el método de preparación de este organelo, se utilizó un procedimiento que permitió obtener una fracción única del complejo de Golgi (35). Para tal fin los hígados fueron extraídos de ratas con 12 horas de ayuno, se cortaron en trozos pequeños y se picaron finamente con tijeras. El tejido se homogeneizó en presencia de sacarosa 0.25 M en frío, con 6-8 golpes de homogeneizador Potter-Elvehjem; el material obtenido fue llevado a una concentración del 20% (p/v) y centrifugado a  $10,000 \times g$  por 10 minutos llevándose el sobrenadante al volumen original del homogeneizado con sacarosa 0.25 M, para ser a continuación centrifugado a  $105,000 \times g$  por 90 minutos (fracción microsomal). Las pastillas de esta centrifugación se resuspendieron en sacarosa 0,25 M y después de homogeneizar suavemente, el volumen de esta suspensión fue ajustado con sacarosa 2 M, hasta obtener una concentración final de 1.3 M.

Porciones de 20 ml de esta suspensión se colocaron bajo un "Colchón" de sacarosa 1.15 M y otro de sacarosa 0.25 M; luego -

de centrifugar en un rotor SW-27 (Beckman) a 23,000 rpm por 3.5 horas a 4°C, se recogió el material de la interfase presente entre los "colchones" de sacarosa 0.25 M y 1.15 M, el cual correspondía a una fracción única de complejo de Golgi. Este material fue almacenado a -70°C en alicuotas de 1 ml. Para la realización de los ensayos de unión, esta suspensión se sometió a 4 ciclos de congelación-descongelación antes de usarse, con la finalidad de reventar las vesículas.

-Ensayo de unión entre  $^{125}\text{I}$ -Insulina y fracciones membranales

Se colocaron de 30 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana en amortiguador de Tris-HCl 25 mM pH 7.4,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, albúmina sérica bovina al 0.1% y  $^{125}\text{I}$ -Insulina 1.0 nM (150,000 cpm), en un tubo y a un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ . Estas mezclas se agitaron por 3-4 segundos en un vortex y fueron incubadas a 30°C por 45 minutos, con agitación constante. Luego de ello, se añadieron 3 ml del mismo amortiguador de Tris frío y el contenido del tubo fue inmediatamente después vaciado en filtros de oxidoide (embebidos previamente en una solución de albúmina sérica bovina al 10%) colocados sobre un sistema de filtración en serie, acoplado a una bomba de vacío. Cada filtro fue lavado con 10 ml de amortiguador de Tris frío y después recogido en tubos de plástico para cuantificarle la radioactividad en un contador de emisiones gamma (36).

Cada punto experimental del ensayo fué efectuado por tri -

plicado y la fracción de radiactividad unida en presencia de un exceso de insulina "fría" ( $\approx 1 \mu\text{M}$ ) en la mezcla del ensayo, correspondía a la  $^{125}\text{I}$ -Insulina unida en forma inespecífica (36).

-Ensayo de Unión entre  $^{125}\text{I}$ -Insulina y fracciones membranales solubilizadas.

El fundamento de este procedimiento, fue la descripción realizada por Cuatrecasas (37) (38), de la precipitación diferencial del complejo soluble Insulina-Receptor por polietilenglicol, en presencia de  $\gamma$ -globulina como acarreador. Para cada uno de estos ensayos, se usaron mezclas de volumen no mayor de  $500 \mu\text{l}$  las cuales contenían: Amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 7.4, albúmina sérica bovina 0.1%,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $^{125}\text{I}$ -Insulina 1.0 nM ( $\approx 150,000$  cpm) y de 50 a  $100 \mu\text{g}$  de proteína de la muestra extraída en forma soluble con el detergente Triton X-100.

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 45 minutos a  $30^\circ\text{C}$ , con agitación constante, después de lo cual se añadieron 0.5 ml de  $\gamma$ -globulina 0.1% en amortiguador de Tris frío y 0.5 ml de polietilenglicol 6,000 al 25%, también frío. Después de agitar las mezclas en vortex por 3-4 segundos, se colocaron en hielo por 15 minutos, para luego ser vaciadas sobre filtros de óxido (los cuales estaban previamente embebidos en solución de albúmina sérica bovina al 10%), colocados sobre el sistema de filtración acoplado a la bomba de vacío. Cada filtro fue lavado con 3 ml de polietilenglicol al 8.5 % en amortiguador de Tris frío, y

después se recogió en tubos de plástico para cuantificarles su radioactividad fijada con un contador de emisiones gamma.

Igual que en el caso anterior para cada punto experimental del ensayo se efectuó por triplicado y la fracción de radioactividad unida en presencia de un exceso de insulina fría ( $\sim 1 \mu$ ) - en la mezcla del ensayo, correspondió a la  $^{125}\text{I}$ -Insulina unida - en forma inespecífica.

-Caracterización electroforética de la preparación de  $^{125}\text{I}$ -Insulina .

Para ello, se tomaron diferentes cantidades de la fracción con la máxima radioactividad en el primer pico de elución de la columna de Sephadex G-10, las cuales fueron adicionadas de amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 8.8, Dodecil Sulfato de sodio a 2%, Glicerol 10% y Rojo de Fenol 1% en condiciones no reductoras (solución digestora de Laemmli, pero sin  $\beta$ -Mercaptoetanol ni Ditiotreitól). Fueron entonces calentadas a  $100^\circ\text{C}$  por un minuto y después de enfriarse a temperatura ambiente se aplicaron en los geles. La cantidad de Insulina marcada analizada en cada pozo, en terminos de su radioactividad fue:  $1.53 \times 10^6$  cpm,  $3.06 \times 10^6$  cpm y  $4.6 \times 10^6$  cpm; en volúmenes de 4, 8 y  $12 \mu\text{l}$ , respectivamente.

Fueron utilizados como marcadores de peso molecular: Albúmina (68,000 Daltones), ovoalbúmina (43,000 Daltones), quimiotripsinógeno (25,700 Daltones) y citocromo C (12,500 Daltones).

El gel separador fue realizado a una concentración de acrilamida de 15% con bis acrilamida 0.2%, dodecil sulfato de sodio - 0.1% y amortiguador de Tris-HCl 0.4 M pH 8.8. La polimerización del gel se obtuvo al agregar Persulfato de amonio 0.01% y TEMED 0.1% (Tetrametil-etilén-diamina) como concentraciones finales.

El gel concentrador se preparó con Acrilamida al 3%, bis - acrilamida 0.08%, dodecil sulfato de sodio 0.1%, amortiguador de Tris-HCl 0.13 M pH 6.8, persulfato de amonio 0.1% y TEMED al - 0.1%, como concentraciones finales.

La corrida electroforética, fué realizada con un amortiguador de Tris-HCl 19 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1% a 30 mA por gel a temperatura ambiente.

Para la realización de la Radioautografía, los geles se secaron con calor y vacío simultáneamente, con un secador para geles en placa, y enseguida, se pusieron en contacto con una película X-omat K, sensible a rayos X por tiempos variables.

-Determinación de la cantidad de Proteína por el Método de Bradford.

El reactivo de Bradford (39) consiste en azul brillante de Coomassie G-250 al 0.01%, etanol al 4.7% y ácido fosfórico al - 8.5% . Para prepararlo se tomaron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250, los cuales se disolvieron en etanol al 95%, a lo que enseguida fué añadido ácido fosfórico al 85%, aforando a un litro con agua tridestilada.

