

2.3 Determinación de actividad ADH en células H4IIEC3

El análisis espectrofotométrico de los homogeneizados de células H4IIEC3 confirmó la existencia de actividad típica de ADH1, ADH3 y ADH4. La actividad determinada a baja (10 mM) y elevada (500 mM) concentración de etanol, en ausencia o presencia de 4-metilpirazol (4-MP), resultó ser una manera simple de cuantificar cada ADH (Tabla 14). A 10 mM de etanol, principalmente se determinó la contribución de ADH1 ($K_m = 1,4$ mM; Parés y col., 1994), que resultó ser de $6,07 \pm 2,10$ mU/ mg proteína y que fue totalmente inhibida en presencia de 4-MP 0,5 mM ($K_i = 4$ μ M; Julià y col., 1987a). En estas condiciones, las células H4IIEC3 presentaban una actividad ADH similar a la de los homogeneizados de hígado de rata, que contienen ADH1 pero no ADH4 (Tabla 14). La actividad ADH de las células H4IIEC3 medida con etanol 500 mM, en presencia de 4-MP 0,5 mM, fue principalmente debida a la ADH4 ($K_m = 340$ mM; Parés y col., 1994) y era parcialmente inhibida en presencia de 4-MP ($K_i = 0,2$ mM; Julià y col., 1987a) (Tabla 14). En estas condiciones, en cuanto a la actividad ADH4, los homogeneizados de células H4IIEC3 se asemejaban a los de estómago de rata, que expresan ADH4 y ADH1. El comportamiento fue diferente en los homogeneizados de hígado donde la ADH1 ya se encuentra saturada a concentraciones de etanol de 15 mM y, por tanto, un aumento de concentración hasta 0,5 M produce un fuerte efecto de inhibición por sustrato. Estos resultados confirmaban que las células de hepatocarcinoma de rata presentaban ADH1 y ADH4, y a niveles incluso superiores a las de hígado y estómago, respectivamente.

Tabla 14. Actividad ADH en homogeneizados de células H4IIEC3 y tejidos de rata. Las actividades se midieron en presencia (+) y ausencia (-) de 4-MP 0,5 mM en tampón glicina-NaOH 0,1 M, pH 10, a 25°C en presencia de etanol 500 mM y NAD^+ 4 mM para ADH4, y en presencia de etanol 10 mM y NAD^+ 2,4 mM para ADH1.

Tejido / 4-MP	ACTIVIDAD ADH (mU/mg de proteína)			
	ADH1		ADH4	
	-	+	-	+
H4IIEC3	$6,07 \pm 2,10$	N.A.	$38,39 \pm 4,04$	$22,8 \pm 3,10$
ESTÓMAGO	$0,92 \pm 0,06$	N.A.	$23,47 \pm 0,01$	$13,61 \pm 0,47$
HÍGADO	$4,69 \pm 0,6$	N.A.	$0,48 \pm 0,03$	N.D.

Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). N.A., actividad no detectada; N.D., actividad no determinada.

La actividad ADH3 (o FALDH), de distribución ubicua (Julià y col., 1987a; 1987b), también se detectó en las células H4IIEC3 como formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión. Se determinó la actividad formaldehído deshidrogenasa en presencia (FALDH) y ausencia (ALDH) de glutatión 1 mM (Tabla 15). No se encontraron diferencias significativas entre ambas actividades. Los niveles de actividad detectados fueron siempre muy similares en las dos condiciones de ensayo, lo que hizo pensar que la actividad formaldehído deshidrogenasa determinada en ausencia de glutatión no era debida tan sólo a la ALDH independiente de glutatión sino también a FALDH, debido seguramente a los elevados niveles de glutatión intracelular en estas células tumorales (DeLong y col., 1986; Duthie y col., 1988). Por esta razón, se utilizaron condiciones de ensayo que aumentaron la sensibilidad y especificidad para FALDH y minimizaron las actividades ALDH no específicas. Se utilizó APAD como coenzima, en lugar de NAD, lo que hizo aumentar la relación FALDH/ALDH de 0,86 a 6,9 (Tabla 15). Este aumento de actividad en presencia de APAD es típico de la FALDH (Uotila y Koivusalo, 1989).

Tabla 15. Actividad FALDH y ALDH en homogeneizados de células H4IIEC3 de hepatoma de rata. Las actividades se midieron en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 8,0, a 25°C, con formaldehído 1 mM, NAD⁺ 1,2 mM o APAD 0,6 mM en presencia (FALDH) o ausencia (ALDH) de glutatión 1 mM.

	FALDH mU/mg proteína	ALDH mU/mg proteína	FALDH/ALDH
NAD ⁺ (2,4 mM)	7,72 ± 0,84	8,93 ± 1,46	0,86
APAD (0,6 mM)	37,01 ± 2,72	5,36 ± 0,62	6,90

Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=5).

