

24/15



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA Y DE TRANSPORTE DE CALCIO DE LA ATPasa(Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) DE LA MEMBRANA PLASMATICA DEL HEPATOMA AS-30D"

T E S I S

Que para obtener el Titulo de QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P r e s e n t a

MAURA CARDENAS GARCIA



México, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



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.

"CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA  
Y DE TRANSPORTE DE CALCIO DE LA ATPasa(Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)  
DE LA MEMBRANA PLASMATICA DEL HEPATOMA AS-30D"

## CONTENIDO

INDICE TEMATICO

INDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCION
2. OBJETIVO
3. HIPOTESIS
4. MATERIALES Y METODOS
5. RESULTADOS Y DISCUSION
6. CONCLUSIONES
7. BIBLIOGRAFIA

## INDICE TEMATICO

	ABREVIATURAS.....	1
	RESUMEN.....	3
1.	INTRODUCCION.....	6
A.	Calcio y proliferación celular.	
B.	Distribución de $Ca^{2+}$ .	
C.	Mecanismos de regulación de $Ca^{2+}$ .	
D.	ATPasa. ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ).	
2.	OBJETIVO.....	22
3.	HIPOTESIS.....	23
4.	MATERIALES Y METODOS.....	24
A.	Materiales.	
	Productos químicos.	
	Equipo.	
	Material biológico.	
B.	Métodos.	
	Mantenimiento de la línea tumoral.	
	Inducción de hígado en regeneración.	
	Obtención de membrana plasmática.	
	Determinación de actividades enzimáticas.	
	Determinación de transporte de $Ca^{2+}$ .	
5.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
A.	Caracterización de la membrana plasmática.	
B.	Caracterización de $Ca^{2+}$ de la ATPasa ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ).	
6.	CONCLUSIONES.....	72
7.	BIBLIOGRAFIA.....	74

## INDICE DE FIGURAS

1.	INTRODUCCION	
1.1	Modelo de membrana plasmática .....	8
1.2	Participación de $Ca^{2+}$ en el ciclo celular .....	10
1.3	Participación de $Ca^{2+}$ en la carcinogénesis .....	12
1.4	Mecanismos de regulación de $Ca^{2+}$ .....	18
1.5	Cinética de la ATPasa ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ) .....	20
1.6	Participación de $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ y ATP .....	21
4.	MATERIALES Y METODOS	
4.1	Micrografía de las células del Hepatoma AS-30D....	27
4.2	Obtención de membrana plasmática .....	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	
5.1	Esquema de hígado.....	42
5.2	Actividad de ATPasa de $Ca^{2+}$ .....	43
5.3	Porcentaje de proliferación de hepatocitos .....	45
5.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	48
5.5	Actividad de enzimas marcadoras.....	50
5.6	Efecto de pH .....	52
5.7	Efecto de la concentración de $Ca^{2+}$ con $Mg^{2+}$ .....	54
5.8	Efecto de la concentración de $Mg^{2+}$ con $Ca^{2+}$ .....	55
5.9	Efecto de la concentración de $Ca^{2+}$ sin $Mg^{2+}$ .....	57
5.10	Efecto de la concentración de $Mg^{2+}$ sin $Ca^{2+}$ .....	58
5.11	Efecto de la calmodulina .....	60
5.12	Efecto del pH .....	62
5.13	Curva contra tiempo .....	64
5.14	Efecto del vanadato .....	66
5.15	Recambio ATP $\rightarrow$ Pi.....	68
5.16	Cinética de la ATPasa ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ) .....	69

ABREVIATURAS

ADP	Adenosindifosfato
ASB	Albúmina de Suero Bovino
ATP	Adenosintrifosfato
ATPasa (Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> )	Adenosin Trifosfatasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> estimulada por Mg <sup>2+</sup> .
ATPasa (Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> )	Adenosin Trifosfatasa dependiente de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup>
AMP	Adenosin Monofosfato
A23187	Ionóforo para Ca <sup>2+</sup> (Gomperts et al., 1981; Ingaki, 1985)
Benzal	Diclorometilbenceno
cpm	Cuentas por minuto
D.E.	Desviación Estandar
DNA	Acido dexosiribonucléico
DTT	D,L, Ditiotreitól
EGTA	Etilenglicol-bis-( $\alpha$ -aminoetil éter del acido N,N' tetra acético
Hepatoma AS-30D	Hepatocarcinoma ascítico derivado del Hepatocarcinoma sólido 30D (Smith et al. 1970)
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperazina del ácido N'-2-etansulfónico
Kd	Kilodaltones
g	10 <sup>-6</sup> gramos
l	10 <sup>-6</sup> litros
mmoles/l	10 <sup>-3</sup> moles/litro
µmoles/l	10 <sup>-6</sup> moles/litro
N	Membrana plasmática de los hepatocitos normales

NADH	$\beta$ -Nicotinamida adenin dinucleótido
nmoles	$10^{-9}$ moles
prot.	Proteína
Pi	Fosfato inorgánico
PPO	2,5-difeniloxazol
R	Membrana plasmática de los hepatocitos en regeneración
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SW	"Swinging Bucket" rotor
T	Membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D
TCA	Acido Tricloro Acético
TEMED	N, N, N', N', Tetrametiletildiamina
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

Una de las funciones primordiales de la membrana plasmática es la regulación iónica y molecular del exterior hacia el interior y viceversa. Tomando en cuenta la importancia que tienen los gradientes iónicos en la regulación de una serie de procesos metabólicos, resulta interesante el estudio de los mismos (Bretschger, 1985). Por ejemplo, el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico de cualquier tipo celular interviene en una serie de procesos biológicos dentro de los cuales se encuentra la proliferación celular, ésto es interesante por las implicaciones que a este ión se le han dado en la carcinogénesis (Scarpa y Carafoli, 1978; Boynton et al., 1982; Jaffe, 1982). Por la intervención del  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos celulares, las células han desarrollado una serie de procesos para la regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , uno de los más importantes en la membrana plasmática para la regulación citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  es la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) (Martonosí, 1980; Kretsinger, 1981).

En nuestro laboratorio decidimos determinar las posibles diferencias en la regulación de la bomba de calcio asociada energéticamente a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células normales y tumorales mediante su caracterización; en este caso particular a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D y compararla con la ATPasa de la membrana plasmática de hepatocitos normales y hepatocitos en regeneración como modelos de células en interfase y división respectivamente. Mientras más se conozca sobre los procesos de regulación que poseen las células transformadas, se

entenderá el por qué de su comportamiento y con ello se facilitará su control.

En la presente tesis se muestra que la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, así como de los hepatocitos en regeneración, tienen una actividad hidrolítica menor ( $0.2-0.3 \mu\text{moles Pi/mg prot/min}$ ), con respecto a la de los hepatocitos normales ( $1-2 \mu\text{moles Pi/mg prot/min}$ ). Sin embargo, la capacidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, así como de los hepatocitos normales es muy semejante ( $1-2 \text{ nmoles Ca}^{2+}/\text{mg prot/min}$ ). Lo mismo ocurre con la síntesis de ATP catalizada por la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ), ya que la enzima de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D y la de los hepatocitos normales presentan una actividad de síntesis similar ( $25-30 \text{ nmoles ATP Pi/mg prot/min}$ ). La capacidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de la ATPasa de la membrana plasmática de los hepatocitos en regeneración es menor con respecto a la de los hepatocitos normales y las células del hepatoma AS-30D ( $0.1-0.5 \text{ nmoles Ca}^{2+}/\text{mg prot/min}$ ), así como su capacidad de síntesis ( $8-9 \text{ nmoles ATP Pi/mg prot/min}$ ).

El hecho de observar una actividad hidrolítica menor con respecto a la mostrada por las células normales y no observar cambios en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , ni en la síntesis de ATP catalizada por la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, hace pensar que la enzima tiene un desplazamiento en su ciclo catalítico hacia la síntesis de ATP y con ello un mejor acoplamiento energético que le permite transportar la misma concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}-$

Mg<sup>2+</sup>) de la membrana plasmática de los hepatocitos normales pero con un menor gasto de energía. El desplazamiento hacia la síntesis del ATP puede deberse a la existencia de variaciones en la afinidad por el ATP y/o en los dos sitios para Ca<sup>2+</sup> el de alta y el de baja afinidad, que den lugar a un mejor acoplamiento energético de la ATPasa (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D.

Las variaciones en la afinidad por ATP y/o Ca<sup>2+</sup> podrían deberse a cambios conformacionales en la enzima provocados por modificaciones en su microambiente, debidas a diferentes proteínas ó diferencias en las proteínas que la rodean, por ejemplo, la proteína inhibidora dependiente de Mg<sup>2+</sup> encontrado para la ATPasa (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) de la membrana plasmática de los hepatocitos normales ó las proteínas activadoras diferentes a la calmodulina encontrados para la ATPasa de hepatocitos normales (Lotersztajn y Pecker, 1982; Lotersztajn et al., 1985; Lotersztajn et al., 1981; Yamaguchi et al., 1988); o bien a variaciones en los lípidos de la membrana que interaccionan con la enzima, provocando cambios en la hidrofóbicidad de su microambiente (Lotersztajn et al., 1984; De Meis, 1989); o a alteraciones hormonales, ya que existen informes sobre la inhibición de la actividad hidrolítica y de transporte de calcio de la ATPasa de la membrana plasmática de hepatocitos normales en presencia de glucagon y proteína cinasa C (Lotersztajn et al., 1984; Smallwood et al., 1988; Frcic et al., 1984).

## 1.0 INTRODUCCION

La actividad química que se lleva a cabo en todas las células depende de manera importante de la compartimentalización que realizan las membranas. El contenido químico de las células es diferente al de su alrededor, gracias a la barrera selectiva creada por la membrana plasmática (Bretscher, 1985) (Figura 1.1).

Una de las funciones primordiales de la membrana plasmática, es la regulación iónica y molecular del exterior hacia el interior y viceversa.

Tomando en cuenta la importancia que tienen los gradientes iónicos en la regulación de una serie de eventos metabólicos, resulta interesante el estudio de los mismos (Bretscher, 1985). Por ejemplo, el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico de cualquier tipo celular interviene como efector de una señal intracelular a través de la cual se provoca una respuesta celular; a su vez, la regulación de su concentración intracelular es una respuesta a estímulos extracelulares (Rasmussen, 1981; Jaffe, 1981). Estos estímulos pueden estar dados por hormonas, neurotransmisores u otras moléculas que incrementan el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (Barritt, 1981; Murphy et al., 1980; Rubín, 1977).

El incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico activa una serie de mecanismos celulares, dentro de los cuales se encuentran los siguientes: motilidad celular (Goldman, 1976), comunicación intercelular (Lowenstein y Rose, 1978), proliferación celular (Ridgway et al., 1977; Whitfield et al., 1979), regulación enzimática (Kretsinger, 1976) y activaciones a nivel celular que llevan a una respuesta tisular como: contracción

muscular (Endo, 1977), neurotransmisión (Greengard, 1978), secreción hormonal (Rubin, 1974), activación de la ovulación (Gwatkin, 1977) y visión (Yoshikami, 1978). Se conocen más de 30 reacciones celulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y es probable que existan más (Racker, 1980).

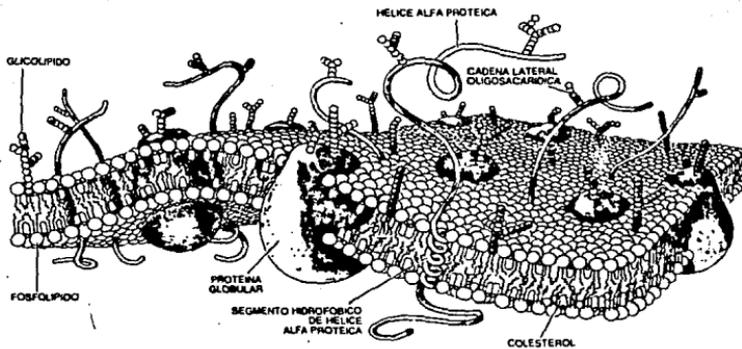


Figura 1.1

Modelo de la membrana plasmática propuesto por Bretscher en 1985.

## A. $\text{Ca}^{2+}$ y proliferación celular

Como se mencionó, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular interviene en la proliferación celular, esto lo hace junto con la calmodulina (proteína soluble receptora intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que media la mayoría de los eventos regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  en las células eucarióticas) al formar un complejo llamado calcicalmodulina (Brostrom y Wolff, 1981; Klee et al., 1983; Wallace y Cheung, 1979). Este complejo participa en una serie de eventos de la división celular (Figura 1.2), entre los que se pueden enumerar los siguientes: (Campbell, 1983)

- a. En la transición de  $G_1$  a S, de S a  $G_2$ , de  $G_2$  a Mitosis, de  $G_1$  a  $G_0$  y finalmente de  $G_2$  a fase de quiescencia.
- b. En las cuatro fases de la mitosis, fundamentalmente en la formación y ensamblamiento del huso acromático, incluyendo el movimiento de los cromosomas a lo largo de éste durante la metafase y anafase, para finalizar con el estrangulamiento de la célula.
- c. En la activación de las células, de la fase  $G_0$  y de la fase de quiescencia.
- d. En la diferenciación de las células, de la fase  $G_0$  a otras fases, en las cuales la célula no es estimulada para dividirse.