Para la cuantificación, se tomó muestra con 10-100  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen total de 0.1 ml y a ello se agregaron 5 ml del reactivo de Bradford. Las mezclas se agitaron en vortex y la absorbencia fue medida a 595 nm, 5 minutos después en un espectrofotómetro Beckman Modelo 35. Las curvas de calibración fueron obtenidas, utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

-Determinación de la cantidad de Proteína por el Método de Markwell.

Este método (40) es una modificación del clásico procedimiento de Lowry et al (41), utilizado con la finalidad de prevenir la interferencia de la sacarosa contenida en las fracciones membranales de plasmalema y complejo de Golgi. El reactivo de Markwell fue preparado a partir de las siguientes soluciones:

Solución A.  $\text{NaCO}_3$  al 2% en NaOH al 0.4%, Tartrato de sodio y potasio 0.16%, Dodecil sulfato de sodio al 1%.

Solución B.  $\text{CuSO}_4$  al 4%

Solución C. Se tomaron 100 partes de la solución A y se les adicionó una parte de la solución B.

Para las cuantificaciones, se tomaron 3 ml de la solución C y se les añadió una muestra en un volumen total de 1 ml, contenido de 10 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína. Esta mezcla se dejó reposar de 10-60 minutos a temperatura ambiente, y después se agregaron 0.3 ml de reactivo fenólico de Folin Ciocalteu diluido 1:1 con agua, mezclando vigorosamente en un vortex. Esta mezcla se dejó

reposar 45 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se midió la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 35. Las curvas de calibración fueron obtenidas utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

## RESULTADOS

### I. Optimización de los métodos para la Cuantificación de Proteínas.

La cuantificación de proteínas es algo que de primera intención parece sumamente simple y carente de relevancia. No obstante, cuando en la práctica experimental nos enfrentamos a ello, podemos percatarnos de su carácter problemático y de su importancia. Existen, tal como podemos comprobar en la hemerografía, una gran cantidad de métodos de determinación de la cantidad de proteínas y modificaciones a ellos, dado que infinidad de sustancias generan interferencia con las lecturas obtenidas con uno u otro; así por ejemplo, el clásico procedimiento de O. H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (41) resulta alterado por la presencia de Tris, Hepes, Glicina, EDTA, Monosacaridos, Ficol, Glicerol, Etilenglicol entre otros muchos reactivos.

Por otro lado, estas complicaciones se ven magnificadas cuando el trabajo consiste en la cuantificación de proteínas provenientes de fracciones membranales aisladas en medios que contienen sacarosa, o bien extraídas en forma soluble por detergentes como el Triton X-100, dado que dichos compuestos también generan interferencia; además de el problema intrínseco de la valoración real de las proteínas en una membrana íntegra, dado que su inserción en el seno de dicha estructura produce

graves subestimaciones.

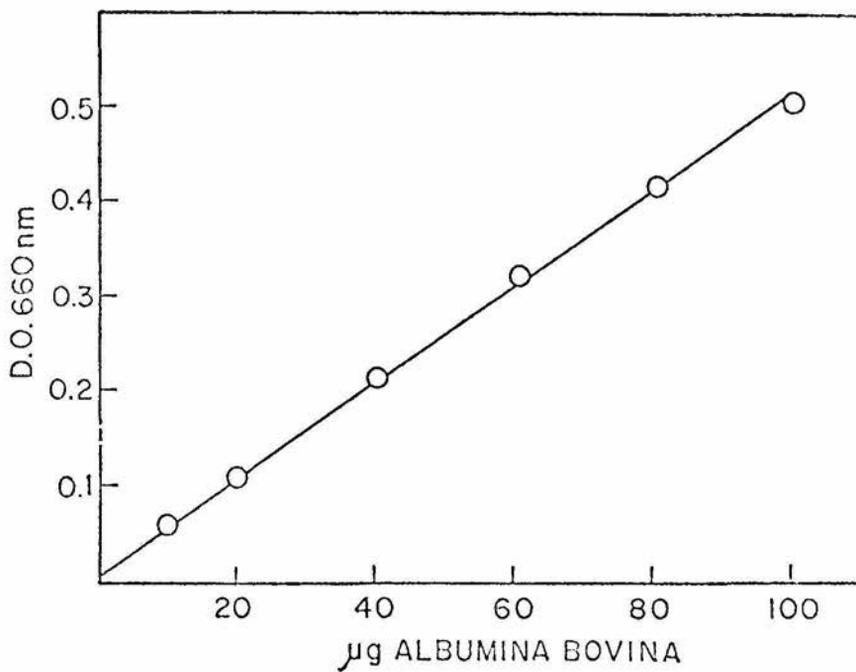
En nuestro laboratorio y en muchos otros, ha adquirido uso frecuente dada su facilidad el método de Bradford. Puesto que las consideraciones apuntadas arriba, generan dudas justificadas en cuando a la validez de la estimación cuantitativa de las proteínas de una fracción; un primer paso en el trabajo consistió en la comprobación de los valores obtenidos con dicho método, - con los que rindiere un procedimiento como es el de Markwell, - el cual incluyera la presencia de un detergente como es el SDS para eliminar la posibilidad de formación de precipitados en - las muestras provenientes de fracciones membranales, tanto de - plasmalema, como de aparato de Golgi.

En la tabla I se comparan los resultados obtenidos utilizando el método de Bradford y el método de Markwell.

Como ahí podemos apreciar, la muestra de membrana plasmática obtenida de acuerdo al procedimiento descrito en la sección anterior, rinde valores altamente disímiles con los dos métodos utilizados, siendo el valor obtenido con el método de Markwell tres veces mayor al encontrado con el de Bradford. Por otro lado, cuando la muestra no es analizada en forma directa - sino sometida a un tratamiento previo de extracción alcalina con NaOH 1 N, 12 hrs., los valores obtenidos con ambos métodos son similares entre si y con respecto al valor obtenido con el método de Markwell, sin pretratamiento. Este hecho sugiere de entrada, que el efecto del detergente incluido en el procedimien-

TABLA I. COMPARACION DE LOS VALORES DE CONCENTRACION DE PROTEINA OBTENIDOS CON EL METODO DE BRADFORD Y CON EL METODO DE MARKWELL.

Muestra	Método	Tratamiento previo	Concentración de proteína
Membrana plasmática	Bradford	-	8 mg/ml
	Markwell	-	24 mg/ml
Membrana plasmática	Bradford	NaOH 1N, 37°C 12 hrs.	25 mg/ml
	Markwell	NaOH 1N, 37°C 12 hrs.	22 mg/ml



GRAFICA 1. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA POR EL METODO DE MARKWELL.

to de Markwell, es similar a la degradación alcalina de la membrana y libera a las proteínas insertas en su seno y por lo tanto ocultas, así como las enmascaradas por la formación de precipitados, haciéndolas susceptibles de ser estimadas.

Sobre la base de este resultado se considero como método a seguir para la cuantificación de proteínas el de Markwell, de forma que todos los valores de cantidad de proteína que sean referidos en el trabajo, son el resultado de su aplicación en el rango de concentración en el que se mantiene su linealidad al realizar las lecturas a 660 nm, con albúmina sérica bovina como patrón, tal como se muestra en la gráfica No. 1.

