



17
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ACIDO
RIBONUCLEICO MENSAJERO (RNAm) DE
ACTINA EN HIGADO DE RATA NORMAL
Y EN REGENERACION”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA LUISA ESTEVES PIÑA

DIRECTOR:

DRA. ISaura MEZA GOMEZ PALACIO



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 está 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.

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 3 |
| III. GENERALIDADES | |
| a) El Hígado. Organización Funcional y Diversidad Celular. | 4 |
| b) Elementos del Citoesqueleto en Hepatocitos. | 11 |
| c) Efectos Hepatotóxicos del Tetracloruro de Carbono. | 19 |
| d) Regeneración Hepática. | 24 |
| e) Naturaleza de la Información Genética. Acido Ribonucleico Mensajero (RNAm). | 29 |
| IV. MATERIAL Y METODOS. | |
| 1. Tratamiento de ratas con CCl ₄ | 42 |
| 2. Aislamiento de Hepatocitos | 42 |
| 3. Extracción del RNA total de hepatocitos | 43 |
| 4. Cromatografía en columna oligo dT del RNA total para obtener el RNA poli A ⁺ (RNA mensajero) | 44 |
| 5. Análisis del RNA en geles de agarosa bajo condiciones no desnaturalizantes para el ácido nucleico | 44 |
| 6. Transferencia del RNA a papel de nitrocelulosa | 45 |
| 7. Preparación del probe radioactivo de ACTINA Marcaje con ³² P. Nick Translation. | 47 |
| 8. Desnaturalización del DNA marcado con ³² P | 48 |
| 9. Hibridación del RNA con el Probe Radioactivo (Método de "Northern Blot Hybridization"). Densitometría de Autorradiografías | 48 |
| 10. Técnica de Hibridación de Manchas (Dot Blot Hybridization) | 49 |
| 11. Ensayo con Ribonucleasa | 49 |

| | |
|--|----|
| 12. Tinción de RNA después de transferir a filtros de nitrocelulosa | 49 |
| 13. Traducción "in vitro" con metionina ³⁵ S y verificación en geles de poliacrilamida: | 50 |
| Unidimensional | 51 |
| Bidimensional | 52 |

V. RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 1. Análisis del incremento del peso de las ratas control e intoxicadas con CCl ₄ durante el tratamiento de cinco semanas | 54 |
| 2. Aislamiento de hepatocitos | 56 |
| 3. Aislamiento y análisis electroforético del RNA total de hepatocitos | 56 |
| 4. Análisis electroforético del RNA total de hepatocitos en geles desnaturalizantes (glixal-DMSO) | 58 |
| 5. Obtención del RNA poli A ⁺ (RNA mensajero) por cromatografía en columna oligo dT a partir de RNA total | 60 |
| 6. Análisis electroforético del plásmido recombinante con la secuencia genómica para actina de <u>Drosophila melanogaster</u> . | 62 |
| 7. Preparación del probe radioactivo de actina. Patrón cromatográfico en Sephadex G-100. Marcaje con ³² P. | 63 |
| 8. Hibridación del RNA con el probe radioactivo (Método de Northern Blot Hybridization) | 65 |
| 9. Localización del RNAm de actina por hibridación del RNA total de hepatocitos con el plásmido recombinante con la secuencia genómica para actina de <u>Drosophila melanogaster</u> . | 73 |
| 10. Hibridación de manchas (Dot Blot Hybridization) Densitometría de autorradiografía | 76 |
| 11. Análisis electroforético unidimensional de proteínas obtenidas al traducir RNA total con incorporación de metionina ³⁵ S. | 78 |
| 12. Análisis electroforético bidimensional de proteínas obtenidas al traducir RNA total con incorporación de metionina ³⁵ S. | 79 |

| | Página |
|--|--------|
| VI. DISCUSION DE RESULTADOS | 88 |
| VII. CONCLUSIONES | 97 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 98 |
| IX. LISTA DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS | 105 |

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se estudia un modelo experimental de cirrosis hepática en ratas, inducido por tetracloruro de carbono durante 5 semanas de tratamiento.

En este tiempo de intoxicación se analizó de forma periódica la variación del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de ACTINA en la población de células parenquimatosas o hepatocitos.

El hecho de que se analice el RNAm de ACTINA, está justificado al considerarse como un parámetro para determinar indirectamente la variación de una de las más abundantes proteínas del citoesqueleto, así como una de las proteínas de mayor expresión celular. Se sabe que en hígados cirróticos se incrementan proteínas constituyentes de la matriz extracelular como colágena, así como se ha demostrado que en el curso de una "regeneración hepática" después de una hepatectomía parcial y en "cirrosis" experimental y humana, los MICROFILAMENTOS se rearreglan e incrementan en cantidad. Existe otro fenómeno peculiar en cirrosis hepática que consiste en la aparición de un tipo celular denominado "miofibroblastos" que contienen abundante cantidad de microfilamentos, es decir de ACTINA y que se relacionan con una contractilidad incrementada del órgano cirrótico. El desarrollo de estas células es independiente del agente etiológico o de las especies y parece representar una respuesta no específica del hígado a una lesión tóxica.

Sin embargo el origen exacto de los "miofibroblastos" se desconoce aunque se han asociado de manera no clara con las células perisinusoidales o células de Ito que se localizan en el espacio de Disse, ya que poseen características morfológicas similares a las células formadoras de colágena.

El análisis densitométrico de las hibridaciones específicas entre el DNA (ácido desoxirribonucleico) recombinante de ACTINA de Drosophila melanogaster y el RNA (ácido ribonucleico) obtenido de hepatocitos de rata, muestra que la variación del RNAm (ácido ribonucleico mensajero) de ACTINA

no aumenta progresivamente, puesto que a pesar de incrementarse considerablemente a las 24 horas (con una dosis de CCl_4) y a la semana de intoxicación, el nivel de RNAm de ACTINA disminuye hasta valores normales durante la tercer semana de tratamiento. Sin embargo a las 5 semanas de continuarse la intoxicación, la cantidad de RNAm de ACTINA vuelve a incrementarse pero no alcanza los valores obtenidos a la semana del tratamiento. Estos datos deben considerarse estar afectados por la aparición de células con diferencia morfológica a la de los hepatocitos, incluidas en la fracción parenquimatosa durante el aislamiento celular, y que pudiesen ser los miofibroblastos.

La realización de geles unidimensionales y bidimensionales de las proteínas traducidas "in vitro" señala que cuando se presenta el incremento del RNAm de ACTINA, éste no es específico, ya que se encuentran incrementadas en general todas las proteínas traducidas a partir del RNA obtenido en las respectivas etapas. Sin embargo encontramos que el sistema pudiese mejorarse al traducir solamente el RNA poli A⁺ en lugar del RNA total.

Con el análisis de la variación del RNA mensajero de ACTINA de las células parenquimatosas del hígado de rata durante el curso de la intoxicación crónica con tetracloruro de carbono, se pudo adquirir experiencia en la metodología respectiva, dentro del campo de biología molecular, la cual sirve como base para ampliar este estudio, investigando otros tipos celulares del hígado para poder hacer conjeturas más válidas con respecto al candidato más apropiado para originar las células miofibroblásticas del hígado cirrótico, así como señalar en que proporción contribuyen al aumento de ACTINA en este estado patológico del hígado.

OBJETIVOS.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL RNAm
 (ACIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO) DE ACTINA EN HEPATOCITOS
 DE RATA DURANTE EL CURSO DE LA INTOXICACION CRONICA CON
 TETRACLORURO DE CARBONO.

ANALISIS DE LAS PROTEINAS SINTETIZADAS "IN VITRO"
 A PARTIR DEL RNAm OBTENIDO DE HEPATOCITOS DE RATA
 DURANTE LA INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO.

EL HIGADO. ORGANIZACION FUNCIONAL Y DIVERSIDAD CELULAR.

El hígado es una de las glándulas más importantes que se comunican con el intestino; en el desarrollo embrionario se localiza cerca de la pared intestinal donde circula una gran vena y siendo un órgano adulto tiene una íntima relación con la sangre. Las células en el hígado que derivan del epitelio primitivo del intestino -LOS HEPATOCITOS- se encuentran colocados en extensiones plegadas originando espacios que contienen sangre y que se denominan SINUSOIDES. La sangre se separa de la superficie de los hepatocitos por una capa de células endoteliales aplanadas que cubren lateralmente las extensiones formadas por los hepatocitos (figura 1). Esta estructura facilita las funciones principales del hígado, que corresponden al intercambio de metabolitos entre los hepatocitos y la sangre. (Alberts, et al., 1983).

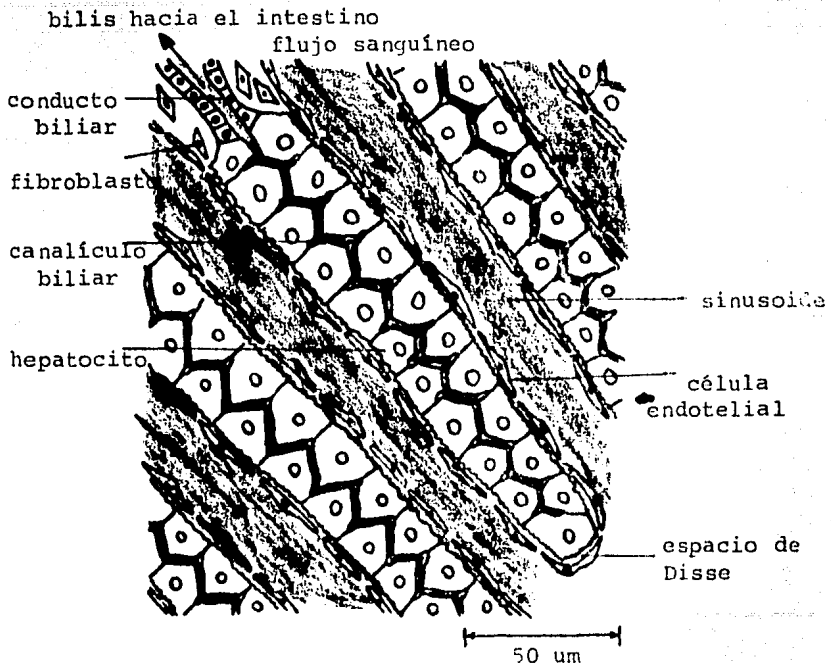


Figura 1 . Diagrama que esquematiza las estructuras del hígado.

El hígado es el sitio más importante donde los nutrientes que han sido absorbidos del intestino y transportados por la sangre son procesados para su uso por otras células corporales. Los hepatocitos son por lo tanto los responsables de la síntesis, degradación y almacenamiento de una inmensidad de sustancias diferentes. Al mismo tiempo, los HEPATOCITOS permanecen en comunicación con el lumen del intestino mediante un sistema de canaliculos (canales diminutos) y de conductos más grandes, secretando por esta vía un agente emulsificante hacia el intestino, la bilis, que ayuda a la absorción de las grasas (figura 1).

La membrana plasmática de los hepatocitos involucra un dominio íntegro lateral (figura 2) en el cual las bicapas de la membrana plasmática de hepatocitos contiguos forman una hendidura intercelular (20 μm de ancho). Las uniones proveen comunicación entre hepatocitos vecinos. La membrana plasmática que se alinea en los espacios perisinusoidales tiene numerosas microvellosidades irregulares que se proyectan en el espacio. Las extensiones del espacio perisinusoidal entre hepatocitos forman un espacio paracelular que retiene pocas microvellosidades; su desaparición indica la transición a la hendidura intercelular. La membrana plasmática de los hepatocitos, que está dirigida hacia los espacios perisinusoidales y paracelulares, se denomina superficie basolateral, en analogía a otras células epiteliales, y difiere químicamente e histoquímicamente de las superficies continuas canaliculares. Sin embargo, los límites entre las microvellosidades y los dominios continuos hepatocíticos son móviles, dependiendo de las demandas funcionales. En regeneración o en colestasis, el dominio continuo se reduce considerablemente (I. Arias et al. 1982).

Los HEPATOCITOS como entran en estrecho contacto con la sangre cargada de alimento, se hallan en posición ventajosa para llevar a cabo las siguientes funciones:

- 1) Almacenamiento. Los hepatocitos pueden captar azúcar de la sangre y almacenarlo como glucógeno. Pueden tomar aminoácidos de la sangre y sintetizar proteínas, por lo que en cierto modo pueden almacenar proteína. Pueden asimismo almacenar grasa y algunas vitaminas, por ejemplo, la A y la B₁₂.

- 2) Transformaciones y conjugaciones. Como las proporciones de sustancias nutritivas de la dieta no son necesariamente las más deseables para las células del cuerpo, las células hepáticas, dentro de ciertos límites, transforman diversas sustancias unas en otras, de manera que lo que los hepatocitos envían a la sangre es más adecuado para el metabolismo de las células corporales.

Ahora en forma de pequeñas gotitas, llamadas quilomicrones, la

grasa de la sangre probablemente es desintegrada en la superficie de los hepatocitos y los productos entran en ellos; algunos se combinan con colina y fósforo para constituir los fosfolípidos, muy útiles, componentes esenciales de las membranas celulares. Si los sinusoides no permitieran que el plasma sanguíneo entrara en contacto con los hepatocitos, los quilomicrones no podrían alcanzar directamente las superficies de los mismos.

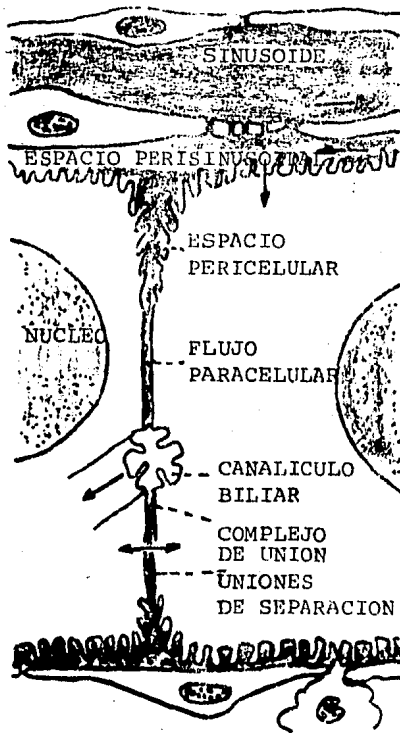


Figura 2 . Ilustración de las principales superficies (dominio) de los hepatocitos en relación con los espacios perihepatocelulares. Las flechas indican las direcciones de los flujos.

Otra función de los hepatocitos que incluye transformación conjugación, o ambas, es la destoxificación de algunos productos indeseables absorbidos del intestino o producidos en el metabolismo y que pudieran tener efecto perjudicial. Por ejemplo, se forma amoniaco en relación con el metabolismo de los aminoácidos; el amoniaco es tóxico a determinada concentración. Los hepatocitos evitan que se alcancen tales concentraciones empleando el amoniaco para formar sustancias útiles o urea; esta última no es tóxica (a menos que alcance concentraciones extraordinarias) y es eliminada del cuerpo por el riñón.

3) Síntesis. Las células hepáticas producen gran parte de la proteína de la sangre. Los hepatocitos producen la albúmina, el fibrinógeno y la mayor parte de las globulinas de la sangre, así como otras proteínas relacionadas con la coagulación de la misma. Si el plasma sanguíneo no pudiera entrar en contacto directo con los hepatocitos, las proteínas de la sangre secretadas por ellos no podrían entrar rápidamente en el torrente vascular. Los hepatocitos no fabrican globulinas gamma, que, según se ha visto se producen por las células plasmáticas.

4) Regulación de la concentración sanguínea de algunas sustancias. Los hepatocitos pueden captar carbohidratos, lípidos y aminoácidos así como algunas otras sustancias necesarias para una buena nutrición y mantenimiento, devolviéndolas al torrente vascular cuando son indispensables. Al efectuar esta función los hepatocitos ejercen un delicado control sobre la concentración de glucosa en la sangre. Cuando se absorbe mucha glucosa, para que ésta no eleve su concentración en sangre, el hígado la incorpora de la sangre y la convierte en glucógeno. Luego, a medida que el carbohidrato se utilice por el cuerpo la glucemia decae y los hepatocitos convierten el glucógeno en glucosa y la envían nuevamente al torrente sanguíneo. En esta forma en presencia de las hormonas insulina y adrenalina, la glucemia se conserva casi constante (Arthur W. Ham, 1970).

Como la mayoría de los tejidos, el hígado es una mezcla de diversos tipos celulares. El volumen total del hígado está ocupado por células (84.1%) y por elementos del espacio extracelular. Del total del volumen celular el 92.5% corresponde a hepatocitos y solamente el 7.5% a la suma de células endoteliales, Kupffer y almacenadoras de grasa o células Ito. Del espacio extracelular, el espacio de Disse y el lumen sinusoidal representan 97.4% del volumen y están interconectadas a través de entradas en las células endoteliales. De esta forma el contenido del espacio extracelular está cubriendo constantemente la membrana plasmática de elementos celulares, y por consiguiente los cambios en la naturaleza y/o distribución de componentes extracelulares influirá de manera importante en la función hepática.

COMPOSICION HEPATICA EN PORCENTAJE DEL VOLUMEN DEL PARENQUIMA*

| LOCALIZACION | % | % RELATIVO CELULAR O DE VOLUMEN |
|--|------|------------------------------------|
| CELULAS | 84.1 | |
| HEPATOCITOS | 77.8 | 92.5 |
| NO HEPATOCITOS | 6.3 | 7.5 |
| CELS. ENDOTELIALES | 2.8 | 3.3 |
| CELS. DE KUPFFER | 2.1 | 2.5 |
| CELS. ALMACENAMIENTO DE GRASA O ITO | 1.4 | 1.7 |
| ESPACIO EXTRACELULAR | 15.9 | |
| ESPACIO DE DISSE | 4.9 | 30.8 |
| LUMEN SINUSOIDAL | 10.6 | 66.6 |
| CANALICULO BILIAR | 0.4 | 2.7 |

*Datos modificados de Blouin, et al. 1977.

El ESPACIO EXTRACELULAR del hígado se compone de una gran variedad de moléculas, algunas de las cuales fluyen en dos direcciones entre los sinusoides y los hepatocitos. Las otras moléculas son elementos del tejido conectivo y constituyen la matriz extracelular: colágena, glicosaminoglicanos y glicoproteínas (Marcos Rojkind, 1982).

Al referirse al LUMEN SINUSOIDAL, es importante mencionar que se refiere a los espacios del acino hepático, de estructura esponjosa, que sirven como enorme receptáculo mezclador para los dos tipos de sangre que penetran ahí con diferentes presiones, la sangre de la vena porta a baja presión y sangre de la arteria hepática a presión elevada.

La mayor parte de células de revestimiento de los SINUSOIDES son células reticuloendoteliales fagocíticas denominadas CELULAS DE KUPFFER. El revestimiento de los sinusoides no constituye

una membrana continua, como el endotelio ordinario de los vasos sanguíneos, ni está firmemente unido a las paredes de las vías que reviste, como ocurre con el endotelio ordinario. Por el contrario el reticuloendotelio (CELULAS DE KUPFFER) está separado de los hepatocitos del parenquima hepático por un espacio denominado ESPACIO DE DISSE, y las conexiones entre células reticuloendoteliales contiguas del revestimiento son suficientemente laxas para permitir que el plasma (pero no las células de la sangre) entre en contacto directo con las membranas celulares de los hepatocitos cuando la sangre circula siguiendo los sinusoides. Esto es ventajoso, porque los hepatocitos tienen que efectuar diversos trabajos que no podrían llevar a acabo, o que harían menos eficaces si tuvieran que operar a través del medio de tejido tisular y de un endotelio continuo. (I. Arias, et al. 1982).

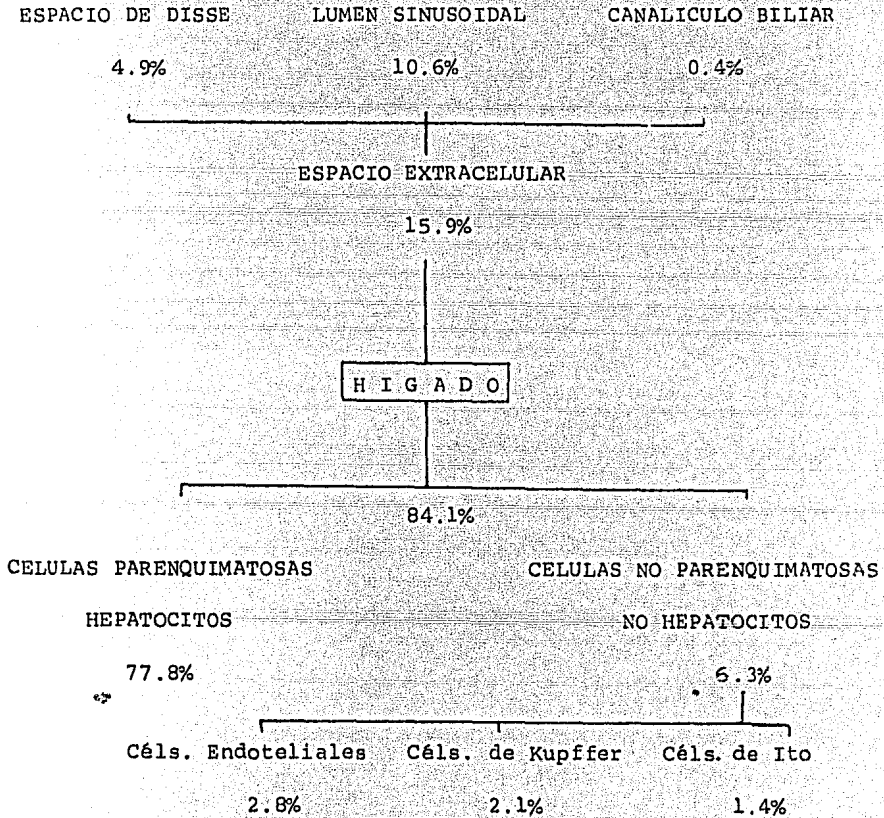
La línea de células endoteliales, además de contener a las células de Kupffer, que fagocitan materiales del flujo sanguíneo así como glóbulos rojos innecesarios, contiene un pequeño número de FIBROBLASTOS que sirven de soporte y constituyen el tejido conectivo. (Alberts, B. et al. 1983).

A lo largo de los conductos de Hering y en las paredes de los preconductillos se distribuyen las células de tipo de conducto o CELULAS EPITELIALES BILIARES que difieren de los hepatocitos al carecer de la reacción característica de glucosa-6-fosfatasa. La transición de un tipo celular a otro en el desarrollo embrionario o en estados patológicos no se ha establecido. Tampoco se ha podido aclarar la diferencia entre células de diferentes conductillos y conductos (I. Arias, et al. 1982).

Otras células que existen en el hígado, son las que tienen la capacidad de almacenar ciertos lípidos y se convierten muy prominentes cuando hay un exceso de tales materiales como la vitamina A, que al ingerirse se almacena en el hígado para mantener su concentración sanguínea dentro del rango normal, a estas células se les denomina CELULAS DE ITO (Lane, 1974).

Todas las células mencionadas son capaces de dividirse. Para una regeneración perfecta, su proliferación debe ser coordinada apropiadamente. El desarrollo embrionario produce una mezcla equilibrada y bien organizada; la regeneración en el adulto puede fallar al tratar de lograr esta organización y equilibrio. Por ejemplo, si los hepatocitos son intoxicados repetidamente con TETRACLORURO DE CARBONO o con ALCOHOL a tal frecuencia, que no sean capaces de recobrase totalmente entre los períodos de intoxicación, los FIBROBLASTOS toman ventaja de la situación y el hígado se convierte irreversiblemente en un tejido fibroso con exceso de tejido conectivo, dejando poco espacio para que crezcan los HEPATOCITOS aún después de que se eliminen los agentes tóxicos. Esta condición denominada CIRROSIS es común en alcohólicos crónicos. (Alberts, B. et al. 1983).

COMPOSICION HEPATICA EN PORCENTAJE DE VOLUMEN DEL PARENQUIMA



Blouin, et al., 1977. Datos modificados.

El Sistema de Microfilamentos.

Propiedades y funciones.

Las células no musculares contienen un sistema de microfilamentos que contiene actina. Los microfilamentos miden de 5 a 7 nm de diámetro y están compuestos de actina globular (G) que forma filamentos de actina (F). Cada filamento consiste de dos cadenas de F-actina enrolladas una alrededor de la otra formando una hélice.

La ACTINA es una proteína globular con un peso molecular de 42,790 daltones, formada por aproximadamente 375 aminoácidos, contiene el aminoácido N-metilhistidina y en su extremo amino terminal contiene una proporción alta de aminoácidos ácidos. Para mantener su conformación nativa requiere de un nucleósido trifosfatado, usualmente ATP, y un catión mono o divalente. El complejo actina-ATP (G-actina), es capaz de formar en presencia de cationes, filamentos helicoidales conteniendo cientos de monómeros de actina-ADP (F-actina). La hidrólisis del nucleótido no es imprescindible para que ocurra la polimerización del monómero, puesto que ésta se lleva a cabo en presencia de análogos no hidrolizables del nucleótido. La estabilidad de los filamentos parece depender en parte del catión que induce su formación (Clarke y Spudich, 1977; Zechel, K. 1981).

Esta proteína se describió en músculo esquelético inicialmente y fue identificada posteriormente en otros tipos celulares y existe en prácticamente todos los tipos de células eucarióticas, describiéndose en más de cien tipos celulares diferentes tanto del reino animal como del vegetal. Es la más abundante de las proteínas del citoesqueleto, y también es una de las proteínas que expresan mayoritariamente todas las células, pudiendo llegar a un 30% del total de las proteínas celulares como ocurre en las plaquetas (Clarke y Spudich, 1977; Rosenberg, et al. 1981; Meza, I., et al., 1983).

La gran conservación de esta proteína en la evolución ha inducido al estudio de genes que la codifican, pues si bien las actinas de diversas fuentes exhiben propiedades muy similares, no son iguales en su composición de aminoácidos, y aun dentro de un mismo organismo, la actina de diversos tejidos no es idéntica. La expresión de los genes de actina ha sido estudiada por técnicas de traducción "in vitro" de RNA mensajero y últimamente por métodos de DNA recombinantes y por caracterización química de la proteína aislada en una gran variedad de especies, como mamíferos, aves y levaduras.