En 1982 Lionel Jaffe propuso una teoría en la cual involucra al  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico en el inicio de la carcinogénesis. Su teoría indica, que el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico, posiblemente dado por iniciadores que pueden ser moléculas extracelulares que aumentan la sensibilidad de proteínas receptoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , probablemente por metilación de las proteínas receptoras, o por promotores intracelulares que provocan la liberación de calcio de las pozas internas. El incremento citoplásmico de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca un aumento en la velocidad de los procesos celulares en los que interviene, así como de los procesos que regulan su concentración, lo cual favorece la respuesta a estímulos oncogénicos que dan lugar a alteraciones en la célula. Si estos estímulos continúan actuando, se llevará a cabo una selección de las células alteradas que finalmente llevara a la transformación neoplásica (Jaffe et al., 1982; Spriger et al., 1979; Armitage, 1981; Swierenga et al. 1980; Boynton et al. 1976) (Figura 1.3).

Se ha observado que las células transformadas durante su proliferación "in vitro", son menos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que las células no neoplásicas o preneoplásicas; aún, algunas células transformadas mueren al crecerlas en medios con niveles normales de  $\text{Ca}^{2+}$  y curiosamente poseen niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (Swierenga et al. 1980, Boynton, 1976; Criss y Kakiuchi, 1982). El hecho de observar que las células tumorales se desarrollen en medios con niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  menores a los requeridos por las células normales, y sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico se encuentren elevados con respecto a los niveles normales, indica que los mecanismos de regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  deben alterarse durante la transformación neoplásica, posiblemente por la intervención de el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Se han iniciado estudios sobre los mecanismos de regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células neoplásicas; por ejemplo, se ha encontrado que las células tumorales de roedores y de humanos producen una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  denominada oncomodulina, que aunque es estructuralmente distinta a la calmodulina se le asemeja funcionalmente (MacManus, 1980; Mac Manus, 1982). También se han estudiado en diferentes tipos de las células transformadas las interacciones anormales entre la membrana plasmática y el ión  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales se propone estén relacionadas con la proliferación celular, el control de crecimiento y la invasividad (Mac Manus, 1982).

## B. Distribución de $\text{Ca}^{2+}$

Los tejidos contienen un promedio de 400 a 500 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por Kg de tejido seco (Stout, M.A., 1985; Williamson et al., 1981). La mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  celular se fija e incorpora en sitios de unión aniónica de glucoproteínas, proteínas y fosfolípidos de la membrana plasmática, distribuido en dos compartimentos generales el intracelular y el extracelular. El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se encuentra unido a la superficie celular y el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular considera tanto al citosólico libre como al unido a diferentes ligandos, que pueden encontrarse en el citoplasma o en la superficie celular interna. La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a diferentes ligandos no se conoce con certeza, pero se cree que esté representada por el  $\text{Ca}^{2+}$  unido a proteínas como la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ), la calmodulina, o formando complejos con el citrato y fosfato, o dentro de los dos reservorios importantes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, la mitocondria y el retículo endoplásmico (Somlyo et al., 1985).

### C. Mecanismos de regulación de la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$

Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico son fundamentales en los procesos de regulación celular. A pesar de la gran diferencia de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (1 a 3 mM (mmoles/l)) y citoplásmico (0.1 a 0.2 M (moles/l)), que favorece el movimiento pasivo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior, su concentración citosólica se mantiene mediante varios procesos desarrollados por la célula (Carafoli y Crompton, 1978) (Figura 1.4).

Dentro de los procesos conocidos hasta ahora se encuentran los siguientes:

-Secuestro del  $\text{Ca}^{2+}$  asociado con la mitocondria dependiente de la concentración de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  celular total, (Backer et al., 1980; Somlyo et al., 1985; Famulski y Carafoli, 1982; Kleineke y Soling, 1985).

-Secuestro del  $\text{Ca}^{2+}$  asociado con el retículo endoplásmico con una gran afinidad y capacidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , (Carafoli y Crompton, 1978; Andia-Waldenbaugh et al., 1980; Dawson, 1982; Brattin et al., 1982; Famulski y Carafoli, 1984; Somlyo et al., 1985; Kitazawa, 1976; Moore, 1975).

-Regulación a nivel de la membrana plasmática. En este trabajo se emplea membrana plasmática, por lo que, a continuación se amplía la información sobre los procesos de regulación a nivel de la misma.

-La participación de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) con alta afinidad por el ión  $\text{Ca}^{2+}$  pero con una menor capacidad de transporte que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Gietzen et al., 1980). A la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) se le ha reconocido como un importante proceso a nivel de membrana plasmática mediante el cual muchas células mantienen sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (Martonosi, 1980).



#### D. ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )

Como se señaló, la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por  $\text{Mg}^{2+}$ , es uno de los procesos más importantes a nivel de la membrana plasmática mediante el cual células excitables y no excitables mantienen sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (Dipolo, 1978; Dipolo y Beauguë, 1979; Wuytack et al., 1981; Michaelis et al., 1983; Mas-Oliva et al., 1979; Reuter, 1974; Pershadsingh et al., 1980; Nellans, 1981).

Esta enzima ha sido estudiada en fracciones de la membrana plasmática o purificada a partir de diferentes tejidos normales (Rega y Garrahan, 1986; Schatzmann, 1981). La más estudiada es la enzima localizada en la membrana plasmática de eritrocito humano (Graf et al., 1982).

La figura 1.5 ilustra la secuencia de la cinética de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ , propuesta para la enzima de microsomas de hígado humano (Spamer et al., 1987). Muy similar a la cinética propuesta para la de eritrocito humano y la de sarcolema de músculo cardíaco, aplicable a las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática de otros tipos celulares, y aún para las células de la línea tumoral 745-PG4 (Debetto y Cantley, 1984).

La participación de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP varía en cada paso de la cinética de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ), en la figura 1.6 se muestra lo encontrado hasta ahora para la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de fantasmas de eritrocito humano, en la que se establecen dos conformaciones de la enzima llamadas  $E_1$  y  $E_2$ , las cuales presentan diferente afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ . La enzima posee un sitio de alta afinidad orientado hacia el interior del plano de la membrana y uno de baja afinidad orientado hacia el exterior (Graf et al., 1982).

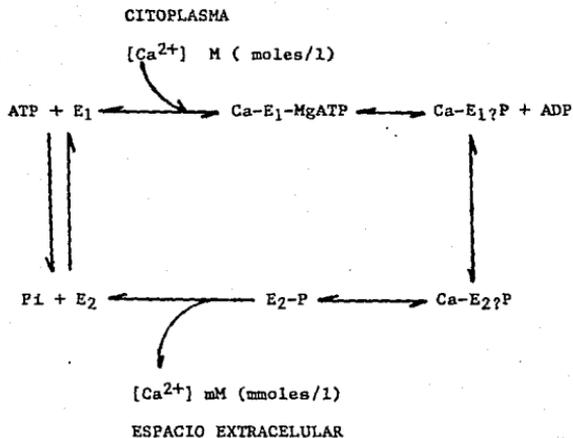


Figura 1.5

Secuencia de la cinética de la ATPasa ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ).  $E_1$  = Estado conformacional uno,  $E_2$  = Estado conformacional dos (Spamer et al., 1987).

Paso	Ca <sup>2+</sup>	ATP	Mg <sup>2+</sup>
$E_1 + ATP \rightleftharpoons E_1 \cdot P + ADP$	Esencial	Esencial con alta afinidad	Activador
$E_1 \cdot P \rightleftharpoons E_2 \cdot P$	No necesario	No necesario	Activador
$E_2 \cdot P \rightleftharpoons E_2 + Pi$	No necesario	Activador con baja afinidad	Esencial en el paso previo a la activación con ATP.
$E_2 \rightleftharpoons E_1$	No necesario	Activador con baja afinidad?	Activador?

Figura 1.6

Intervención de ATP, Ca<sup>2+</sup>, y Mg<sup>2+</sup> en cada paso cinético de la ATPasa (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>). E<sub>1</sub> = Estado conformacional uno, E<sub>2</sub> = Estado conformacional dos, (Graf et al., 1982).

## 2.0 OBJETIVO

Con base en lo anterior y en la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en el metabolismo en general, especialmente por estar involucrado en la proliferación celular y en la carcinogénesis, resulta interesante el estudio de los mecanismos que regulan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células transformadas. Por lo que el objetivo de esta tesis fue determinar posibles diferencias entre la regulación de la bomba de calcio asociada energéticamente a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ), contenida en la membrana plasmática de células transformadas, en este caso en particular a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de las células del hepatoma AS-30D. Como modelo de comparación se empleó la enzima de la membrana plasmática de los hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración. La utilización del modelo de los hepatocitos en regeneración constituye un sistema de células en división.

### 3.0 HIPOTESIS

Por los antecedentes mencionados en la introducción, sobre el control del  $\text{Ca}^{2+}$  presente en las células neoplásicas en comparación con la mayoría de las células normales, el estudio de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos normales nos informara sobre las diferencias de modulación entre la enzima de las células transformadas y la de las células normales, por lo que se espera que las características cinéticas de la ATPasa de la membrana plasmática del hepatoma AS-30D, sean diferentes a las de la ATPasa de la membrana plasmática de los hepatocitos normales.

#### 4.0 MATERIALES Y METODOS

##### A. Material

##### Productos Químicos:

[ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]CaCl<sub>2</sub> y [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, fueron adquiridos de Biomedicals, Inc. (Boston, Mass. U.S.A.)

La calmodulina fue obtenida a partir de testículos de toro mediante modificaciones a la técnica establecida por Gopalakrishna que emplea una columna de afinidad de fenil sefarosa (Gopalakrishna y Anderson, 1982).

Las proteínas marcadoras de masa molecular anhidrasa carbónica 29 Kd, ovoalbúmina 45 Kd, albúmina de suero bovino 66 Kd, fosforilasa b 97 Kd,  $\beta$ -galactosidasa 116 Kd y miosina 205 Kd; SDS, N,N, metil,bis-acrilamida fueron adquiridos de Bio-Rad (New York, N.H. U.S.A.).

La ouabaina, sacarosa, TEMED, triton X-100, persulfato de amonio, tris-base, glicilglicina, EGTA, ácido málico, imidasol, ASE, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Na-HEPES, CaCl<sub>2</sub>, ATP, 5'AMP, KCN, ác. succínico, citocromo C, elon, reactivo de Folin Ciocalteu's, benzal y A23187, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.).

La glicerina, KCl, heptamolibdato de amonio, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, AgNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fueron adquiridos de Merck México, S.A. (Naucalpan, Edo. de México. MEXICO).

El HCl, NaOH, formaldehído, NaCl, m-bisulfito de sodio, cloroformo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O,  $\beta$ -mercaptoetanol, Glutaraldehído y tartrato de sodio fueron adquiridos de J.T. Baker, S.A. de C.V. (México, D.F. MEXICO)

Los filtros con poro de 0.45 de diámetro fueron adquiridos de Millipore Corp. (Bedford, MA. U.S.A.).

Equipo.

Las centrifugas empleadas fueron las siguientes: centrifuga L8-55M Beckman y centrifuga RC2-B Sorvall.

+

Los rotores empleados fueron los siguientes: rotor SW 27 Ti Beckman, rotor SW 40Ti Beckman, rotor 60Ti Beckman y rotor SS 34 Sorvall.

Todas las lecturas espectrofotométricas fueron realizadas en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II.

Los corrimientos electroforéticos se efectuaron en una cámara para electroforesis Multiphor LKB Multitemp 2209, con fuente de poder 2197 LKB Bromma.

El portafiltros empleado consistió en un sistema de ultrafiltración Millipore de 10 posiciones para filtros de 2 centímetros de diámetro.

El contador de centelleo líquido empleado fue un Tri-Carb Modelo 4530 Packard.

El homogeneizador fue el Ultraturrax Labasco y el homogeneizador vidrio-teflón fue marca Wheaton.

La centrifuga clinica empleada fue una Dynac Clay, Adams, Bacton y Dickenson Co.

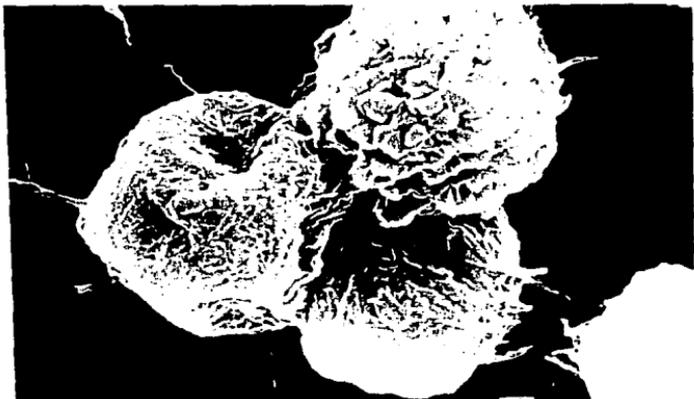
El baño a temperatura constante de incubación fue un Tecam.