## II. Marcaje de $^{125}\text{I}$ -Insulina. Caracterización de la preparación.

Siendo el elemento central de este trabajo la cuantificación de la Insulina unida a diferentes fracciones subcelulares, se requirió para tal fin contar con una preparación de ella con una alta actividad específica que permitiera estimar interacciones en el rango de  $10^8$  a  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , con niveles adecuados de radiactividad, cercanos a 150,000 cpm por ensayo. Para ello, la Insulina porcina fué marcada con  $\text{Na}^{125}\text{I}$  por la acción de la Cloramina T y separada del  $^{125}\text{I}$  libre por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-10.

La gráfica No. 2, muestra la resolución total de la radiactividad sembrada en la columna, en dos picos: el primero de los

cuales, considerado como la exclusión, que corresponde al material proteico resultó ser precipitable por el ácido tricloroacético e identificado como  $^{125}\text{I}$ -Insulina y el segundo el cual es correspondiente al volumen interno de la columna que es el  $\text{Na}^{125}\text{I}$  libre.

La tabla II muestra las características de la preparación las cuales son apropiadas para la caracterización de la unión entre la hormona y las fracciones membranales.

Dada la necesidad de estar ciertos de la integridad física de la molécula de Insulina marcada, fué efectuada su caracterización electroforética en condiciones no reductoras. En la figura 0 se muestra el esquema del autorradiograma, en el que la mayoría de la radiactividad aparece en una sola banda en cada carril, la cual es correspondiente a un P.M. de 6,000 daltones, concordante con el reportado para la Insulina. La otra banda radiactiva corresponde a la albúmina utilizada como acarreador de la Insulina para evitar que se adsorbiera inespecíficamente en la columna u otras superficies con las que hiciera contacto, y que, seguramente formó agregados con la hormona durante la ebullición previa a la aplicación de las muestras sobre el gel.

### III. Caracterización de la unión de $^{125}\text{I}$ -Insulina a membrana plasmática.

Como primer paso se determinaron las condiciones óptimas para la realización del ensayo de unión a la membrana plasmática.

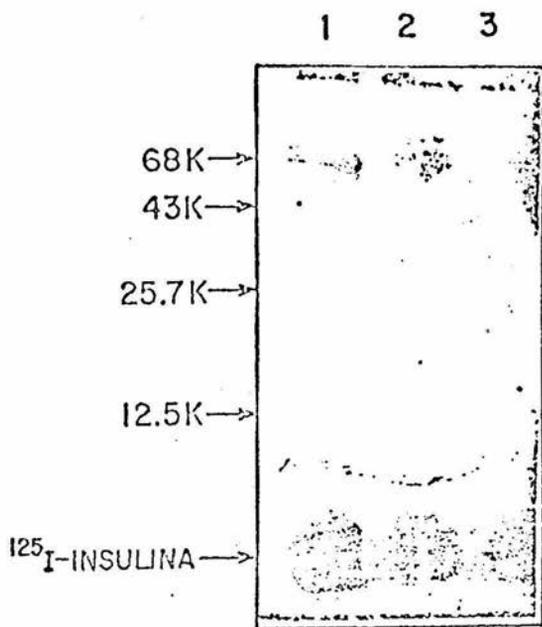
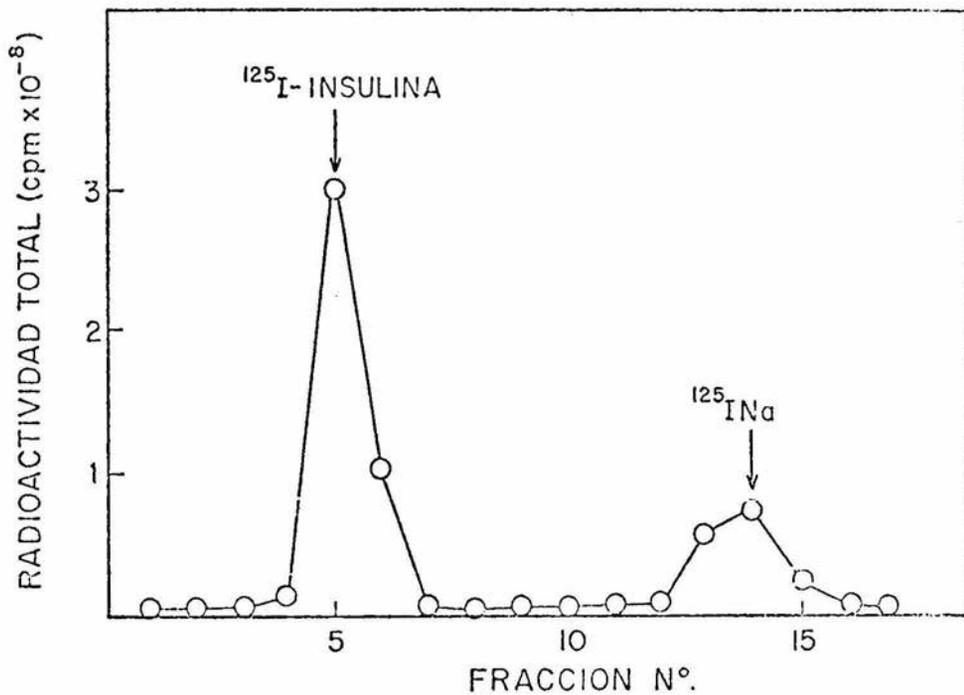


FIGURA 0. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LA PREPARACION DE  $^{125}\text{I}$ -INSULINA.



GRAFICA 2. PATRON DE ELUCION DE LA  $^{125}\text{I}$ -INSULINA Y DEL  $^{125}\text{I}$ -LIBRE EN CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR EN SEPHADEX G-10.

TABLA II. CARACTERISTICAS DE LA PREPARACION DE  $^{125}\text{I}$ -INSULINA

---

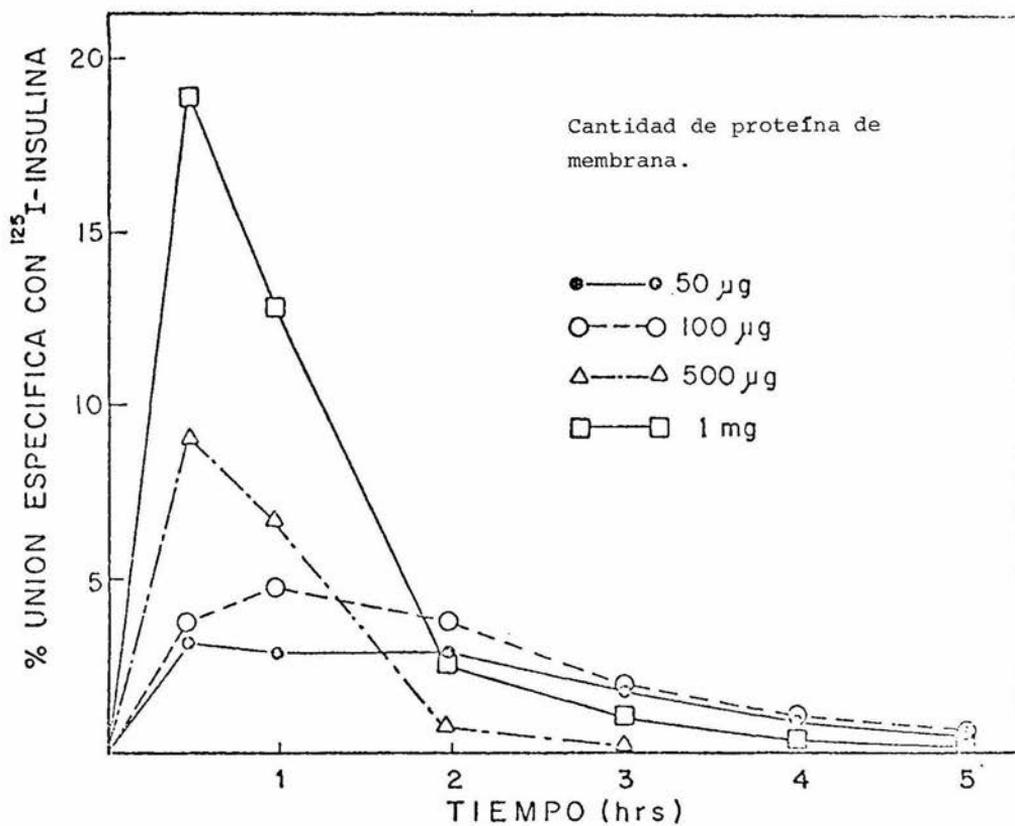
RADIOACTIVIDAD INCORPORADA A PROTEINA	$766.61 \pm 18.3 \mu\text{Ci}$
PORCENTAJE DE IODACION	$80.05 \% \pm 4.8 \%$
ACTIVIDAD ESPECIFICA	$153.32 \pm 3.7 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$
PRECIPITABILIDAD EN ACIDO TRICLOROACETICO	$97 \%$