En animales de sangre caliente se expresan cuando menos seis diferentes formas de la proteína (Vandekerckhove y Weber, 1978), una de músculo esquelético, una de músculo cardíaco (alfa actinas), dos de músculo liso (beta y gama actinas) y dos de células no musculares

del citoesqueleto. Además, la colestasis puede inducirse con falojina, clorpromazina o citocalasina, debido a su efecto en los microfilamentos, mientras que el transporte transhepático vesicular o la secreción de lipoproteínas se inhibe con colchicina o alcohol. Así mismo, la retención de proteínas de excreción se cree que se deba a las alteraciones producidas por la enfermedad alcohólica hepática, ya que puede provocar la despolimerización del sistema de microtúbulos. Los componentes de los filamentos intermedios del hepatocito responden de manera más indirecta a la colchicina y griseofulvina produciendo los cuerpos de Mallory en el hepatocito. Usando análisis tridimensional por microscopía electrónica, es posible visualizar como se colapsan los filamentos intermedios para formar condensaciones de filamentos que constituyen los cuerpos de Mallory. Los filamentos que aparecen en los cuerpos de Mallory se acumulan como resultado de una resistencia adquirida hacia la proteólisis. El desarrollo de los cuerpos de Mallory en células de hepatomas se asocian con cambios en el citoesqueleto donde se ha comprobado la transformación celular del tejido. Cultivos primarios de células de hepa toma de ratón muestran que los cambios en el medio ambiente alteran el citoesqueleto y causan la desaparición de los cuerpos de Mallory por autofagocitosis. La griseofulvina "in vitro" no reestablece los cuerpos de Mallory. Así pues, los cambios en el medio ambiente pueden ser importantes en la patogénesis de los cuerpos de Mallory y pueden explicar su formación observada en una gran variedad de enfermedades hepáticas. Las subunidades hepáticas son antigénicas en el hombre. El daño hepatocelular de una naturaleza crónica permite la formación de autoanticuerpos para microfilamentos, filamentos intermedios y para microtúbulos, derivados de polipéptidos. Se han presentado los siguientes casos de formación de autoanticuerpos para citoesqueleto; en hepatitis activa crónica (anti-microfilamentos en 67% de los casos), en cirrosis biliar primaria (microfilamentos en 53%) y en alcoholismo hepático (microfilamentos en 25%, microtúbulos en 50%, filamentos intermedios 100%). Los complejos inmunes contienen cuerpos de Mallory como antígenos que se han observado en glomérulos de pacientes con enfermedad renal asociada con alcoholismo hepático (S.W. French, et al. 1985).

A continuación se describirá con mayor detalle el SISTEMA DE MICROFILAMENTOS, ya que al ser la ACTINA su principal constituyente, nos interesa su descripción para el desarrollo de este trabajo de investigación.

ELEMENTOS DEL CITOESQUELETO EN HEPATOCITOS.

El citoplasma contiene dos componentes principales, que se distinguen por sus propiedades de solubilidad: (a) una estructura sólida o gelosa y (b) el citosol. El citosol constituye el medio interno de la célula y es el sitio de diversas funciones fundamentales para la célula. Contiene proteínas solubles, RNA y enzimas, que constituyen aproximadamente el 25% de la proteína total celular.

La existencia de estructuras esqueléticas intracelulares se postuló primeramente en 1928 pero se observó tiempo después como un artificio de fijación. Técnicas bioquímicas y la localización por microscopio de luz y electrónico, han establecido claramente la existencia e importancia de un sistema elaborado de estructuras citoesqueléticas en la mayoría de las células eucarióticas. Los principales componentes de este sistema son varias clases de diferentes filamentos, microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Estos filamentos forman con la estructura de la membrana un sistema complejo de interacción mutua, que entre otras funciones, juega un papel importante en la regulación de la forma y movilidad, movimientos intracelulares, incluyendo procesos contráctiles y secretorios, mitosis y hendiduras celulares.

La organización de estos filamentos y su asociación con componentes no filamentosos depende de la diferenciación celular y factores ambientales. Diversas condiciones patológicas afectan las estructuras del citoesqueleto (Denk y Franke, 1982).

Los microfilamentos consisten de actina, los filamentos intermedios se constituyen de una combinación de citoqueratinas (vimentina) y los microtúbulos están constituidos por tubulina polimerizada. Los microfilamentos y los microtúbulos difieren de los filamentos intermedios en que sus subunidades están en equilibrio dinámico entre ensamblaje y desensamblaje, mientras que las subunidades de filamentos intermedios están probablemente polimerizadas tan pronto como se sintetizan y permanecen polimerizadas hasta que se desintegren por proteólisis. Los tres sistemas de filamentos están integrados para formar un andamiaje complejo que proporciona al hepatocito su forma así como su organización para organelos y núcleo.

Funciones tales como el transporte transhepático vesicular del sinusoides al canalículo biliar, la secreción de proteínas y el flujo biliar dependen de la integridad del CITOESQUELETO. Drogas que alteran los componentes del citoesqueleto tales como colchicina, griseofulvina, faloidina, alcohol, citocalasina y clorpromazina, se utilizan para determinar el papel funcional de los diversos componentes

Aunque el origen exacto de los MIOFIBROBLASTOS es desconocido, se ha demostrado que en un tejido de granulaci3n las c3lulas fibrobl3sticas se originan localmente (Ross, et al. 1970; Ryan, et al. 1973, 1974) y tal vez se originen de c3lulas perivasculares (c3lulas musculares lisas) o de otros miofibroblastos existentes. Recientemente las c3lulas de Ito mostraron responder al envenenamiento con CCl_4 por hipertrofia, proliferaci3n y transformaci3n en c3lulas no distinguibles de los miofibroblastos (Kent, et al. 1976). Adem3s se ha propuesto que tales c3lulas transformadas son responsables para la formaci3n de dep3sitos de col3gena tipo III durante cirrosis alcoh3lica hep3tica (Rojkind y Mart3nez Palomo, 1976).

En h3gado normal se encuentra escasamente asociados a los FIBROBLASTOS con los HEPATOCITOS de manera íntima; las c3lulas perisinusoidales o c3lulas de Ito se localizaron en el espacio de Disse y poseen varias características morfol3gicas asociadas con las c3lulas formadoras de col3gena, sin embargo su relaci3n con los fibroblastos no est3 clara, ya que no est3n equipadas normalmente con MICROFILAMENTOS prominentes.

La demostraci3n de que los MIOFIBROBLASTOS encontrados en tejidos de granulaci3n de heridas est3n asociados con la producci3n de col3gena tipo III (Gabbiani, et al. 1976), provee evidencias aunque indirectas en favor de la hip3tesis sobre la formaci3n y evoluci3n de la FIBROSIS HEPATICA como fen3meno similar a la de un tejido de granulaci3n de una herida. En conclusi3n parece que una respuesta a una LESION TOXICA CRONICA como por ejemplo la INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO, incrementa la distribuci3n y aparici3n del SISTEMA CONTRACTIL, siendo un constituyente de 3ste el SISTEMA DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA. La retracci3n del h3gado cirr3tico y las alteraciones que lo acompa1an resultan probablemente en parte por la contracci3n activa de tales sistemas localizados primordialmente en los MIOFIBROBLASTOS, de ah3 la importancia en el estudio sobre la distribuci3n y localizaci3n del sistema de MICROFILAMENTOS.

pueden ocurrir también en varias condiciones colestáticas en animales y hombre (Denk y Franke, 1982).

En el curso de una REGENERACION HEPATICA después de una hepatectomía parcial y en CIRROSIS experimental y humana, los MICROFILAMENTOS se rearreglan e incrementan en cantidad, como se demuestra por microscopía de inmunofluorescencia y electrónica (Gabbiani y Ryan, 1974; Lampert, et al. 1974; Toh, et al. 1977). Como consecuencia del daño parenquimal, los fibroblastos (MIOFIBROBLASTOS), que contienen abundante cantidad de microfilamentos, aparecen y se relacionan con una contractilidad incrementada del órgano cirrótico.

Los HEPATOCITOS están normalmente equipados con una red discreta de filamentos compatibles con la presencia de ACTINA y miosina como se ha especificado anteriormente, y se sabe que desarrollan una red de filamentos muy prominente durante la REGENERACION. También se conoce que la regeneración del parénquima se acompaña por la proliferación de ambos ducto biliar y vasos sanguíneos asociados a células musculares (C. Irle, et al. 1980).

Los MIOFIBROBLASTOS han sido descritos en hígados de pacientes con CIRROSIS alcohólica y en CIRROSIS inducida en ratones. Además el desarrollo de tales células es independiente del agente etiológico o de las especies y parece representar una respuesta no específica del hígado a una lesión tóxica (C. Irle, et al. 1980). Asimismo en el hígado fibrótico existe un incremento en el número de células fibroblásticas (o MIOFIBROBLASTOS), y estas células son responsables del exceso en la síntesis de colágena (Rojkind y Kershenovich, 1984).

Se ha demostrado que en el hígado de ratas con CIRROSIS inducida por TETRACLORURO DE CARBONO, varios MIOFIBROBLASTOS típicos aparecen, atribuyéndoseles la contractilidad potencial en respuesta a agentes estimulantes del músculo liso, en analogía con un tejido de granulación (Majno, Gabbiani, et al., 1971).

Existe una similitud evidente del miofibroblasto y de la célula muscular lisa y las características presentes en ambas células son: a) un núcleo con pliegues e indentaciones, b) un gran aparato contráctil formado por filamentos de ACTINA, c) cuerpos densos intracitoplásmicos y d) membrana basal (Gabbiani y Majno, 1972; Grimaud y Borojevic, 1977). Las células han sido localizadas, en la cirrosis humana de diversa etiología como en la experimentalmente inducida en animales de laboratorio, codistribuidas con las bandas de tejido conjuntivo en el espesor del parénquima (Bathal, 1972; Rudolph, et al. 1979; Irle, et al. 1980).

(beta y gama actinas). Esta expresión es independiente de la especie y es específica de tejido.

En el genoma humano se indica que existen alrededor de 20 genes que codifican para actina, encontrándose en vertebrados de sangre caliente que la alfa actina es codificada por al menos cuatro genes que codifican para beta-actina, no se conoce si existen genes que no se expresen o si su producto de expresión es tan poco que no se ha detectado con los métodos utilizados actualmente (Engel, et al. 1981; Humphries, et al. 1981; Dodemont, et al., 1982).

La presencia en todos los tipos de células eucarióticas de la ACTINA, se ha relacionado con todos los eventos móviles de la célula, tales como, contracción, pinocitosis, formación de pseudópodos, mitosis, movimiento de receptores y proteínas membranales. Asimismo se sugiere la participación de la actina en el transporte de aminoácidos y glucosa, secreción de hormonas, transporte de lipoproteínas y de sales biliares (Mak y Pitot, 1980).

La movilidad electroforética de las diferentes actinas en geles de SDS-poliacrilamida es similar, la introducción del método de separación de proteínas por enfoque isoeléctrico permite la separación de las actinas de los vertebrados superiores en tres diferentes formas denominadas alfa, beta y gama, siendo la alfa actina la más ácida de las formas, con un punto isoeléctrico aproximadamente de 5.4. La actina de músculo esquelético y la de músculo cardíaco corresponden a la isoforma alfa, el músculo liso contiene casi exclusivamente la isoforma gama, y las células no musculares contienen tanto beta como gama actinas.

El equilibrio de ensamblaje y desensamblaje puede alterarse por varias sustancias químicas y fármacos. Por ejemplo, el metabolito fungal Citocalasina B, se une en concentraciones subestequiométricas a la actina, con una elevada afinidad sobre sitios de terminales de los filamentos de F-actina, inhibiendo su elongación filamentosa e interrumpe los arreglos regulares de los microfilamentos, conduciendo eventualmente a la despolimerización.

La faloidina, una de las sustancias tóxicas del hongo Amanita phalloides, estabiliza F-actina y promueve o induce la polimerización de G-actina, provocando una acumulación de microfilamentos.

En contraste con las células musculares, solamente bajas concentraciones de miosina están presentes en células no musculares. En las células musculares, las moléculas de miosina contienen ATPasa activa por Ca^{2+} , que se localiza en las cabezas globulares de la molécula. La menor distribución del sistema de microfilamentos en células no musculares, comparadas con células musculares, y la menor concentra-

ción de miosina, originan una actividad contráctil menos eficiente en este sistema.

Presencia y Distribución en Hepatocitos.

La ACTINA comprende aproximadamente del 1 al 2% de la proteína hepática en mamíferos (Fisher y Phillips, 1979; Brandon, 1976; Gordon, et al. 1977; Elias, E. y Boyer, 1979). La actina del hepatocito es B y actinas no muscular (Vandekerckhove y Weber - comunicación personal con Denk 1982-). La miosina asociada a los hepatocitos es similar en composición de aminoácidos a la miosina esquelética y del músculo cardíaco. La relación actina-miosina en hepatocitos es considerablemente mayor que en el músculo esquelético (Fisher y Phillips 1979; Brandon 1976). Los microfilamentos de actina forman una red, que se extiende a través del citoplasma y es concentrada en el citoplasma subcortical del hepatocito, particularmente alrededor del canalículo biliar (Fisher y Phillips, 1979; Oda et al, 1974; Trenchev et al. 1974; French y Davies, 1975; Franke et al. 1979). Pueden asociarse también con organelos celulares, excepto con mitocondria (Fisher y Phillips, 1979), y han sido localizados en núcleos aislados de hepatocitos.

La importancia de la actina intranuclear es controvertida (Le Sturgeon, 1978). Contradictoriamente los núcleos no se tiñen por anticuerpos en microscopía de inmunofluorescencia, al tratar secciones hepáticas o hepatocitos cultivados (Franke et al. 1979). La actina se asocia también con membrana plasmática aislada de preparaciones, pero el modo de su anclaje en la membrana no está aclarado (Oda, et al. 1974). El contenido de actina de los microfilamentos hepáticos se ha demostrado por pruebas de afinidad a meromiosina pesada, que provoca la formación de complejos típicos similares a puntas de flecha (French y Davies, 1975) y por localización inmunomorfológica al microscopio de luz y electrónico. La microscopía de inmunofluorescencia revela actina y miosina teñidas inmunológicamente de forma específica, en la periferia de los hepatocitos y rodeando el canalículo biliar (patrón de tinción poligonal), que resulta de la alta densidad de los microfilamentos en este sitio (Trenchev et al. 1974). Los anticuerpos contra actina y miosina usualmente no muestran una tinción de fibras notorias dentro del citoplasma de los hepatocitos "in situ", posiblemente debido a la escasez de microfilamentos que atraviesan esta región citoplasmática (Franke et al. 1979; Trenchev et al. 1974). Como lo demuestra la microscopía electrónica los microfilamentos de actina están presentes en arreglo paralelo en el centro de las microvellosidades intracanaliculares, similar a lo descrito en mayor detalle en las microvellosidades intestinales (Oda, et al. 1974; French y Davies, 1975; Franke, et al. 1979; Flanagan y Lin 1980). En hepatocitos aislados de cultivos, se localizan microfilamentos relativamente densos y extendidos como cables que se visualizan por microscopía de inmunofluorescencia indirectamente, asimis-

mo se ven fibras ordenadas concéntricamente, que dependen del estado de crecimiento celular y que son similares a los cables encontrados en otros tipos celulares en cultivo (Franke, et al. 1979).

Los datos actuales están de acuerdo con la función del sistema de microfilamentos, en cuanto al fenómeno de motilidad del hepatocito. La concentración de este sistema de filamentos alrededor del canalículo biliar sugiere una relación específica con la secreción biliar. Los filamentos pueden proveer tono al sistema canalicular manteniendo los canalículos en un estado contraído. Pueden también regular el flujo biliar a través de ciclos de contracciones y relajaciones (contracciones activas del canalículo biliar se han demostrado recientemente por cinefotomicrografía por lapsos) y contracciones del centro de las microvellosidades (Denk y Franke, 1982).

Los filamentos de actina pueden involucrarse probablemente también en la formación de la corteza celular sinusoidal del hepatocito como lo sugieren la formación de protuberancias (zeiotic blebs) en estas regiones después de aplicar faloidina o citocalasina B. Todavía existen detalles sobre las funciones biológicas del hepatocito que involucran a la actina, que tienen que ser estudiados (Denk y Franke, 1982).

Patología del Sistema de Microfilamentos Hepático.

La faloidina indujo la hiperplasia de filamentos de actina en hepatocitos de rata como un ejemplo del daño tóxico al sistema de microfilamentos. Los canalículos biliares se dilataban progresivamente con protuberancias en las microvellosidades (Gabbiani, et al. 1975). Bajo la influencia de citocalasina B "in vivo" e "in vitro", los microfilamentos parecen separarse de la membrana canalicular y transformarse en agregados amontonados de filamentos no ordenados junto con material amorfo y granular. Los canalículos están dilatados y las microvellosidades se reducen en número. Además de estos efectos morfológicos, la citocalasina B inhibe diversas actividades enzimáticas y puede también tener otros efectos en las membranas.

En el hígado de ratones envenenados con griseofulvina, el sistema de microfilamentos, particularmente alrededor del canalículo biliar se desordenaba progresivamente. Esta alteración se acompaña por alteraciones canaliculares (ej. la dilatación y anomalías de las microvellosidades) (Franke, et al. 1979). Las intoxicaciones de este tipo se asocian con un decremento (dependiente de sales biliares e independiente de sales biliares) del flujo biliar, lo que sugiere que un sistema intacto de microfilamentos está involucrado en la secreción biliar (Gabbiani et al. 1975). Además los cambios canaliculares y pericanaliculares son rasgos ultraestructurales que

EFFECTOS HEPATOTOXICOS DEL TETRACLORURO DE CARBONO.

El estudio del daño hepático no es sencillo dado que en ocasiones los aspectos bioquímicos no concuerdan. Los mejores modelos de hepatotoxicidad emplean compuestos tales como el tetracloruro de carbono, cuyo daño en el hígado es consistente y reproducible.

Los efectos del tetracloruro de carbono en la estructura hepática y función han sido bien estudiados. La investigación sobre este agente tóxico, ha establecido claramente que la necrosis hepática y la acumulación de lípidos en el hígado son fenómenos independientes. Así como en todos los modelos de respuesta dosis, en el hígado, la dosis y el tiempo de duración del tratamiento son determinantes importantes en la toxicidad. Una sola dosis de CCl_4 puede ocasionar puede ocasionar ningún cambio observable en el microscopio de luz; una dosis elevada puede ocasionar esteatosis; y todavía dosis más elevadas pueden producir necrosis lobular central masiva. La administración crónica de dosis subletales han producido cirrosis o hepatomas en algunas especies.

De acuerdo a las evidencias obtenidas por microscopía de luz, una sola dosis de tetracloruro de carbono provoca la presencia de lípidos a las 3 - 5 horas; a las 6 horas se observan focos de necrosis aislados; y necrosis central se hace evidente después de 12 a 24 horas. Las alteraciones ultraestructurales son una evidencia que precede al daño y que se puede estudiar por microscopía de luz. Los primeros cambios en los organelos consisten de un efecto casi inmediato en el retículo endoplásmico rugoso (RER), con pérdida del arreglo ordenado de éste, una dispersión de ribosomas de la membrana y en el citoplasma, también se observa una desorganización de los polisomas. La incorporación de aminoácidos a las proteínas se disminuye, se desaclopa el transporte de electrones en el sistema microsomal de NADPH y se desorganiza el perfil polisomal. Aparecen agregados densos de retículo endoplásmico liso (REL), que asemejan microsomas que han efectuado peroxidaciones "in vitro". Disminuyen los niveles de la hemoproteína P-450, así como las funciones metabólicas asociadas con fármacos. Los lípidos, particularmente triglicéridos, se acumulan en la fase temprana de la intoxicación, debido probablemente a un defecto en el empaquetamiento o secreción de lípidos, que junto con su molécula proteica, impide su liberación del hígado. La alteración de la estructura mitocondrial y de sus funciones ocurre después, en esta secuencia de daño celular se ve afectada por último la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa se desaclopa (Ilene, 1974).

Las evidencias ultraestructurales, demuestran que el retículo endoplásmico es el primer sitio de interacción del tetracloruro de carbono y concuerda bien con la observación de que el tetracloruro de carbono es transformado en los microsomas hepáticos en metabolitos que destruyen a éstos y otros organelos. Tal metabolito no se ha identificado aún y existen evidencias indirectas a este respecto. El tetracloruro de carbono se une a membranas microsomales y a la hemoproteína P-450 como se ha medido en espectroscopia diferencial. Incrementando los niveles de hemoproteína P-450 por un pretratamiento con fenobarbital o DDT, antes de dosificar con CCl_4 provoca una mayor concentración de tetracloruro de carbono en el hígado y una toxicidad más pronunciada, a pesar de que el tetracloruro de carbono se está convirtiendo en CO_2 , el producto final, a una velocidad acelerada (Ilene, 1974).

Matsubara et al. demostraron que la hepatotoxicidad del CCl_4 y sus efectos en el citocromo hepático P-450 diferían en los diversos lóbulos hepáticos. La magnitud del daño hepático, se relacionó con el aumento hidrópico, degeneración y necrosis central en el lóbulo, siendo mayor en los lóbulos medianos y derechos, asimismo se encontró una degradación considerable del citocromo P-450 por el CCl_4 en el lóbulo mediano del hígado (Ivanetich, et al. 1984).

El tratamiento de ratas con una sola dosis de CCl_4 , de dibromuro de etileno u otro compuesto halogenado, decremanta los niveles del citocromo P-450 en el hígado, riñón, testículos, pulmón e intestino delgado a las 48 horas. Sin embargo, se observa una rápida disminución del citocromo P-450 en el hígado y un incremento de la peroxidación de lípidos después del tratamiento con este xenobiótico. El CCl_4 disminuyó los niveles del citocromo P-450 en las fracciones microsomales rugosas y lisas y en el núcleo, pero no en la mitocondria. La pérdida de actividades de oxidación en núcleos y microsomas después de un tratamiento con CCl_4 varió significativamente en función del sustrato halogenado estudiado.

"In vivo" la pérdida en función del CCl_4 de la k_m de la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial, así como la disminución del citocromo P-450 microsomal hepático, se propuso como un marcador para investigar los efectos inmediatos bioquímicos del CCl_4 , ya que esta actividad se pierde antes de observar el daño mitocondrial. La enzima aldehído deshidrogenasa metaboliza al malondialdehído (Ivanetich, et al. 1984).

Diversos factores alteran la hepatotoxicidad del CCl_4 . Yoshimine y Jakagi demostraron que la hepatotoxicidad del CCl_4 (10 ml/kg) en ratones macho C57BL/6 se incrementó después de un ayuno de 24 horas y manteniendo una dieta deficiente en proteínas durante 1 mes. Estas

condiciones también retrasaron la subsecuente regeneración del hígado (1982).

Shen y colaboradores demostraron que las condiciones anóxicas incrementaron la capacidad del CCl_4 para elevar los niveles de SGPT (glutamato-piruvato transaminasa sérica), existiendo cambios histológicos observables que correspondían a necrosis centrilobular severa. La hipoxia también estimuló la unión de metabolitos de CCl_4 a lípidos hepáticos microsomales y a proteínas. Se propuso que la unión covalente de los metabolitos de CCl_4 a macromoléculas puede en parte explicar la potenciación de la toxicidad por hipoxia.

Se han reportado varios xenobióticos que disminuyen la toxicidad del CCl_4 . El pretratamiento con malonato de diisopropil 1,3-ditiol 2-ilideno (NKK-105) fue demostrado por Egashira y asociados en 1982, protegiendo la hepatotoxicidad del CCl_4 . Feher y colaboradores (1982) reportaron que el antioxidante liposoluble no tóxico 6,6-metilenbis(2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolina) y que un análogo hidrosoluble protegían contra la toxicidad del CCl_4 , así como de la galactosamina respectivamente (Ivanetich, et al. 1984).

Los efectos hepáticos del CCl_4 y del N-hidroxil-2 acetilamino-fluoreno fueron estudiados por Groothuis y colaboradores (1983). Demostraron que el CCl_4 y el N-hidroxil-2-acetilamino-fluoreno eran capaces de producir daño selectivo acinar de la zona 3 perivenosa y de la zona 1 periportal. La especificidad de los dos xenobióticos pueden proveer una herramienta útil para más investigaciones de la heterogeneidad de los hepatocitos con respecto a las funciones de transporte. El CCl_4 produjo hiperplasia en las células de Kupffer a las 24 horas de intoxicar a ratas, y se analizaron los efectos por microscopia electrónica (Ivanetich et al. 1984).

Frenzel et al. (1982) demostraron que el CO_2 inducía una hiperventilación y que era efectiva para prevenir el daño hepático provocado por el CCl_4 en ratas Wistar hembras. Se propone que la intoxicación posterior a la hiperventilación inducida por CO_2 en pacientes los puede proteger contra efectos hepatotóxicos al eliminar gran cantidad de halocarburos volátiles por la vía pulmonar.

Benedetti y colaboradores (1982) observaron que una gran cantidad de CCl_4 y bromotriclorometano (BrCCl_3) estimulaban la peroxidación lipídica (medida por la formación de malondialdehído), paralela a la formación de especies de carbonilo (aldehídos) en los microsomas hepáticos tanto "in vitro" como "in vivo". La producción de carbonilo se demostró espectrofotométricamente al reaccionar con 2,4-dinitrofenil hidrazina (Ivanetich et al. 1984).

La activación metabólica del CCl_4 a radicales libres ha sido ensayada por Albano et al. (1982), utilizando técnicas de atrape de spin en spin de electrones de resonancia. El CCl_4 se convierte sin duda en un radical CCl_3 como resultado de estudios que usan compuestos específicos que atrapan electrones, asimismo se pudieron detectar radicales lipídicos no saturados generados por la iniciación de la peroxidación lipídica. Los compuestos atrapadores de spin tienen efectos importantes en reacciones dependientes del citocromo P-450.