Material Biológico.

La línea celular del hepatoma AS-30D (Figura 4.1) empleada en este trabajo, fue inducida originalmente con 3-metil-4-dimetil azobenceno y donada a nuestro laboratorio por el Dr. Antonio Villalobo de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá (Smith, 1970; Church et al., 1988; Vercesi et al., 1988; Fiskum y Pease, 1984; Fiskum y Pease, 1986).

Para inducir la regeneración del hígado y obtener el hígado normal se emplearon ratas de la cepa Wistar macho con un peso entre 200 y 300 g.

a)



b)

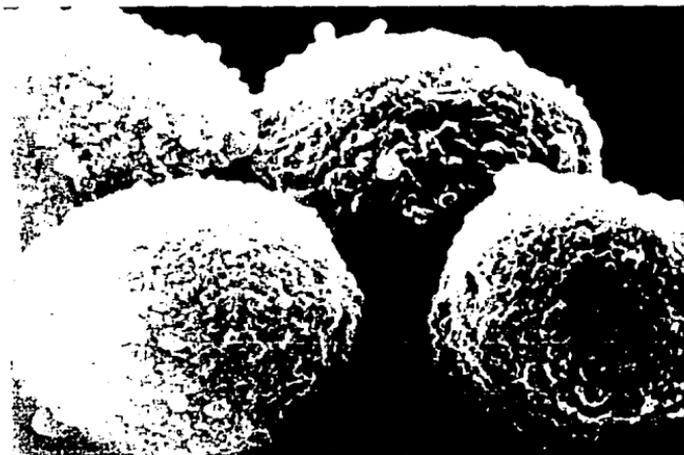


Figura 4.1

(a) Micrografía electrónica de las células del Hepatoma AS-30D, donada por el Dr. A. Osornio del Depto. de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología. Microscopio electrónico de barrido 4 500 X.

(b) Micrografía electrónica de hepatocitos normales, donada por el Dr. A. Cárabez del Instituto de Fisiología Celular. Microscopio electrónico de barrido 5 500 X.

## B. Métodos

### Mantenimiento de la línea tumoral

Las células del hepatoma AS-30D se desarrollaron en el líquido de ascitis de ratas de la cepa Wistar macho de 200 a 300 g mediante la inoculación de aproximadamente  $3 \times 10^7$  células en la cavidad peritoneal de la rata (Cheeseman et al., 1988). 80 ml de líquido de ascitis con una concentración de  $3 \times 10^7$  células/ml se obtiene en aproximadamente 7 días.

### Inducción de hígado en regeneración

Para inducir la regeneración del hígado, se realizaron hepatectomías parciales a 4 ó 6 ratas Wistar macho de 200 a 300 g. Para la realización de las hepatectomías, las ratas fueron anestesiadas con éter, el instrumental (tijeras, bisturí, pinzas, agujas e hilo seda); se lavó previamente con benzal. La rata anestesiada se sujetó a la mesa de operación, se le lavó perfectamente el abdomen y se le hizo una incisión a la altura del hígado, se le extirpó el lóbulo izquierdo del hígado y se suturó perfectamente. La fracción de hígado en regeneración se obtuvo 48 h después de la hepatectomía.

### Ailamiento de la fracción enriquecida de la membrana plasmática (Figura 4.2)

Se obtuvo la fracción enriquecida de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, de los hepatocitos en regeneración y de los hepatocitos normales, empleando un método desarrollado en el laboratorio basado en técnicas ya establecidas, que emplean centrifugación diferencial y gradientes discontinuos de sacarosa (Brown et al., 1976; Neville, 1968; Wisher y Evans,

1975; Touster y Aronson, 1970). El aislamiento de la fracción enriquecida de la membrana plasmática, se inicia con la obtención de un homogeneizado crudo, el cual se obtiene de la siguiente manera:

Para la obtención del homogeneizado crudo de las células del hepatoma AS-30D, es necesario lavar las células ya que se encuentran en líquido de ascitis. El lavado se realiza de 4 a 6 veces resuspendiendo 80 ml de líquido de ascitis en 50 ml cada vez, de una solución que contiene 150 mM (mmoles/l) de NaCl, 5 mM (mmoles/l) de KCl y 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 y centrifugando a 1,000 rpm durante 4 min en un rotor SS 34. La pastilla final se resuspende en 5 ml de una solución que contiene 150 mM (mmoles/l) de KCl, 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 y se homogeneiza 8 segundos en posición 10 en un homogeneizador Ultraturrax, la fracción obtenida se denomina HOMOGENEIZADO CRUDO.

En el caso de hígado normal o en regeneración el homogeneizado crudo se obtiene cortando finamente el hígado o el lóbulo regenerado con tijeras; los trozos de hígado se resuspenden en 50 ml de una solución que contiene 150 mM (mmoles/l) de KCl y 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0, se homogeneiza 15 segundos en posición 10 en un homogeneizador Ultraturrax, para posteriormente homogeneizarse con 6 golpes en un homogeneizador de vidrio teflón, la fracción obtenida se denomina HOMOGENEIZADO CRUDO.

A partir de este paso se sigue el mismo procedimiento con el homogeneizado crudo de cualquiera de los tres tipos celulares.

El HOMOGENEIZADO CRUDO se centrifuga por 15 min a 2,000 x g (4,000 rpm para el rotor SS 34), la pastilla se resuspende en 10 ml de una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0, se

añade sacarosa hasta obtener una solución al 47 % (p/p). La solución anterior se coloca en el fondo de 4 a 6 tubos y se cubre con igual volumen de soluciones de sacarosa al 44 % y 42.3 % (sacarosa en una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 p/p). Se centrifuga durante 1 h a 150,000 x g (27,000 rpm para el rotor SW 27 Ti).

La FRACCION CRUDA DE LA MEMBRANA PLASMATICA migra a la parte superior de la solución al 42.3 %. Esta fracción se resuspende en 5 ml de una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 y se centrifuga a 40,000 x g durante 15 min (20,000 rpm para el rotor 60 Ti ó 19,000 rpm para el 45 Ti). La pastilla obtenida se resuspende en 15 ml de una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 y se homogeneiza 8 segundos en posición 10 en un homogeneizador Ultraturrax. El homogeneizado obtenido se coloca sobre una serie de gradientes discontinuos de sacarosa en una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 en una concentración al 40, 34 y 32 por ciento p/p. Se centrifuga a 300,000 x g durante 2 h (40,000 rpm para el rotor SW40 Ti).

La FRACCION LIGERA DE LA MEMBRANA PLASMATICA migra a la parte superior de la solución de sacarosa al 32 %, se colecta y resuspende en 5 ml de una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl pH 8.0 para ser centrifugada a 150,000 x g durante 30 min (38,000 rpm para el rotor 60 Ti). La pastilla se resuspende en el menor volumen de una solución de 5 mM (mmoles/l) de Tris-HCl, se toman alícuotas de 500 l cada una y se congelan en nitrógeno líquido, se toma una alícuota de 50 l para determinar proteínas.

### Determinación de proteínas

El contenido de proteína se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Lowry de la siguiente manera: a 5, 10 ó 20  $\mu$ l de la fracción ligera de la membrana plasmática, de la fracción cruda de la membrana plasmática ó de el homogeneizado crudo; ó 25, 50, 75 ó 100  $\mu$ l de una solución de albúmina de suero bovino de 1 mg/ml; en un volumen final de 200  $\mu$ l, se les añade 1 ml de la solución 4 constituida por 50 ml de la solución 1 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 mg y NaOH 2g en  $\text{H}_2\text{O}$  cbp 100 ml), 1 ml de la solución 2 (1 mg de tartrato de sodio en  $\text{H}_2\text{O}$  cbp 100 ml) y 1 ml de la solución 3 ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.5g en  $\text{H}_2\text{O}$  cbp 100 ml). Se incuba a 37°C durante 25 min, se adicionan 100  $\mu$ l de reactivo de Folin:agua (1:1) y se incuba nuevamente a 37°C durante 20 min. Transcurrida esta incubación se leen a 660 nm contra un blanco que contiene 100  $\mu$ l de agua y 1 ml de la solución 4 incubado de igual manera que las muestras y la curva patrón (Lowry et al., 1951).

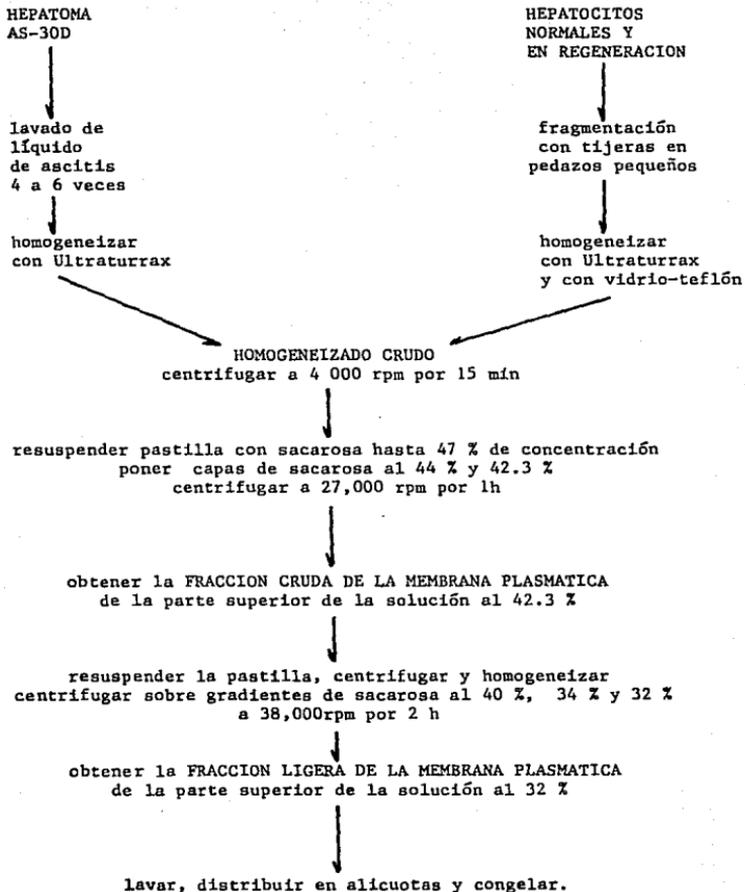


Figura 4.2

Diagrama de obtención de la la membrana plasmática.

### Electroforesis

Se realizó un corrimiento electroforético del homogeneizado crudo, la fracción cruda y la fracción ligera de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, de los hepatocitos en regeneración y de los hepatocitos normales, en un gel horizontal de poliacrilamida al 8 % en presencia de SDS, de acuerdo al método de Laemmli. Para cada caso se emplearon, 60 g de proteína (homogenado crudo, fracción cruda o fracción ligera de la membrana plasmática), previamente digerida en una solución de Tris-HCl 2 M (moles/l) pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol al 10 %, glicerol al 20 %, SDS al 4 % y azul de bromofenol al 0.5 % en un volumen final de 60 l (Laemmli, 1970).

Para hacer evidentes las proteínas presentes en el gel obtenido, éste se tiñó con plata de acuerdo al método de Oakley el cual emplea como solución fijadora metanol al 50 % y ácido acético al 10 %, como solución de tinción DTT al 0.5 % y  $\text{AgNO}_3$  al 0.1 %, como baño de paro ácido cítrico 2.3 M (moles/l) y como solución reveladora carbonato de sodio al 6 % con 50 l de formaldehído al 37 % (Oakley et al., 1980)

### Determinación de actividades enzimáticas

#### ATPasa (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)

La actividad hidrolítica de la ATPasa (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) fue determinada mediante modificaciones a la técnica descrita por Post. La reacción se inicia adicionando 50 g de proteína (fracción ligera de la membrana plasmática u homogeneizado crudo) a la mezcla de reacción (30 mM (mmoles/l) de Imidazol-Glicilglicina pH 7.6, 4 mM (mmoles/l) de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM (mmoles/l) de NaCl, 25 mM (mmoles/l) de KCl, 4.5 mM (mmoles/l) de ATP, 5 mM (mmoles/l) de azida de sodio, con o sin 0.5 mM (mmoles/l) de Ouabaina) en un volumen final de 400 l. Se mezcla y se incuba a 37 °C durante 15 min. La reacción se detiene adicionando 100 l de TCA al 30 %. Se centrifuga y se toman 300 l del sobrenadante para la determinación de Pi. Finalmente la actividad se expresa en nmolesPi/mg prot/min (Post, 1967).

#### 5'Nucleotidasa.

La actividad hidrolítica de la 5'nucleotidasa fue determinada según la técnica descrita por Evans. La reacción se inicia adicionando 50 g de proteína (fracción de la membrana plasmática u homogeneizado crudo), a la mezcla de reacción (100 mM (mmoles/l) de Glicina-NaOH pH 8.5, 10 mM (mmoles/l) de MgCl<sub>2</sub> y 2.5 mM (mmoles/l) de 5'AMP), en un volumen final de 500 l, se mezcla y se incuba a 37°C durante 15 min. La reacción se detiene mediante la adición de 100 l de TCA al 30%. Se centrifuga y se toman 300 l del sobrenadante para la determinación de Pi. Finalmente la actividad se expresa en nmoles Pi/mg prot/min (Evans, 1973; Evans, 1980).

### ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ).

La actividad hidrolítica de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) fue determinada según modificaciones a la técnica descrita por Mas-Oliva. La reacción se inicia adicionando 50 g de proteína (fracción de la membrana plasmática u homogeneizado crudo), a la mezcla de reacción (50 mM (mmoles/l) de Tris-Malato pH 7.4, 10 mM (mmoles/l) de EGTA, 6 mM (mmoles/l) de ATP, concentraciones variables de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  para dar de  $10^{-11}$  a  $10^{-2}$  M (moles/l) de  $\text{CaCl}_2$  libre y de  $10^{-11}$  a  $10^{-2}$  M (moles/l) de  $\text{MgCl}_2$  libre) en un volumen final de 300 l, se mezcla y se incuba a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min. La reacción se detiene mediante la adición de 100 l de TCA al 30 %. Se centrifuga y se toma una alícuota de 200 l para determinar concentración de Pi. Finalmente la actividad se expresa en nmoles Pi/ mg prot/ min (Mas-Oliva et al., 1979). Las concentraciones libres de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  fueron calculadas empleando un programa para computadora (Mas-Oliva, 1978).

En todos los casos el Pi fue determinado colorimétricamente de acuerdo al método descrito por Fiske y Subbarow que emplea ácido-1-amino-2-naftol-4-sulfónico, sulfito de sodio y m-bisulfito de sodio (Fiske y Subbarow, 1925).

La actividad de síntesis de ATP, catalizada por la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ), fue determinada según modificaciones a la técnica descrita por Mas-Oliva. La reacción se inicia mediante la adición de 100 g de proteína (fracción ligera de la membrana plasmática o de el homogeneizado crudo), a la mezcla de reacción (50 mM (mmoles/l) de tris-malato pH 7.4, 10 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 6mM (mmoles/l) de ATP, 0.2 mM (mmoles/l) de ADP, 4 mM (mmoles/l) de Pi-tris ( $^{32}\text{P}$  30 x  $10^3$  cpm por nmoles de Pi), 2 mM (mmoles/l) de

EGTA, 10  $\mu$ l de tritón-X100 al 10 % y concentraciones variables de  $\text{CaCl}_2$  para dar 0.02, 0.2, 1, 2, 3, 4 y 6 mM (nmoles/l) de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en un volumen final de 200  $\mu$ l, se mezclan y se incuban a 37  $^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. La reacción se detiene mediante la adición de 50  $\mu$ l de TCA al 30 %. Se centrifuga y se toman 200  $\mu$ l del sobrenadante; de esta alícuota se extrae el [ $^{32}\text{P}$ ] Pi incorporado en ATP extrayendo el [ $^{32}\text{P}$ ] en exceso con solventes orgánicos, de la siguiente manera: a la alícuota de 200  $\mu$ l se le adiciona 1 ml de una solución 40 mM (nmoles/l) de molibdato de amonio en HCl 1N, 30  $\mu$ l de una solución 100 mM (nmoles/l) de Pi-tris, 50  $\mu$ l de acetona y 1 ml de acetato de butilo. Se agita 30 segundos, se separan las dos fases por centrifugación (15 segundos a 3 500 rpm) y se elimina la fase orgánica, se repite la extracción 5 veces. Al finalizar las extracciones se toman alícuotas de 300  $\mu$ l de la fase acuosa y se colocan en viales con 5 ml de agua. Las cpm son dadas por un contador de centelleo líquido. Finalmente se calcula la actividad y se expresa en nmoles  $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{Pi}/\text{mg prot}/\text{min}$  (Mas-Oliva, 1985).

#### Lactato deshidrogenasa.

La actividad hidrolítica de la lactato deshidrogenasa se determinó empleando un reactivo para diagnóstico clínico prueba UV optimizada, adquirido de Diagnostica Merck México, S.A. Y se realizó de la siguiente manera: a 100  $\mu$ l de proteína (1 g de proteína/ l) (fracción ligera de la membrana plasmática u homogeneizado crudo) se adicionaron 3 ml de una solución 60 mM (nmoles/l) de  $\text{NADH}_2$  y 200 mM (nmoles/l) de piruvato de sodio en amortiguador de fosfatos 15 M (moles/l) pH 7.5, se mezclan y se

leen a 37°C, las variaciones de absorción de NADH a 365 nm a 1, 2 y 3 min. La actividad final se expresa en nmoles NADH /mg prot /min (Schneider y Lehmann, 1967)

#### Succinato deshidrogenasa.

La actividad hidrolítica de la succinato deshidrogenasa fue determinada mediante los cambios espectrofotométricos de Extinción a 550 nm según la técnica descrita por Cooperstein, de la siguiente manera: a la mezcla de reacción que contiene 45.5 M (moles/l) de amortiguador de fosfatos pH 7.4 y 45.5 mg/ml de ASB, se le adicionaron 50 g de proteína (fracción ligera de la membrana plasmática u homogeneizado crudo). Se lleva a un volumen final de 200 l con agua, se mezcla y se incuba a 37°C durante 10 min. A continuación se adicionan 680 l de una mezcla compuesta por 1.5 M (moles/l) de KCN y 7.4 M (moles/l) de succinato de sodio, se mezcla y se incuba en hielo durante 2 min. Pasado este tiempo se adicionaron 200 l de una solución de 5 mg/ml de citocromo C, tomando el tiempo al momento de la adición y se leen las diferentes Extinciones cada 30 segundos a 550 nm. La actividad se expresa como nmoles succinato/mg prot/min (Cooperstein y Lazarow 1951).

#### Citocromo oxidasa.

La actividad hidrolítica de la citocromo oxidasa fue determinada mediante los cambios espectrofotométricos de Extinción a 550 nm según una modificación a la técnica descrita por Cooperstein de la siguiente manera: se mezclan 8 mg de citocromo C en 30 ml en una solución de 30 M (moles/l) de amortiguador de

fosfatos pH 7.4. Se adicionan 100 l de una solución recién preparada de 1.2 M (moles/l) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  y se mezcla vigorosamente durante 2 min para la obtención de citocromo C reducido. De la solución anterior se colocaron 3 ml en una cubeta para espectrofotómetro y se le adicionaron 100 g de proteína (fracción ligera de la membrana plasmática u homogeneizado crudo). Se mezcla y se leen los cambios de Extinción a 550 nm al minuto y a los 5 min. Finalmente se adicionaron 10 l de una solución saturada de  $(\text{Fe}(\text{CN})_6)$  para completar la oxidación del citocromo C y se lee nuevamente. La actividad se expresa en nmoles citocromo C/mg prot/min (Cooperstein y Lazarow, 1951).

### Determinación del transporte de $\text{Ca}^{2+}$

El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó de acuerdo a técnicas establecidas que emplean  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , de la siguiente manera: a la mezcla de reacción modificada, de la establecida por Fabiato, que contiene 20 mM (mmoles/l) de HEPES pH 6.6, 1 mM (mmoles/l) de EGTA, 0.82 mM (mmoles/l) de  $\text{CaCl}_2$  ( $^{45}\text{Ca}$ , 1 nmoles  $\text{Ca}^{2+}/10^6$  cpm), 5 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$  80 mM (mmoles/l) de KCl, se le adicionan 400 g de proteína (homogeneizado crudo, fracción cruda o fracción ligera de la membrana plasmática), en un volumen final de 2 ml, se mezcla y se incuba a 37°C por 5 min. Pasado este tiempo se inicia la reacción con la adición de 3 mM (mmoles/l) de ATP (concentración final), se mezcla y se incuba durante 1, 5 y 10 min.

Se toman alícuotas de 450 l a cada tiempo. Después de tomada la alícuota de 10 min se adiciona A23187 en una concentración final de 5 M (moles/l), (A23187 ionoforo para calcio Gomperts et al., 1981; Ingaki, 1985); se incuba a 37°C durante 5 min. Pasado este tiempo se toma una alícuota de 450 l.

Cada una de las alícuotas tomadas se filtran a través de un filtro con poro de 0.45 de diámetro: los filtros son prehidratados 30 min en una solución de 250 mM (mmoles/l) de KCl, los filtros se lavan para eliminar el  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en exceso con 15 ó 20 ml de una solución que contiene 250 mM (mmoles/l) de sacarosa y 40 mM (mmoles/l) de KCl. Finalmente los filtros se secan al vacío, y cada uno se coloca en un vial que contiene 5 ml de líquido de centelleo (xileno, tritn X-100, alcohol etílico, etilen glicol y PPO), las cpm son dadas por un contador de centelleo líquido. Finalmente se calcula la actividad y se expresa en nmoles  $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$

prot/min (Chan y Junger, 1983; Kraus Friedmann et al., 1982;  
Inesi, G., 1985; Bygrave, 1978; Fabiato y Fabiato, 1978).

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Desde hace algunos años se han comparado fracciones de la membrana plasmática de diferentes hepatomas con la membrana plasmática de hepatocitos normales y se han encontrado variaciones en el contenido de glucoproteínas, glucolípidos, degradación de glucoproteínas, fluidez de membrana y en actividad enzimática (Leblond-Larouche et al. 1975; Tauber y Reutter, 1978; van Hoesen et al., 1979). Sin embargo, la interpretación de las diferencias encontradas en cada caso resulta difícil, ya que, las fracciones de la membrana plasmática originadas de los hepatocitos pueden provenir de tres dominios funcionales, que poseen diferentes propiedades bioquímicas y físicas (Evans, 1980; Bachs et al., 1985; Guyton, 1977). Estos dominios están clasificados de acuerdo a sus funciones, en: región sinusoidal, región canalicular y región intersticial (región lisa con uniones adherentes que las separa), (Figura 5.1).



Figura 5.1

Esquema de hígado (Copenhaver et al., 1978).



Figura 5.1

Esquema de hígado (Copenhaver et al., 1978).

Para facilitar la interpretación de los resultados, en nuestro laboratorio decidimos modificar las técnicas de purificación de la membrana plasmática ya establecidas, y obtener una fracción enriquecida de la membrana plasmática de la región sinusoidal, fundamentalmente, por presentar la membrana plasmática de las células de esta región una mayor actividad de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bachs et al., 1985). Tabla 5.2.

Tabla 5.2

Actividad de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (nmolesPi/mg prot/min), en las regiones canalicular, intersticial y sinusoidal.

Región	Actividad de ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ (nmolesPi/mg prot/min)
Sinusoidal	806
Intersticial	227
Canalicular	106

Durante la caracterización de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, se le comparó con la ATPasa de la membrana plasmática de hepatocitos normales y hepatocitos en regeneración como modelos de células en interfase y división respectivamente.

Como se sabe el hígado es un órgano con un alto poder de regeneración, por lo que, al elegir el tiempo de regeneración se debe considerar que en éste exista el mayor porcentaje de células en división.

En la tabla 5.3, se encuentran los datos obtenidos por Grisham, que muestran el porcentaje de células en proliferación y el porcentaje de síntesis de DNA, efectuados por hepatocitos parenquimales, células litorales y células ductales, durante la regeneración de el hígado de rata, después de una hepatectomía parcial .

Tabla 5.3

Porcentaje de células hepáticas en proliferación. HP-Hepatocitos Parenquimales, CL-Células Litorales y CD-Células Ductales.  
(Grisham, 1962)

## Duración de periodos de regeneración

	Tipo celular	0-36 h	36-72 h	72-96 h
% total de células	HP	61.8	84.0	22.2
	CL	28.0	78.7	50.7
	CD	30.5	88.5	58.0
# relativo de células en división	HP	37.4	50.9	13.5
	CL	9.4	26.3	16.9
	CD	0.6	1.8	1.2
% total de hepatocitos en división	HP	75.9	61.8	41.0
	CL	18.9	32.0	51.7
	CD	1.1	2.2	3.6
Aumento relativo de DNA hepático sintetizado	HP	130.9	178.2	47.3
	CL	18.8	52.6	33.8
	CD	1.2	3.6	2.4
% total de DNA hepático sintetizado	HP	83.2	74.1	54.3
	CL	11.9	21.6	40.5
	CD	1.0	1.4	2.8

Grisham informa en su trabajo que entre 12 y 18 h posteriores a la hepatectomía parcial, un gran número de hepatocitos comienzan a sintetizar DNA; aproximadamente a las 20 h ya que un 29.4 ± 6.2 % lo están sintetizando, en las siguientes 26 h se alcanza el mayor porcentaje de células en mitosis y a las 72 h de la hepatectomía el 80 % del hígado está regenerado. De acuerdo con estos datos el mayor porcentaje de células en división se alcanza entre 36 y 72 h. Por lo que decidimos emplear el hígado con 48 h de regeneración, para tener el mayor porcentaje de células en división.