---

ca. Se resolvió llevar acabo los experimentos a una temperatura de 30°C, con la intención de que el nivel estacionario de la interacción tienda a ser más bajo que a temperaturas inferiores (42) en tiempos razonables.

Como podemos ver en la gráfica No. 3, la cantidad de radiactividad unida en forma específica a las membranas es función del tiempo y de la cantidad de proteína a la temperatura de 30 °C. Así cuando la cantidad de proteína en el ensayo es de 50-100 µg, se observa el mayor porcentaje de unión específica a los 60 minutos de incubación; aunque con cantidades de proteína mayores (de hasta 1 mg) se observa un abrupto incremento en la unión específica a los 30 minutos, la caída de esa unión es también bastante brusca durante el resto del tiempo del ensayo, lo cual dificultaría la estimación precisa del evento, dado que el tiempo de filtración aumenta más de 10 segundos cuando se usan mayores cantidades de proteína membranal, perturbando así el nivel de equilibrio estacionario dependiente de un aumento en la disociación de la hormona unida en ese tiempo aumentado (43). Por tal razón se resolvió no utilizar cantidades de proteína mayores de 100 µg en el ensayo.

Bajo las condiciones así fijadas, el nivel de unión inespecífica de  $^{125}\text{I}$ -Insulina nunca fué mayor de 1.0 a 1.5 % de la radioactividad total, hecho justificante de las conclusiones que se deriven de los valores de unión de la hormona marcada a membranas, como debidos a los eventos estudiados y no a artefactos



GRAFICA 3. CINETICA DE ASOCIACION DE  $^{125}\text{I}$ -INSULINA A MEMBRANA PLASMATICA.

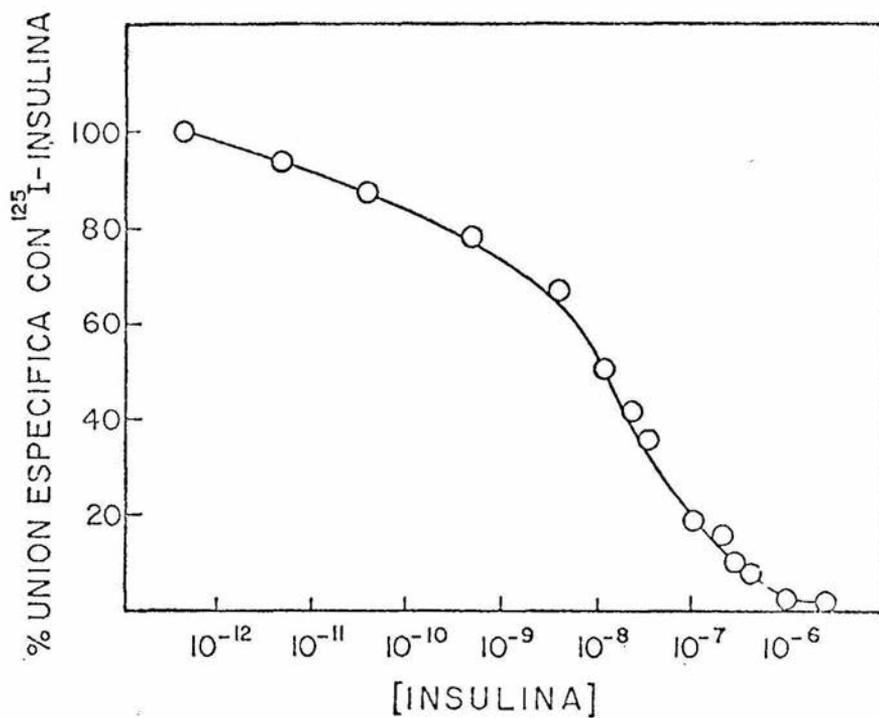
tos del método.

Ya determinadas las condiciones óptimas, fueron realizados ensayos de competencia de Insulina fría (no marcada) en concentraciones crecientes, contra una concentración fija de  $^{125}\text{I}$ -Insulina (1.10 nM), sobre las membranas plasmáticas. La gráfica No. 4 muestra una curva de desplazamiento, en la que el 50% de unión específica se obtuvo a una concentración de Insulina de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}\text{M}$ .

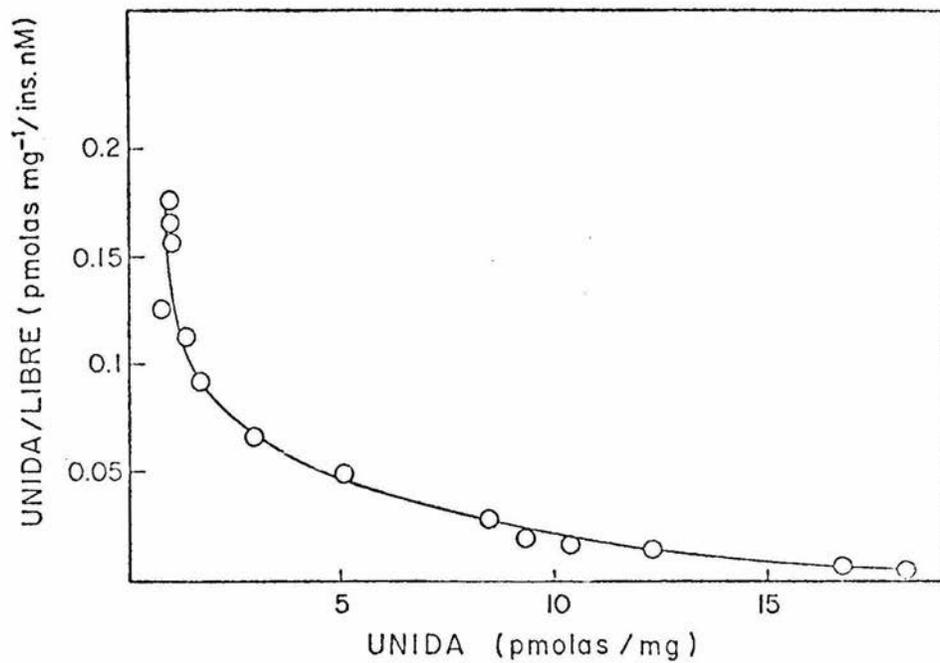
Con todo lo anterior caracterizado, se procedió a realizar los experimentos de unión de insulina a membrana plasmática y su análisis por el método de Scatchard. Así, en la gráfica No.5 podemos apreciar el carácter definidamente curvilíneo con concavidad superior, característico de la unión de insulina con su receptor.