El metabolismo del CCl_4 y del BrCCl_3 por los microsomas hepáticos de rata más la generación de fosgeno del sistema NADPH producen el ácido l-oxotiazolideno-4-carboxílico. Las cantidades de fosgeno producidos (aproximadamente 1.5%-3% del halocarburo agregado) fueron menores a las requeridas para decrementar la actividad del citocromo microsomal P-450 o la glucosa-6-fosfatasa. La cisteína no proporcionó protección contra las pérdidas mediadas por el halometano o contra la disminución en la capacidad de los microsomas para secuestrar Ca^{2+} . De esta forma, parece que el fosgeno no juega un papel importante en la hepatotoxicidad del CCl_4 y del BrCCl_3 (Ivanetiĉh, et al. 1984).

Es intrigante el problema de la lipoperoxidación y más aún difícil de resolver. Un número de sistemas peroxidativos en el hígado existen, donde el malonaldehído es el producto final, aunque no necesariamente. Nucleófilos, tales como el glutatión, descomponen hidropéroxidos intracelulares en reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa en la fracción soluble del hígado. En ausencia del glutatión, los microsomas y la mitocondria son capaces de descomponer los hidropéroxidos por un mecanismo que involucra radicales libres y citocromos. Los microsomas son ricos en sistemas peroxidativos, que pueden regular naturalmente el P-450 intracelular. Debido a que los microsomas carecen de la glutatión peroxidasa pero abundan las enzimas que catalizan la peroxidación, este organelo puede ser particularmente vulnerable al daño por peroxidación, mientras que la mitocondria puede estar protegida relativamente por un contenido abundante de antioxidantes.

El glutatión administrado a ratas antes de la administración de CCl_4 protege a los animales contra alteraciones de los polisomas y mejora la incorporación de aminoácidos en proteínas microsomales hepáticas.

A pesar de todo lo estudiado sobre el daño hepático por tetracloruro de carbono, no se ha elucidado porqué las células hepáticas mueren y por qué predominantemente ocurre en la zona centrolobular.

La peroxidación puede provocar una polimerización extensa de los ácidos grasos en la membrana interior, provocando un "estado rígido de gel" o de "fijación química" en el interior de la célula. La necrosis centrolobular no parece relacionarse directamente con el flujo sanguíneo del hígado dado que una perfusión reversa de CCl_4 a través de las venas hepáticas todavía provoca necrosis centrolobular. Las reacciones ligadas a flavinas tienden a concentrarse en las regiones centrales del lóbulo hepático y tal vez esta sea la razón de la localización de estos y otros constituyentes celulares esenciales (Ilene, 1974).

REGENERACION HEPATICA.

La proliferación y diferenciación son manifestaciones esenciales de los seres vivos. Las células de mamíferos, generalmente expresan estas propiedades con un control recíproco. Los tejidos maduros en animales superiores, por ejemplo, contienen poblaciones celulares cuyas funciones especializadas son expresadas optimamente durante el período de reposo proliferativo. Sin estas condiciones, no existiría ninguna estabilidad fenotípica ni forma de vida. Consecuentemente el estado de reposo es una fase crítica (Leffert, et al., 1982).

Con respecto al crecimiento de los hepatocitos, estudiado en ratas, el estado de reposo no implica una proliferación nula, es decir, se demuestra una velocidad espontánea de proliferación de aproximadamente 0.05 y 0.005% para los hepatocitos de rata adulta. Estos son parámetros estándar de proliferación medidos "in vivo" e "in vitro". El estado de reposo (G_0) se caracteriza por bajas frecuencias de hepatocitos diferenciados para incorporarse al ciclo celular, que está balanceado por bajas velocidades de envejecimiento y muerte de los hepatocitos (Leffert, et al., 1982).

En tejidos de regeneración lenta, un pequeño desequilibrio, pero que sea persistente, entre la velocidad de producción celular y la velocidad de pérdida celular, originaría un desastre. Si 2% de las células hepáticas en un ser humano se dividieran cada semana, pero solamente 1% se perdiera, el hígado crecería hasta exceder el peso total del cuerpo en ocho años. Existe por lo tanto, un control homeostático que opera para ajustar la velocidad de proliferación celular de acuerdo a la masa del tejido presente. Es muy importante la necesidad de este control en un órgano como es el hígado, cuyas células pueden ser destruidas de vez en cuando por sustancias tóxicas incluídas en la dieta (como el alcohol).

La evidencia firme del control homeostático de la proliferación celular hepática, se origina de experimentos en los cuales un gran número de hepatocitos se remueven quirúrgicamente o se eliminan intencionalmente al intoxicar con TETRACLORURO DE CARBONO. En un día o después que se origina el daño, surge la división celular de los HEPATOCITOS que sobreviven y el tejido perdido se reemplaza rápidamente, asimismo si dos tercios de un hígado de rata son removidos de un hígado de tamaño normal, éste puede regenerarse dentro de una semana o más. En estos casos se puede demostrar que existe una señal para la regeneración en la circulación; si a dos ratas se les interconecta su sistema circulatorio, y a una de ellas se le extir-

pan dos tercios de su hígado, se provoca la mitosis en el hígado intacto de la otra rata. Se desconoce que factor actúa originando esta respuesta, aunque fenómenos similares de regeneración son vistos en el riñón que parece tener su propio sistema de control para su crecimiento (Alberts, B. et al. 1983).

El concepto de ciclo celular es útil para cuantificar los cambios cinéticos cuando las células se multiplican. Cuando las ratas adultas están sujetas a estímulos hepatoproliferogénicos (por ejemplo 70% de hepatectomía), los índices de marcaje nuclear con timidina tritiada, así como las frecuencias de los índices de marcaje mitótico se incrementan 600 veces, aunque no inmediatamente. Para empezar se presenta una fase prerreplicativa donde la fase G_0 sale. Este período de inicio S_t dura entre 12 y 16 horas. Cuando finaliza, los hepatocitos sintetizan DNA nuclear de forma semiconservativa (fase S). Las velocidades en el comienzo de la fase S, a menudo varían, dependiendo de los animales, de su edad y del tipo de estímulo para el crecimiento, así como de la dosis del agente tóxico o letal. Esta variación refleja un comienzo de la fase S asincrónico sobre toda la población de HEPATOCITOS. En contraste, la duración temporal de la replicación del DNA nuclear es constante por célula (aproximadamente 8 horas) y es independiente del estímulo y de su dosis. Cuando finaliza la fase S se necesitan otras 4 a 6 horas para una preparación adicional de la célula en su división (fase G_2). Por último el proceso mitótico comienza, y dentro de 30 a 60 minutos se generan dos hepatocitos de uno (fase M). En el hígado en regeneración de rata, la mayoría de los hepatocitos proliferan por lo menos una vez entre 24 a 36 horas después de exponerse al estímulo. Las células no parenquimatosas también proliferan pero después. Si existe una proliferación continua de hepatocitos, la progenie celular entra en otro "hueco" temporal (G_1) entre la fase M y la fase S subsecuente. Durante la REGENERACION, algunos hepatocitos llevan dos y tres "ciclos" de proliferación. Bajo estas condiciones, la fase G_1 de los hepatocitos dura entre 6 a 8 horas, mucho menos que lo que dura la fase S_t . La respuesta hepática hacia algún estímulo, no es ni específica ni sincrónica y tampoco está bajo control (Leffert, et al. 1982).

Cuando ocurre una proliferación crónica, la función especializada del hepatocito disminuye. Tan pronto la proliferación cesa normalmente, las funciones se restablecen, algunas rápidamente, otras más gradualmente. Esto usualmente ocurre dentro de los 7 o 28 días después del nacimiento o después de una hepatectomía del 70% en ratas. Si ocurre una proliferación anormal, de todas formas, las funciones diferenciadas pueden reducirse permanentemente o aún extinguirse. Estos fenómenos han sido descritos en detalle en diversos estudios de desarrollo hepático, regeneración y carcinogénesis (Leffert et al. 1982).

Como ya se mencionó, el hepatocito representa una célula de una capacidad funcional muy compleja, que a pesar de este alto grado de especialización, retiene la capacidad para prepararse rápidamente y participar en la división celular. Esta respuesta tiene un común denominador, que es la presencia de hepatocitos normales; sin embargo parece que un aspecto de las enfermedades crónicas del hígado es la incapacidad de las células residuales de mantener una velocidad mitótica igual a la velocidad de pérdida celular. La respuesta mitótica puede dispararse por la pérdida de una célula similar o por la pérdida de cuando mucho el 90% del número total de células.

El término regeneración hepática es algo inadecuado, ya que en una cirugía donde se remueve una masa hepática, el fenómeno no puede reconstruirse completamente, dada la complejidad del proceso regenerativo. Los lóbulos amputados nunca se reestablecen. En su lugar se presenta un alargamiento compensatorio de la masa residual, vía hiperplasia celular.

Comunmente tres factores provocan la aparición del ciclo celular en los hepatocitos: infecciones, alteraciones químicas y amputaciones quirúrgicas. Es común que en una destrucción progresiva del parénquima por tumores o por otra expansión de masa celular, ocurra una hiperplasia de las células residuales y que la necrosis de los hepatocitos se presente por tales desórdenes genéticos.

Poco o nada se sabe con respecto a los mecanismos por los cuales los hepatocitos responden a la pérdida de una sola célula o un pequeño grupo celular. Este fenómeno se presenta con gran frecuencia después de una infección aguda con pérdida celular (Becker, 1974).

Si se pierde una gran cantidad de células por agentes químicos o infecciosos, o por amputación quirúrgica, la secuencia de eventos subsecuentes parece ser similar, con respecto al CITOESQUELETO, este se incrementa al observar un rearrreglo y aumento en cantidad de los microfilamentos, demostrado por microscopía de inmunofluorescencia y electrónica (Gabbiani y Ryan, 1974; Lampert, et al. 1974; Toh, et al. 1977). En la mayoría de los experimentos, donde se amputa el 70% del hígado, la respuesta es similar tanto en humano como en ratón (Becker, 1974).

De los factores que ocasionan muerte hepatocelular puede mencionarse que los principales procesos para ocasionarla son;

- a) Pérdida de homeostasis con transferencia de iones y por lo tanto variaciones en el volumen de los compartimientos celulares y
- b) Fallas en las fuentes energéticas, particularmente asociadas con alteraciones mitocondriales y cambios en la membrana celular. Puede mencionarse también la inhibición de síntesis macromolecular.

Durante la cicatrización de una herida experimental en piel y en REGENERACION HEPATICA después de una hepatectomía parcial, las células epidérmicas y hepatocitos desarrollan un extenso sistema del citoesqueleto citoplásmico, identificado por:

- 1) La unión de anticuerpos específicos anti-actina al citoplasma de células en regeneración y
- 2) La microscopía electrónica demuestra una red filamentosa (diámetro de 40 a 80 Å) localizada en su mayor parte en la parte periférica de la célula. Esta red filamentosa junto con la habilidad para unirse a los anticuerpos anti-actina gradualmente desaparece de las células cuando la epitelización o la regeneración hepática es completa.

Asimismo, en regeneración hepática, aparecen los miofibroblastos que contienen abundante cantidad de microfilamentos y se relacionan con una contractilidad incrementada del órgano cirrótico. Se propone que el aparato contráctil así como el citoesqueleto, juegue un papel importante en la movilidad celular permitiendo que las células individuales se reorganicen por sí mismas en un patrón apropiado como respuesta a un desorden de su microambiente normal (G. Gabbiani y G.B. Ryan, 1974).

Se han involucrado diversos factores que ocasionan muerte hepatocelular y también se han establecido posibilidades terapéuticas que gradualmente se mejoran. Además de los antidotos en intoxicaciones específicas y la modulación de ataques inmunológicos, se incluyen a) aminoración de componentes hipóxicos en varios daños, b) incremento de factores, incluyendo glutatión y otros antioxidantes, que atrapan metabolitos tóxicos, c) modulación de mecanismos de transporte hepatocelulares, principalmente receptores de membrana plasmática, previniendo la entrada de toxinas, d) fortalecimiento de la barrera sinusoidal y e) protección de la membrana plasmática por restauración de proteínas alteradas estimulando la biosíntesis o reduciendo la degradación, particularmente previniendo la entrada de calcio. Los efectos beneficios de varios agentes de distinta naturaleza química, tales como la clorpromazina, antihistamínicos, dietilditiocarbamato, cicloheximida y algunos flavonoides, en diferentes tipos de intoxicaciones sugieren la protección de daños comunes posiblemente por factores endógenos. El reemplazamiento de la función hepática por transplantes de dispositivos artificiales es muy remota (Popper, 1982).

El papel de la peroxidación lipídica en el daño celular hepático debido a agentes exógenos como el TETRACLORURO DE CARBONO y metales pesados ha sido aclarado al delinarse las diversas enzimas que producen o protegen al hígado de los metabolitos tóxicos y elucidando los mecanismos de iniciación de la peroxidación lipídica por estos xenobióticos. Sin embargo el control de la REGENERACION HEPATICA permanece todavía sin entenderse en su totalidad (Ivanetich, et al. 1984).

NATURALEZA DE LA INFORMACION GENETICA.
ACIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO (RNAm)

Durante siglos es evidente como los seres humanos al sembrar o tener animales en crianza, observan que cada semilla o huevo fertilizado debe contener un plan secreto o diseño para desarrollar un organismo. Actualmente la ciencia de la genética establece que los GENES son los elementos que contienen la información invisible que están distribuidos en las dos células originadas por cada división celular. Antes que se divida cada célula tiene que realizarse una copia de sus genes para dar un juego completo a cada célula producida. Los genes en el esperma y en los óvulos contienen la información hereditaria de una generación a otra. Aunque la herencia tenga características biológicas y parezca misteriosa, debe involucrar patrones de átomos que sigan las leyes físicas y químicas, en otras palabras los GENES deben estar constituidos de moléculas.

Al finalizar el siglo diecinueve, los biólogos reconocieron que los cromosomas que se hacían visibles en el núcleo cuando una célula comenzaba a dividirse eran los portadores de la información de la herencia. Pero la evidencia que el ácido desoxirribonucleico (DNA) es la sustancia que constituye a los GENES en estos CROMOSOMAS, se originó mucho después de estudios en bacterias (Alberts, B, et al. 1983).

Crick enunció en 1958 el dogma central de la biología molecular donde postula que la información genética se localiza en la secuencia de DNA (o en el caso de algunos virus en el RNA). Mediante las etapas de transcripción y traducción puede convertirse en la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

El dogma central manifiesta que la información en los ácidos nucleicos puede ser transferida o perpetuada, pero que la transferencia de información de proteínas hacia ácidos nucleicos no es posible. Esto significa que el ácido desoxirribonucleico (DNA) puede replicarse (duplicación exacta), transcribirse en otro ácido nucleico (ácido ribonucleico RNA) y traducirse en proteínas.

Sin embargo, aunque durante algún tiempo se pensó que el proceso era completamente irreversible, es decir una vez que la información se transcribía en RNA la reintegración para uso como material genético no parecía posible, utilizándose solamente para traducirse en proteínas, se descubrió el proceso de la transcripción inversa como un mecanismo normal en virus de RNA tumorales; la ca-

dena sencilla de ácido ribonucleico del genoma del virus puede convertirse en una cadena duplex de DNA que es insertada en el genoma y entonces se hereda como cualquier otro gene. También se ha descubierto en los virus de RNA que se replican a través de la forma de RNA, utilizando las bases complementarias, en ocasiones con la formación de un RNA duplex estable y otras ocasiones careciendo de estabilidad.

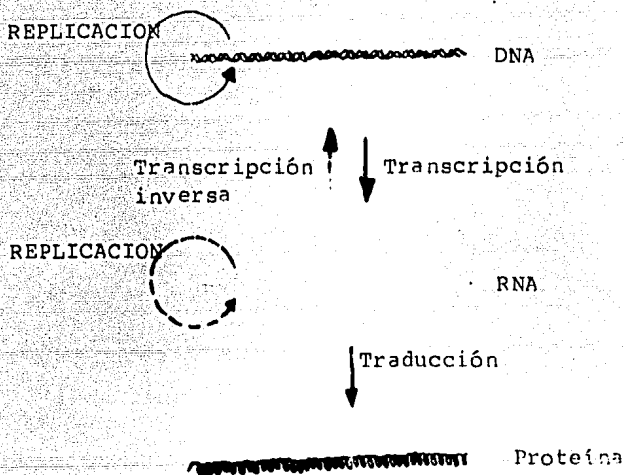


Figura 3 . El Dogma Central de la Biología Molecular queda esquematizado aquí, indicándose con líneas continuas el proceso utilizado por las células y con líneas discontinuas el proceso utilizado aparentemente solo por infecciones virales.
(Lewin, B., 1983)

El código genético demuestra que la información genética se almacena en forma de tripletes de nucleótidos, pero no revela como se traduce cada codón para formar su correspondiente aminoácido. Por lo tanto debe existir un modelo del cual se pueda traducir los aminoácidos y al existir una separación física entre el material genético en el núcleo y la síntesis proteica efectuada en el citoplasma de las células eucarióticas, se hace evidente que el DNA por si mismo no es el modelo de la traducción

Una relación general entre los niveles de RNA y los de síntesis proteica han sido la evidencia que el RNA puede proveer un intermediario entre el DNA y la PROTEINA. Puesto que los ribosomas contienen RNA así como proteínas, se suponía que los ribosomas se podían especializar por el hecho de contener diferentes RNA utilizados para la síntesis de las correspondientes proteínas, pero se sabe ahora que todos los ribosomas en la célula son los mismos (tanto en su contenido proteico como de RNA) y que hay otra especie de RNA, el RNA MENSAJERO o RNAm, que se une transitoriamente a los ribosomas y que les provee las instrucciones para la síntesis de las proteínas específicas.

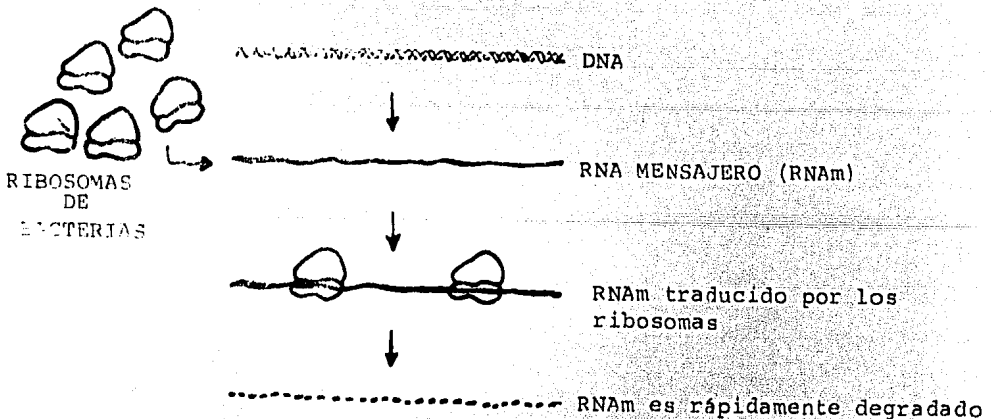


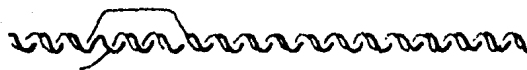
Fig. 4 El RNAm en las bacterias tiene una breve existencia
Los ribosomas permanecen para traducir más RNAm

A pesar de no haber observado una molécula de RNAm intacto, ha sido posible demostrar la existencia de un RNA que representa específicamente la secuencia de una cadena de DNA, es inestable y se asocia con ribosomas. Puede inferirse que su transcripción en procariotes sigue una vía general que se ilustra a continuación:

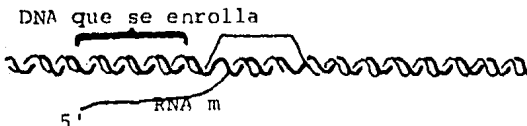
La síntesis de RNA comienza al desenrollarse la doble cadena de DNA



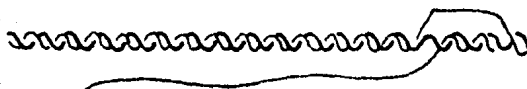
El RNA se sintetiza al colocarse las bases complementarias en una cadena de DNA



La región desenrollada se mueve a lo largo del DNA



La región desenrollada alcanza el final del gene



El RNA es liberado completamente y se reconstituye el DNA duplex.

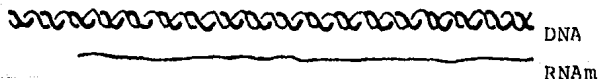


Figura 5 EL RNA MENSAJERO EN PROCARIOTES, SE SINTETIZA POR APAREAMIENTO DE BASES CON UNA CADENA DE DNA EN UNA REGION QUE ESTA DESEENROLLADA TEMPORALMENTE. La región que está desenrollada se mueve de izquierda a derecha y el DNA duplex se recupera detrás de esta zona, desplazando el RNAm en forma de una cadena sencilla de polinucleótidos.

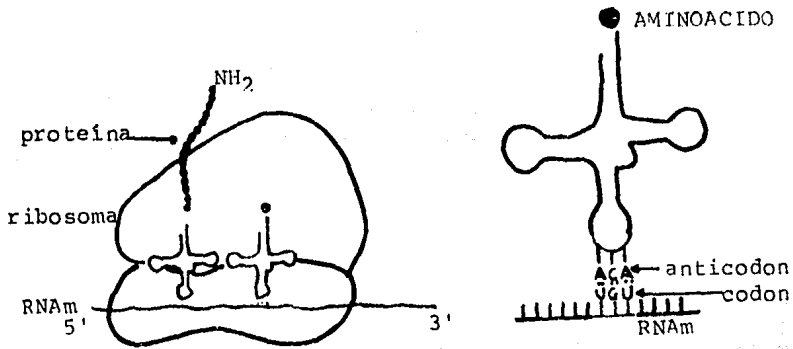
El DNA debe desenrollarse para permitir el apareamiento de bases a una cadena que es utilizada como intermediario de la transcripción de RNA por un proceso que involucra movimiento de la región desenrollada a lo largo del DNA y originando que se recupere la cadena doble de DNA así como la liberación del RNA. Todos los ácidos nucleicos se sintetizan en dirección 5' a 3' esto significa que el RNAm es transcrito en la misma dirección en la que debe ser traducido. En bacterias, de hecho, esto es posible por los ribosomas que empiezan a traducir un RNAm aún antes de que su transcripción haya sido completada.

En EUCARIOTES, la investigación para el RNA mensajero ha encontrado dificultades. Como en las bacterias, el RNAm constituye solamente una pequeña proporción del RNA total celular (aproximadamente 3% del porcentaje en masa). El primer RNAm específico que se aisló fue el mensajero de la globina de los eritrocitos. Los mensajeros son generalmente estables, por lo menos durante un período de horas y pueden aislarse intactos y traducirse "in vitro" cuando los ribosomas y otros componentes necesarios se adicionan. Para comprobar que un determinado RNAm representa una proteína en particular se hace sintetizar "in vitro" bajo la dirección de este RNAm, la información puede ampliarse al determinar la secuencia de nucleótidos del RNA por comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína (Lewin, B. 1983).

El RNAm contiene codones que no reconocen directamente los aminoácidos que especifican. La traducción utiliza moléculas "adaptoras" que reconocen tanto al aminoácido como al grupo de bases nucleotídicas. Estos adaptadores consisten de un juego de pequeñas moléculas de RNA conocidas como RNA de transferencia (RNAt), cada uno de los cuales consiste de 70 a 90 nucleótidos de longitud.

El reconocimiento del codon que transfiere la información genética del RNAm a la proteína depende de las mismas interacciones de pares de bases que regulan la transferencia de la información genética del DNA al DNA y del DNA al RNA; pero el mecanismo de ordenar a las moléculas de RNAt en el RNAm están reguladas y requieren del ribosoma.

En la figura 6 puede observarse a un ribosoma que tiene dos moléculas de RNAt, la primera lleva el polipéptido sintetizado con la terminal amino y la segunda lleva el siguiente aminoácido que será añadido a la cadena.



La dirección de traducción del RNAm es de 5' a 3'

Figura 6. La traducción del RNAm a proteínas se lleva a cabo en los ribosomas, al acoplarse los RNA de transferencia con los RNA mensajeros a través de secuencias específicas (codon y anticodon).

Existen tres RNA polimerasas en los EUCARIOTES, transcribiendo los genes solamente la RNA polimerasa II. Las otras dos polimerasas sintetizan RNAs que forman parte de la maquinaria proteica sintética; la polimerasa I produce los RNA ribosomales largos y la polimerasa III produce una variedad de RNA muy pequeños y estables, incluyendo los RNA de transferencia y el RNA 5S del ribosoma (figura 7).

Las moléculas de RNA polimerasa a semejanza de las de los procariotes, comienzan y terminan la transcripción en sitios específicos del cromosoma. La longitud promedio de una molécula de RNA terminada y producida por unidad de RNA polimerasa II en una transcripción es de aproximadamente 8000 nucleótidos, aunque existen moléculas de RNA de 10,000 a 20,000 nucleótidos de largo. Analizando estas longitudes, las que son mayores de 1,200 nucleótidos, son moléculas de RNA necesarias para codificar una proteína de 400 aminoácidos, lo cual refleja la estructura peculiar de los genes eucarióticos. Sin embargo es importante mencionar que una unidad de transcripción no necesariamente es equivalente a un gene; algunos transcritos de RNA no pueden tener función, mientras que otros originan productos provenientes de más de un gene.