#### A. Caracterización de la membrana plasmática.

Ya establecida la técnica para el aislamiento de la fracción ligera de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos control, se observaron las diferencias generales en el patrón proteico presente en el homogeneizado crudo, fracción cruda y fracción ligera de la membrana plasmática de las células de hepatoma AS-30D, de los hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración; para ello se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 8 % en presencia de SDS (figura 5.4).

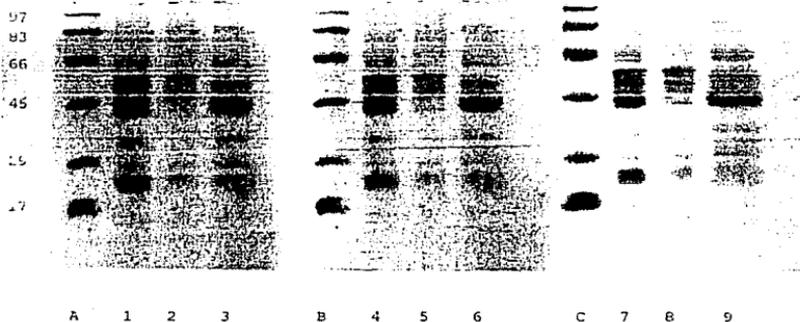


Figura 5.4

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en presencia de SDS al 0.1 %, teñida con plata. Carril A, B, y C marcadores de p.m. (Kd) 17, 29, 45, 66, 83, 97, 116 y 205. Carriles 1, 2 y 3 homogeneizado crudo, fracción cruda y fracción ligera de la membrana plasmática de los hepatocitos normales. Carriles 4, 5 y 6 homogeneizado crudo, fracción cruda y fracción ligera de la membrana plasmática de los hepatocitos en regeneración. Carriles 7, 8 y 9 homogeneizado crudo, fracción cruda y fracción ligera de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D.

Como se puede observar en la electroforesis, la fracción ligera de la membrana plasmática presenta menor cantidad de proteínas que la fracción cruda y el homogeneizado crudo, para los tres tipos celulares. El patrón proteico observado, entre la fracción ligera de la membrana plasmática de los hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración es similar, pero la fracción ligera de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D presenta un patrón proteico diferente, lo cual indica que posee otras proteínas diferentes o diferencias en las proteínas con respecto a la membrana plasmática de hepatocitos normales y en regeneración.

Para verificar si la fracción obtenida se encontraba enriquecida de membrana plasmática, se determinaron tanto en la fracción ligera de la membrana plasmática como en el homogeneizado crudo, la actividad de enzimas marcadoras de diferentes organelos como son la ATPasa ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ) y 5'nucleotidasa de la membrana plasmática, succinato deshidrogenasa de mitocondria y lactato deshidrogenasa de citoplasma. En la Tabla 5.5 se muestran las actividades específicas encontradas para las enzimas marcadoras, en el homogeneizado crudo y en la fracción ligera de la membrana plasmática de los tres tipos celulares.

Tabla 5.5

Actividades enzimáticas encontradas en homogeneizado crudo y fracción ligera de la membrana plasmática de los hepatocitos normales, de los hepatocitos en regeneración y de las células del hepatoma AS-30D. Las actividades específicas se muestran en nmoles/mg prot/min D.E. La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

Tejido	ATPasa (Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ) sensible a Ouabaina	5'Nucleotidasa	Succinato Deshidrogenasa	Lactato Deshidrogenasa	Citocromo oxidasa
<u>Hígado normal</u>					
Homogeneizado crudo	41.2 ± 0.86	222.0 ± 1.2	12.05 ± 0.3	4 778.0 ± 63.7	3.72 ± 0.01
Fracción ligera de la membrana plasmática	182.0 ± 0.1	3 078 ± 69.7	1.09 ± 0.005	767.0 ± 25	1.32 ± 0.02
<u>Hígado en regeneración</u>					
Homogeneizado crudo	46.7 ± 0.3	101.2 ± 4.5	7.6 ± 1.04	9 296.7 ± 42	0.84
Fracción ligera de la membrana plasmática	153.3 ± 0.6	1 216.4 ± 10.1	6.65 ± 0.3	123.06 ± 9.3	0.60
<u>Hepatoma AS-30D</u>					
Homogeneizado crudo	11.3 ± 0.06	10.1 ± 0.01	5.05 ± 0.34	231.2 ± 12.2	4.2 ± 0.02
Fracción ligera de la membrana plasmática	144.7 ± 0.5	271.3 ± 8.5	3.42 ± 0.14	276.0 ± 29	0.48

En la tabla 5.5 se observa el enriquecimiento de las actividades de las dos marcadoras de la membrana plasmática, la actividad de la ATPasa ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) sensible a ouabaina se incrementa 700 % y la actividad de la 5'nucleotidasa 2 000 %, la actividad de las enzimas marcadoras de organelos contaminantes disminuyó en la fracción ligera de la membrana con respecto al homogeneizado crudo. Por lo que la fracción ligera de la membrana plasmática se encuentra realmente enriquecida de membrana plasmática, de manera similar a lo encontrado para la membrana plasmática de los hepatocitos normales por otros grupos de investigación (Spamer et al., 1987; Bachs et al., 1985; Church et al., 1988; Tauber y Reutter, 1978). Las actividades específicas de las diferentes enzimas marcadoras varían entre hepatocitos normales y las células del hepatoma AS-30D, como ya fue encontrado, al comparar la fracción de la membrana de las células del hepatoma ascítico AH-130 con la fracción de la membrana plasmática de hígado normal (Ikahara et al., 1977).

En la figura 5.6 se observa que el pH de óptimo de la reacción en las condiciones empleadas es 7.4, lo cual ya fue encontrado para la ATPasa de hepatocitos normales (Lin y Fain, 1984), sin embargo es notable la escasa actividad hidrolítica de la enzima de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos en regeneración, con respecto a la de los hepatocitos normales, en cualquiera de los pH empleados.

A continuación se determinaron las concentraciones óptimas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para la expresión de la actividad hidrolítica de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ). Para determinar la concentración óptima de  $\text{Ca}^{2+}$ , se emplearon concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  para dar de  $10^{-11}$  a  $10^{-2}$  M (moles/l) de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en presencia de 10 mM (mmoles/l)  $\text{MgCl}_2$  (Figura 5.7). Y para determinar la concentración óptima de  $\text{Mg}^{2+}$ , se emplearon concentraciones crecientes de  $\text{MgCl}_2$  para dar de  $10^{-11}$  a  $10^{-3}$  M (moles/l) de  $\text{Mg}^{2+}$  libre en presencia de 10 mM (mmoles/l) de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 5.8).

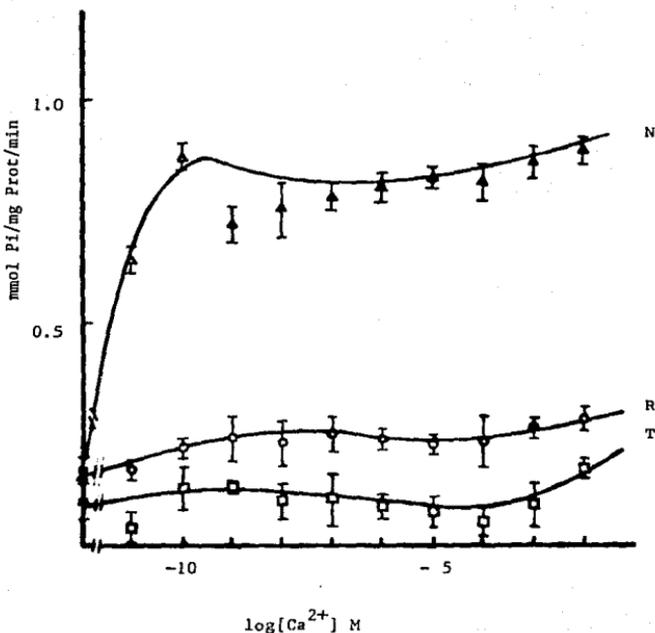


Figura 5.7

Efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D (■), de los hepatocitos en regeneración (●) y de los hepatocitos normales (▲). El medio de incubación contiene 50 mM (mmoles/l) de Tris-Malato pH 7.4, 6 mM (mmoles/l) de ATP, 10 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM (mmoles/l) de EGTA y diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de  $10^{-11}$  a  $10^{-2}$ . La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

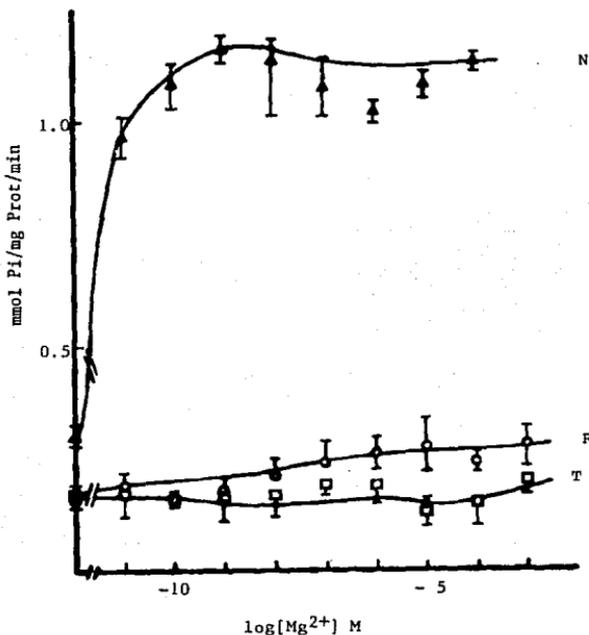


Figura 5.8

Efecto de la concentración de  $Mg^{2+}$  en presencia de  $Ca^{2+}$ , sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D (■), de los hepatocitos en regeneración (○) y de los hepatocitos normales (▲). El medio de incubación contiene 50 mM (mmoles/l) de Tris-Malato pH 7.4, 6 mM (mmoles/l) de ATP, 10 mM (mmoles/l) de  $CaCl_2$ , 10 mM (mmoles/l) de EGTA y diferentes concentraciones libres de  $10^{-11}$  a  $10^{-2}$  de  $Mg^{2+}$ . La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

En las figuras 5.7 y 5.8 se observa que a bajas concentraciones de  $Mg^{2+}$  libre la actividad de la ATPasa ( $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ ) de la membrana plasmática de los hepatocitos normales es mayor a la que presenta con  $Ca^{2+}$ , ya que, la ATPasa ( $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ ) requiere mayor concentración de  $Ca^{2+}$  para ser estimulada. Al obtener curvas de estimulación por  $Ca^{2+}$  y por  $Mg^{2+}$  no aditivas, se decidió determinar si la ATPasa ( $Ca^{2+}-Mg^{2+}$ ) de las células del hepatoma AS-30D, como ya fue informado para la ATPasa de los hepatocitos normales, puede trabajar indistintamente con uno u otro ión (Lin y Fain, 1984). Para ello se emplearon concentraciones crecientes de  $Ca^{2+}$  libre en ausencia de  $Mg^{2+}$  (Figura 5.9) o concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  libre en ausencia de  $Ca^{2+}$  (Figura 5.10).

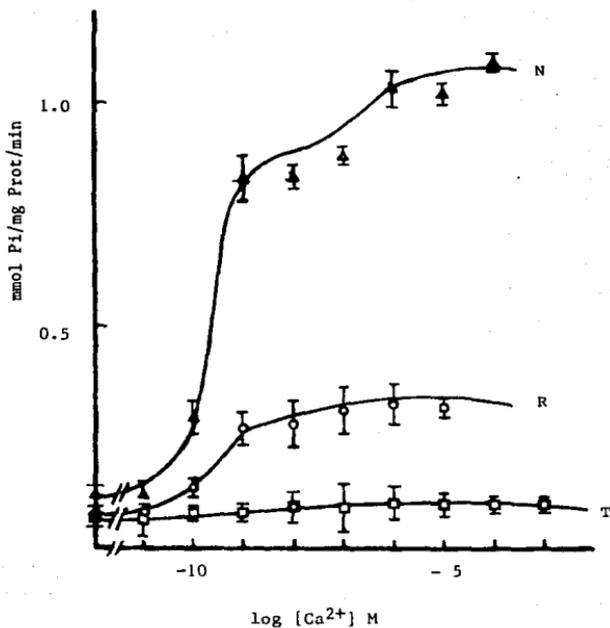


Figura 5.9

Efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa de la membrana plasmática de células del hepatoma AS-30D (■), de los hepatocitos en regeneración (●) y de los hepatocitos normales (▲). El medio de incubación contiene 50 mM (mmoles/l) de Tris-Malato pH 7.4, 6 mM (mmoles/l) de ATP, 10 mM (mmoles/l) de EGTA y diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de  $10^{-11}$  a  $10^{-2}$  M (moles/l). La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

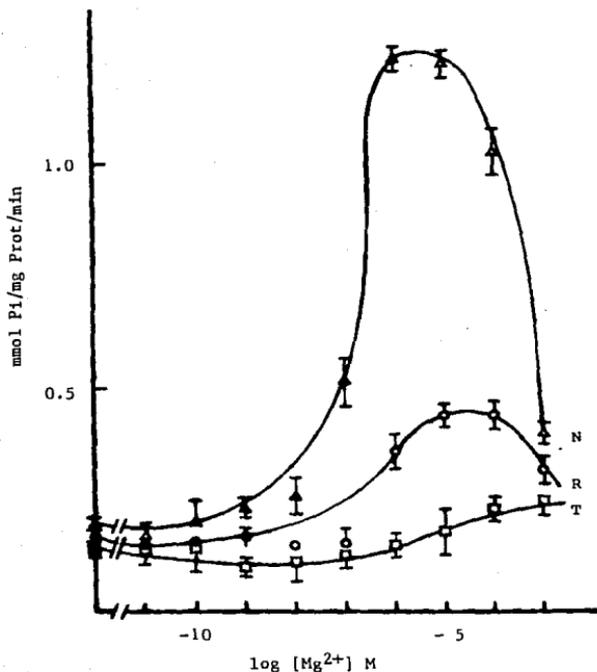


Figura 5.10

Efecto de la concentración de  $Mg^{2+}$  en ausencia de  $Ca^{2+}$ , sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa de la membrana plasmática de células del hepatoma AS-30D (□), de los hepatocitos en regeneración (○) y de los hepatocitos normales (▲). El medio de incubación contiene 50 mM (mmoles/l) de Tris-Malato pH 7.4, 6 mM (mmoles/l) de ATP, 10 mM (mmoles/l) de EGTA y diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  libre de  $10^{-2}$  a  $10^{-11}$  M (moles/l). La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

De acuerdo a las gráficas 5.9 y 5.10 se observa que la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de las células del hepatoma AS-30D, se estimula en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y aparentemente requiere una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  para estimularse, ya que no se observa aparentemente estimulación, con este ión. La ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de los hepatocitos en regeneración es estimulada por ambos iones, como ya se informó para la enzima de los hepatocitos normales (Lin y Fain, 1984).