Los parámetros de afinidad fueron obtenidos para ese caso, de acuerdo al valor de las pendientes para cada porción de la curva experimental. La tabla III muestra los valores de las constantes determinadas, los cuales caen en los órdenes de magnitud reportados en la hemerografía.

Partiendo del supuesto de la existencia de dos poblaciones de receptores, podría afirmarse que el sistema consta de un componente de alta afinidad y baja capacidad de saturación con una  $K_1 = 19.5 \text{ nM}^{-1}$  y una  $R_1 = 1.053 \text{ pmolas/mg}$ ; además de un componente de baja afinidad y alta capacidad de saturación con una  $K_2 = 1.75 \text{ nM}^{-1}$  y una  $R_2 = 3.99 \text{ pmolas/mg}$ .



GRAFICA 4 . COMPETENCIA ENTRE <sup>125</sup>I-INSULINA UNIDA A MEMBRANA PLASMATICA E INSULINA PORCINA FRIA.



GRAFICA 5. ANALISIS DE SCATCHARD DE LA INTERACCION INSULINA-MEMBRANA PLASMATICA.

TABLA III. PARAMETROS DE AFINIDAD PARA LA INTERACCION INSULINA-RECEPTOR EN MEMBRANAS PLASMATICAS DE HIGADO NORMAL.

---

$K_1$	$19.5 \pm 2.6$	$nM^{-1}$
$K_2$	$1.75 \pm 0.3$	$nM^{-1}$
$R_1$	$1.053 \pm 0.27$	pmolas/mg
$R_2$	$3.99 \pm 1.09$	pmolas/mg
$R_0$	$5.05 \pm 0.86$	pmolas/mg

---

$K_1$  y  $K_2$  = Constantes de disociación del complejo Hormona-Receptor para cada uno de los dos componentes de afinidad descritos en el texto.

$R_1$  y  $R_2$  = Número de sitios de unión que indican la capacidad de saturación de cada uno de los dos componentes descritos.

$R_0$  = Número total de sitios de unión en las membranas.

Ecuación de Scatchard:

$$\frac{B}{F} = \frac{R_0 - B}{K_n} \quad \text{Donde : } B = \text{Hormona unida}$$

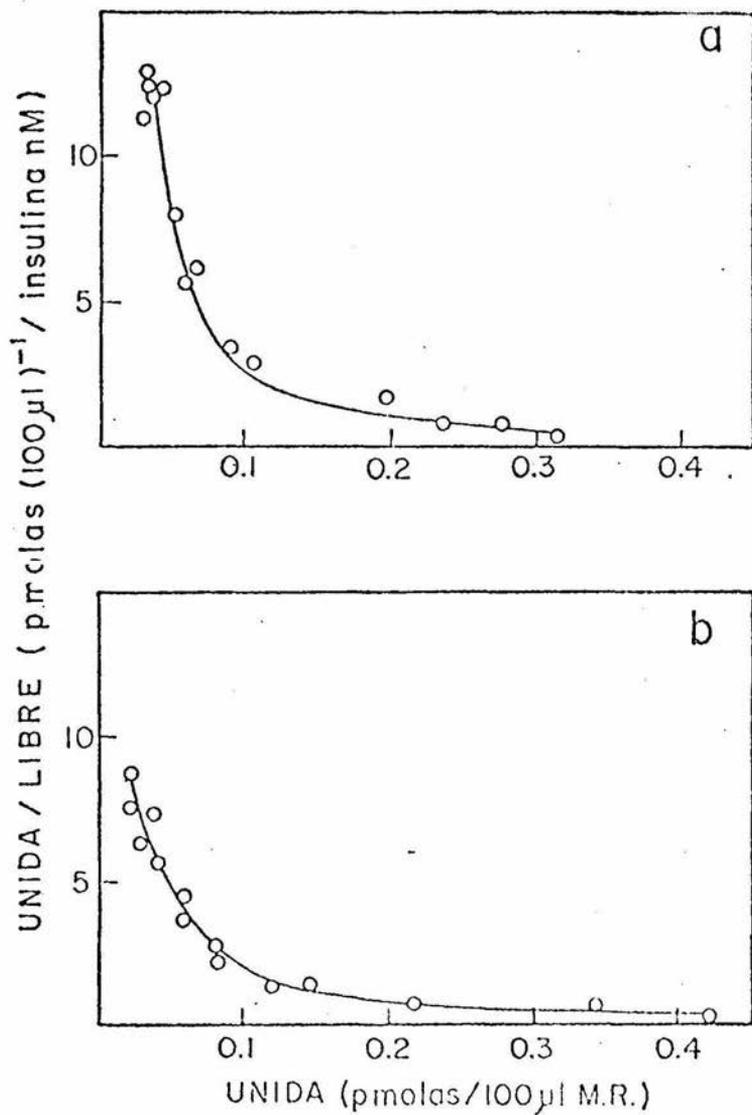
$$F = \text{Hormona libre}$$

IV. Comparación de la unión de  $^{125}\text{I}$ -Insulina a membranas plasmáticas de hígado de ratas normales y en regeneración.

Utilizando hígados de ratas normales y de ratas con cinco días de intoxicación aguda con  $\text{CCl}_4$ , se obtuvieron las membranas plasmáticas aisladas de acuerdo al procedimiento descrito y se efectuaron los ensayos de unión hormona-receptor que con el tratamiento de Scatchard, rindieron los resultados que se muestran en la gráfica No. 6 (a y b), en donde se ve un aparente aumento en la capacidad de unión de las membranas plasmáticas provenientes de los animales en proceso hepatoregenerativo.

En la tabla IV, podemos apreciar los valores de las constantes de afinidad, calculados aproximando las asintotas a la porción final de cada curva experimental, en los que no se observan cambios significativos. En cuanto al número de receptores presentes en dichas membranas, ahí sí encontramos diferencia significativa, de forma tal que en las membranas de los hígados normales tenemos 5.05 pmolas/mg y en las membranas de las ratas con el hígado en el quinto día de regeneración, tenemos 12.0 pmolas/mg.

Cabe recalcar que la utilización del valor obtenido al quinto día de regeneración, en esta caracterización y en las que le siguen, se basa en la observación realizada en un trabajo previo de nuestro laboratorio (27), el cual muestra que los cam



GRAFICA 6

INTERACCION  $^{125}\text{I}$ - INSULINA MEMBRANA PLASMATICA  
 DURANTE LA REGENERACION HEPATICA.

TABLA IV. COMPARACION DE LOS VALORES DE LAS CONSTANTES DE AFIDIDAD Y EL NUMERO DE SITIOS DE UNION PARA INSULINA, AL QUINTO DIA DE REGENERACION.