Las RNA polimerasas II comienzan en sus sitios de función con diferentes eficiencias, y de esta manera algunos genes son transcritos a velocidades mucho mayores que otros. El patrón de transcripción observado en fotografías al microscopio electrónico está de acuerdo con los resultados bioquímicos que muestran que mientras diversas moléculas de RNA mensajero se acumu-

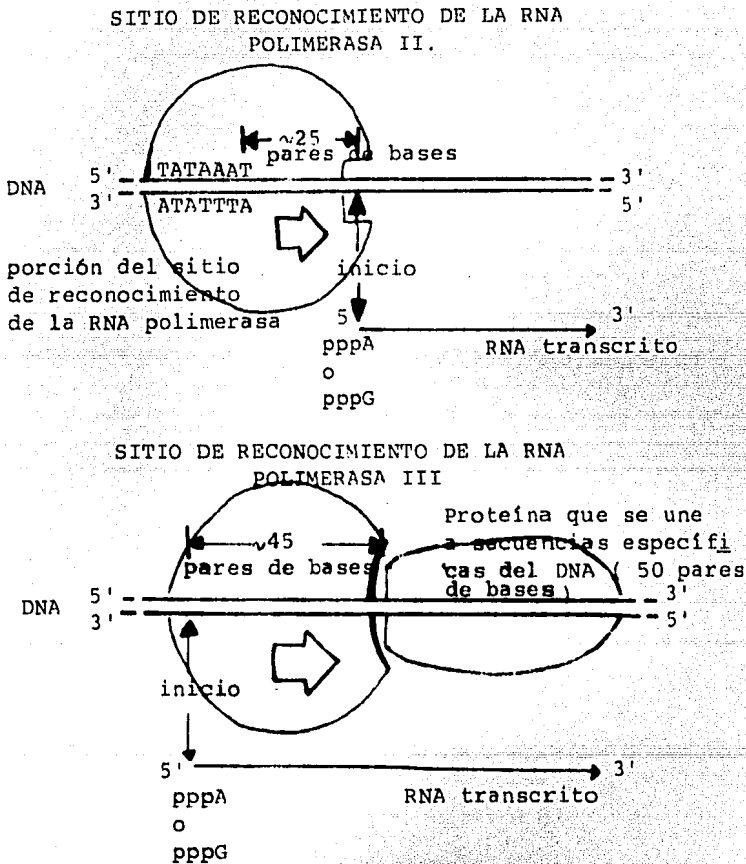


Figura 7. Diferentes sitios de reconocimiento de las RNA polimerasas II y III en eucariotes. La RNA polimerasa II parece reconocer secuencias específicas de DNA localizadas antes del sitio donde se inicia la síntesis de RNA, parece ser que parte de esta secuencia la integran hasta 150 nucleótidos (sólo se muestra la secuencia promotora). En contraste la RNA polimerasa III reconoce una proteína reguladora del gen (Factor de transcripción 5S en este caso) que se une a una secuencia que se localiza después del sitio de inicio de la síntesis de RNA por la polimerasa.

lan en una célula, la mayoría de ellas están presentes a una frecuencia relativamente baja.

POBLACION DE MOLECULAS DE RNAm EN UNA CELULA DE MAMIFERO.

| | COPIAS POR CELULA DE CADA SECUENCIA DE RNAm | | NUMERO DE DIFERENTES SECUENCIAS DE RNAm EN CADA CLASE. | | No. TOTAL DE RNAm EN CADA CLASE. |
|------------------|---|---|--|---|---|
| Clase abundante | 12,000 | x | 4 | = | 48,000 |
| Clase intermedia | 300 | x | 500 | = | 150,000 |
| Clase escasa | 15 | x | 11,000 | = | 165,000 |

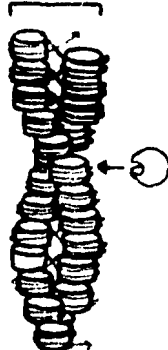
Usualmente el 95% o el 97% del RNA total citoplásmico es RNA ribosomal y solamente el 3% es RNAmensajero, una proporción consistente, con presencia de aproximadamente 10 ribosomas por cada molécula de RNAm.

En eucariotes el complejo formado por las cuatro histonas nucleosomales (H2A, H2B, H3 y H4) que están firmemente asociadas con el DNA produciendo un octámero, parece ser que tiene importantes implicaciones en la regulación de la transcripción de los genes eucarióticos. Aún en el caso de que los octámeros se expandan (cuentas en cadena que forman la cromatina), es difícil imaginar a la RNA polimerasa transcribiendo el DNA unido al nucleosoma sin un cambio temporal en la conformación del nucleosoma. Es inconcebible que el DNA en su forma más condensada de la cromatina, tal como la fibra de 30 nm pueda ser transcrito por la RNA polimerasa sin desarreglarse del empaquetamiento producido por los nucleosomas

Fig. 8

fibra de cromatina

30 nm



RNA
polimerasa

En la figura anterior (Fig. 8) se ilustra una molécula de RNA polimerasa acercándose a una fibra de cromatina de 30 nm, el dibujo es a escala. El número de nucleosomas mostrados es aproximadamente el mismo que se presenta por unidad de transcripción. De alguna manera la polimerasa tiene acceso al DNA sin desplazar a los octámeros de las histonas que constituyen la cromatina, sin embargo se requiere de un despliegue mayor de la cromatina para que esto pueda suceder.

Todos los transcritos de la RNA polimerasa II en el núcleo son conocidos como RNA heterogéneo nuclear (RNAhn), debido a una de las primeras características de estas moléculas que las diferenciaban de otras, y que correspondía a la diversidad de tamaños en la que existen. Varios de estos transcritos están destinados a salir del núcleo como RNA mensajero (RNAm), sin embargo antes de salir, el RNAhn sufre una serie de modificaciones covalentes que están relacionadas a su función posterior y que lo distinguen claramente de otros transcritos realizados por otras RNA polimerasas.

Primeramente el final 5' de la molécula de RNA que se sintetiza durante la transcripción en primer término, se cubre por una estructura especializada que posteriormente será el mediador que se une al ribosoma. La estructura que cubre el extremo 5' aparece inmediatamente antes que la transcripción del resto de la molécula se complete. La molécula de RNA continúa creciendo en dirección 5' a 3' a una velocidad de 30 nucleótidos por segundo, hasta que alcance la señal de terminación en la cromatina, deteniendo la transcripción. Posteriormente, para la mayoría de los transcritos destinados para RNAm, una enzima poli-A polimerasa añade 100 a 200 residuos de ácido adenílico (como poli A) al extremo 3' de la cadena de RNA para completar el transcrito primario de RNA. El sitio de poliadenilación (adición poli A) se origina por una ruptura en la cadena creciente o por la terminación de la cadena hecha por la RNA polimerasa. La función del sitio poliA no se conoce con certeza, pero parece ayudar al subsecuente proceso de exportar el RNA maduro del núcleo

Debido a que solamente los transcritos de la RNA polimerasa II tienen cubierto el extremo 5' y existe la poliadenilación el extremo 3', se ha sugerido que las reacciones de la formación de la estructura de la cubierta (capping) y las de adición de poli A, están mediadas por enzimas que interactúan con la RNA polimerasa II, pero no con las polimerasas I o III.

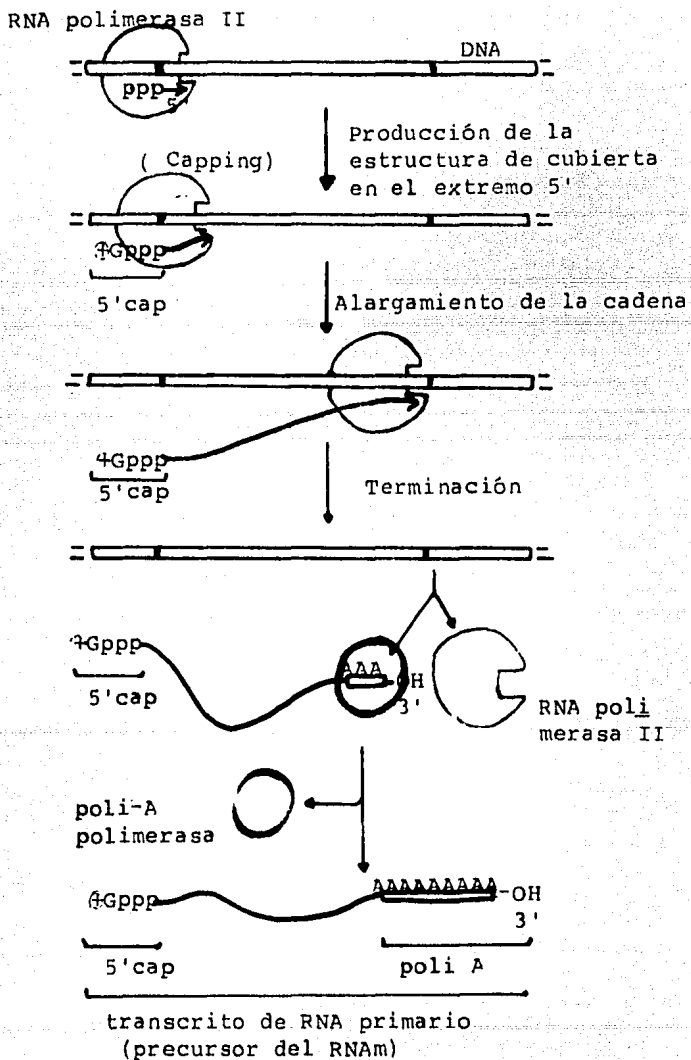


Figura 9. Formación del precursor del RNAm.
RNA heterogéneo nuclear (RNAhn) modificado
para poder ser traducido.

La carga positiva (+) en la estructura de cubierta del extremo 5' se produce por la metilación del nitrógeno en la posición 7 de la base de guanina, que ocurre inmediatamente después que se transfiere la guanina al grupo trifosfato (ppp).

Aunque los transcritos de la polimerasa II comprenden más de la mitad de la síntesis de RNA efectuada por una célula, estos transcritos son inestables y de vida corta. Consecuentemente el RNAhn en el núcleo celular y el RNAm citoplásmico derivado de él, constituyen solamente una mínima fracción del RNA total presente en una célula (3%).

Sin embargo, para los bioquímicos, la extensión de poli-A característica del extremo 3' en estas moléculas de RNA, provee una manera conveniente de purificarlas a pesar de su relativa escasez. Cuando se pasa el RNA total celular a través de una columna conteniendo poli dT unido al soporte sólido (la base complementaria de adenina es timina), los residuos de T se unen selectivamente a las moléculas con terminales poli A hacia la columna; las moléculas pueden liberarse entonces con soluciones de determinada fuerza iónica, para poder analizarse posteriormente. Este procedimiento se emplea ampliamente para separar RNAhn y RNAm del RNAr y RNAt que predominan en las células.

Los transcritos de RNA en eucariotes, tienen la misma polaridad que los RNAm de procariotes; los nucleótidos en el extremo 5' codifican el grupo amino terminal de la proteína y los que se localizan en el extremo 3' especifican el grupo carboxilo terminal. Sin embargo contienen muy a menudo largas inserciones de secuencias que no codifican, copiadas de regiones del gene conocidas como SECUENCIAS DE INTERVENCION o como INTRONES. Estas secuencias intrónicas deben eliminarse de cada transcrito de RNA, con el objeto de producir el RNA mensajero que codifique para la proteína específica completa.

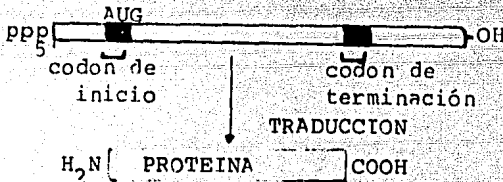
El descubrimiento de genes interrumpidos en 1977 fue completamente inesperado. Las secuencias que codifican en ambos lados de la secuencia del intron, se unen entre sí después que se elimina la secuencia intrónica (figura 11); el proceso se denomina empalme de RNA (RNA splicing).

El empalme de RNA (RNA splicing) parece ocurrir en el núcleo celular antes que salga el RNA al citoplasma, puede ser que convierta una molécula de RNAhn muy larga (más de 50,000 nucleótidos) a una molécula citoplásmica de RNAm pequeña (usualmente 500 a 3,000 nucleótidos). La membrana nuclear en eucariotes parece ser que mantiene las moléculas de RNA recién sintetizadas lejos de los ribosomas citoplásmicos, hasta que las reacciones procesan el RNA

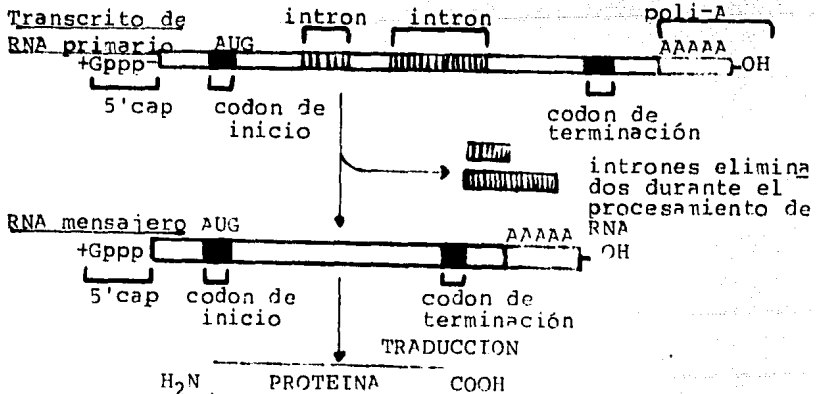
que han seleccionado las secciones que se traducirán en proteínas.

Aunque la mayoría de las secuencias intrónicas no parecen tener por sí mismas ninguna función específica, existen evidencias que el aparato de empalme (splicing) asociado con ellas, les confiere una flexibilidad genética adicional en la célula. Esta flexibilidad es posible debido a que diferentes patrones de empalme del RNA, pueden generar varias y diversas proteínas derivadas del mismo transcrito de RNA. Los cambios en el patrón de empalme de algunos transcritos, se sabe que ocurren en el curso de la diferenciación celular, de tal manera que las mismas secuencias de DNA codifican para diferentes proteínas según se desarrolle la célula (Alberts, B., et al., 1983).

Fig.10 LOS TRANSCRITOS DE RNA EN PROCARIOTES SON DIRECTAMENTE TRADUCIDOS.



LA MAYORIA DE LOS TRANSCRITOS DE RNA EN EUKARIOTES REQUIEREN DE UN PROCESAMIENTO ANTES DE TRADUCIRSE.



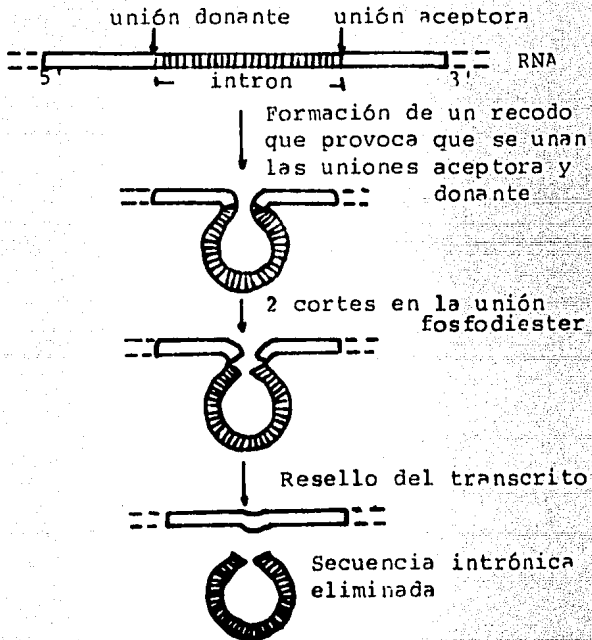


Figura 11. Reacción de empalme del RNA (RNA splicing)

MATERIAL Y METODOS

TRATAMIENTO DE RATAS CON CCl_4 .

El tratamiento tendrá una duración de cinco semanas y se llevará a cabo de acuerdo al método descrito por Ehrinpreis y colaboradores (1980), iniciándose con ratas macho de 5 semanas de edad (50-60 g de peso). Existen dos grupos de animales, el primero de ellos recibe tetracloruro de carbono en aceite mineral, el otro solamente aceite mineral. La administración del CCl_4 en aceite mineral se hace tres veces por semana vía intraperitoneal dosis de 0.15 ml de una dilución 1:7 de CCl_4 en aceite mineral, variándose la dilución progresivamente cada semana hasta 1:4 en la cuarta semana del tratamiento y manteniéndose durante el resto del tratamiento. El grupo control recibe únicamente 0.15 ml de aceite mineral vía intraperitoneal.

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

La técnica utilizada se basa principalmente en la reportada por G. Van de Werve (1980), que consiste en perfundir al hígado medio Krebs Henseleit bicarbonato sin calcio (118 mM-NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.19 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3) pH 7.4 y a una temperatura de 39°C (flujo 20 ml/min), el volumen depende del tamaño del hígado, aproximadamente se pasan 50 ml del medio sin calcio. Posteriormente se recircula medio con colagenasa 50 ng/100 ml aproximadamente 70 ml en un hígado normal, y se incrementa el volumen dependiendo del estado fibrótico del hígado, hasta verificar que la integridad del tejido es adecuada para disociar las células. El hígado se remueve del animal y gentilmente se agita en una caja de Petri conteniendo medio, con el objeto de disociar las células. La preparación conteniendo los diferentes tipos celulares así como material no digerido y residuos se filtra y se centrifuga a temperatura ambiente a 50 g (500 RPM en centrifuga clínica) durante 30 segundos. El sobrenadante contiene las células no parenquimatosas que pueden recuperarse al centrifugar a mayor velocidad (1000 RPM) durante 15 minutos.

Las células se suspenden en medio Krebs-Henseleit bicarbonato sin calcio, se determina viabilidad con la técnica de exclusión del azul de tripano, se cuentan y se colocan en alícuotas para congelarse posteriormente en nitrógeno líquido (-80°C).

EXTRACCION DE RNA TOTAL DE HEPATOCITOS.

Las células congeladas a -80°C (2×10^7 cél.) se pulverizan en mortero y se colocan en un Dounce, se le agrega 3.5 ml del Buffer Isotiocianato de Guanidina reportado por Maniatis en 1982 (4 M Isotiocianato de Guanidina, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA, 2% Sarcosil, .14 M B-mercaptoetanol). Se homogeniza la mezcla hasta observar la lisis completa de las células, después se transfiere a tubos corex para centrifugar a 8000 RPM, 10 minutos a 10°C (Rotor HB4-Sorvall). El sobrenadante se coloca sobre tubos para ultracentrifuga (rotor SW 50.1) que fueron lavados previamente con agua oxigenada y etanol o que están estériles, los tubos contienen 1.2 ml de CsCl 5.9 M ultrapuro. Se ultracentrifuga a 35,000 RPM durante 17 horas a 16°C (J. M. Chirgwin, 1979). Se decanta y colecta la pastilla del fondo del tubo de la ultracentrifuga, teniendo precaución de no contaminarla con el buffer de Guanidina. Se disuelve esta pastilla en un buffer TES (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 1% SDS) con volumen suficiente para que no queden partículas sin disolver. Se extrae esta solución con cloroformo-1-butanol 4:1 y se transfiere la fase acuosa a un corex, las fases se separan centrifugando a 3500 RPM, 10 min a 4°C . Se reextrae la fase orgánica con un volumen igual del buffer TES. Se combinan las fases acuosas (Maniatis 1982). Se ajusta a las fases combinadas una concentración de LiCl 4 M y se deja precipitar toda la noche a 4°C . Se colecta el precipitado centrifugando a 10,000 RPM durante 10 minutos y a 4°C (Rotor HB-4 Sorvall). La pastilla se disuelve en el buffer TES con suficiente volumen y se ajusta a una concentración de 0.2 M de LiCl y 70% de etanol (2.2 volúmenes). Se deja precipitando selectivamente el RNA a -20°C toda la noche y se colecta el ácido nucleico al centrifugar a 10,000 RPM durante 30 minutos a 4°C , disolviéndose posteriormente la pastilla en agua bidestilada estéril y reprecipitando dos veces más, al ajustar 0.2 M LiCl y 70% ETOH. Por último la pastilla se seca con vacío y se ajusta con el mínimo volumen de agua estéril bidestilada (Rhoads 1975). Se toma una alícuota y se diluye en agua bidestilada para leerse a 230, 260 y 290 nm para calcular su concentración y estado de pureza. Se sabe que $1 \text{ DO a } 260 \text{ nm} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$. Absorbancia a 260/Absorbancia a 290 ≈ 1.8 a 2 implica RNA puro libre de proteínas. Absorbancia a 260/Absorbancia a 230 menor a 2.4 implica RNA contaminado con proteínas.

El rendimiento teórico del ácido ribonucleico total es de 5 a 10 mg a partir de 5×10^8 células. El RNA total de los hepatocitos se almacena en recipientes estériles a -20°C .

NOTA:

El material utilizado en el aislamiento de RNA se lava con

2N de NaOH toda la noche, se enjuaga extensamente con agua destilada hasta pH neutro. Se hornea a 200°C toda la noche y se autoclavea a 20 lb durante 20 minutos.

El plástico se lava con 2N NaOH y autoclavea solamente.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA OLIGO DT DEL RNA TOTAL PARA OBTENER EL RNA POLI A⁺ (RNA MENSAJERO).

Se monta una columna de aproximadamente 3 cm de longitud y 1 cm de diámetro y se equilibra la resina de oligo DT celulosa con buffer BE I estéril (20 mM Tris-HCl pH 7.6; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 0.1% SDS). La columna de 1 ml de volumen aproximadamente se lava con 3 volúmenes de cada una de las siguientes soluciones y en ese orden; a) agua estéril, b) 0.1 M NaOH; 5 mM EDTA y c) agua estéril. Checar que el pH sea menor de 9. Se lava la columna con 5 volúmenes del buffer BE I. Se disuelve el RNA total en agua estéril (> 30 ug/ul) y se calienta a 65°C durante 5 minutos, colocándose inmediatamente después en hielo. Se le agrega a la muestra el buffer BE I 2x (40 mM Tris-HCl pH 7.6; 1 M NaCl; 2 mM EDTA; 0.2% SDS) y se pone a temperatura ambiente. Se pasa la muestra por la columna y se colecta el flujo en fracciones de 1 ml. Puede volverse a pasar el flujo colectado por la columna, siempre y cuando se caliente la muestra nuevamente a 65°C y se enfríe. Se lava la columna con 5 a 10 volúmenes del buffer BE I, acarreado el RNA poli A⁺. Posteriormente se lava la columna con 4 volúmenes del buffer BE II (20 mM Tris-HCl pH 7.6; 0.1 M NaCl; 1 mM EDTA; 0.1% SDS). Por último se eluye con 2 o 3 volúmenes del buffer BE III (10 mM Tris-HCl pH 7.6; 1 mM EDTA; 0.05% SDS) sin NaCl, y en estas fracciones eluye el RNA poli A⁺. Se combinan estas fracciones y se ajusta 0.2 M de acetato de sodio pH 5.5 y 70% de etanol frío. Se deja toda la noche a -20°C y se colecta el precipitado centrifugando a 12,000 RPM durante 60 minutos a -10°C (Rotor HB-4 Sorvall). Se disuelve la pastilla en agua bidestilada estéril y se almacena a -70°C (rendimiento teórico es de 1 a 5 ug de RNA poli A⁺ a partir de 10⁷ células).

La colección de fracciones se monitorea al leer la absorbancia a 260 nm (Maniatis 1982).

ANALISIS DEL RNA EN GELES DE AGAROSA BAJO CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES Y DESNATURALIZANTES PARA EL ACIDO NUCLEICO.

Los geles de agarosa se preparan en placas para minigeles horizontales. Los geles no desnaturizantes para el RNA se preparan de la siguiente forma: se prepara una solución de agarosa al 1.2% en buffer tris-boratos (0.089 M Tris-Borato,

0.089M Acido Bórico) o también puede prepararse en buffer TEA (40 mM Tris-HCl; 20 mM acetato de sodio; 18 mM de NaCl; 2 mM EDTA) y se gelifica en la placa horizontal (11 cm x 7 cm). Se llena la cámara para minigeles con el buffer Tris-boratos o TEA según sea el caso. se colocan las muestras del RNA total en los carriles respectivos del gel (RNA total de 1 a 5 ug). A las muestras debe de agregárseles un colorante (azul de bromofenol; xilen cianol; glicerol). Ya que estén listas las muestras en el minigel, se aplica una corriente a voltaje constante de 70 volts (20 miliamperes aproximadamente) durante el tiempo suficiente para que llegue el colorante hasta 1 cm antes del borde del gel. Posteriormente se saca el minigel de la placa y se sumerge en una solución acuosa de bromuro de etidio 0.5 ug/ml durante 15 minutos. Se observa el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y se fotografía el gel.

Para correrse geles desnaturalizantes para el RNA, se prepara el minigel horizontal con agarosa al 1.2% en buffer 10 mM Na_2HPO_4 pH 7, se llena la cámara con el mismo buffer de fosfato adaptándose a la cámara un recirculador de buffer, ya que es importante que en la corrida no varíe el pH de 7. En tubos eppendorf estériles se prepara la siguiente mezcla; RNA (12 ug mínimo de RNA total; 2 ug RNA poli A⁺); 0.1 M glioxal (desionizado con resina AG 501-X8 de BIO RAD, y almacenado a -20°C); 50% v/v de dimetil sulfóxido (DMSO); 10 mM de Na_2HPO_4 pH 7. Se calienta a 50°C la muestra durante 1 hora y se le agrega el buffer de muestra a 20°C (azul de bromofenol; xilen cianol; glicerol). Posteriormente se coloca en el gel horizontal la muestra y se aplica una corriente a voltaje constante de 40 a 50 volts y 20 miliamperes hasta que el colorante llegue aproximadamente a 1 cm antes del borde del gel. Se corre recirculando el buffer para mantener el pH. Se saca el minigel de la cámara y se sumerge en una solución acuosa de bromuro de etidio de 0.5 ug/ml si es que no se va a transferir a papel de nitrocelulosa, durante 15 minutos o hasta que se detecten las bandas del RNA por el transiluminador de luz ultravioleta. Si el gel se va a transferir a papel de nitrocelulosa no se tinte con bromuro de etidio (Maniatis, 1982).

TRANSFERENCIA DEL RNA A PAPEL DE NITROCELULOSA.

El papel de nitrocelulosa (BA 85 0.45 um Schleicher & Schuell) se sumerge en agua extensamente para después sumergirlo en el buffer 20 SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio) hasta antes de la transferencia.

Sobre una superficie plana y suave se coloca;

- 1) Toallas de papel secas con un espesor aproximado de 5 cm.
- 2) 3 piezas húmedas en 20 SSC de papel Whattman 3 MM.

- 3) Papel de nitrocelulosa húmedo en 20 SSC.
- 4) Gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes sin tefir con bromuro de etidio.
- 5) 3 piezas húmedas en 20 SSC de papel Whattman 3 MM
- 6) Toallas de papel secas con un espesor aproximado de 5 cm
- 7) Una placa de vidrio.
- 8) Un peso de aproximadamente 1 kg

NOTA:

No manejar el papel de nitrocelulosa con las manos, puesto que las huellas causan problemas. Las burbujas deben evitarse entre cualquiera de las capas puesto que causan vacíos en la transferencia.

Se comprimen todas las capas durante toda la noche o durante 24 horas a temperatura ambiente y se hornea 2 horas a 80°C al vacío.