Empleando el pH y las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  óptimas se estudió el efecto de la calmodulina sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de los tres tipos celulares, ya que como se sabe esta molécula estimula a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de diferentes tejidos (Brostrom y Wolff, 1981; Klee et al., 1983; Wallace y Cheung, 1979).

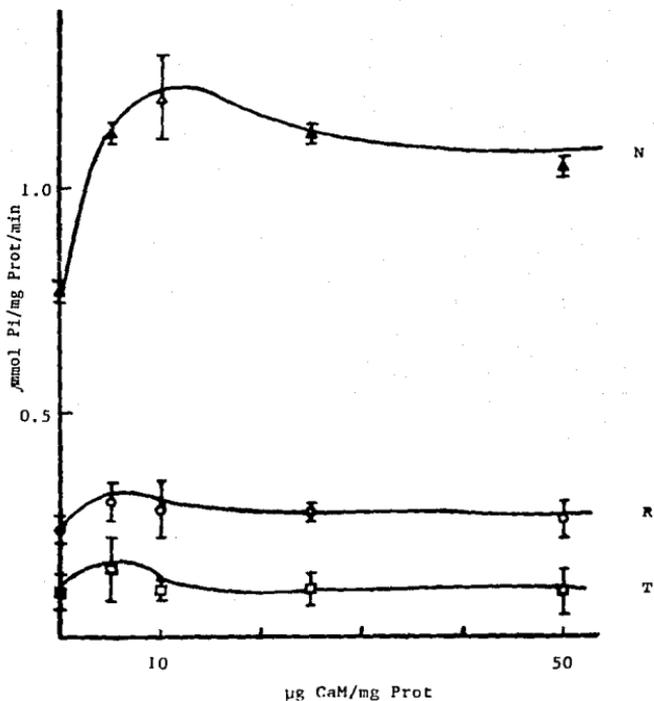


Figura 5.11

Efecto de la calmodulina (CaM) sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa de la membrana plasmática del hepatoma AS-30D (□), de los hepatocitos en regeneración (○) y de los hepatocitos normales (▲). El medio de incubación contiene 50 mM (mmoles/l) de Tris-Malato pH 7.4, 6 mM (mmoles/l) de ATP, 10 mM (mmoles/l) de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$  y CaM en una relación de 0  $\mu\text{M}$  (moles/l) a 50  $\mu\text{M}$  (moles/l) de CaM/mg proteína. La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

En la figura 5.11 se observa estimulación por calmodulina sobre la actividad hidrolítica la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de los hepatocitos normales, y al parecer ninguna estimulación sobre la ATPasa de las células del hepatoma AS-30D o de los hepatocito en regeneración. La estimulación encontrada para la ATPasa de los hepatocitos normales puede deberse a una contaminación de la ATPasa de la membrana plasmática de las células hepáticas no parenquimales, ya que la ATPasa de células hepáticas no parenquimales es estimulada por calmodulina (Schtze y Sling, 1987).

Continuando con la caracterización de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ), se determinó el pH óptimo para estudiar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 5.12), (Chan y Junger, 1983), empleando la mezcla de reacción establecida por Fabiato, la cual se varió de acuerdo a su programa para cálculo de concentraciones iónicas, (Fabiato y Fabiato, 1978).

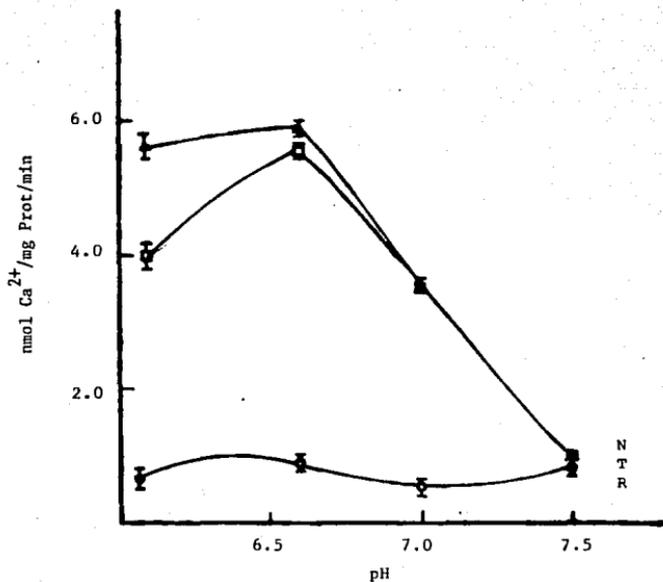


Figura 5.12

Efecto del pH sobre el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D (□), de los hepatocitos en regeneración (○) y de los hepatocitos normales (▲). El medio de incubación contiene 20 mM (mmoles/l) de HEPES-HCl a pH 6.0, 6.6, 7.0 y 7.5, 3 mM (mmoles/l) de ATP, 0.82 nM (nmoles/l) de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^6$  cpm por nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ ), 5 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM (mmoles/l) de EGTA a pH 6.6 y 80 mM (mmoles/l) de KCl. La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

En la figura 5.12, se observa claramente que el pH óptimo para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en las condiciones empleadas a  $37^{\circ}$  es 6.6, es de notar que la capacidad de transporte es muy similar entre la ATPasa de las células del hepatoma AS-30D y la de los hepatocitos normales contrariamente a lo que se encontró para la hidrólisis (Figura 5.6), la ATPasa de los hepatocitos en regeneración tiene una capacidad de transporte menor con respecto a la enzima de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos normales.

Con el pH óptimo, se desarrolló una curva de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  contra tiempo en vesículas de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, de los hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración (Figura 5.13).

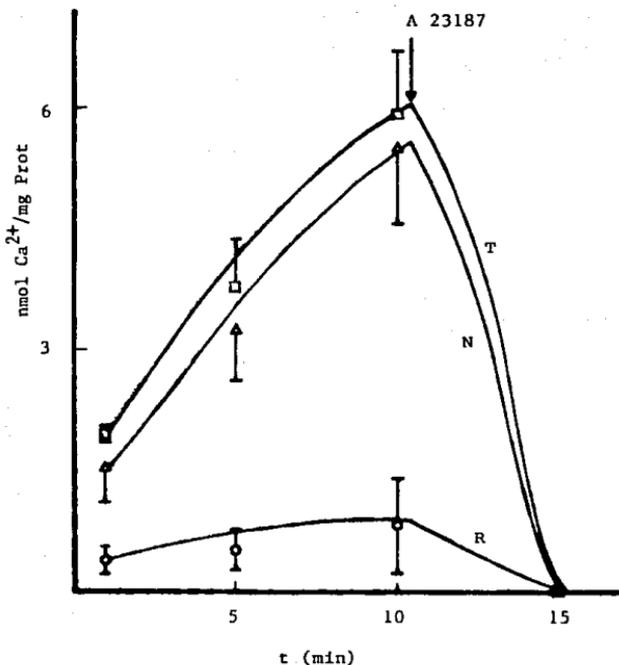


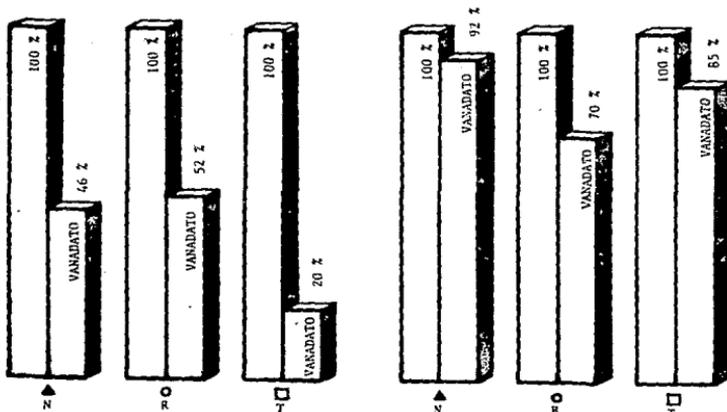
Figura 5.13

Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D ( $\square$ ), los hepatocitos normales ( $\blacktriangle$ ) y los hepatocitos en regeneración ( $\circ$ ). Se realizó empleando un medio de reacción que contiene 20 mM (mmoles/l) de HEPES-HCl a pH 6.6, 3 mM (mmoles/l) de ATP, 0.82 nM (mmoles/l) de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^6$ cpm/nmoles  $\text{Ca}^{2+}$ ), 5 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM (mmoles/l) de EGTA a pH 6.6 y KCl 80 mM (mmoles/l) en un volumen final de 500  $\mu$ l, incubándose a 37 °C durante 1, 5 y 10 min, a los 10 min se le adicionaron 5  $\mu$ M (moles/l) de A23187 concentración final (flecha) y se incubó durante 5 min. La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

En la figura 5.13 se observa que la capacidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa a través del tiempo de manera similar, para la ATPasa de las células del hepatoma AS-30D, de los hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración. Al adicional A 23187, a cualquiera de los tres tipos de vesículas, e incubar el  $\text{Ca}^{2+}$  sale totalmente.

Se ha encontrado que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de hepatocitos normales se inhibe en presencia de vanadato pero la actividad hidrolítica no; al momento se desconoce el mecanismo por el cual es posible observar una inhibición en el transporte y no en la hidrólisis, pero se cree que esta relacionada con los cambios en la conformación de la enzima (Lin, 1985). Ya que la actividad hidrolítica de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) es menor con respecto a la normal y su transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  es normal, decidimos estudiar el efecto de vanadato sobre la enzima de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D. En el histograma 5.14, se observa el efecto de vanadato sobre la actividad hidrolítica y de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, de los hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración.

TRANSPORTE



HISTOGRAMA 5.14

Efecto de vanadato sobre la actividad hidrolítica y sobre el transporte de  $\text{Cu}^{2+}$  de la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D (□), de los hepatocitos en regeneración (○) y de hepatocitos normales (▲). Para la actividad hidrolítica el medio de incubación contiene 100 mM (mmoles/l) de HEPES a pH 6.6, 80 mM (mmoles/l) de KCl, 5 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM (mmoles/l) de EGTA, 0.82 mM (mmoles/l) de  $\text{CaCl}_2$  y con o sin 100  $\mu\text{M}$  (moles/l) de vanadato. Para el transporte de  $\text{Cu}^{2+}$  el medio de reacción que contiene 100 mM (mmoles/l) de HEPES a pH 6.6, 80 mM (mmoles/l) de KCl, 5 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM (mmoles/l) de EGTA, 0.82 mM (mmoles/l) de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^6\text{cpm/nmoles } \text{Cu}^{2+}$ ), 3 mM (mmoles/l) de ATP y con o sin 100  $\mu\text{M}$  (moles/l) de vanadato en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . Las barras muestran el % de inhibición, observado en cada caso.

Como se muestra en el histograma 5.14 en los tres casos la hidrólisis de ATP se inhibe en presencia de vanadato para la ATPasa de la membrana plasmática de los hepatocitos normales la inhibición fue de 8%, para la enzima de los hepatocitos en regeneración fue de 30% y para la enzima de las células del hepatoma AS-30D fue de 15%, en contraste con el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  que se inhibió en un mayor porcentaje ya que para la ATPasa de los hepatocitos normales la inhibición fue de 54%, para la enzima de los hepatocitos en regeneración fue de 48% y para la enzima de las células de hepatoma AS-30D fue de 80%. De acuerdo con los resultados, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  se inhibe en presencia de vanadato en mayor porcentaje que la hidrólisis de ATP, en el caso de la ATPasa de los hepatocitos normales y de las células del hepatoma AS-30D, y curiosamente la inhibición es muy similar para el transporte y la hidrólisis en presencia de vanadato para la ATPasa de los hepatocitos en regeneración.