FRACCION SUBCELULAR	ESTADO	
	NORMAL	REGENERANTE
MEMBRANA PLASMATICA		
$K_1$	19.5 ± 2.6 nM <sup>-1</sup>	23.0 ± 3.5 nM <sup>-1</sup>
$K_2$	1.75 ± 0.27 nM <sup>-1</sup>	1.78 ± 0.24 nM <sup>-1</sup>
$R_0$	5.05 ± 0.86 pmolas/mg	12.0 ± 1.74 pmolas/mg
Receptores Extraidos con Triton X-100 $R_0$	4.50 ± 0.82 pmolas/mg	40.65 ± 4.2 pmolas/mg
Membranas del Complejo de Golgi $R_0$	54.0 ± 5.6 pmolas/mg	12.75 ± 1.54 pmolas/mg

Los datos representan el promedio de seis de terminaciones. El análisis de significancia estadística se realizó utilizando la prueba "t de student" por comparación de medias con una p < 0.001

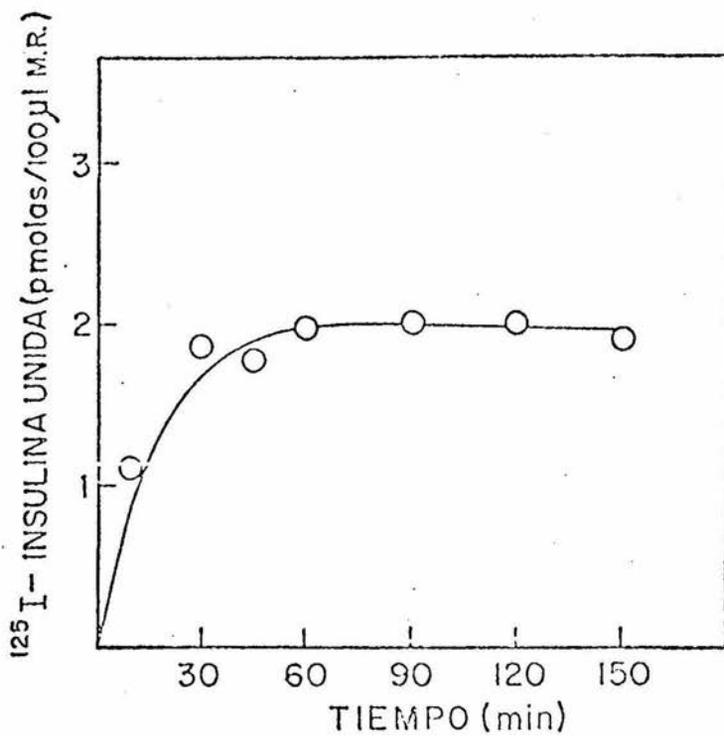
bios máximos del estado hepatogenerante, consecutivos a la intoxicación aguda con  $\text{CCl}_4$  se dan en ese día.

V. Comparación de la unión de  $^{125}\text{I}$ -Insulina a receptores-membranales extraídos en forma soluble con Triton X-100

Partiendo del supuesto de que una fracción de los receptores para la hormona estuviesen ocultos en el seno de la membrana (receptores crípticos) y no pudiesen ser detectados, se procedió a su exposición al extraerlos de la membrana con el detergente, revelando así su número real. Los resultados obtenidos se muestran en el renglón correspondiente de la tabla No. IV, - en donde podemos apreciar un notable cambio en su número de - 4.50 pmolas/mg en el estado normal a 40.65 pmolas/mg en el estado regenerante, esto es nueve veces más.

VI. Comparación de la unión de  $^{125}\text{I}$ -Insulina a membranas del complejo de Golgi.

Dada la participación fundamental del complejo de Golgi en la biosíntesis y procesamiento de proteínas de membrana, dentro de las cuales se encuentra el receptor de Insulina, se consideró que el estudio de los cambios en el número de receptores entre este organelo y la membrana plasmática, sería el elemento - clave para el esclarecimiento de la pregunta referente a si el cambio en la afinidad a Insulina en la regeneración Hepática co rresponde a una redistribución entre dos compartimientos celu -



GRAFICA 7. CINETICA DE ASOCIACION DE  $^{125}\text{I}$ -INSULINA A MEMBRANAS DE GOLGI.

lares.

Habiendo obtenido el complejo de Golgi aislado en un gradiente de sacarosa, de acuerdo al procedimiento descrito con anterioridad, se procedió como en el caso de las membranas plasmáticas a determinar las condiciones óptimas de incubación para los experimentos de unión. La temperatura elegida para tal fin fué también 30°C, basándonos en el mismo argumento utilizado en el caso anterior y con el fin de obtener comparaciones válidas entre ambas estructuras.

Como se puede ver en la gráfica No. 7 que ilustra la cinética de asociación entre  $^{125}\text{I}$ -Insulina y membranas de Golgi, a los 30 minutos de incubación el nivel de unión se encuentra ya practicamente constante y se mantiene hasta las 2.5 horas después. A diferencia de lo observado con las membranas plasmáticas, el nivel de unión no decrece con el tiempo, lo cual coincide a su vez con la información encontrada en la hemerografía (44).

En la tabla No. IV se muestra el resumen de los resultados encontrados al analizar las fracciones membranales de complejo de Golgi al quinto día de regeneración, en donde apreciamos una disminución en el número de los receptores; de 54.0 pmolas/mg en los hígados normales, a 12.75 pmolas/mg en los hígados en regeneración, siendo esta relación inversa a la encontrada en el caso de la membrana plasmática. Las constantes de afinidad encontradas para la unión de insulina a este organelo fueron de

15 a 20  $\text{nM}^{-1}$  para  $K_1$  y de 1 a 5  $\text{nM}^{-1}$  para la  $K_2$ .

Apreciando en su conjunto la tabla No. IV, vemos que el número total de receptores en la membrana plasmática aumenta durante la regeneración hepática con respecto al control; que aparentemente no existen receptores crípticos extraíbles con Triton X-100 en la membrana plasmática en condiciones normales, pero sí en el hígado regenerante, siendo este valor cerca de nueve veces mayor que en el hígado normal y cerca de 3.4 veces mayor que el apreciado en la misma condición en la membrana intacta. Por último se observa una disminución de cerca de cuatro veces en los receptores presentes en complejo de Golgi, con el concomitante aumento en los membranales, al quinto día de regeneración.

## DISCUSION.

Lejos de considerarse como una cuestión cerrada, el problema de la regeneración hepática está abierto y lleno de enigmas no resueltos. Tal como Becker (45) ha sostenido "sólo el hígado conoce el secreto de su regeneración" y a pesar de la riqueza de la teoría endócrina desarrollada para explicarla, ésta aún no ha dado respuesta a un conjunto de preguntas derivadas de ella. Así uno de los aspectos más interesantes del fenómeno es el papel de la Insulina y el Glucagón como hormonas simultáneamente requeridas para la consecución del proceso.

Resulta difícil de comprender el hecho de que hormonas con efectos metabólicos antagónicos tales como Insulina y Glucagón, sean requeridas en un mismo tiempo y más paradójico aún es que la Insulina promueva la síntesis de DNA en el hepatocito, tanto in vivo como in vitro, mientras que el Glucagón la inhibe (46)-(22). Cuando por otro lado, una inyección de Insulina por vía intravenosa suprime la síntesis de DNA en ratas parcialmente hepatectomizadas (49).