Se almacenan los filtros horneados en el desecador a 4°C durante meses o más tiempo, o pueden utilizarse inmediatamente para la hibridación con el probe radioactivo (Maniatis, 1982; Schleicher & Schuell).

PREPARACION DEL PROBE RADIOACTIVO DE ACTINA.
MARCAJE CON ^{32}P . NICK TRANSLATION.

Se utilizó el plásmido recombinante con la secuencia genética para actina de Drosophila melanogaster obtenido de Federico Sánchez, Instituto de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno, y fue descrito en Tobin et al., 1980.

Se procede de acuerdo a las instrucciones del ensayo comercial de Amersham Corporation: el DNA por marcar (Plásmido recombinante con la secuencia de actina) se disuelve en agua bidestilada y en un tubo eppendorf estéril, se agrega de 1 a 2 ug de DNA, después se agregan 20 ul del buffer de nucleótidos (dATP, dGTP y dTTP), los nucleótidos están en cantidades equimolares de 100 um. Se añade el nucleótido marcado con fósforo radioactivo y que corresponde al trifosfato de deoxicitidina $5'[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$, en una cantidad de 250 pmoles= 100 uCi tomados de un stock con actividad específica de 400 Ci/mmol y una concentración de radioactividad de 10 mCi/ml. Posteriormente se agregan 10 ul del stock de enzima que corresponde a la DNA polimerasa I de E. coli y por último se ajusta con agua bidestilada estéril a un volumen de 100 ul. Se tapa el tubo y se mezcla suavemente por inversión, después se centrifuga 2 segundos en la microcentrifuga. Se incuba en baño de temperatura constante de $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ de 2.5 a 3.5 horas. Se detiene la reacción con 0.2 M EDTA en hielo. La mezcla de reacción se coloca directamente en columna Sephadex G-10 de 10 cm de longitud, cuyo buffer de equilibrio así como de suspensión de la muestra es: 150 mM NaCl; 10 mM EDTA, 0.1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Se eluye la columna con este mismo buffer y se colectan fracciones de 10 gotas, monitoreando la radiactividad con el Geiger. Se confirma en qué fracciones se colectó el DNA, al contar las cuentas por minuto de una alícuota de cada fracción. Se obtienen dos picos de cpm, donde el primero corresponde al DNA marcado con ^{32}P y el segundo corresponde al isótopo libre. Se juntan las fracciones del primer pico y se ajusta 0.2M de NaCl; 5 mg/ml de DNA acarreador (DNA de timo de ternera; 70 % etanol (2.2 volúmenes). Se deja toda la noche precipitar al DNA a -20°C y se colecta al centrifugar a 10,000 RPM durante 30 minutos a 4°C (Rotor HB-4 Sorvall). Se resuspende en 500 ul de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1 mM EDTA) y se toma una alícuota por duplicado de 2 ul para saber la actividad específica de cpm/ug DNA (10^{-10} cpm/ug DNA). Tanto las alícuotas de las fracciones de colección de la columna de Sephadex, como las alícuotas del DNA precipitado se cuentan en un espectrofotómetro de centelleo líquido PACKARD TRI-CARB agregándoseles líquido de centelleo AQUASOL.

DESNATURALIZACION DEL PROBE.

El DNA marcado con ^{32}P y disuelto en solución TE, se ajusta a una concentración final de NaOH 0.1 N. Se incuba durante 20 o 30 minutos a 37°C. Se coloca en hielo y se neutraliza con HCl 1 N a un pH aproximado de 6.5 a 7.5.

El DNA marcado radioactivamente y desnaturalizado se mezcla en la solución de hibridación.

HIBRIDACION DEL RNA CON EL PROBE RADIOACTIVO. (METODO DE "NORTHERN BLOT HYBRIDIZATION"). DENSITOMETRIA DE AUTORADIOGRAFIAS.

El papel de nitrocelulosa donde está fijado el RNA se sumerge en 5 SSC y se coloca en una bolsa de plástico donde se le añade 0.2 ml de solución de prehibridación por cm^2 de papel de nitrocelulosa (50% v/v formamida; 5 SSC; 5x sol. Denhardt; 50 mM NaH_2PO_4 pH 6.5; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA timo de ternera desnaturalizado) y se incuba a 42°C de 4 a 24 horas con agitación.

Después de la prehibridación se elimina de la bolsa de plástico la solución de prehibridación y se agrega la solución de hibridación con el probe radioactivo (50% v/v formamida; 5 SSC; 2x sol. Denhardt; 20 mM NaH_2PO_4 pH 6.5, 10% dextran sulfato; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA de timo de ternera desnaturalizado; 1 μg Probe de ACTINA desnaturalizado). La cantidad de solución de hibridación es de 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de papel de nitrocelulosa y se incuba 48 horas a 42°C (Schleicher & Schuell; Maniatis, 1982; Thomas Patricia 1980; Wahl et al. 1979).

Terminado el tiempo de hibridación se elimina la solución respectiva y se saca el papel de nitrocelulosa de la bolsa de plástico para colocarse en un recipiente donde se va a agregar una solución de lavado (0.1 SSC; 0.1% SDS p/v) durante 1 hora con 5 cambios a una temperatura de 50°C (Mc Cutchan, 1984).

Se seca al aire el filtro de nitrocelulosa y se expone para autorradiografía, con película de rayos X, a -70°C con placa intensificadora. Los tiempos de exposición para visualizar las bandas radioactivas de híbridos con secuencias homólogas, fluctúa de 12 horas a 24 horas dependiendo de la actividad específica del probe de actina.

Las autorradiografías obtenidas se analizan densitométricamente con el objeto de hacer más cuantitativa la comparación

de las manchas que hibridaron con el probe de actina.

Las áreas bajo las curvas obtenidas del análisis densitométrico de cada autorradiografía se analizaron mediante el recorte de las mismas áreas y pesándolas. Posteriormente se compararon sus pesos tomando como unidad el caso del RNA control.

La densitometría se efectuó en el espectrofotómetro Gilford a una longitud de onda de 580 nm.

TECNICA DE HIBRIDACION DE MANCHAS. (DOT BLOT HYBRIDIZATION)

Alternativamente a la obtención de geles desnaturalizantes de RNA y a su transferencia a papel de nitrocelulosa, se puede colocar directamente el RNA en papel de nitrocelulosa después del siguiente tratamiento; el RNA (15 ug) se disuelve en buffer TE frío ajustando un volumen de 50 ul y se le agrega un volumen igual de formaldehído al 14% en 12 SSC (1.8 M NaCl, 0.18 M citrato de sodio). Se incuba a 65°C durante 10 minutos con el objeto de desnaturalizar el ácido nucleico. Posteriormente se hacen diluciones progresivas en buffer 15 SSSC 1:1 v/v y se aplican directamente al papel de nitrocelulosa BA 85 Schleicher & Schuell que ha sido previamente humedecido en agua y en 20 SSC, aunque en el momento de colocar la muestra el papel está seco. Se hornea el papel de nitrocelulosa a 80°C durante 90 minutos al vacío y a continuación se prehibrida, hibrida, lava y se expone para la autorradiografía como ya se mencionó anteriormente (White y Carter, 1982; Chafouleas, et al., 1984; Jefferson, et al., 1985). También se analizaron las autorradiografías por densitometría.

ENSAYO CON RIBONUCLEASA.

La muestra de RNA se suspende en buffer TE, ajustando una concentración de 1 SSC. Se agrega la ribonucleasa pancreática a una concentración final de 100 ug/ml o 200 ug/ml y se incuba a 37°C durante 60 minutos.

TINCION DE RNA DESPUES DE TRANSFERIR A FILTROS DE NITROCELULOSA.

El filtro de nitrocelulosa después de la hibridación y de la exposición para la autorradiografía en placas de rayos X, se sumerge en ácido acético durante 15 minutos a temperatura ambiente, transfiriéndose después a una solución de acetato de sodio 0.5 M pH 5.2, azul de metileno 0.04% por 5 o 10 minutos a temperatura ambiente. Se enjuaga el filtro en agua durante 5 a 10 minutos y se observan bandas cuando el RNA es 28S, 18S o el mensajero de globina 9S. Si existe RNA mensajero

aparecerán manchas. Esta técnica sirve para verificar tamaños de RNA transferidos, así como para observar la eficiencia de la transferencia (Maniatis, 1982).

TRADUCCION "IN VITRO" CON METIONINA³⁵S Y VERIFICACION EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN UNA Y DOS DIMENSIONES.

Se procede según el protocolo dispuesto por el ensayo comercial de Amersham (Rabbit Reticulocyte Lysate N. 90. Nuclease treated, message dependent).

A 100 ul del lisado de reticulocitos se le añaden 250 uCi de metionina ³⁵S, esta mezcla es útil para 12 muestras de RNA. Se separa la mezcla en alícuotas de 10 ul cada una en tubos eppendorf estériles. Se agrega a cada tubo 1 ul que a veces corresponde a 1 ug de RNA. Debe contarse con un control positivo que corresponde al RNA del virus del mosaico del tabaco, así como un control negativo donde no se agregue RNA, sino que solamente agua bidestilada.

Se mezclan en vortex las muestras y centrifugan unos segundos para incubarse después a 30°C durante 60 minutos. Se toman alícuotas de 2 ul por duplicado para ponerlas sobre filtros de 3 MM y se secan. Las muestras en los papeles se precipitan con TCA 10% a 4°C durante 30 a 60 minutos, se enjuagan 3 veces consecutivas con TCA 5% y se hierve en la última ocasión durante 15 minutos. Se enjuagan nuevamente con TCA 5%, etanol y éter y se dejan secar. Se les agrega a cada papel colocado en un vial líquido de centelleo y se cuentan en el contador de centelleo.

Las muestras de RNA traducidas se disuelven en diferente buffer dependiendo del tipo de electroforesis por efectuar, si es electroenfoque, se disuelven en 40 ul de buffer A (9.5 M urea ultrapura, 2% NP 40, 5% B-mercaptoetanol, 2% anfolinas pH 5-7 LKB). Si se efectúa un gel en una dimensión, las muestras se disuelven en 10 ul de buffer 2x (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 25% p/v glicerol, 0.002% pironina) y se les agrega unos cuantos cristales de urea ultrapura así como 2 ul de B-mercaptoetanol, se hierven las muestras durante 1 minuto y se aplican en los carriles del gel unidimensional.

ELECTROFORESIS EN UNA DIMENSION.
GELES VERTICALES DE 10% ACRILAMIDA-BIS ACRILAMIDA.

Los geles de poliacrilamida verticales de un ancho de 1.5 mm se preparan en placas de vidrio, agregando las siguientes soluciones en el orden especificado:

- 1) TAPON. Solución de: 30%-0.8% Acrilamida-Bis acrilamida 2 ml, 8% Temed 40 ul, 12.5% persulfato 80 ul.
Polimeriza inmediatamente a temperatura ambiente.
- 2) SEPARADOR 10%. Solución de: Buffer 4x pH 8.8 (1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 0.4% SDS) 5 ml, 30%-0.8% Acrilamida-Bis acrilamida 6.9 ml, agua bidestilada 8.4 ml, 8% Temed 100 ul, 12.5% persulfato 200 ul.
Se deja polimerizar durante 15 minutos aproximadamente teniendo la precaución de agregar inmediatamente después de la solución anterior butanol en la superficie del gel. Después de polimerizar se elimina la fase orgánica y se enjuaga muy bien con agua destilada así como se seca con cuidado.
- 3) CONCENTRADOR. Solución de: Buffer 4x pH 6.8 (1.5 M Tris-HCl pH 6.8; 0.4% SDS) 1.5 ml, 30%-0.8% Acrilamida-Bis acrilamida 1.2 ml, agua bidestilada 3.5 ml, 8% Temed 40 ul, 12.5% persulfato 80 ul.
Se deja polimerizar durante 15 minutos, colocando inmediatamente después de agregar la solución el peine para formar los carriles donde se van a colocar las muestras.

Ya que haya polimerizado el gel se coloca en cámaras especiales donde se agrega el buffer de corrida (0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS). Se colocan las muestras con el buffer 2x en los carriles respectivos y se aplica una corriente con voltaje constante de 100 volts hasta que el colorante haya pasado la fase concentradora de acrilamida, ya que se incrementa el voltaje a 125 volts hasta que llegue el colorante al tapón.

Al finalizar la corrida se saca el gel de las placas de vidrio y se sumerge en una solución de tinción de proteínas (azul de coomasie-metanol-ácido acético) durante 1 hora si la solución no se ha utilizado y durante toda la noche si ya es una solución usada. Se destiñe con varios cambios de una solución de metanol; ácido acético; agua en la proporción 5:5:1 respectivamente. Si las muestras tienen incorporación de metionina ³⁵S, entonces, se sigue el siguiente tratamiento:

Se sumerge el gel durante 1 hora con 2 cambios en una solución al 100% de dimetil sulfóxido DMSO, con el objeto de deshidratar el gel. Posteriormente se sumerge el gel en una solución al 20% (p/p) de 2,5-difeniloxazol (PPO) en DMSO durante 3 horas. Terminado este tiempo se deja lavando el gel en agua corriente durante 1 hora para secarlo al vacío y poder exponerlo a placas de rayos X a -70°C para obtener la autorradiografía correspondiente (W.M. Bonner y R.A. Laskey, 1974).

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Para correr la primera dimensión o electroenfoque deben prepararse tubos de vidrio delgados de 15 cm de longitud por 0.5 cm de diámetro de la siguiente manera:

Se deben lavar con jabón (sigmaclin), dándoles una cepillada con un escobillón delgado. Enjuagar con agua corriente durante 15 minutos. Meterlos en KOH alcohólica durante 15 minutos (8 M KOH 3 ml, etanol absoluto 240 ml). Posteriormente se enjuagan nuevamente con agua corriente durante 15 minutos y con 2 o 3 enjuagadas con agua bidestilada. Se secan y se cubren hasta antes de usarse.

Se prepara la solución de acrilamida para los tubos de la siguiente forma: 28.38% acrilamida, 1.62% bis-acrilanida. Para 12 tubos se toman 2 ml de la solución anterior y se agregan 3 ml de 10% NP-40, 2.96 ml de agua y 0.75 ml de anfolinas de pH 5-7, ajustando un volumen de 15 ml. Se agita la solución anterior agregando 8.25 g de urea hasta que este disuelta completamente, posteriormente se agregan 15 μl de 10% persulfato de amonio y se quita el gas con vacío durante 1 minuto, por lo que se recomienda utilizar un pequeño quitavato. Después se agregan 10.5 μl de Temed y esta solución es la que se agrega a los tubos de vidrio que están sellados en el fondo con parafilm. El volumen que se agregue a los tubos debe alcanzar una altura de 12 cm aproximadamente. Sobre la solución anterior se agregan 20 μl de 8 M urea y se deja gelificar durante 1 a 2 horas. Se remueve la solución 8 M urea por aspiración y se sustituye con 20 μl de buffer A (9.5 M urea ultrapura, 2% NP-40, 5% B-mercaptoetanol, 2% anfolinas pH 5-7). Se colocan sobre este buffer 10 μl de agua y se deja así durante 1 a 2 horas. Posteriormente se quita el parafilm del fondo del tubo y se coloca un cuadro de nylon en el fondo ajustado con una goma, para colocar de esta forma los tubos en la cámara de electroforesis. Se quita el buffer A y el agua y se vuelve a colocar buffer A (20 μl), llenando el tubo con 0.02 M de NaOH desgasificada. El reservorio inferior de la cámara de electroforesis se llena con ácido fosfórico 0.01 M y el reservorio superior con hidróxido de sodio 0.02 M, tenien

do cuidado de no combinar las fases de los tubos. Se efectúa una pre-corrida a voltaje constante de la siguiente manera: 200 volts durante 15 min, 400 volts 30 min y 600 volts 30 min. Se suspende la corriente y se quita por aspiración el contenido del reservorio superior, así como el buffer A de lisis de los tubos. Se colocan las muestras de traducción disueltas previamente en 40 ul del buffer A y se les agrega sobre esta solución 10 ul de buffer K (9 M urea, 1% anfolinas pH 5-7), llenando posteriormente el tubo con 0.02 NaOH desgasificada, es de suma importancia no combinar las fases en el tubo. Se vuelve a llenar la cámara superior con 0.02 M de NaOH y se corren durante 15 horas a voltaje de 600 y una hora a 800 volts. Terminada la corrida se sacan los geles de los tubos con una jeringa a presión, evitando que se rompan e inmediatamente se equilibran de 1 a 2 horas con el buffer O (0.06 M Tris pH 6.8, 10% glicerol, 2.3% SDS, 0.07M B-mercapto-etanol), si no se va a correr la segunda dimensión inmediatamente pueden almacenarse a -20°C . (P. W. O'Parrell, 1975).

Segunda Dimensión.

Se preparan geles de 10% acrilamida-bis acrilamida verticales en placas de vidrio como ya se mencionó anteriormente, sin colocar peine a la solución concentradora. Se coloca sobre el concentrador el gel cilíndrico de los tubos de electroenfoque y se cubre con 1% agarosa en buffer O, cerciorándose de que no se formen burbujas de aire entre el gel plano y el cilíndrico. Se deja gelificar la agarosa que también tiene disuelto azul de bromofenol (25 ul). Se coloca en la cámara de electroforesis el gel vertical con el gel cilíndrico y se llena la cámara con el buffer de corrida (0.025M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS). Se aplica una corriente a voltaje constante de 100 volts hasta que el colorante haya pasado la fase concentradora de acrilamida, y después se incrementa el voltaje a 125 volts hasta que llegue el colorante al tapón.

Después puede teñirse con azul de coomasie y tratarlo con 2,5-difeniloxazol PPO en DMSO, de la manera que se especificó en la electroforesis unidimensional, ya que las muestras traducidas incorporaron metionina ^{35}S . Asimismo se secan los geles y se exponen a placas de rayos X a -70°C para obtener las respectivas autorradiografías.

RESULTADOS

ANALISIS DEL INCREMENTO DEL PESO DE LAS RATAS CONTROL E INTOXICADAS CON TETRACLORURO DE CARBONO DURANTE EL TRATAMIENTO DE 5 SEMANAS.

Se realizaron tres tratamientos de cinco semanas de duración cada uno, con 3 diferentes lotes de ratas Wistar macho de cinco semanas de edad al iniciarse el experimento. Las ratas fueron alimentadas con la misma dieta especial, tanto las del grupo control como las intoxicadas con CCl_4 .

En cada lote se agruparon 8 ratas para el grupo control y 8 ratas para el grupo intoxicado. Al grupo control solamente se le inyectó intraperitonealmente aceite mineral, mientras que al grupo intoxicado se le inyectó intraperitonealmente el tetracloruro de carbono diluido en aceite mineral como se indica en la sección de Material y Métodos.

El peso inicial promedio de los tres lotes de ratas control fue de 60.23 ± 5.35 g de un total de 24 animales. El peso inicial promedio de los tres lotes de ratas a las que se les intoxicó con tetracloruro de carbono fue de 58.65 ± 3.16 g.

En las tablas que se muestran en la siguiente página, se señalan los incrementos en peso (gramos) observados en los animales control y tratados con tetracloruro de carbono, durante períodos de una semana durante el tratamiento total de 5 semanas.

ANALISIS DEL INCREMENTO DEL PESO DE LAS RATAS CONTROL
E INTOXICADAS CON TETRACLORURO DE CARBONO DURANTE
EL TRATAMIENTO DE 5 SEMANAS.

GRUPO CONTROL

| | Periodo Semanal del Tratamiento | | | | |
|----------|---------------------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
| | 0 - 1 | 1 - 2 | 2 - 3 | 3 - 4 | 4 - 5 |
| LOTE 1 | 18.13 \pm 2.4 | 27.19 \pm 3.8 | 23.4 \pm 3.7 | 49.52 \pm 5.1 | 29.2 \pm 2.9 |
| LOTE 2 | 14.29 \pm 3.9 | 21.8 \pm 6.0 | 10.1 \pm 2.6 | 24.2 | 14.0 |
| LOTE 3 | 19.3 \pm 6.2 | 31.58 \pm 7.6 | 42.4 \pm 6.5 | 74.95 \pm 16.2 | 39.0 \pm 2.8 |
| PROMEDIO | | | | | |
| TOTAL | 17.24 \pm 2.6 | 26.86 \pm 4.9 | 25.3 \pm 6.3 | 49.6 \pm 25.4 | 27.4 \pm 12.6 |

GRUPO INTOXICADO CON CCl₄

| | Periodo Semanal del Tratamiento | | | | |
|----------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | 0 - 1 | 1 - 2 | 2 - 3 | 3 - 4 | 4 - 5 |
| LOTE 1 | 19.65 \pm 2.6 | 25.08 \pm 8.4 | 13.89 \pm 8.9 | 24.38 \pm 12.1 | 15.1 \pm 8.1 |
| LOTE 2 | 9.51 \pm 3.8 | 11.55 \pm 4.1 | 17.97 \pm 9.3 | 8.5 | 3.0 |
| LOTE 3 | 12.4 \pm 5.7 | 18.1 \pm 11.4 | 13.73 \pm 8.9 | 48.15 \pm 8.0 | 30.5 \pm 2.1 |
| PROMEDIO | | | | | |
| TOTAL | 13.85 \pm 5.2 | 18.24 \pm 6.8 | 15.2 \pm 2.4 | 27.01 \pm 20.0 | 16.19 \pm 13.8 |

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

En el aislamiento de hepatocitos por medio de la técnica de perfusión hepática, no se encontraron dificultades y se efectuaron 31 ensayos en total, donde se obtuvieron como valor promedio $15 \times 10^7 \pm 5.92 \times 10^7$ células, que tenían generalmente una viabilidad entre 70 y 90%, determinada por la técnica de exclusión de azul de tripano.

En ocasiones el aislamiento de hepatocitos de ratas intoxicadas durante 5 semanas con tetracloruro de carbono, presentaba algunas dificultades, puesto que no era suficiente la cantidad de colagenasa perfundida en el tejido, ya que en esta semana el hígado se encontraba sumamente dañado, mostrando una fibrosis extrema, por esta razón el rendimiento celular durante la quinta semana de tratamiento disminuía al compararse con el obtenido con las demás ratas (15×10^7 cel.), llegando a ser en ocasiones de 1×10^7 hepatocitos.

Los hepatocitos obtenidos se alicuotaban en viales en cantidad aproximada de 4×10^7 células por vial y se congelaban inmediatamente en nitrógeno líquido.

AISLAMIENTO Y ANALISIS ELECTROFORETICO DEL RNA TOTAL DE HEPATOCITOS.

El extracto de RNA total de hepatocitos se analizó electroforéticamente en geles de agarosa al 1.2% en buffer Tris-Boratos o en Tris-Acetato-EDTA (TAE). El gel se tñió con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta.

En la siguiente figura se observa un minigel con 8 diferentes muestras o preparaciones con aproximadamente 1 ug de RNA total en cada carril.

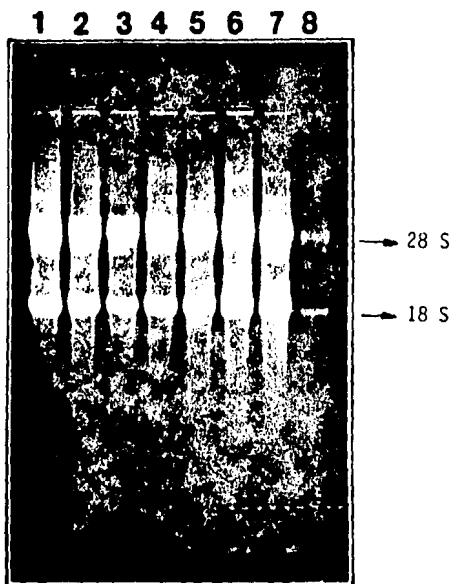


Fig. 12 ANALISIS ELECTROFORETICO DE RNA TOTAL EXTRAIDO DE HEPATOCITOS DE RATA. AGAROSA 1.2% EN BUFFER TRIS-BORATOS. TINCION CON BROMURO DE ETIDIO Y VISUALIZADO EN TRANSILUMINADOR DE LUZ U.V.

- 1) RNA_t rata con intoxicación aguda con CCl₄ (1 dosis, 24 horas)
- 2) RNA_t rata con intoxicación de 3 semanas con CCl₄
- 3) RNA_t rata con intoxicación de 1 semana con CCl₄
- 4) RNA_t rata con intoxicación de 5 semanas con CCl₄
- 5) RNA_t rata sin intoxicar
- 6) RNA_t rata con intoxicación aguda con CCl₄ (1 dosis, 24 horas)
- 7) RNA_t rata con intoxicación aguda con CCl₄ (1 dosis, 24 horas)
- 8) RNA_t cerebro de rata; Marcadores de RNA ribosomal 28S y 18S.

En el anterior gel (figura 12) se observa una banda de mayor P.M. con respecto a los marcadores ribosomales, corresponde a DNA residual en la preparación.

La pureza del ácido nucleico utilizado en las preparaciones se midió al hacer el cociente de las absorbancias del RNA a 260 nm y a 280 nm y generalmente corresponde a una relación de 1.7 a 1.9, considerándose que tiene escasa cantidad de proteínas. Asimismo se registró la relación de absorbancias de 260 nm y de 230 nm y se obtuvieron datos de 2.2 a 3.0, que certifican nuevamente la escasa cantidad de proteínas en las preparaciones. Muestras de RNA total que no cubrieran estos requisitos de pureza se descartaban para los análisis posteriores de hibridaciones con el DNA con la secuencia de ACTINA.

En cuanto al rendimiento de RNA total de los hepatocitos se efectuaron 27 ensayos de los cuales se determinó un valor medio que correspondió a un rendimiento del $62.95\% \pm 38.51\%$. Cabe hacer la observación de que al extraer el RNA total de ratas hepatectomizadas, el rendimiento disminuía al ser comparado con el RNA total obtenido de ratas control o intoxicadas con CCl_4 . Así mismo el aspecto de este RNA total de ratas hepatectomizadas, presentaba un aspecto opalescente, hecho que no se observaba en las preparaciones restantes.