Al encontrar una actividad hidrolítica menor con respecto a la normal y un transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  normal para la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, decidimos determinar la capacidad de síntesis de ATP catalizada por la ATPasa de las células transformadas, para esclarecer los cambios aparentes en el acoplamiento entre el transporte de calcio y la transducción de energía en esta línea tumoral. Para determinar la capacidad de síntesis, se emplearon concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Figura 5.15).

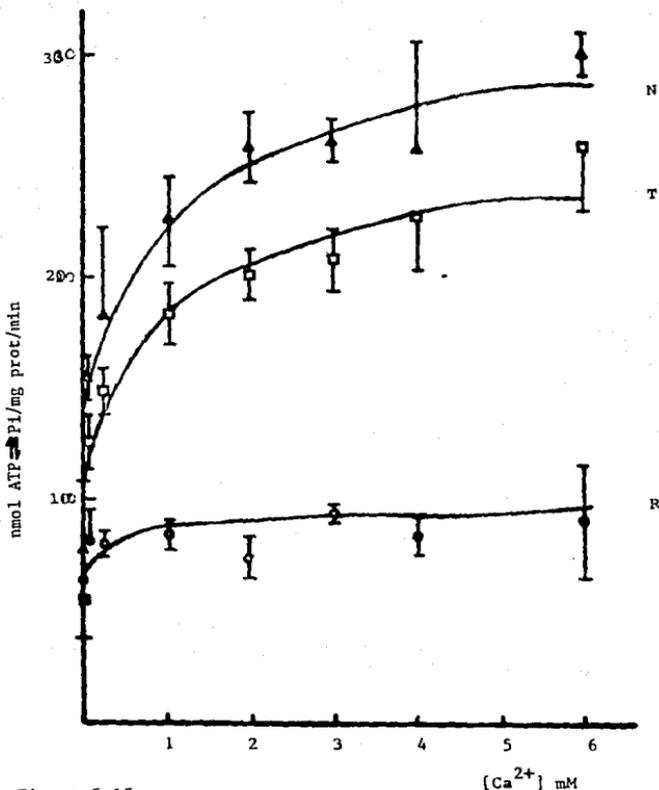


Figura 5.15

Capacidad de recambio ATP  $\rightarrow$  Pi catalizado por la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D ( $\square$ ), de los hepatocitos normales ( $\blacktriangle$ ) y de los hepatocitos en regeneración ( $\circ$ ). El medio de reacción contiene 50 mM (mmoles/l) de tris-malato pH 7.4, 10 mM (mmoles/l) de  $\text{MgCl}_2$ , 6mM (mmoles/l) de ATP, 0.2 mM (mmoles/l) de ADP, 4 mM (mmoles/l) de Pi-tris ( $^{32}\text{P}$   $30 \times 10^3$  cpm por nmoles de Pi), 2 mM (mmoles/l) de EGTA y concentraciones variables de  $\text{Ca}^{2+}$  libre 0.02, 0.2, 1, 2, 3, 4 y 6 mM (mmoles/l). La desviación estándar corresponde a un promedio de 6 experimentos por dato.

En la figura 5.15 podemos observar que la capacidad de síntesis de ATP catalizada por la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, es muy similar a la que presenta la enzima de los hepatocitos normales, en contraste con lo encontrado para la hidrólisis. La ATPasa de la membrana plasmática de los hepatocitos en regeneración, presenta una capacidad de síntesis de ATP mucho menor a la encontrada para la enzima de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos normales. El hecho de observar una actividad hidrolítica menor con respecto a la normal y ningún cambio en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , ni en la síntesis de ATP, catalizadas por la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, hace pensar en que la enzima tenga un desplazamiento en su ciclo catalítico hacia la síntesis de ATP (Figura 5.16) y con ello un mejor acoplamiento energético que le permite transportar la misma concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de los hepatocitos normales, con un menor gasto de energía.

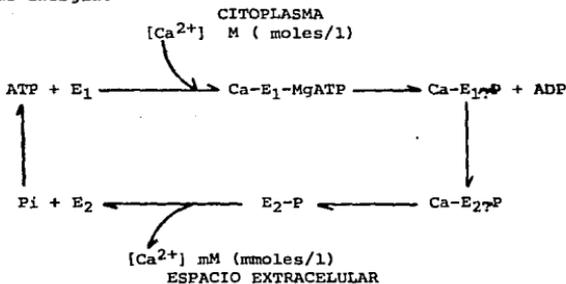


Figura 5.16

Secuencia de la cinética de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ).  $E_1$  = Estado conformacional uno,  $E_2$  = Estado conformacional dos (Spamer et al., 1987).

El posible desplazamiento en el ciclo catalítico de la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) podría deberse a:

I- Modificaciones en su microambiente provocadas por diferentes proteínas o diferencias en las proteínas que la rodean; por ejemplo, la proteína inhibidora dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  encontrada para la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ ) de la membrana plasmática de los hepatocitos normales podría estar presente y permanentemente unida a la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D alterando su conformación. De este modo se facilitarían la síntesis de ATP y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lotersztajn y Pecker, 1982; Lotersztajn et al., 1985). También las proteínas activadoras diferentes a la calmodulina encontradas para la ATPasa de hepatocitos normales, podrían regular a la enzima de tal forma que facilitarían la síntesis de ATP y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lotersztajn et al., 1981; Yamaguchi et al., 1988).

II- Variaciones en los lípidos de la membrana que interactúan con la enzima, provocándole cambios en la hidrofobicidad de su microambiente, ya que, de acuerdo a la revisión realizada por el Dr. Leopoldo De Meis sobre el papel del agua en la energía de hidrólisis de los compuestos de fosfato, transductores de energía en membranas biológicas, nos indica que en un medio con baja actividad de agua los compuestos de fosfato pueden ser de baja energía y formarse espontáneamente en un medio con alta actividad de agua la molécula adquiere características de alta energía y requieren energía para formarse. Un medio con diferente composición de agua puede formarse en el sitio catalítico de una enzima y la energía puede ser usada por la enzima para cambiar su conformación y dar dos microambientes diferentes, uno antes y

otro despues del cambio conformacional.

De acuerdo con el mecanismo propuesto anteriormente, la síntesis de un compuesto y su cambio de baja a alta energía, puede ocurrir en presencia de gran cantidad de agua, porque la formación de este no dependera de la concentración del agua en el medio, pero sí, de la forma en que ésta se organice alrededor de la enzima y en el microambiente de la misma, y ésto depende de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas del medio que la rodea (Lotersztajn et al., 1984; De Meis, 1989).

III-Alteraciones hormonales, ya que existen informes que indican que el glucagón y la proteína cinasa C inhibe la actividad hidrolítica y el transporte de calcio de la ATPasa de la membrana plasmática de hepatocitos normales (Loterstajn et al., 1984; Smallwood et al., 1988; Prpic et al., 1984).

## 6.0 CONCLUSIONES

1. La ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos en regeneración, presentan actividades hidrolíticas menores con respecto a la encontrada para la enzima de los hepatocitos normales.

2. La ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, no es estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia o ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , a diferencia de la ATPasa de la membrana plasmática de hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración que sí son estimuladas.

3. La ATPasa de la membrana plasmática de células del hepatoma AS-30D, no es estimulada por  $\text{Mg}^{2+}$  en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  pero es estimulada por  $\text{Mg}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , a diferencia de la ATPasa de la membrana plasmática de hepatocitos normales y de los hepatocitos en regeneración que son estimuladas en ambos casos.

4. El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  observado en la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D es muy similar al presentado en la membrana plasmática de hepatocitos normales.

5. La actividad hidrolítica de la enzima de los tres tipos celulares se vé afectada por la presencia de vanadato en menor porcentaje que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .

6. La síntesis de ATP catalizada por la ATPasa de la membrana plasmática de las células del hepatoma AS-30D, se mantienen al mismo nivel que el encontrado para los hepatocitos normales. Este dato abre un importante camino en el esclarecimiento del fenómeno presentado por las células tumorales, al sugerir posibles diferencias entre la regulación de la bomba de calcio asociada energéticamente a la ATPasa ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ), contenida en la membrana

plasmática de las células del hepatoma AS-30D y de los hepatocitos normales dadas por un mejor acoplamiento energético de la ATPasa presente en las membrana plasmática de las células de esta línea tumoral.

## 7.0 BIBLIOGRAFIA

1. Andia-Waldenbaugh, A.M., Lan, A., Hummel, L. y Friedmann, N. (1980) Characterization of the hormone-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake activity of the hepatic endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Acta.* 630 (2) 165-175.
2. Armitage, J. (1981) Multiple methylation and bacterial adaptation. *Nature.* 289 (5793) 121-122.
3. Bachs, O., Famulski, K.S., Mirabelli, F. y Carafoli, E. (1985) ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in vesicles plasma membrane isolated from the bile canalicular region of the hepatocyte. *Eur. J. Biochem.* 132 (1) 1-7.
4. Backer, G., Fiskan, G. y Lehninger, A.L. (1980) Regulation of free  $\text{Ca}^{2+}$  by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255 (19) 9009-9012.
5. Barritt, G.J. (1981) Calcium transport across cell membranes: progress toward molecular mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 6 (1) 322-325.
6. Boynton, A.L. y Whitfield, J.F. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 (2) 1651-1557.
7. Boynton, A. L., Mc Keehan, W.L. y Witfield, J.F. (1982) Mediation by ions, cell proliferation, and cancer. Ions, cell proliferation and cancer. Academic Press Londres. 417-432.
8. Brattin, W.J., Jr., Waller, R.L. y Recknagel, R.P. (1982) Analysis of microsomal calcium sequestration by steadystate isotope. *J. Biol. Chem.* 257 (17) 10044-10051.
9. Bretscher, M.S. (1985) The molecules of the cell membrane. *Scientific American.* 253 (4) 86-91.
10. Brostrom, C.O. y Wolff, D.J. (1981) Properties and functions of calmodulin. *Biochem. Pharmacol.* 30 (12) 1395-1405.
11. Brown, B. A., Lok, M. P. y Elovson, J. (1976) Improved method for the isolation of rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 426 (1) 418-432.
12. Bygrave, F.L. (1978) Properties of energy-dependent calcium transport by rat liver microsomal fraction as revealed by initial-rate measurements. *Biochem. J.* 170 (1) 87-91.
13. Campbell, A.K. (1983) Intracellular calcium its universal role as regulator. John Wiley and sons LTD. Londres. 362-452.

14. Carafoli, E. y Crompton, M. (1978) The regulation of intracellular calcium. *Current. Top. Membr. Transp.* Bronner, F., Kleenzeller, A., eds, New York Academic. USA. 1st edi. 10, 151-216.
15. Caroni, P. y Carafoli, E. (1983) The regulation of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange of heart sarcolemma. *Eur. J. Biochem.* 132 (2) 451- 460.
16. Cooperstein, S. J. y Lazarow, A. (1951) A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 189, 665-670.
17. Copenhaver, W.M., Kelly, D.E. y Wood, R.L. (1978) Bailey's text book of histology. The Williams and Wilkins company. Londres. 17 edi. 16, 530.
18. Criss, W.E. y Kakiuchi, S. (1982) *Fed. Proc.* 41, 2289-2291.
19. Chan, K.M. y Junger, K.D. (1983) Calcium transport and phosphorylated intermediate of  $(\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+})$  ATPase in plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.* 258 (7), 4404-4410.
20. Cheeseman, K.H., Emery, S., Maddix, S.P., Slater, T.F. y Burton, G.W. e Ingold, K.U. (1988) Studies on lipid peroxidation in normal and tumour tissues. *Biochem. J.* 250 (2) 247-252.
21. Cheung, W.Y. (1979) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science.* 207 (1) 19-27.
22. Chiesi, M., Zurini, M. y Carafoli, E. (1984) ATP synthesis catalyzed by the purified erythrocyte  $\text{Ca}$ -ATPase in the absence of calcium gradients. *Biochemistry.* 23 (1) 2595-2600.
23. Church, J.G., Ghosh, Sh., Roufogalis, B.D. y Villalobo, A. (1988) Endogenous hyperphosphorylation in plasma membrane from an ascites hepatocarcinoma cell line. *Biochem. Cell Biol.* 66 (1) 1-12.
24. Dawson, A.P. (1982) Kinetic properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation system of a rat liver microsomal fraction. *Biochem. J.* 206 (1) 73-79.
25. Debetto, P. y Cantley, L. (1984) Characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$  stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent adenosin triphosphatase in friend murine erytroleukemic cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259 (22) 13824-13831.
26. De Meis, L. (1989) Role of the water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds energy transduction in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 42951. Preprint.