Aparece con singular atractivo la idea de tratar de dar respuesta al problema del descenso en los niveles circulantes de Insulina y el ascenso en los de Glucagón durante el estado regenerativo, el cual pareciera sugerir un mecanismo de comunicación entre el hígado y el páncreas. Dado que los cambios en la capacidad de unión de las hormonas mencionadas, son la consecuencia

de ese cambio no explicado en sus niveles circulantes, el estudio de los mecanismos que rigen ese fenómeno, es una etapa inicial para llegar a obtener a la larga, una caracterización completa de la regeneración hepática.

Dentro de esa línea de pensamiento, se consideró importante tener conocimiento de los eventos involucrados en la interacción de la Insulina con la célula hepática, y puesto que el primero de dichos eventos es la interacción de la hormona con su receptor membranal se procedió a estudiar la certeza de la tesis planteada en un trabajo previo de nuestro laboratorio, en donde se sostuvo que la síntesis del receptor se veía incrementada. Para saber si lo que realmente ocurre en el proceso proliferativo es una síntesis de novo del receptor de insulina y no una redistribución, un primer paso fue contar con un método cierto de valoración de las cantidades de proteína en las preparaciones membranales, el cual permitiera evaluar en forma cuantitativa el número total de receptores presentes tanto en plasmalemma como en el aparato de Golgi. Como ya se indicó en la sección correspondiente a los resultados, el método de Markwell fue el que se tomó como válido, dadas las ventajas que se desprenden del análisis de la tabla I, donde se ve que elimina cualquier forma de enmascaramiento de proteínas. Resuelto esto, otro elemento fundamental fue contar con una preparación de la hormona marcada con  $^{125}\text{I}$ , la cual conservara todas las caracte-

rísticas de actividad biológica de la molécula original y que presentara un nivel elevado de radiactividad para su detección en el ensayo.

Por razones operacionales, nosotros no realizamos ninguna prueba de la acción biológica de la preparación de Insulina sobre algunas de las funciones celulares que desempeña, sin embargo tomamos como base de su integridad física el criterio de precipitabilidad por ácido Tricloroacético, la aparición autoradiográfica de la radiactividad en una banda con peso igual al reportado para Insulina; y como criterio para su actividad biológica, su capacidad de unión a las fracciones membranales y el desplazamiento específico de la radiactividad por la Insulina no marcada (fría) así como las características cinéticas de la interacción, que es rápida y alcanza un equilibrio estacionario en menos de 60 minutos a 30 °C.

Si se observa en la gráfica No. 3, encontramos que gradualmente hay una caída en el nivel estacionario de la unión entre la hormona y su receptor membranal, la cual sugiere la degradación del receptor durante la incubación. Otros autores (44) han observado que la preincubación de membranas a 30 °C por períodos variables de tiempo conduce a una pérdida gradual en la capacidad de unión de Insulina, una posible explicación al respecto, sería el considerar que el receptor es digerido por proteasas inherentes a la membrana o de origen lisosomal.

Correlativamente, en la gráfica No. 8 vemos que la interacción de la insulina con las membranas del aparato de Golgi no tienen cambios en el nivel estacionario de la unión, inclusive a tiempos tan largos como 150 minutos a 30 °C. Dicha situación conduce a pensar que esta fracción subcelular no está contaminada de elementos lisosomales, tal como ha sido planteado en un estudio semejante (44).

Consideramos que los resultados obtenidos son válidos y de interés fisiológico, puesto que el sistema utilizado para su obtención es de alta afinidad para  $^{125}\text{I}$ -Insulina y en el cual sus constantes se encuentran en el orden de magnitud nanomolar, que es coincidente con las concentraciones circulantes de Insulina de  $\approx 10^{-9}$  M en la sangre venosa portal (50), así como por su patrón altamente reproducible, y aunque las fracciones tanto de membrana plasmática como de aparato de Golgi no hayan sido sometidas a una caracterización distintiva con marcadores enzimáticos específicos de ellas (5'-nucleotidasa, fosfodiesterasa alcalina I, fosfatasa alcalina para membrana plasmática y galactosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa y sialiltransferasa para aparato de Golgi), además de algún procedimiento inmunohistoquímico con anticuerpo anti-receptor de insulina, en cada caso nosotros confiamos en la naturaleza de las fracciones estudiadas, por la aplicación rigurosa de los métodos de centrifugación diferencial y en gradiente de densidad utilizados para

su obtención y realizados en forma rutinaria en el laboratorio.

Con todo ese fundamento y consecutivamente al análisis de la información contenida en la tabla IV, podemos ver que si bien no hay cambio significativo en la afinidad de la interacción entre la Insulina y el receptor entre el hígado normal y el regenerante, si hay un notable cambio en el número de sitios de unión ( $R_0$ ), de 5.0 a 12.0 pmolas/mg en la membrana plasmática y de 4.50 a 40.65 pmolas/mg de receptores extraídos en forma soluble por el Tritón X-100 a partir de la membrana plasmática. Ahora, observando los datos para el aparato de Golgi, vemos que hay una disminución en los sitios de unión, de 54.0 a 12.75 pmolas/mg. Si realizamos la suma total de sitios del estado normal (extraídos de la membrana por el detergente + presentes en el aparato de Golgi) tenemos un valor de 58.5, y haciendo lo mismo con el hígado regenerante, tenemos un valor de 53.4, siendo ambos muy similares entre sí, no existiendo diferencia significativa entre ellos tal como indica el análisis de "t student".

Por tal evidencia, nos inclinamos en pensar que en el estado de regeneración hepática hay un incremento en el tránsito de receptores para Insulina entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática, esto es, una redistribución.

Esta idea se fortalece por el conocimiento que se tiene acerca del proceso de maduración del receptor de Insulina (como Glicoproteína que es) en el sistema de Adipocitos 3T3-L1 (31) -

(32), en donde se sabe que existe una molécula de 20,000 daltones la cual parece ser el precursor del receptor, tal como se ha demostrado en experimentos de pulso y caza, y que constituye una forma inmadura con capacidad de unir Insulina, cuyo procesamiento terminaría en el seno de la membrana en la que estarían como estructuras crípticas.

De acuerdo a este razonamiento, el incremento en los receptores de Insulina en la membrana plasmática de las células del hígado regenerante, sería debido a un incremento en el tránsito de los mismos con el aparato de Golgi, como consecuencia de un estado "forzado" por la disminución de los niveles de insulina circulantes y el requerimiento de ella por el hepatocito para su proliferación.

De esta forma, en el hepatocito normal el número de receptores crípticos es bajo, no porque en su membrana no se concluya su maduración, sino porque el proceso no es abrupto y por lo tanto el recambio es equilibrado, de forma que los receptores llegan a madurar pero otros son reciclados simultáneamente para su degradación.

Ahora, con respecto a la evidencia apuntada por Mourelle y Rubalcava (27) de que lo que ocurre en el estado hepatoproliferativo es una síntesis de novo, puesto que el incremento en el número de sitios de unión observado por ellos, es detenido y revertido por la administración de cicloheximida y mitomicina C,

nosotros podemos sugerir que lo que podría ocurrir en dicha situación es una inhibición de la síntesis de alguna enzima o proteína que participara en el proceso de traslocación del receptor entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática, puesto que es bien conocido que en los procesos de secreción celular participan gran cantidad de elementos celulares, tal como los componentes del citoesqueleto (44) (47).