ANALISIS ELECTROFORETICO DEL RNA TOTAL DE HEPATOCITOS EN GELES DESNATURALIZANTES (GLIOXAL-DMSO)

La figura 13 muestra el minigel de agarosa 1.2% en buffer de 10 mM fosfatos pH 7, después del corrimiento electroforético de diversas muestras de RNA total obtenidas de hepatocitos de rata. Se tiñió con bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Analizando el corrimiento de las muestras de RNA total de hepatocitos, se distingue claramente que las muestras no desnaturalizadas^{1,4} tienen un mayor corrimiento electroforético, al observar los marcadores ribosomales del RNA (28S, 18S) en la parte inferior de la banda de 2.0 kb, mientras que la muestra desnaturalizada 3, tiene un corrimiento electroforético menor, ya que los marcadores ribosomales del RNA se encuentran entre las bandas de 4.4 y 2.0 kb.

Debe señalarse también que la fluorescencia del RNA_t desnaturalizado (carril 3) no es tan marcada como la mostrada por los RNA_t sin desnaturalizar (carriles 1 y 4).

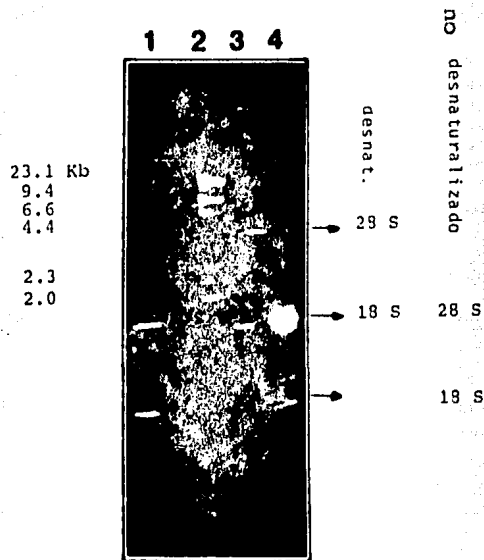


Fig. 13 ANALISIS ELECTROFORETICO DEL RNA TOTAL DE HEPATOCITOS EN GELES DESNATURALIZANTES (GLIOXAL-DMSO) AGAROSA 1.2%, 10 mM FOSFATOS pH 7. TINCION CON BROMURO DE ETIDIO, VISUALIZADO EN TRANSILUMINADOR DE U.V.

1) y 4) RNA_t de hepatocito (2 ug) sin desnaturalizar

3) RNA_t de hepatocito (20 ug) desnaturalizado con glioxal-DMSO.

2) DNA bacteriófago lambda (1 ug) digerido con la enzima Hind III. Fragmentos de DNA obtenidos de arriba hacia abajo (Kb): 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0.

OBTENCION DE RNA POLI A⁺ (RNA MENSAJERO) POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA OLIGO dT A PARTIR DE RNA TOTAL DE HEPATOCITOS.

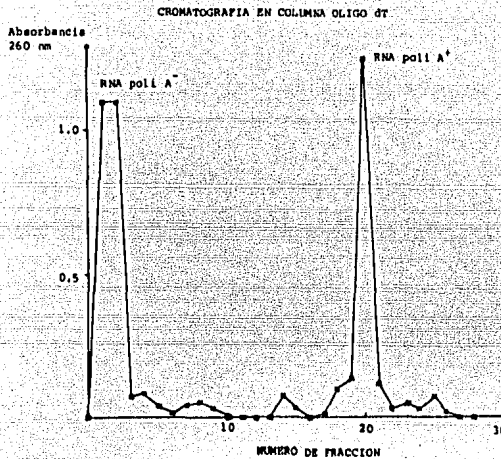


Fig. 14 PATRON DE ABSORBANCIA DEL RNA EN CROMATOGRAFIA EN COLUMNA OLIGO dT

Gráfica de absorbancia a 260 nm vs número de fracciones obtenidas al hacer las respectivas diluciones con amortiguadores de diferente fuerza iónica sobre la columna oligo dT, con el objeto de obtener el RNA poli A⁺.

Fracción 1-13: SOLUCION BE I, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS.

Fracción 14-17: SOLUCION BE II, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS.

Fracción 18-28: SOLUCION BE III, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.05% SDS.

Las fracciones colectadas con la solución BE III (18-28) se precipitaron con 0.2 M de acetato de sodio y 70% de etanol durante 12 horas a -20°C , posteriormente se centrifugó la muestra para obtener los cristales de RNA poli A⁺, que se resuspendieron en un mínimo volumen de agua bidestilada estéril, de la cual se tomó una alícuota para medir su absorbancia a 260 nm. El rendimiento obtenido de RNA poli A⁺ fue del 83.5%.

ANALISIS ELECTROFORETICO DEL PLASMIDO RECOMBINANTE CON LA SECUENCIA GENOMICA PARA ACTINA DE Drosophila melanogaster

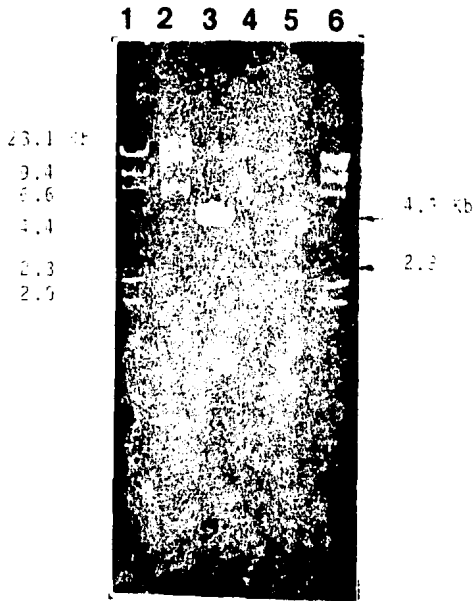


Fig. 15 AGAROSA 1% en TAE. TINCION CON BROMURO DE ETIDIO Y VISUALIZADO EN UN TRANSILUMINADOR DE LUZ U.V.

- 1) y 6) DNA del bacteriófago lambda (1 ug) digerido con Hind III.
- 2) Plásmido PBR322 (0.5 ug)
- 3) Plásmido PBR322 (0.5 ug) digerido con BAM HI
- 4) Plásmido recombinante de actina (1 ug)
- 5) Plásmido recombinante de actina (1 ug) digerido con BAM HI.

En el carril 5 se observa un fragmento de 4300 pares de bases que corresponde al DNA del plásmido PBR322 linearizado y un fragmento de 2800 pares de bases que corresponde al DNA genómico de ACTINA. Con esto se verifica lo reportado por Tobin, et al., es decir que la subclona genómica K1a para ACTINA de Drosophila melanogaster porta una secuencia insertada de 2800 pares de bases en el sitio BAM HI del plásmido PBR322.

PREPARACION DEL PROBE RADIOACTIVO DE ACTINA.
 PATRON CROMATOGRAFICO EN SEPHADEX G-100.
 FRACCIONAMIENTO DE LA MEZCLA DE MARCAJE CON ^{32}P .

Se efectuó la técnica de "Nick Translation" que nos permitió marcar radiactivamente cualquier DNA con una actividad específica del orden de 9.1×10^7 cpm - 5.8×10^7 cpm por μg de ácido nucleico. Esta técnica se utilizó para marcar el plásmido recombinante con la secuencia genómica para actina de Drosophila melanogaster obtenido de Federico Sánchez del Instituto de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno y descrito por Tobin, et al. 1980.

La reacción es catalizada por la DNA polimerasa I de E. coli, incubando simultáneamente con DNAasa I para generar rupturas en cadena sencilla que son los sitios de iniciación de la DNA polimerasa I (Pol I). Se marcó con $5' \text{[}\alpha\text{-}^{32}\text{P]}$ trifosfato de deoxicitidina, que posee una actividad específica de 410 Ci/mmol. El DNA marcado se purificó por cromatografía en Sephadex G-100. En la gráfica se muestra un patrón de elución en Sephadex G-100 obtenido al promediar datos de 6 ensayos. El primer pico de radiactividad corresponde al DNA marcado con ^{32}P que es excluido de la columna. El segundo pico de radiactividad corresponde a nucleótidos libres no incorporados al DNA.

Se precipitan con etanol al 70% y 0.2M de NaCl, así como con DNA acarreador (5 mg/ml), las fracciones correspondientes al primer pico de radiactividad y el DNA marcado se recupera por centrifugación.

La actividad específica que se obtiene fluctúa entre $9.1\text{-}5.8 \times 10^7$ cpm/ μg de DNA.

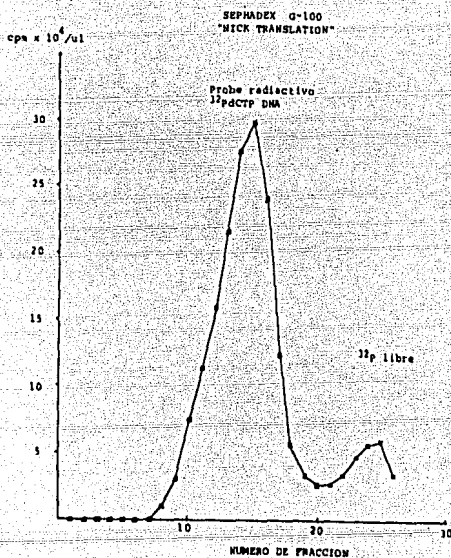


Fig. 16 PATRON CROMATOGRAFICO EN SEPHADEX G-100
Gráfica de radioactividad (cpm $\times 10^4/\text{ul}$)
vs número de fracciones obtenidas al
eluir con: 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1%
SDS, 50 mM Tris-HCl. El pico de radioac-
tividad se colectó y precipitó para obte-
ner el DNA marcado con ^{32}P que tiene la
secuencia de actina.

HIBRIDACION DEL RNA CON EL PROBE RADIOACTIVO.
 (METODO DE "NORTHERN BLOT HYBRIDIZATION")
 DENSITOMETRIA DE AUTORADIOGRAFIAS.

Las hibridaciones se realizaron con los plásmidos recombinantes para actina marcados radioactivamente con ^{32}P y con los filtros de nitrocelulosa a los cuales se les transfirieron las muestras de RNA desnaturalizado en geles con glioxal, provenientes de hepatocitos de rata después de haberse cumplido las diferentes etapas del tratamiento con tetracloruro de carbono.

La hibridación se realizó a 42°C en condiciones relajadas en presencia de formamida al 50%. El tiempo de hibridación fue de 48 horas, aunque puede disminuirse al tomar en cuenta el tiempo de renaturalización media del probe de doble cadena, calculado con la ecuación que se expone a continuación, de donde se obtiene un valor de 2.84 horas. Se toma en cuenta para asegurar más este tiempo de renaturalización el triple del valor obtenido, o sea 8.52 horas, en las cuales se deja hibridando el probe desnaturalizado con el RNA fijado al papel de nitrocelulosa (Maniatis, et al., 1982).

$$\frac{1}{X} \times \frac{Y}{5} \times \frac{Z}{10} \times 2 = \text{Número de horas para alcanzar la renaturalización media del probe} = C_0 t_{1/2}$$

$$X = \text{Peso del probe añadido a la Solución de Hibridación (ug)} = 1 \text{ ug probe de actina}$$

$$Y = \text{Complejidad del probe (proporcional a la longitud del probe en Kb)} = 4.3 + 2.8 = 7.1 \text{ Kb}$$

$$Z = \text{Volumen de la reacción (Sol. de hibridación)} = 10 \text{ ml aprox. para 1 ug de probe}$$

$$\frac{1}{1} \times \frac{7.1}{5} \times \frac{10}{10} \times 2 = 2.84 \text{ h} = C_0 t_{1/2}$$

$$3 \times C_0 t_{1/2} = 8.52 \text{ horas}$$

Después de la hibridación y los lavados pertinentes para eliminar inespecificidad, el filtro de nitrocelulosa se secó y se expuso a película para rayos X, obteniéndose las autorradiografías que se sometieron al análisis densitométrico. En este análisis de las manchas autorradiográficas de la HIBRIDACION ESPECIFICA del RNA con el 5' [α - 32 P] dCTP DNA de ACTINA, se determinaron comparaciones de las intensidades de las manchas mediante el peso de los picos de absorbancia obtenidos gráficamente del espectrofotómetro, tomándose como unidad la mancha del RNA control en cada caso.

ESPECIFICIDAD DE LA HIBRIDACION

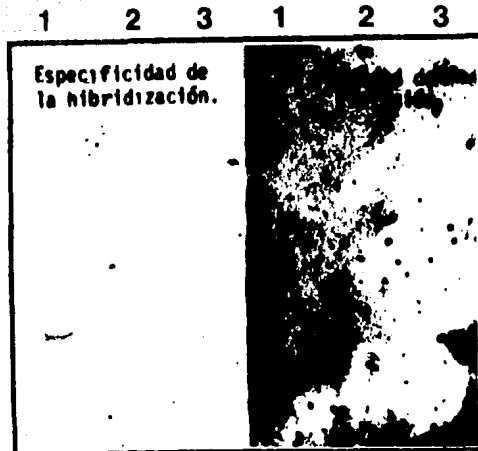


Fig.17 La Especificidad de la Hibridación entre el RNA total de hepatocito y el probe radioactivo de ACTINA, se demostró al observar una sola mancha radioactiva donde se corrió el RNA desnaturalizado (10 ug) -carril 1-. En el carril 2 se analizó una muestra de RNA sin desnaturalizar (10 ug), la cual no hibrida con el DNA radioactivo. Por último en el carril 3 se incubó una muestra de RNA con RNAasa pancreática(10ug) y se corrió electroforéticamente, careciendo de hibridación con el probe de actina. La placa autorradiográfica se muestra con diferentes tiempos de exposición en la película de rayos X, sobreexponiendo la placa del lado derecho para cerciorarse de la especificidad (carril 1).

HIBRIDACION DEL RNA POLI A⁺ Y RNA POLI A⁻
 CON EL PROBE DE ACTINA RADIOACTIVO

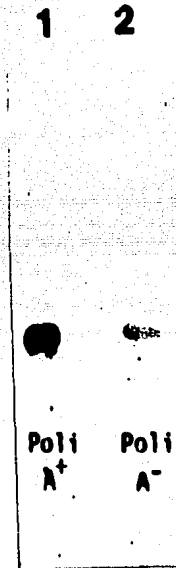


Fig. 18 Autorradiografía que muestra la hibridación de muestras de RNA poli A⁺ y RNA poli A⁻ con el DNA que contiene la secuencia de ACTINA marcado con ³²P. Las muestras de RNA se obtuvieron mediante una cromatografía en columna oligo dT a partir de RNA total de hepatocitos de rata. Densitométricamente el RNA poli A⁻ (carril 2) representa el 90% de la intensidad mostrada de manera más compacta por el RNA poli A⁺ (carril 1).

El análisis de la anterior autorradiografía muestra que a pesar de aislar el RNA mensajero (RNA poli A⁺ -carril 1) a partir del RNA total, quedan residuos de RNA mensajero de ACTINA en la fracción correspondiente al RNA poli A⁻ (carril 2), por lo que se decidió trabajar con el RNA total de hepatocitos que provoca que se observen manchas claras de hibridación, comparables a la observado con el RNA poli A⁺.

RNAm DE ACTINA DE HEPATOCITOS DE RATA. INTOXICACION AGUDA CON TETRACLORURO DE CARBONO -24 horas-. ("NORTHERN HYBRIDIZATION").

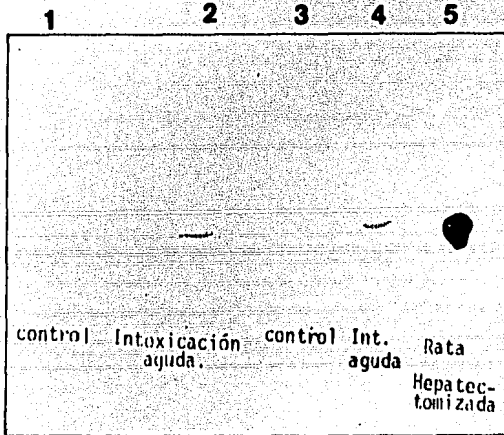


Fig.19 Autorradiografía de RNAm de actina obtenido de hepatocitos de rata. La cantidad de RNA total que se corrió electroforéticamente en cada carril fue constante (15 ug). 1) y 3) RNAm de actina de hepatocitos de rata control (casi no se aprecian en la fotografía). 2) y 4) RNAm de actina de hepatocitos de rata intoxicada con una sola dosis de CCl_4 y sacrificada a las 24 horas (Intoxicación Aguda). 5) RNAm de actina de hepatocitos de rata hepatectomizada y sacrificada a las 24 h. El análisis densitométrico muestra que las intensidades de las manchas 2 y 4 se incrementaron 7.28 y 6.9 veces con respecto al control respectivamente. La mancha 5 se incrementó 19.4 veces con respecto al control. Cada muestra corresponde a diferente animal con características de peso y camada similares uno de otro.

En otro experimento similar, se obtuvo una muestra de Intoxicación Aguda con 1.84 veces más la intensidad de la mancha autorradiográfica del control, según lo detalló el análisis densitométrico.

RNAm DE ACTINA DE HEPATOCITOS DE RATA. UNA SEMANA DE INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO. ("NORTHERN HYBRIDIZATION")

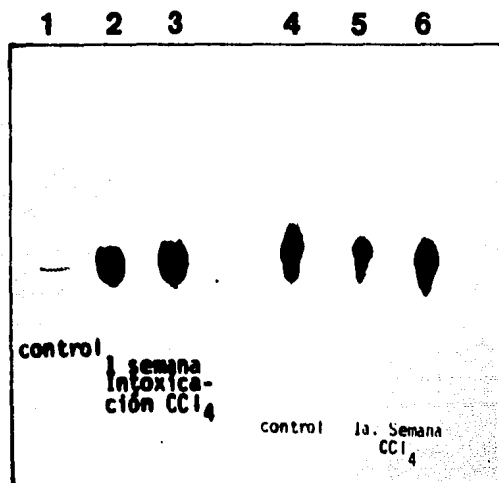


Fig. 20 Autorradiografías que muestran la variación del RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata con una semana de intoxicación con CCl₄ (carriles 2, 3 y 6), asimismo se observan las muestras del RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata control (carriles 1, 4 y 5).

La densitometría detalla que las intensidades de las manchas 2, 3 y 6, que representan al RNAm de ACTINA, corresponden a 4.2, 6.3 y 2.01 veces el valor del control, respectivamente. En las muestras 1, 2 y 3 se analizaron 12.5 ug de RNA total, mientras que en las muestras 4, 5 y 6 se analizaron 20 ug de RNA total.

RNAm DE ACTINA DE HEPATOCITOS DE RATA. TRES SEMANAS DE INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO. ("NORTHERN HYBRIDIZATION").

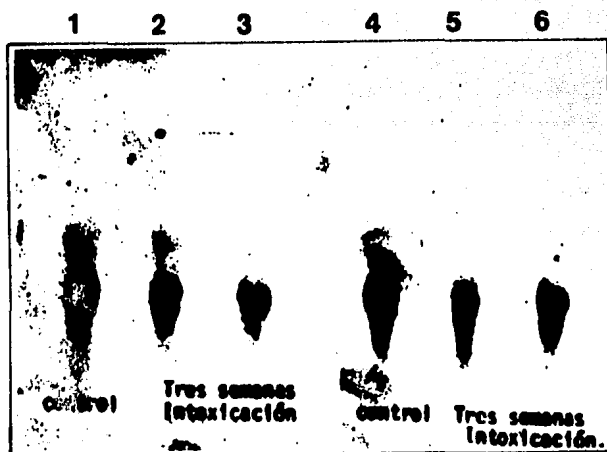


Fig. 21 Las autorradiografías que se ilustran contienen en cada carril 20 ug de RNA total de hepatocitos de rata. 1) y 4) RNAm de ACTINA de hepatocitos de ratas control. 2), 3), 5) y 6) RNAm de ACTINA de hepatocitos de ratas intoxicadas durante 3 semanas con CCl_4 . La densitometría señala el siguiente análisis: las muestras 2, 3, 5 y 6 representan 0.8, 0.6, 0.6 y 1.1 veces el valor del control, respectivamente.

RNAm DE ACTINA DE HEPATOCITOS DE RATA. CINCO SEMANAS DE INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO. ("NORTHERN HYBRIDIZATION")

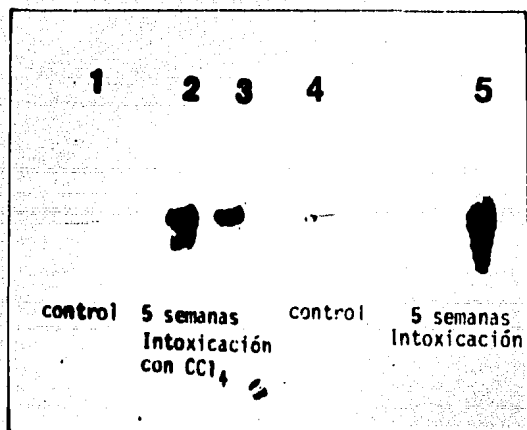


Fig. 22 Las autorradiografías que se ilustran analizaron en cada carril 20 ug de RNA total de hepatocitos de rata. 1) y 4) RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata control. 2), 3) y 5) RNAm de ACTINA de hepatocitos de ratas intoxicadas durante 5 semanas con CCl_4 .

La densitometría señala lo siguiente; las manchas de RNAm de ACTINA 2, 3, y 5 representan 2.1, 2.1 y 2.9 veces el valor del RNAm de ACTINA control respectivamente.

RNA_m DE ACTINA DE HEPATOCITOS DE RATA DURANTE EL TRATAMIENTO DE CINCO SEMANAS DE INTOXICACION CON TETRACLORURO DE CARBONO ("NORTHERN HYBRIDIZATION").

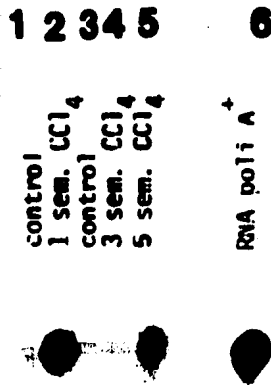


Fig. 23

La autorradiografía muestra en el orden que se indica el RNA mensajero de ACTINA obtenido al hibridar el RNA total transferido a papel de nitrocelulosa con el probe radioactivo de ACTINA ³²P.

- 1) RNA_m ACTINA de hepatocitos control
- 2) RNA_m ACTINA de hepatocitos intoxicados durante 1 semana con CCl₄
- 3) RNA_m ACTINA de hepatocitos control
- 4) RNA_m ACTINA de hepatocitos intoxicados durante 3 semanas con CCl₄
- 5) RNA_m ACTINA de hepatocitos intoxicados durante 5 semanas con CCl₄
- 6) RNA_m ACTINA de hepatocitos normales a partir de RNA poli A⁺ obtenido de RNA total.

El RNA total analizado en cada muestra fue de 35 ug a excepción del RNA poli A⁺ que fue de 20 ug.

LOCALIZACION DEL RNAm DE ACTINA POR HIBRIDACION DEL
RNA TOTAL DE HEPATOCITOS CON EL PLASMIDO RECOMBINANTE
CON LA SECUENCIA GENOMICA PARA ACTINA DE Drosophila
melanogaster.

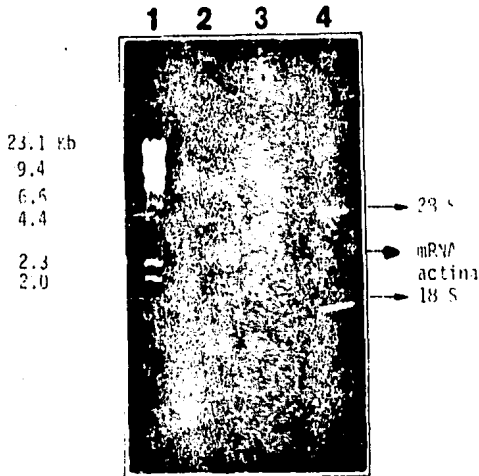


Fig. 24 La fotografía muestra el minigel en condiciones desnaturalizantes -glioal/DMSO- del RNA total de hepatocitos de rata (agarosa 1.2% en buffer de 10 mM fosfatos pH 7). El minigel fue transferido a papel de nitrocelulosa durante 24 horas; el RNA residual o que no se transfirió fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador de luz U.V.

- 1) DNA del bacteriófago lambda (2 ug) digerido con la enzima Hind III.
- 2) RNA de hepatocitos de rata control (12.5 ug)
- 3 y 4) RNA de hepatocitos de ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono durante 1 semana.

Se observa en el gel, en los carriles donde se analizaron las muestras de RNA, dos manchas que corresponden a los marcadores ribosomales 28S y 18S desnaturalizados, asimismo se señala la localización en el gel donde se encontró la mancha de hibridación específica con el "probe de actina", al comparar distancias con la autorradiografía respectiva del papel de nitrocelulosa donde se transfirieron estas muestras para hibridarse después con el DNA radioactivo.

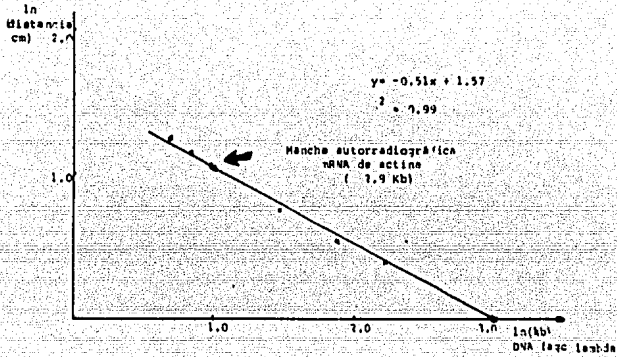


Fig. 25 Gráfica que muestra la localización de la mancha autorradiográfica, correspondiente a la hibridación del "probe de actina" con el RNA total de hepatocitos de rata.