27. Dipolo, R. (1978) Ca pump driven by ATP in squid axons. *Nature*. 247 (5669) 390-392.
28. Dipolo, R. y Beaugué, L. (1979) Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axons. *Nature*. 278 (5701) 271-273.
29. Endo, M. (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum *Physiol. Rev.* 57, 71-108.
30. Evans, W.H. y Gurd, J.W. (1973) Properties of a 5'-nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. *Biochem. J.* 133 (1) 189-199.
31. Evans, W.H. (1980) Properties of a 5' nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. *Clinical Science*. 58 (3) 439-444.
32. Fabiato, A. y Fabiato, F. (1978) *J. Physiol.* 75 463-465.
33. Famulski, K. y Carafoli, (1982) E.  $\text{Ca}^{2+}$  transporting activity of membrane fractions isolated from the post-mitochondrial supernatant of rat liver. *Cell Calcium*. 3, 263-281.
34. Famulski, K. y Carafoli, E. (1984) Calmodulin-dependent protein phosphorylation and calcium uptake in rat-liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 141 (1) 15-20.
35. Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 66, 375-380.
36. Fiskum, G. y Pease, A. (1984) Comparison of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport in normal liver and AS-30D hepatoma cells (abstract). *Fed. Proc.* 43 (8) 2003-2015.
37. Fiskum, G. y Pease, A. (1986) Hydroperoxide-stimulated release of calcium from rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria. *Cancer Res.* 46 (9) 3459-3463.
38. Gietzen, K., Tejcka, M. y Wolf, V. (1980) Calmodulin affinity chromatography yields a functional purified erythrocyte ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-dependent adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* 189 (1) 81-88.
39. Goldman, R., Pollard, T. y Rosenbaum, J. (1976) Depolarization and calcium entry. *Cell Movility, A, B and C*. Plenum Press. New York. USA. 1ra edición. (9) 151-164.
40. Gomperts, B.D., Bennett, J.P. y Allan, D. (1981) A synthetic ionophore for  $\text{Ca}^{2+}$  studies with model and biological systems. *Eur. J. Biochem.* 117 (2) 559-562.

54. Klee, C.B., Newton, D.N., Ni, W.C. y Draetta, G.D. (1983) Regulation of the calcium signal by calmodulin. Intracellular calcium its universal role as regulator. John Wiley and sons LTD. Londres. 41-46.
55. Kleineke, J. y Soling, H.D. (1985) Mitochondrial and extra-mitochondrial  $Ca^{2+}$  pools in the perfused rat liver. J. Biol. Chem. 260 (2) 1040-1045.
57. Knowles, A.F. y Racker, E. (1975) Formation of adenosine triphosphate from Pi and adenosine diphosphate by purified  $Ca^{2+}$ -adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250 (5) 1949-1951.
58. Kraus-Friedmann, N., Biber, J., Murer, H. y Carafoli, E., (1982) Calcium uptake in isolated hepatic plasma membrane vesicles. Eur. J. Biochem. 129 (1) 8-12.
59. Kretsinger, R. H. (1976) Calcium binding protein. Ann. Rev. Biochem. 45 (1) 239-266.
60. Kretsinger, R.H. (1981) Calcium binding proteins. Membrana transport of calcium. Carafoli, E. editor. Academic Press Londres. 83-85.
61. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 14. Nature. 227, 680-685.
62. Leblond-Larouche, L., Morais, R., Nigamy, V.N. y Karasaki, S. (1975) A comparative study of carbohydrate content protein. glycoprotein and ganglioside patterns of cell membranes isolated from Novikoff ascites hepatoma and normal liver. Archiv. Biochem. Biophys. 167, 1-12.
63. Lin, S.H. y Fain, J. (1984) N. Purification of  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase from rat liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 259 (5) 3016-3020.
64. Lin, S.H. (1985) Novel ATP-dependent calcium transport component from rat liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 260 (13) 7850-7856.
65. Lin, S.H. (1985) The rat liver plasma membranes high affinity  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase is not a calcium pump. J. Biol. Chem. 260 (20) 10976-10980.
66. Lotersztajn, S., Hanoune, J. y Pecker, F. (1981) A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 256 (21) 11209-11215.
67. Lotersztajn, S. y Pecker, F. (1982) A membrane-bound protein inhibitor of the high affinity Ca ATPase in rat liver plasma membrane. J. Biol. Chem. 257 (12), 6638-6641.

68. Lotersztajn, S., Epand, R.M., Mallat, A. y Pecker, F. (1984) Inhibition by glucagon of the calcium pump in liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259 (13) 8195-8201.
69. Lotersztajn, S., Mallat, A., Pavoine, C. y Pecker, F. (1985) The inhibitor of liver plasma membrane (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 260 (17), 9692-9698.
70. Lowenstein, W.R. y Rose, B. (1978) Calcium in (junctional) intercellular communication and a thought on its behavior. *Intracellular communication. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 307 (1) 285-307.
71. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. (1951) J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1) 265-275.
72. Mac Manus, J.P. (1981) The stimulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by AMr 11500 calcium binding protein from hepatoma. *FEBS Letters.* 126 (2) 245-253.
73. Mac Manus, J.P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 621, 296.
74. Mac Manus, J.P. (1982) Calcium-binding proteins and cell proliferation. Ions, cell proliferation and cancer. Academic Press Londres. 489-498.
75. Mac Manus, J.P. (1982) Calmodulin and Oncomodulin content of tumours. Ions, cell proliferation and cancer. Academic Press Londres. 489-498.
76. Martonosi, A.H. (1980) Calcium pumps. *Fed. Proc.* 39 (7) 2401-2402.
77. Mas-Oliva, J. (1978) Computer course. Run iones program. Londres. Colección personal.
78. Mas-Oliva, J., Williams, A. y Nayler, W.G. (1979) ATP-induced stimulation of calcium binding to cardiac sarcolemma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 87, 441-447.
79. Mas-Oliva, J. y Varela, M.E. (1987) Independent conformational changes caused by calmodulin and calcium in the cardiac microsomal (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase during its ATP hydrolysis-ATP synthesis cycle. *J. Mol. Cell Cardiol.* 19 (1) 39-46.
80. Michaelis, E.K., Michaelis, M.I., Chang, H.A. y Kitos, T.E. (1983) High affinity Ca<sup>2+</sup>-stimulated Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase in rat brain, synaptosomes, synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 258 (10) 6101-6108.
81. Moore, L., Chen, T., Knapp, H.R., Jr. y Landon, E.J. (1975) Energy-dependent calcium sequestration activity of the hepatic endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 250 (2) 4562-4568.

82. Moore, P.B. y Kraus-Friedman, (1983) N. Hepatic microsomal  $Ca^{2+}$ -dependent ATPase. *Biochem. J.* 214 (3) 69-75.
83. Murphy, E., Coll, K., Rich, T. y Williamson, J.R. (1980) Hormone effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 255 (5) 6600-6608.
84. Nellans, H.N. y Popovith, J.E. (1981) Calmodulin-regulated ATP-driven calcium transport by basolateral membranes of rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 256 (19) 9932-9936.
85. Neville, D.H. (1960) The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 413-422.
86. Neville, D.M. (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 154, 540-552.
87. Oakley, R.B., Kirsch, D.K. y Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 361-363.
88. Pershadsingh, H.A., Lardt, M. y McDonald, J.M. (1980) A high affinity calcium-stimulated magnesium dependent adenosine triphosphatase in rat adipocyte plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 255 (9) 4087-4093.
89. Post, R. L. y Sen, A. K. (1967) Sodium and potassium-stimulated ATPase. *Methods Enzymol.* 10, 762-768.
90. Prpic, V., Kelli, C.G., Blackmore, P.F. y Exton, J.H. (1984) Vasopressin, angiotensin II-and  $\beta_1$ -adrenergic-induced inhibition of  $Ca^{2+}$  transport by rat liver plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 259 (3) 1382-1385.
91. Racker, E. (1980) Fluxes of  $Ca^{2+}$  and concepts. *Federation Proc.* 39 (1) 2422-2426.
92. Rasmussen, H. (1981) Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. In *Calcium and cAMP as Synarchis Messenger*. John Wiley and Sons, Nueva York. USA. 31-59.
93. Rega, A.F. y Garrahan, P.J. (1986) Partial reactions of the  $Ca^{2+}$ -ATPase. The  $Ca^{2+}$  Pump of Plasma Membranes. CRC Press Inc. USA. 8, 105-125.
94. Reuter, H. (1974) Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance. *Circulation Res.* 34 (1) 599-605.
95. Ridgway, E.B., Gilkey, J.C. y Jaffe, L.F. (1977) Free calcium increases expositively in activating medaka eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (1) 623-627.

96. Rubin, R.P. (1977) The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. Calcium and the secretory process. Plenum Press, Nueva York. USA. 24-35.
97. Scarpa, A. y Carafoli, E. (1978) Calcium transport and cell function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 307-321.
98. Schanne, F.A.X. y Moore, L. (1986) Liver plasma membrane calcium transport. J. Biol. Chem. 261 (21) 9886-9889.
99. Schatzmann, H.J. (1981) The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. Membrane transport of calcium. Carafoli, E., editor. Academic Press Londres. 41-108.
100. Schneider, K.W. y Lehmann, F.G. (1967) Arztl. Labor. 13, 339. De acuerdo con Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. (1970), 8, 658; (1971), 9, 464, (1972), 10, 182.
101. Schtze, S. y Sling, H.D. (1987) Does a calmodulin-dependent  $Ca^{2+}$ -regulated  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase contribute to hepatic microsomal calcium uptake. Biochem. J. 243 (3) 729-737.
102. Smallwood, J.I., Gugi, B. y Rasmussen, H. (1988) Regulation of erythrocyte  $Ca^{2+}$  pump activity by protein kinase C. J. Biol. Chem. 263 (5) 2195-2202.
103. Smith, D.F., Walborg, E.F. Jr. y Chang, J.P. (1970) Establishment of a transplantable ascites variant of a rat hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene. Cancer Res. 30 (1) 2306-2309.
104. Somlyo, A.P., Bond, M. y Somlyo, A.V. (1985) Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly in vivo. Nature. 314 (6012) 622-625.
105. Spamer, C., Heilmann y Gerok, W. (1987)  $Ca^{2+}$ -activated ATPase in microsomes from human liver. J. Biol. Chem. 262 (16) 7782-7789.
106. Springer, M.S., Goy, M.F. y Adler, J. (1979) Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. Nature. 280 (5717) 279-280.
107. Stout, M.A. (1985) Ca Distribution. Calcium in biological systems. Rubin, R.P., Weiss, G.B. y Putney, J.W. editores. Plenum press 1<sup>era</sup> edición.
108. Swierenga, S.H.H., Whitfield, J.F., Boyton, A.L., MacManus, J.P., Rixon, R.H., Sikorska, M., Tsang, B.K. y Walker, P.R. (1980) The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Ann. N. Y. Ac. Sc. 339 (4) 216-240.
109. Tauber, R. y Reutter, W. (1978) Protein degradation in the plasma membrane of regenerating liver and Morris hepatomas. Eur. J. Biochem. 83 (1) 37-45.

110. Touster, O. y Aronson, Jr., N.N., Dulaney, J.T., Henrickson, H. (1970) Insolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *J. Cell Biol.* 47 (7) 90-102.
111. van Hoeven, R.P., van Blitterswijk, W.J. y Emmelot, P. (1979) Fluorescence polarization measurements on normal and tumour cells and their corresponding plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 551 (1) 44-54.
112. Vercesi, A.E., Ferraz, V.L., Macedo, D.V. y Fiskum, G. (1988)  $Ca^{2+}$ -dependent  $NAD(P)^+$ -induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 (3) 934-941.
113. Wallace, R.W. y Cheung, W. Y. (1979) Calmodulin production of an antibody in rabbit and development of a radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 254 (14) 6364-6571.
114. Wei, J.W. y Hickie, R.A. (1981) Increased content of calmodulin in Morris hepatoma 5123 t. c. (h). *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 100 (4) 1562-1568.
115. Whitfield, J.F., Boynton, A.L., Mac Manus, J.P., Sikorska, M. y Tsang, B.K. (1979) The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. *Mol. Cell Biochem.* 27 (3) 155-179.
116. Williamson, J.R., Ronald, H.C. y Hoek, J.B. (1981) Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 639 (3) 243-295.
117. Wisher, M.H. y Evans, H. (1975) Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. *Biochem J.* 146 (1) 375-388.
118. Wuytack, F., de Schutter, G. y Casteels, R. (1981) Partial purification of  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -dependent ATPase from pig smooth muscle and reconstitution of an ATP-dependent  $Ca^{2+}$ -transport system. *Biochem. J.* 198, 265-271.
119. Yamaguchi, M., Mori, S. t Kato, S. (1988) Calcium-binding protein regucalcin is an activator of  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -adenosine triphosphatase in the plasma membranes of rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (9) 3532-3539.
120. Yoshikami, S. y Hagins, W.A. (1978) Calcium in excitation of vertebrate rods and cones: retinal efflux of calcium studied with dichlorophosphonazo III. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 37, 545-561.