## REFERENCIAS.

- 1) Bresnick E. Regenerating Liver: An experimental model for the Study of Growth. In: Methods in Cancer Research. VI: 347, 1971.
- 2) Abney Soto R. Estudio sobre péptidos libres en plasma e - hígado de rata normal y hepatectomizada parcialmente. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias Químicas, UNAM. México, 1965.
- 3) Smuckler E.A. and E.P. Benditt. Carbon tetrachloride - poisoning in rats: Alterations in ribosomes of the liver. Science 140: 308, 1963.
- 4) Smuckler E.A. and E.P. Benditt. Studies on carbon tetra - chloride intoxication III. A subcellular defect in protein synthesis. Biochemistry 4: 671, 1965.
- 5) Recknagel R.O. and A.K. Ghoshal. Lipoperoxidation as a - Vector in Carbon Tetrachloride hepatotoxicity. Lab. Invest 15: 132, 1966.
- 6) Recknagel R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pha - macol. Rev. 19: 145, 1976.
- 7) Recknagel R.O. and B. Lombardi. Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their - relationship to a new hypothesis regarding the pathogene - sis of Carbon tetrachloride fat accumulation. J. Biol. - Chem. 236: 564, 1961.

- 8) Leevy C.M. et al. Liver regeneration in experimental carbon tetrachloride intoxication. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102: 672, 1959.
- 9) Baserga R. Multiplication and Division in Mammalian Cells New York. Dekker, 1976.
- 10) Ginos A. D. and G. O. Gey. Humoral factors involved in the induction of liver regeneration in rat. Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 80: 421, 1952.
- 11) Richard L. et al. A study of possible humoral factors in liver regeneration in rat. Surgery 44: 561, 1958.
- 12) Balinsky I. B. Introducción a la embriología. Omega, Barcelona. 1978.
- 13) Bullough W. S. Analysis of the life cycle in mammalian cells. Nature. 198: 359, 1953.
- 14) Bullough W. S. and E. B. Lawrence. Mitotic control by internal secretion. Exp. Cell. Res. 31: 1, 1963.
- 15) Bullough W. S. and T. Ryttomaa. Mitotic Homeostasis. Nature 205: 4971, 1965.
- 16) Leffert H. L., Koch K.S., Moran T. and B. Rubalcava. Hormonal control of rat liver regeneration. Gastroenterology - 76: 1470, 1972.
- 17) Higgins G. M. and R. M. Anderson. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Path. 12: 186, 1931.

- 18) Morley C.C.G. and H.S. Kingdom. The regulation of cell - growth. I Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factors from the serum of partially hepatectomized rats. Biochem. Biophys. Acta. 308: 260, 1973.
- 19) Bucher N. L. Regeneration of Mammalian Liver. Int. Rev. Cytol. 15:245, 1963.
- 20) Bucher N. L. Regeneration liver and kidney. New Eng. J. Med. 277:686, 1967.
- 21) Short J. et al. Induction of DNA synthesis in the liver of the intact animal. M. Biol. Chem. 247(6): 1757, 1972.
- 22) Leffert H.L. et al. Specific endocrine and hormonal receptor changes associated with liver regeneration in adult - rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4033, 1972.
- 23) Leffert H. L. et al. Hepatocyte Growth control: In vitro problems approach of Liver Regeneration and Function. Natl. Cancer Inst. Monogr. 48:87, 1978.
- 24) Cohen S. and J.M. Taylor. Epidermal Growth Factor: Chemical and Biological Characterization. EN: Hay E.D. et al. (Eds) Macromolecules regulating growth and development. Academic Press. New York, p. 25, 1974.
- 25) Bucher N.L.R. and M.N. Seaffield. Regulation of Hepatic - regeneration in rats by synergistic action of Insulin and Glucagon, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1157, 1975.

- 26) Bucher N.L., Patel, U. and Cohen, S. Hormonal factors - concerned with liver regeneration. CIBA Foundation Symp. 55: 95, 1978.
- 27) Mourelle M. and Rubarcava B. Regeneration of the liver - after carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 265: 1956, - 1981.
- 28) Cuatrecasas P. Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes. J. Biol. Chem. - 247: 1980, 1972.
- 29) Czech, M.P., Massague, J. and Pilch, P.F. The Insulin - Receptor: Estructural features. TIBS 6: 222, 1981.
- 30) Czech, M.P. and Massague, J. Subunit structure and dynamics of insulin receptor. Fed. Proc. 41: 2719, 1982.
- 31) Deutsch, P.J. et al. Identification and characterization of a latent pool of insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 257: 5350, 1982.
- 32) Deutsch, P.J. et al. Latent insulin receptors and possible receptor precursors in 3T3-L1 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 133, 1983.
- 33) Neville D. M. Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver. Biochem. - Biophys. Acta. 154: 540, 1968.
- 34) Pohl, S.L. et al. Glucagon sensitive adenyl cyclase in - plasma membrane of hepatic parenchimal cells. Science. - 164: 566, 1969.

- 35) Bergeron J.J.M., et al. Golgi fractions prepared from - rat liver homogenates. II. Biochemical Characterization. J. Cell. Biol. 59: 73, 1973.
- 36) Rubalcava B. and Rodbell M. The role of acidic phospho - lipids in glucagon action on rat liver adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 248: 3831, 1973.
- 37) Cuatrecasas, P. Isolation of the Insulin Receptor of Li - ver and Fat-Cell Membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 318-322, 1972.
- 38) Cuatrecasas P. Properties of Insulin Receptor Isolated - from Liver and Fat-Cell Membranes. J. Biol. Chem. 247: 1980-1991, 1972.
- 39) Bradford J.J.M. et al. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein uti - lizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248, 1976.
- 40) Markwell, M.A.K. et al. A modification of the Lowry proce - dure to simplify protein determination in membrane and - lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87: 206, 1978.
- 41) Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin Fe - nol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 42) Ginsberg, B.M. et al. The insulin receptor of the turkey erythrocyte: Characterization of the membrane bound re - ceptor Biochem. Biophys. Acta. 443: 227-242, 1976.
- 43) Brindbaumer, L. Membrane receptor: Criteria and selected methods of study In: Schcrader, W.T. et al. Laboratory -

- methods manual for hormonal action and molecular endocrinology. Dept. Cell. Biology, Texas Medical Center, Houston p. 3/1-3/21, 1980.
- 44) Posner, B.J. et al Intracellular Polypeptide Hormonal receptors. J. Biol. Chem. 253: 4067-4073, 1978.
- 45) Becker F.F. Humoral aspects of liver regeneration In: Love, J. Gordon, A.S. Humoral control of growth and differentiation. Vol. I Academic Press, Inc. p. 249-256, 1973.
- 46) Leffert H. L. Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VII. Hormonal control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration. J. Cell. Biol. 62: 749-801.
- 47) Posner, B.I. et al. Uptake of Insulin by plasmalemma and Golgi subcellular fractions of rat liver. J. Biol. Chem. 255: 735-741, 1980.
- 48) Alberts, B. et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York, 1983.
- 49) Leffert H.L., Koch K.S., and Rubalcava B. Present Paradoxes in environmental control of hepatic proliferation. Cancer Research, 36: 4250-4255. 1976.
- 50) Parsons, J.A., (Ed.) Peptide Hormones, London, The Macmillan Press LTD, p. 76, 1976.