Se graficaron logaritmos naturales de los valores obtenidos al correr en un gel de agarosa al 1.2% fragmentos del DNA del fago lambda al digerirse con la enzima Hind III, en este mismo gel se analizaron las muestras del RNA total desnaturalizado que se transfirió a papel de nitrocelulosa para hibridarse específicamente con la secuencia de ACTINA contenida en el probe radioactivo.

| Fragmentos DNA lambda (Hind III) | ln (x) | Distancia recorrida | ln (y) |
|----------------------------------|--------|---------------------|--------|
| 23.1 kb | 3.14 | 1.0 cm | 0.0 |
| 9.4 | 2.24 | 1.5 | 0.405 |
| 6.6 | 1.89 | 1.75 | 0.56 |
| 4.4 | 1.48 | 2.15 | 0.77 |
| 2.3 | 0.83 | 3.2 | 1.16 |
| 2.0 | 0.69 | 3.5 | 1.25 |

ECUACION DE LA RECTA:

$$y = -0.51x + 1.57$$

$$r^2 = 0.99$$

La mancha autorradiográfica de la hibridación (RNAm ACTINA) observó los siguientes datos:

Distancia recorrida 2.8-2.9 cm
 $\ln(y)$ 1.03-1.06 $\bar{y} = 1.045$

Interpolando en; $y = -0.51x + 1.57$

se tiene que ; $x = \frac{y - 1.57}{-0.51} = \frac{1.045 - 1.57}{-0.51} = 1.029$

$x = 1.029 = \ln(kb)$

por lo tanto;

$kb = e^{1.029} = 2.8$

RNAm ACTINA: 2.8 kb

HIBRIDACION DE MANCHAS. ("DOT BLOT HYBRIDIZATION").
DENSITOMETRIA DE AUTORADIOGRAFIA.

En este experimento alternativo a la técnica de obtención de geles desnaturalizantes de RNA y a su transferencia a papel de nitrocelulosa, se colocaron directamente muestras de RNA total desnaturalizadas con formaldehído en papel de nitrocelulosa y se hibridaron con el probe de ACTINA marcado radioactivamente con ^{32}P , bajo las mismas condiciones mencionadas en los experimentos anteriores.

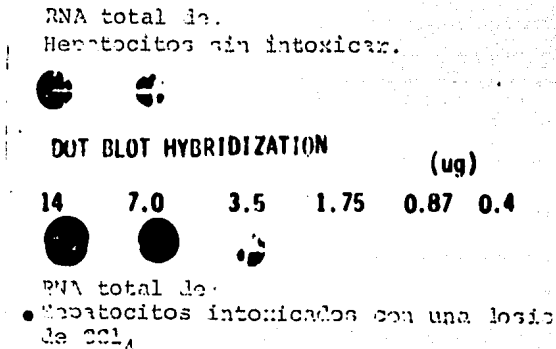
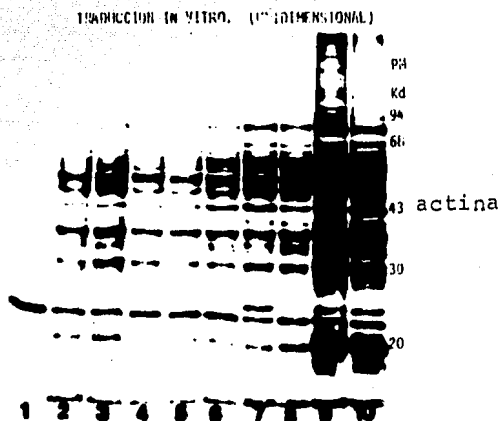


Fig. 26 Autorradiografía que corresponde a la hibridación del RNA total de hepatocitos de rata con el probe radioactivo ^{32}P de actina. La primera línea de manchas corresponde a diversas diluciones 1:1 del RNA total de hepatocitos sin intoxicar. La segunda línea de manchas corresponde a diluciones 1:1 de RNA total de hepatocitos de rata intoxicadas con una dosis de CCl_4 y obtenidos después de 24 horas (Intoxicación Aguda). El RNA mensajero de actina de hepatocitos con intoxicación aguda incrementa su cantidad con respecto al control, puesto que la intensidad de la mancha en el primer caso es mayor al compararla con la dilución respectiva del control (verificar con la densitometría).

ANALISIS ELECTROFORETICO UNIDIMENSIONAL DE LAS PROTEINAS
OBTENIDAS AL TRADUCIR "IN VITRO" RNA TOTAL DE HEPATOCITOS
DE RATA, CON INCORPORACION DE METIONINA ^{35}S .



- Fig. 28 Autorradiografía de las proteínas que incorporaron metionina ^{35}S , al ser traducidas "in vitro" diferentes muestras de RNA total obtenido de hepatocitos de rata durante el tratamiento con CCl_4 . Gel vertical al 10% de acrilamida-bis acrilamida tratado con DMSO-PPO después del corrimiento electroforético, secado y expuesto a la placa de rayos X.
- 1) Control negativo (sin RNA total de hepatocitos).
 - 2) y 4) 1 semana de intoxicación con CCl_4 .
 - 3) Hepatocitos sin intoxicar
 - 5) y 6) 3 semanas de intoxicación con CCl_4 .
 - 7) 5 semanas de intoxicación con CCl_4 .
 - 8) Hepatocitos sin intoxicar (control int. aguda)
 - 9) Hepatocitos intoxicados agudamente (una dosis de CCl_4 y obtenidos a las 24 horas).
 - 10) Hepatocitos de rata hepatectomizada y sacrificada a las 24 horas.

ANALISIS ELECTROFORETICO BIDIMENSIONAL DE PROTEINAS OBTENIDAS AL TRADUCIR RNA TOTAL CON INCORPORACION DE METIONINA-³⁵S.

En este experimento se tradujeron "in vitro" las siguientes muestras de RNA total de hepatocitos de rata:

- 1) Control Negativo: agua y lisado (sin RNA total de hepatocitos).
- 2) RNA total de hepatocitos sin intoxicar
- 3) RNA total de hepatocitos con 1 semana de intoxicación con CCl₄.
- 4) RNA total de hepatocitos con 3 semanas de intoxicación con CCl₄.
- 5) RNA total de hepatocitos con 5 semanas de intoxicación con CCl₄.
- 6) RNA total de hepatocitos intoxicados con una dosis de CCl₄ y obtenidos a las 24 horas (int. aguda).
- 7) RNA total de hepatocitos de rata hepatectomizada y sacrificada a las 24 horas.

Las muestras de RNA total corresponden a las utilizadas en el ensayo del análisis electroforético unidimensional de las proteínas obtenidas al traducirlas "in vitro".

Después de traducir las muestras de RNA total, se procedió a efectuar el electroenfoque y posteriormente se corrió la segunda dimensión en geles verticales al 10% de acrilamida-bis acrilamida, los cuales se sometieron al tratamiento de DMSO-PPO para poderlos secar y exponer a las placas de Rayos X, con el fin de obtener las respectivas autorradiografías.

A continuación se muestran las autorradiografías resultantes del análisis bidimensional de proteínas, señalándose la posición de la actina en cada una de ellas.

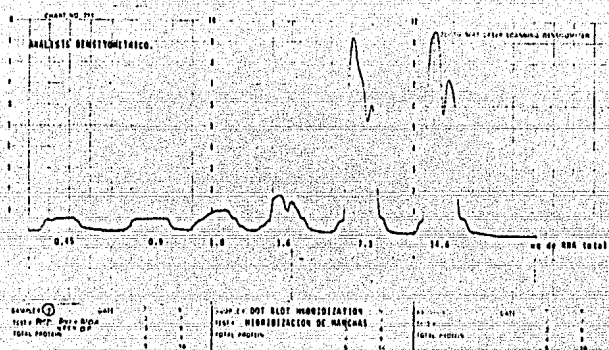


Fig. 27 Gráfica obtenida del análisis densitométrico de la autorradiografía correspondiente a la hibridación de manchas de RNA total (Dot Blot Hybridization). La densitometría de la autorradiografía anterior señala que la intensidad del RNA mensajero de ACTINA correspondiente a los hepatocitos con intoxicación aguda es aproximadamente 4.6, 5.1, 2.01 y 1.72 veces mayor que la intensidad del RNAm de ACTINA de los hepatocitos control, de las concentraciones 14 ug, 7 ug, 3.5 ug y 1.75 ug respectivamente. Las muestras restantes no registraron una señal adecuada en el espectrofotómetro.

Cabe señalar que hubo un detalle que interfirió en la adecuada obtención de manchas autorradiográficas, ya que puede observarse que se presenta una marca en forma de cruz dentro de la mancha radioactiva, que carece de registro de emisión de partículas radioactivas. Posiblemente esto se haya debido a que se marcó con lápiz el papel filtro donde se sobrepuso el papel de nitrocelulosa para poder colocar exactamente las muestras de RNA desnaturalizado. Este hecho probablemente impidió la fijación del RNA al papel por lo que no hibridó con el probe radioactivo de ACTINA.

TRADUCCION "IN VITRO". (BIDIMENSIONAL).
 RATA HEPATECTOMIZADA (24 HORAS).

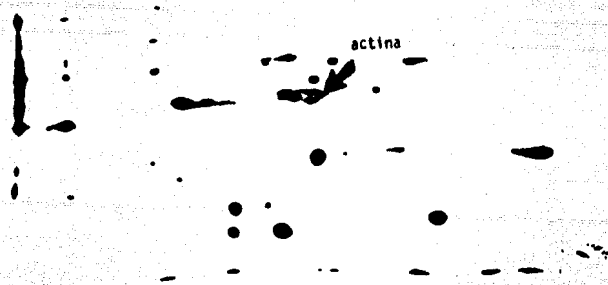


Fig. 33 Autorradiografía que muestra el análisis bidimensional de las proteínas que incorporaron metionina ^{35}S , obtenidas al traducir "in vitro" El RNA total de hepatocitos de rata hepatectomizada y sacrificada a las 24 horas. La placa de rayos X se expuso durante 1 día a -70°C .

TRADUCCIÓN "IN-VITRO" (BIOHIBENS (ONAL).
INTOXICACION AGUDA CON CCl_4 (UNA DOSIS, 24 HORAS).

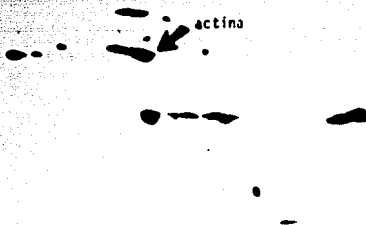


Fig. 32 Autorradiografía que muestra el análisis bidimensional de las proteínas marcadas con metionina ^{35}S , obtenidas al traducir "in vitro" el RNA total de hepatocitos de rata intoxicada con una dosis de CCl_4 y sacrificada a las 24 horas. La exposición de la placa de rayos X fue de 1 día a $-70^{\circ}C$.

CONTROL NEGATIVO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE UN GEN

→ 44 Kd

Fig. 30 Autorradiografía que muestra el control negativo, es decir no se agregó RNA total de hepatocitos al lisado de reticulocitos, por lo que las proteínas que se aprecian son inherentes al sistema y deben descartarse de las autorradiografías posteriores. La exposición de la placa de rayos X fue de 6 días a -70°C .

ELECTROFRESIS BIDIMENSIONAL (ALFA ACTINA)



Fig. 29 Gel bidimensional que muestra la posición de la alfa actina obtenida de músculo de conejo y que no se marcó radioactivamente (pI 5.4). Este patrón sirvió como punto de referencia para localizar en las autorradiografías la actina marcada radioactivamente con ^{35}S -met, obtenida al traducir "in vitro" RNA total de hepatocitos de diferentes períodos de intoxicación con CCl_4 . La actina de hepatocitos (beta y gamma) se encuentran adyacentes a la alfa actina pero al ser más básicas se encuentran hacia la izquierda del gel. (Gabbiani, et al. The American Society for Clinical Investigation, Inc. Vol. 73, 148-152, 1984).

TRADUCCION "IN VITRO". (DIDIMENSIONAL)
HEPATOCITOS DE RATA SIN INTOXICAR CON CCl_4 .



Fig. 31 Autorradiografía que muestra el análisis bidimensional de las proteínas obtenidas al traducir "in vitro" el RNA total de hepatocitos de rata control. La exposición de la placa de rayos X fue de 24 horas a $-70^{\circ}C$.

TRADUCCION "IN VITRO". (BIDIMENSIONAL).
UNA SEMANA DE INTOXICACION CON CCl_4 .

actina



Fig. 34 Autorradiografía que muestra el análisis bidimensional de las proteínas que incorporaron metionina ^{35}S y que se obtuvieron al traducir "in vitro" el RNA total de hepatocitos de rata con 1 semana de intoxicación con CCl_4 . El tiempo de exposición de la placa de rayos X fue de 24 horas a -70°C .

TRADUCCION "IN VITRO". (BIDIMENSIONAL).
TRES SEMANAS DE INTOXICACION CON CCl_4 .

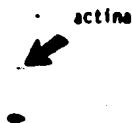


Fig. 35 Autorradiografía que muestra el análisis bidimensional de las proteínas que incorporaron metionina ^{35}S y que se obtuvieron al traducir "in vitro" el RNA total de hepatocitos de rata con 3 semanas de intoxicación con CCl_4 . El tiempo de exposición de la placa de rayos X fue de 24 horas a -70°C .

TRADUCCION "IN VITRO". (BIDIMENSIONAL).
CINCO SEMANAS DE INTOXICACION CON CCl_4 .

actina




Fig. 36 Autorradiografía que muestra el análisis bidimensional de las proteínas marcadas con metionina ^{35}S , obtenidas al traducir "in vitro" el RNA total de hepatocitos de rata con 5 semanas de intoxicación con CCl_4 . La placa de rayos X se expuso durante 24 horas a -70°C .

DISCUSION DE RESULTADOS.

Para lograr los objetivos planteados en este trabajo se dispuso de técnicas específicas en el campo de la Biología Molecular, ya que se realizaron ensayos de aislamiento de ácido ribonucleico (RNA) total de hepatocitos de rata, identificación del mismo mediante electroforesis e hibridaciones con el plásmido recombinante para actina de Drosophila melanogaster con la finalidad de localizar y cuantificar el RNAm (ácido ribonucleico mensajero) de ACTINA en este tipo celular. Asimismo se procedió a traducir "in vitro" el RNA total para analizar las proteínas sintetizadas. Las condiciones bajo las cuales se trabajó fueron durante el tratamiento con tetracloruro de carbono, con el objeto de producir cirrosis hepática, que se manifiesta con la aparición de tejido conectivo y regeneración nodular en el hígado aunque de manera no muy prominente a las 5 semanas de la intoxicación (R. Pérez Tamayo, 1983).

El primer aspecto a discutir son las variaciones de peso de las ratas que se sometieron al tratamiento con CCl₄, comparadas con los animales control, los cuales solamente fueron inyectados intraperitonealmente con el vehículo del agente tóxico, es decir con aceite mineral. Los resultados muestran claramente que si hay diferencia entre el lote control y el lote intoxicado, con respecto a los gramos aumentados durante cada semana del tratamiento; esta diferencia corresponde a que en el lote control se incrementa más el peso que en el lote intoxicado, o sea que la intoxicación afecta al crecimiento normal del animal, disminuyendo el incremento en el peso. Cabe señalar que dentro del período de tratamiento, entre la tercera y cuarta semana se nota que el aumento en gramos es más considerable con respecto a las semanas restantes, ya que entre la cuarta y quinta semana la variación disminuye; este fenómeno es observable tanto en el grupo control como en el intoxicado.

Sin embargo existen dentro de un mismo grupo de animales variaciones en el peso, confirmadas con la desviación estándar obtenida en cada caso, la cual es de considerarse. Esto se debe a que persisten variaciones individuales originadas por

múltiples factores, entre los cuales podemos mencionar los de origen genético y los del medio ambiente, así pues la respuesta al tetracloruro de carbono es variable como se ha reportado en algunos casos, donde después de un curso completo de 10 o 20 inyecciones de 0.2 ml de esta sustancia, algunas ratas muestran una mínima fibrosis o carecen de ella, mientras que otras tienen presencia de tejido conectivo en escasas zonas del hígado y otras ya presentan una cirrosis total (R. Pérez Tamayo, 1983).

Con respecto al aislamiento de hepatocitos, mediante la técnica de perfusión hepática, se puede señalar que durante las tres semanas de intoxicación, los hepatocitos se podían aislar con facilidad y con una cantidad de colagenasa normal, o sea la reportada, sin embargo a la quinta semana se presentaron dificultades ya que el hígado se encontraba en un estado fibroso en mayor proporción, por lo que se tenía que agregar más colagenasa a la solución de perfusión y este hecho traía como consecuencia la disminución de la viabilidad celular y el menor rendimiento en la obtención de células. Hay que señalar, que aunque no se tienen fotografías al respecto, las células a partir de la tercera semana ya manifestaban anormalidades morfológicas, como son la presencia de inclusiones lipídicas en el citoplasma, y a la quinta semana se pierde la forma redonda de la membrana citoplásmica de las células aisladas, transformándose en membranas muy irregulares, asimismo las células aumentan en tamaño, aún así se podían observar también hepatocitos normales dentro de esta población celular aislada. Este hecho nos sugiere que tal vez se estén aislando otras células además de los hepatocitos, o que en realidad los hepatocitos estén muy afectados por el curso de la intoxicación.

Si se estuviera aislando otro tipo celular durante la quinta semana del tratamiento, el candidato que se sugiere es el correspondiente a los miofibroblastos, por las evidencias de su aparición reportadas en la cirrosis, células que contienen un aparato contráctil significativo constituido entre otras proteínas de ACTINA, y que en los resultados obtenidos en este trabajo se podrían manifestar al analizar el incremento de RNAm de ACTINA durante la quinta semana del tratamiento con CCl_4 . Además al centrifugar la población celular obtenida después de perfundir el hígado hace más factible que estos miofibroblastos queden en la pastilla obtenida que en el sobrenadante, donde quedan suspendidas las células de menor tamaño, que corresponden a las células no parenquimatosas.

Durante las extracciones del RNA total de los hepatocitos, se presentaban bajos rendimientos y menores índices de pureza al trabajar con muestras de cinco semanas de intoxicación con CCl_4 y con hepatocitos de ratas hepatectomizadas y sacrificadas a las 24 horas. Sin embargo al hacer los geles desnaturizantes para transferir posteriormente a papel de nitrocelulosa, se colocaban cantidades de RNA equivalentes en todas las muestras analizadas dentro de un solo gel, como se pudo ver en los resultados. El análisis del RNA en geles no desnaturizantes puede comprobar la ausencia de degradación de este ácido nucleico al presentar claramente los marcadores ribosomales, asimismo el análisis del gel desnaturizante del RNA y transferido a papel de nitrocelulosa, manifiesta solamente manchas correspondientes a los marcadores ribosomales y no se distingue otra tinción en el gel.

El análisis electroforético del plásmido recombinante con la secuencia genómica para actina de *Drosophila melanogaster* fue satisfactorio, ya que se pueden localizar al digerir con la enzima de restricción BAM HI dos fragmentos que corresponden a uno de 4300 pares de bases, que es el plásmido pBR 322 linealizado y a uno de 2800 pares de bases que equivale al DNA genómico de ACTINA, es decir la secuencia de ACTINA está insertada en el sitio BAM HI del plásmido pBR 322, lo que concuerda con los datos reportados (Tobin, et al. 1980). Figura 15.

Al encontrarse en condiciones adecuadas el plásmido recombinante de ACTINA, se marcó radioactivamente con ^{32}P ($5'$ [α - ^{32}P] trifosfato de deoxicitidina) sin tener problemas al respecto y se procedió a hibridar los papeles de nitrocelulosa a los que se les había transferido el RNA desnaturizado de hepatocitos en diversas etapas del tratamiento.

La especificidad de la hibridación del DNA con la secuencia de ACTINA y el RNA fijado en el papel de nitrocelulosa (Método de "Northern Hybridization"), se pudo comprobar como se observa en la figura 17, ya que el "probe radioactivo" solo hibridó en un solo sitio con la muestra de RNA desnaturizado, no haciéndolo con el RNA sin desnaturizar ni con el RNA digerido con RNasa pancreática. Sin embargo al sobreexponer la autorradiografía, en el carril del RNA sin desnaturizar puede observarse una pequeña mancha autorradiográfica en la parte inferior del gel, no coincidiendo con el mismo sitio de la hibridación específica, es decir donde se localiza el RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata. La explicación para esta hibridación, corresponde a que el RNA no desnaturizado tiene un mayor corrimiento electroforético y por lo tanto la secuencia de ACTINA en el RNA fue loca

lizada por el "probe radioactivo" con mayor dificultad en una zona inferior a la mancha específica del RNA desnaturalizado.

La hibridación específica del "probe de ACTINA" con el RNA poli A⁺ produjo una mancha autorradiográfica muy clara y compacta, sin embargo se decidió trabajar con el RNA total ya que al observar la hibridación del RNA poli A⁻ se muestra una mancha autorradiográfica que representa el 90% de la intensidad producida por la mancha específica del RNA poli A⁺, localizada en la misma posición aunque de manera más dispersa, no tan compacta, este hecho indica que hay residuos considerables del RNAm de ACTINA en la fracción poli A⁻. Además las hibridaciones obtenidas con el RNA total no mostraron diferencias significativas respecto a la hibridación con el RNA poli A⁺ (figuras 18, 20).

El análisis de las hibridaciones específicas entre el RNA total desnaturalizado y el plásmido recombinante de ACTINA marcado radioactivamente, muestra una mancha autorradiográfica clara que corresponde al RNAm de ACTINA, localizada entre los marcadores ribosomales 28S y 18S, comparando la autorradiografía con el gel transferido y teñido con bromuro de etidio (figura 24), asimismo se obtuvo de manera aproximada el tamaño de este RNAm, señalándose de 2.8 kilopares de bases (figura 25).

A continuación se resumen los datos obtenidos del análisis densitométrico, que analiza las intensidades de las manchas autorradiográficas que representan al RNAm de ACTINA. Se anota el valor promedio de los resultados mostrados en cada etapa del tratamiento con CCl₄:

"ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LAS AUTORRADIÓGRAFÍAS DE NORTHERN HYBRIDIZATION COMPARANDO EL CONTENIDO DE RNA DE ACTINA EN HEPATOCITOS BAJO CONDICIONES DE TRATAMIENTO CON TETRACLORURO DE CARBONO"

| TIEMPO DE INTOXICACION | PATA HEPATECTOMIZADA | | | | |
|-------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------|
| | 24 HORAS | 1 SEM. | 3 SEM. | 5 SEM. | 24 HORAS |
| HEPATOCITOS CONTROL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| HEPATOCITOS INTOXICADOS | 1.84 7.20 6.9 | 4.1 6.1 2.11 | 7.9 1.6 1.1 | 2.1 1.1 2.9 | 19.1 |
| $\bar{x} \pm s$ | 5.1 ± 3.04 | 1.2 ± 2.0 | 0.0 ± 0.2 | 1.4 ± 1.0 | 19.4 |

* LAS UNIDADES DENSITOMÉTRICAS FUERON ARBITRARIAMENTE DETERMINADAS COMO 1 EN EL CASO DE LA MUESTRA CONTROL.

(LA PATA HEPATECTOMIZADA NO SE INTOXICÓ CON CCl₄)

Del análisis anterior se observa que el nivel de RNAm de ACTINA en hepatocitos al transcurrir la intoxicación con tetracloruro de carbono, varía de la siguiente manera; a las 24 horas con una sola dosis del agente tóxico, se incrementa considerablemente la cantidad del RNAm de ACTINA, aunque la respuesta no es constante en todos los animales, demostrado por la desviación estándar obtenida. A la primera semana de intoxicación el nivel se mantiene incrementado con respecto al control, pero disminuye un poco con respecto al valor del RNAm de ACTINA en la intoxicación con una sola dosis de CCl_4 a las 24 horas (intoxicación aguda), aunque también hay gran variación individual. A la tercera semana sucede un fenómeno curioso, ya que el nivel del RNAm de ACTINA disminuye llegando a alcanzar valores menores al del control o similares al del control. Por último a las cinco semanas se vuelve a incrementar el nivel del RNAm de ACTINA pero sin alcanzar niveles comparables a los obtenidos en la primera semana.

Como punto de referencia para comparar la síntesis incrementada de ACTINA, se analizó el nivel de RNAm de ACTINA de una rata hepatectomizada y sacrificada a las 24 horas, ya que se sabe que el estímulo es drástico hacia los hepatocitos y la respuesta para regenerar el tejido hepático, trae implícito el desarrollo de la mitosis en los hepatocitos, elevándose hasta 600 veces con respecto al nivel basal (Leffert et al., 1982), fenómeno que requiere de un aumento considerable del sistema de MICROFILAMENTOS constituidos por ACTINA. Este hecho pudo constatare ya que el nivel de RNAm de ACTINA obtenido en este ensayo es 19.4 veces mayor que el nivel de RNAm de ACTINA de una rata normal, y asimismo el nivel de la rata hepatectomizada es mayor comparado con el nivel obtenido para hepatocitos intoxicados agudamente con CCl_4 .

Con los resultados descritos anteriormente puede mencionarse que a medida que avanza la intoxicación con tetracloruro de carbono, el nivel de RNAm se va incrementando hasta alcanzar un nivel basal a las tres semanas. A la primera dosis la respuesta dentro de las 24 horas es drástica ya que el nivel de RNAm de ACTINA se eleva considerablemente, y este hecho se apoya con lo reportado en antecedentes, puesto que después de exponerse el hepatocito a un estímulo letal como es el tetracloruro de carbono, la célula parenquimatosa entra en un ciclo de proliferación o de MITOSIS que aproximadamente tarda entre 24 a 36 horas, lo que implica salir de la etapa de reposo (G_0) y entrar a una fase donde al replicarse tiene que desarrollar un SISTEMA abundante de MICROFILAMENTOS, esto es similar a lo que ocurre

en una hepatectomía parcial, sin embargo la respuesta es más marcada en la hepatectomía, ya que el daño es mayor. Cabe hacer notar que las células no parenquimatosas proliferan después que los hepatocitos (Leffert et al., 1982).

A pesar de que el primer ciclo replicativo dura entre 24 y 36 horas, éste no se presenta de manera sincrónica por lo que se justifica la variación en el nivel de RNAm de actina en diferentes individuos, ya que la respuesta al daño, no depende solamente del estímulo sino también está en función de las características del animal. Sin embargo al no suspender el agente tóxico en contacto con el hígado, la proliferación hepática es continua, y el hepatocito se sigue replicando lo que trae consigo el aumento en el sistema de microfilamentos de actina y por lo tanto del nivel de RNAm de actina, pero el hepatocito tiene un límite en su capacidad de dividirse, es decir no lo hace de manera indefinida, sino que la regeneración en enfermedades crónicas no es total, puesto que nunca llega a igualar se la velocidad mitótica de las células residuales a la velocidad de pérdida celular, este hecho se menciona puesto que a pesar de incrementarse el RNAm de actina durante la primera semana de intoxicación a las tres semanas se decremента, alcanzando valores por abajo o iguales a los obtenidos de hepatocitos sin intoxicar. Lo que es sorprendente es que a las cinco semanas de tratamiento se vuelve a incrementar el nivel del ácido ribonucleico de actina. La explicación que se propone se fundamenta en el hecho de que durante el aislamiento celular se obtienen dentro de la población de los hepatocitos, células morfológicamente normales y células con morfología distinta a la de los hepatocitos, que constituye un tipo celular de mayor tamaño e inclusiones citoplásmicas; posiblemente este tipo de células contribuyan al incremento del RNAm de actina ya que se propone que sean miofibroblastos, los cuales desarrollan un abundante sistema de microfilamentos y que se presentan durante la regeneración hepática en una cirrosis según datos reportados por Majno, Gabbiani, et al. en 1971.

La observación acerca de la aparición de células de mayor tamaño durante una regeneración hepática en una cirrosis también lo han reportado otros investigadores al aislar tres poblaciones de la fracción de células parenquimatosas mediante un gradiente de Percol y que se diferenciaban además de su tamaño en la densidad que reportaban, ya que dos poblaciones tenían similar diámetro (15 μ m) y la tercera era mayor (22 μ m). Las células de menor tamaño mostraban incrementado su retículo citoplásmico rugoso y glicógeno, mientras que el otro tipo celular presentaba vacuolas (Homma, et al. 1982). El hecho es de que existe la posibilidad de que la población de células aislada en la quinta semana de intoxicación con CCl_4 , no corresponde solamente a hepatocitos sino que está apareciendo otro

tipo celular que correspondería a los miofibroblastos de acuerdo a las observaciones mencionadas antes. El origen de los miofibroblastos se desconoce aunque se ha sugerido que provengan localmente de células perivasculares (Gabbiani et al., 1974; Lampert et al., 1974) y se desarrollan independientemente del agente etiológico que origina la cirrosis hepática o de la especie afectada (Majno, Gabbiani et al., 1971).

La hibridación de manchas ("Dot Blot Hybridization"), permitió constatar nuevamente la diferencia entre el RNAm de ACTINA de hepatocitos sin intoxicar y de hepatocitos intoxicados con una dosis de CCl_4 y obtenidos a las 24 horas, incrementándose el nivel del RNAm de ACTINA en estos últimos de acuerdo a los ensayos analizados con la técnica de "Northern Hybridization". En este experimento se analizaron dos muestras de RNA total (una de rata control y otra de rata intoxicada) que se diluyeron progresivamente, considerándose que las cantidades adecuadas para analizarse en este tipo de ensayo son las de 7 a 14 μg de RNA total, ya que menores cantidades no permiten que la mancha se defina bien en intensidad y por lo tanto su observación para su análisis no es tan adecuada.

La electroforesis unidimensional de las proteínas marcadas con ^{35}S -met sintetizadas "in vitro" a partir del RNA total de los hepatocitos, permite observar un aumento significativo en la síntesis general de proteínas a las 24 horas de intoxicación, incluyendo entre ellas a la ACTINA, inclusive el patrón de rata hepatectomizada es comparable al de la intoxicación aguda. Sin embargo las muestras de una y tres semanas no presentan cambios marcados en cuanto al incremento de ACTINA ni de otras proteínas, pero al analizar la muestra de cinco semanas se percibe que si se incrementa la ACTINA pero también otras proteínas están incrementadas en síntesis, comparadas con las proteínas sintetizadas por la muestra control (hepatocitos sin intoxicar), aún así este aumento en la síntesis proteica a las cinco semanas no es comparable con el obtenido durante la intoxicación aguda. La falta de concordancia entre la ACTINA sintetizada y su RNAm durante la intoxicación con CCl_4 , se puede adjudicar a que el sistema requiera de ácido ribonucleico de mejor definición, es decir RNA poli A^+ , en lugar de utilizar el RNA total, con el objeto de obtener una mejor síntesis proteica sin que interfiriera RNA de otra especie y se cuantificara así más confiablemente las proteínas sintetizadas "in vitro". Aún así los resultados obtenidos a las 24 horas y a las 5 semanas de intoxicación siguen sosteniendo lo postulado con anterioridad con lo que respecta a la explicación hecha sobre el incremento de RNAm de ACTINA en estos períodos, pero cabe señalar que pareciese ser que el aumento de RNAm de ACTINA no es específico sino que se incrementan diversos ácidos ribonucleicos mensajeros, puesto que se manifiesta al traducirlos "in

vitro". También existe la posibilidad de que no se encontraran los ácidos ribonucleicos mensajeros en condiciones óptimas para su traducción, al no utilizarse el RNA total inmediatamente después de su extracción y que por lo tanto no manifestara los valores reales de las proteínas sintetizadas.

El corrimiento electroforético en geles bidimensionales de las proteínas sintetizadas "in vitro" a partir del RNA total permite que se identifique de mejor manera la actina, ya que el electroenfoque pH 5-7 permite separar a las proteínas que tengan su punto isoeléctrico dentro de este rango, siendo una de estas proteínas la actina, cuya forma más ácida, alfa actina, tiene un punto isoeléctrico de 5.4; sin embargo existen la forma beta y la forma gamma que son más básicas, pero que se localizan adyacentes al analizarse en geles bidimensionales. La actina del hepatocito es beta y gamma actina no muscular (Vandekerckhove y Weber, -comunicación personal con Denk 1982-). Con estos datos se localizó la actina no muscular del hepatocito marcada con ^{35}S met, al obtenerse de la síntesis "in vitro" del RNA total de hepatocitos de diferentes períodos de intoxicación con tetracloruro de carbono. La comparación de las manchas autorradiográficas correspondientes a la actina, muestra que también se incrementa con respecto al control, la actina de hepatocitos intoxicados con una dosis de CCl_4 y que se obtuvieron a las 24 horas, así como en circunstancias de hepatectomía parcial, pero no es un aumento específico, sino que en realidad casi todas las proteínas se incrementan. El análisis de muestras de una y tres semanas, no muestran cambios significativos con respecto al control, pero nuevamente aumenta la intensidad de la mancha de actina durante la quinta semana de intoxicación, sin llegar a la intensidad de la mancha obtenida en el tratamiento agudo, pero también se observa un incremento en la intensidad de las manchas de otras proteínas, lo que confirma que el cambio no es específico para actina.

En trabajos anteriores (Reyes Romero, M.A. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Especialidad Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. 1984) se observa que al analizar el contenido de actina en hígado total de ratas durante un tratamiento de intoxicación crónica con CCl_4 , se manifiesta a la primer dosis de CCl_4 un incremento del 47%, existiendo una relación de isoformas beta/gamma del 60:40, similares a las que existen en hígados normales; esta relación no se mantiene conforme progresa la intoxicación con tetracloruro de carbono, ya que a pesar de mantenerse elevado el contenido de actina total de hígado, la relación de las

isoformas beta y gamma fue la siguiente: a la tercer semana la relación fue de 50:50 y al finalizar el esquema de siete semanas de tratamiento fue de 40:60 y 25:75 en algunos casos. Los cambios encontrados en la relación beta/gamma por un incremento de esta última conforme avanza la intoxicación, refleja la presencia de un tipo celular rico en esta isoforma proteica posiblemente con características de célula muscular lisa denominado MIOFIBROBLASTO y que se ha descrito en la cirrosis hepática. Así pues al comparar estos datos con los obtenidos en este trabajo, se señala la importancia de analizar bidimensionalmente la actina que se obtenga (ya sea directamente o mediante traducciones "in vitro" del RNAm respectivo), puesto que al ser la isoforma gamma un marcador más diferencial entre la actina de hepatocitos y la de miofibroblastos, puede ser una guía para poder concluir a que tipo celular se le atribuye el incremento de actina durante una intoxicación crónica con CCl_4 y a su vez determinar en qué etapa del tratamiento aparece este tipo celular. Sin embargo los resultados de este trabajo no diferencian muy bien las isoformas beta y gamma alteradas durante la intoxicación crónica y desgraciadamente no se continuó el período de tratamiento para observar si existía alguna diferencia más significativa. Tampoco los resultados que se refirieron anteriormente (Reyes Romero, M.A.) muestran el análisis de actina atribuible a hepatocitos solamente, sino que es analizado de hígado total, donde hay heterogeneidad celular. De esta manera y con el objeto de cerciorarse que en realidad se trabaja con una población homogénea de hepatocitos, se sugiere determinar marcadores específicos para estas células, tal como la albúmina y para diferenciar a los hepatocitos de los miofibroblastos se podía determinar un marcador específicos para los últimos como es la colágena, ya que desarrolla un extenso aparato contráctil del citoesqueleto este tipo celular, conteniendo abundante cantidad de colágena tipo III. Por lo tanto si se dispusiera de los apropiados plásmidos recombinantes para albúmina, colágena y actina, se podría hacer un estudio más completo y certero, con respecto a la distribución y localización del sistema de MICROFILAMENTOS durante una intoxicación crónica con tetracloruro de carbono que origina cirrosis hepática, asimismo se procuraría una mejor resolución durante los ensayos electroforéticos unidimensionales y bidimensionales.

CONCLUSIONES

- 1.- La metodología utilizada permitió aislar, identificar y cuantificar el ácido ribonucleico mensajero de ACTINA en hepatocitos de rata durante el curso de la intoxicación crónica con tetracloruro de carbono.
- 2.- El RNAm de ACTINA obtenido de hepatocitos de rata tiene aproximadamente 2.8 kilopares de bases.
- 3.- El tratamiento con tetracloruro de carbono durante cinco semanas produjo cirrosis hepática aunque de manera no muy prominente.
- 4.- Con una dosis de tetracloruro de carbono y a las 24 horas después de haberse administrado, las ratas incrementaron significativamente el contenido de RNAm de ACTINA en la población de células parenquimatosas o hepatocitos.
- 5.- A la semana del tratamiento, el nivel de RNAm de ACTINA se encuentra elevado, sin embargo disminuye con respecto a la intoxicación aguda (una dosis de CCl_4).
- 6.- En la tercera semana se alcanzan niveles normales o menores que el control (hepatocitos sin intoxicar) en cuanto a la cantidad de RNAm de ACTINA.
- 7.- Al finalizar el tratamiento de cinco semanas con CCl_4 el nivel de RNAm de ACTINA vuelve a incrementarse sin alcanzar los valores reportados en la primera semana.
- 8.- Se sospecha que la contribución de RNAm de ACTINA durante la última semana del tratamiento se deba a un tipo celular diferente a los hepatocitos, proponiéndose como candidatos apropiados a los miofibroblastos.
- 9.- El análisis electroforético de las proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de las muestras de RNA total de la población de células parenquimatosas, no fue muy convincente puesto que no se observan cambios cuantitativos de las proteínas de hepatocitos a la primera y tercera semana del tratamiento, aunque si prevalece el incremento significativo en la síntesis general proteica de hepatocitos en la intoxicación aguda y de menor forma a la quinta semana. Es decir no solamente se incrementa la ACTINA sino que en general se manifiesta en las proteínas restantes este incremento.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, et al. (1983). Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Arias, I., et al. (1982). The Liver; Biology and Pathobiology. Raven Press. New York.
- Bathal, P.S. (1972). Presence of Modified Fibroblasts in Cirrhotic Livers in Man. Pathology 4; 139-144.
- Becker, F.F. (1974). Regeneration. Chapter 4. The Liver; Normal and Abnormal Functions. Part A. F.F. Becker & Marcel Dekker, Inc. New York.
- Blouin, A., et al. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. J. Cell. Biol. 72; 441-455.
- Bonner, M. & Laskey R.A. (1974). A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels. Eur. J. Biochem, 46; 83-88.
- Brandon, D.L. (1976). The identification of myosin in rabbit hepatocytes. Eur. J. Biochem. 65; 139-146.
- Chafouleas, J.G., et al. (1984). Changes in Calmodulin and Its mRNA Accompany Reentry of Quiescent (Go) Cells into the Cell Cycle. Cell. Vol. 36; 73-81.
- Chirgwin, J.M., et al. (1979). Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. Biochemistry Vol. 18, No. 24; 5294-5299.
- Clarke, M. & Spudich, J.A. (1977). Nonmuscle Contractile Proteins. Ann. Rev. Biochem. 46; 797-822.

- Denk, H. & Franke, W.W. (1982). Cytoskeletal Filaments Chapter 5. The Liver; Biology and Pathobiology. Arias, I., et al. Raven Press. New York.
- Dodemont, H.J., et al. (1982). The Genes Coding for the Cytoskeletal Proteins Actin and Vimentin in Warm-Blooded-Vertebrates. EMBO J. 1: 167-171.
- Ehrinpreis, M.N., et al. (1980). Liver Proline Oxidase Activity and Collagen Synthesis in Rats with Cirrhosis Induced by Carbon Tetrachloride. Biochimica et Biophysica Acta, 629: 184-193.
- Elias, E., & Boyer, J.L. (1979). Mechanism of intra-hepatic cholestasis. In: Progress in Liver Diseases, Vol. VI, edited by H. Popper & F. Schaffner, pp. 457-470. Grune & Stratton. New York.
- Engel, J.E., et al. (1981). Isolation and Characterization of Human Actin Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 4674-4678.
- Fisher, M.M., & Phillips, M.J. (1979). Cytoskeleton of the hepatocyte. In: Progress in Liver Diseases, Vol. VI, edited by H. Popper and F. Shaffner. pp. 105-121. Grune & Stratton. New York.
- Flanagan, M.D. & Lin, S. (1980). Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. J. Biol. Chem. 255, 835-838.
- Franke, W.W., et al. (1979). Characterization of the intermediate-sized filaments in liver cells by immunofluorescence and electron microscopy. Biol. Cell., 34: 99-110.
- French, S.W. & Davies, P.L. (1975). Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes. Gastroenterology 68: 765-774.

- Ilene Raisfeld, (1974). Models of Liver Injury; The Effect of Toxins on the Liver. Chapter 9. The Liver; Normal and Abnormal Functions. Part A. F.F. Becker & Marcel Dekker, Inc. New York.
- Irle, C., et al. (1980). Contractility of Myofibroblasts During Experimental Liver Cirrhosis. J. Submicrosc. Cytol. 12; 209-217.
- Ivanetich, K.M., et al. (1984). Liver Injury and Regeneration. The Liver Annual/4. A series of critical surveys of the international literature. Arias. I.M., et al. Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam-New York-Oxford.
- Jefferson, D.M., et al. (1985). Effects of Dexamethasone on Albumin and Collagen Gene Expression in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes. Hepatology. Vol. 5, No. 1; 14-20.
- Kent G., et al. (1976). Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73; 3719-3722.
- Lampert, I.A., et al. (1974). Contractile protein changes in regenerating rat livers. Virchows Archiv. (Cell Pathol.), 15;351-355.
- Lane, B.P. (1974). Functional Analysis of the Liver. Chapter 1. The Liver; Normal and Abnormal Functions. Part A F.F. Becker & Marcel Dekker, Inc. New York.
- Leffert, H.L., et al. (1982). Hepatocyte Regeneration, Replication and Differentiation. Chapter 35. The Liver; Biology and Pathobiology. Arias, I., et al. Raven Press. New York.
- LeSturgeon, W.M. (1978). The occurrence of contractile proteins in nuclei and their possible functions. The Cell Nucleus. Vol. VI., Chromatin, edited by H. Busch, pp. 305-326. Academic Press. New York.

- French, S.W., et al. (1985). The Cytoskeleton of hepatocytes in Health and Disease. International Academy of Pathology United States-Canadian Division Long Course. "The Pathogenesis of Liver Diseases". Toronto, Ontario. Hepatology. Rapid Literature Review. Vol. 15. No. 3.
- Gabbiani, G. & Majno, G. (1972) Dupuytren's Contracture: Fibroblasts Contraction? Am. J. Pathol. 66: 131-145.
- Gabbiani, G., & Ryan, G.B. (1974). Development of a contractile apparatus in epithelial cells during epidermal and liver regeneration. J. Submicr. Cytol., 6; 143-157.
- Gabbiani, G., et al. (1975). Phalloidin induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. Lab. Invest. 33; 562-569.
- Gabbiani, G., et al. (1976). Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. Virchows Arch. B. 21, 133-145.
- Gordon, D.J., et al. (1977). Comparative biochemistry of nonmuscle actins. J. Biol. Chem., 252; 8300-8309.
- Grimaud, J.A. & Borojevic, R. (1977). Myofibroblasts in Hepatic Schistosomal Fibrosis. Experientia 33; 890-892.
- Ham, A.W. (1970). Tratado de Histología. Páncreas, hígado y vesícula biliar (cap. 25). Sexta edición. Ed. Interamericana, S.A.
- Homma S., et al. (1982). The morphological studies on characteristics of isolated parenchymal and non-parenchymal cells of the rat liver. J. Electron Microsc., 31; 389.
- Humphries, S.E., et al. (1981). There are Approximately 20 Actin Genes in the Human Genome. Nuc. Ac. Res. 9; 4895-4908.

- Lewin, B. (1983). Genes. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Majno G., et al. (1971). Contraction of granulation tissue "in vitro"; similarity to smooth muscle. Science. 173; 548-550.
- Mak, W. W-N., et al. (1980). Accumulation of Actin Microfilaments in Adult Rat Hepatocytes Cultured on Collagen Gel/Nylon Mesh. Canc. Res. 40; 4552-4564.
- Maniatis, T., et al. (1982). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- McCutchan, T.F., et al. (1984). Evolutionary Relatedness of Plasmodium Species as Determined by the Structure of DNA. Science, Vol. 225; 808-811.
- Meza, I., et al. (1983). Isolation and Characterization of Actin from E. histolytica. J. Biol. Chem. 258; 3936-3941.
- O'Farrell, P.H., (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 250, No. 10; 4007-4021.
- Oda, M., et al. (1974). Ultrastructure of bile canaliculi with special reference to the surface coat and the pericanalicular web. Lab. Invest., 31; 314-323.
- Pérez Tamayo, Ruy. (1983). Is Cirrhosis of the Liver Experimentally Produced by CCl_4 an Adequate Model of Human Cirrhosis? Hepatology, Vol. 3 No. 1, pp. 112-120.
- Popper Hans. (1982). Hepatocellular Degeneration and Death. Chapter 45. The Liver: Biology and Pathobiology. Arias, I., et al. Raven Press. New York.
- Rhoads, R.E. (1975). Ovalbumin Messenger Ribonucleic Acid. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 250, No. 20; 8088-8097.

- Rojkind, M., & Martínez Palomo, A. (1976). Increase in Type I and Type III Collagens in Human Alcoholic Liver Cirrhosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 539-543.
- Rojkind, Marcos (1982). The Extracellular Matrix. Chapter 32. The Liver; Biology and Pathobiology. Arias, I., et al. Raven Press. New York.
- Rojkind, M. & Kershenovich D. (1984). The extracellular matrix; fibrosis and cirrhosis. The Liver Annual/4. A series of critical surveys of the international literature. Arias, I., et al. Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam-New York- Oxford.
- Rosenberg, S., et al. (1981). Isolation and Characterization of Actin and Actin-binding Protein from Human Platelets. J. Cell. Biol. 91: 201-211.
- Ross, R., et al. (1970). Wound healing and collagen formation VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. J. Cell. Biol. 44: 645-654.
- Rudolph, R., et al. (1979). Contractility of Myofibroblasts in Chronic Alcoholic Cirrhosis. Gastroenterology. 76: 704-709.
- Ryan, G.B., et al. (1973). Myofibroblasts in an avascular fibrous tissue. Lab. Invest., 29: 197-206.
- Ryan, G.B., et al. (1974). Myofibroblasts in human granulation tissue. Hum. Pathol. 5: 55-67.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 77, No. 9: 5201-5205.
- Tobin, S.L., et al. (1980). Multiple Actin-Related Sequences in the Drosophila melanogaster Genome. Cell. Vol. 19: 121-131.
- Toh, B.H., et al. (1977). Actin-like contractile protein in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat. Pathology, 9: 187-194.

| | Página |
|--|--------|
| 14. Patrón de Absorbancia del RNA en cromatografía en columna oligo dT. Obtención de RNA poli A ⁺ . | 60 |
| 15. Análisis electroforético del plásmido recombinante con la secuencia genómica para ACTINA de <u>Drosophila melanogaster</u> . | 62 |
| 16. Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del probe radioactivo. (Nick Translation) | 64 |
| 17. Especificidad de la Hibridación entre el RNA total de hepatocito de rata y el probe radioactivo de ACTINA (Método de "Northern Blot Hybridization"). | 66 |
| 18. Hibridación del RNA poli A ⁺ y RNA poli A ⁻ con el probe de ACTINA radioactivo ("Northern Hybridization"). | 67 |
| 19. RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata con intoxicación aguda con CCl ₄ y de rata hepatectomizada ("Northern Hybridization"). | 68 |
| 20. RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata con una semana de intoxicación con CCl ₄ ("Northern Hybridization"). | 69 |
| 21. RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata con tres semanas de intoxicación con CCl ₄ ("Northern Hybridization"). | 70 |
| 22. RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata con cinco semanas de intoxicación con CCl ₄ ("Northern Hybridization"). | 71 |
| 23. RNAm de ACTINA de hepatocitos de rata durante el tratamiento de cinco semanas de intoxicación con CCl ₄ ("Northern Hybridization"). | 72 |
| 24. Localización del RNAm de ACTINA. Hibridación del RNA total de hepatocitos de rata con el probe radioactivo de ACTINA ("Northern Hybridization"). | 73 |

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y CUADROS.

| FIGURAS. | Página |
|--|--------|
| 1. Diagrama que esquematiza las estructuras del hígado. | 4 |
| 2. Ilustración de las principales superficies (dominio) de los hepatocitos en relación con los espacios perihepatocelulares. | 6 |
| 3. El Dogma Central de la Biología Molecular. | 30 |
| 4. El RNAm y los ribosomas en bacterias. | 31 |
| 5. Síntesis del RNAm en procariotes. | 32 |
| 6. Traducción del RNAm. | 34 |
| 7. Sitios de Reconocimiento de las RNA polimerasas II y III en eucariotes. | 35 |
| 8. Fibra de cromatina. | 36 |
| 9. Formación del precursor del RNAm. RNA poli A ⁺ . | 38 |
| 10. Procesamiento de los RNA mensajeros de procariontes y eucariotes para traducirse. | 40 |
| 11. Reacción de empalme del RNA. (RNA splicing). | 41 |
| 12. Análisis electroforético del RNA total extraído de hepatocitos de rata en condiciones no desnaturizantes. | 57 |
| 13. Análisis electroforético del RNA total extraído de hepatocitos de rata en condiciones desnaturizantes (glioxal-DMSO). | 59 |

- Trenchev, P., et al. (1974). Immunofluorescent tracing of smooth muscle contractile protein antigens in tissues other than smooth muscle. *Clin. Exp. Immunol.*, 16: 125-136.
- Vandenkerckhove, J. & Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammals. *J. Mol. Biol.* 126: 783-802.
- Van de Werve, G. (1980). Isolation and Characteristics of Hepatocytes. *Toxicology*, 18: 179-185.
- Wahl, G.M., et al. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 76, No. 8: 3683-3687.
- White B.A. y Carter Bancroft, F. (1982). Cytoplasmic Dot Hybridization. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 257, No. 15: 8569-8572.
- Zechel, K. (1981) Effects of formamide on the polymerization and depolymerization of muscle actin. *Eur. J. Biochem.* 119: 209-213.

| | Página |
|--|--------|
| 25. Gráfica para la determinación del número de kilobases del RNAm de ACTINA. | 74 |
| 26. Hibridación de Manchas de RNA total de hepatocitos de rata con el probe radioactivo de ACTINA ("Dot Blot Hybridization"). | 76 |
| 27. Gráfica del análisis densitométrico de la autorradiografía correspondiente a la hibridación de manchas de RNA total ("Dot Blot Hybridization"). | 77 |
| 28. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas obtenidas al traducir "in vitro" RNA total de hepatocitos de rata, con incorporación de ³⁵ S-met. | 78 |
| 29. Gel bidimensional de alfa actina obtenida de músculo de conejo, no se encuentra marcada con ³⁵ S-met. | 80 |
| 30. Autorradiografía del control negativo de la traducción "in vitro", sin RNA total de hepatocitos de rata (bidimensional). | 81 |
| 31. Autorradiografía del gel bidimensional con la traducción "in vitro" del RNA total de hepatocitos de rata sin intoxicar con CCl ₄ . | 82 |
| 32. Autorradiografía del gel bidimensional con la traducción "in vitro" del RNA total de hepatocitos de rata con intoxicación de una dosis de CCl ₄ (int. aguda). | 83 |
| 33. Autorradiografía del gel bidimensional con la traducción "in vitro" del RNA total de hepatocitos de rata hepatectomizada. | 84 |
| 34. Autorradiografía del gel bidimensional con la traducción "in vitro" del RNA total de hepatocitos de rata intoxicados durante una semana con CCl ₄ . | 85 |

| | Página |
|---|--------|
| 35. Autorradiografía del gel bidimensional con la traducción "in vitro" del RNA total de hepatocitos de rata intoxicados durante tres semanas con CCl ₄ . | 86 |
| 36. Autorradiografía del gel bidimensional con la traducción "in vitro" del RNA total de hepatocitos de rata intoxicados durante cinco semanas con CCl ₄ . | 87 |

TABLAS Y CUADROS.

| | |
|---|----|
| 1. Composición hepática en porcentaje del volumen del parénquima. | 8 |
| 2. Esquema de la composición hepática en porcentaje del volumen del parénquima. | 10 |
| 3. Población de moléculas de RNAm en una célula de mamífero. | 36 |
| 4. Análisis del incremento del peso de las ratas control e intoxicadas con tetracloruro de carbono durante el tratamiento de cinco semanas. | 55 |
| 5. Datos para graficar y localizar el RNAm de ACTINA obtenido al hibridar RNA total de hepatocitos de rata y el probe radioactivo de ACTINA. | 74 |
| 6. Análisis densitométrico de las autorradiografías obtenidas por el método de "Northern Hybridization" comparando el contenido de RNAm de ACTINA en hepatocitos bajo condiciones de tratamiento con tetracloruro de carbono. | 91 |