2.4 Análisis por transferencia *Northern* del patrón de expresión de ADH en células H4IIEC3

El análisis de los homogeneizados de células H4IIEC3 por transferencia *Northern* demostró la presencia de mRNA de ADH1, ADH3 y ADH4 (Fig. 62). El tamaño de los transcritos fue aproximadamente de 1,3 kb para ADH1 y ADH3. En contraste, la ADH4 mostró dos transcritos de longitudes diferentes, uno de 2,1 kb detectado en estómago, pulmón y células H4IIEC3, y otro de 1,5-1,6 kb que fue predominante en hígado, aunque también se detectó en las células de hepatoma (Fig. 62). Este único transcrito

Resultados

de menor tamaño en hígado podría explicar la ausencia de actividad ADH4 en tejido hepático.

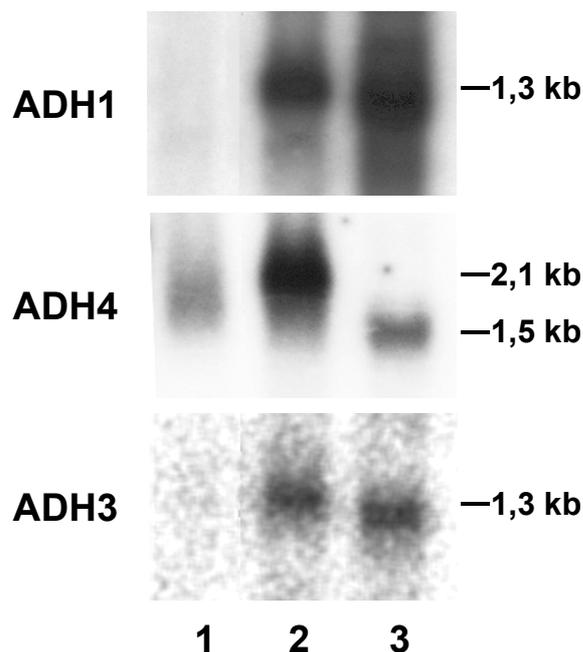


Figura 62. Análisis de mRNA de diferentes ADH en las células H4IIEC3 y tejidos de rata. Se separaron 2 μg de RNA poliA⁺ en un gel de agarosa-formaldehído, que fueron transferidos a un filtro de Nylon. Como sondas se utilizaron los cDNA de ADH1, ADH3 y ADH4, marcados radiactivamente. (1) Estómago, (2) células H4IIEC3 y (3) hígado de rata. kb, kilobases.

Los resultados obtenidos demostraban de forma inequívoca que las células de hepatocarcinoma de la línea H4IIEC3 contenían tanto mRNA como proteína activa de las formas ADH1, ADH3 y ADH4. Por lo tanto, estas células podrían constituir un buen modelo para el estudio de la regulación de la expresión de los genes ADH.

2.5 Efecto de la eliminación del suero sobre la actividad ADH

Las células H4IIEC3, una vez alcanzada su confluencia, se incubaron en un medio totalmente exento de suero durante un período de seis días. A los tres días, se observó una drástica disminución en la actividad ADH1, conservándose sólo el 31% de la actividad detectada en los frascos control (Tabla 16, Fig. 64A). En comparación, se observó un 75% de la actividad ADH4 respecto a la actividad inicial con suero (Tabla 16, Fig. 64A). Tras seis días, la actividad ADH1 descendió a un 8% de su valor inicial, mientras que la actividad ADH4 todavía representó el 51% de la actividad inicial (Tabla 16, Fig. 64A).

Tabla 16. Efecto de la eliminación del suero sobre la actividad ADH1 y ADH4 de las células H4IIEC3

ACTIVIDAD ADH (mU/mg proteína)		
DÍA	ADH1	ADH4
0	6,81 ± 0,10	13,08 ± 0,02
3	2,08 ± 0,14 ^a	9,71 ± 0,56 ^a
6	0,55 ± 0,005 ^b	6,72 ± 0,30 ^b

Los valores se expresan como la media ± SEM (n = 5). ^ap<0,05, ^bp<0,001, respecto al control con suero (día 0).

2.6 Efecto del AR sobre la expresión de la ADH

Se investigó el efecto del AR sobre la expresión de ADH1, ADH3 y ADH4 en la línea celular H4IIEC3 de hepatoma de rata. La concentración de AR ensayada fue de 10⁻⁶ M. Así, cultivos semiconfluentes (aproximadamente, con un 70% de confluencia) fueron incubados, por separado, con tres isómeros de AR (*todo-trans*, *9-cis* y *13-cis*) en medio totalmente exento de suero, con el fin de no enmascarar el efecto de la hormona. Se realizaron incubaciones de 8, 12, 24 y 48 h. Al final de cada experimento, las células se recogieron, y se procedió a la extracción del RNA y posterior análisis por transferencia *Northern* (Fig. 63).

Con el fin de determinar las diferencias entre los cultivos tratados con los isómeros de AR y los correspondientes controles, los resultados fueron primero normalizados respecto a los niveles de mRNA de la G3PDH; y después se calculó la relación entre los niveles de mRNA de los cultivos tratados respecto a los controles correspondientes (Fig. 63).

Se observó un descenso significativo en los niveles de mRNA para ADH1 y ADH4 en los cultivos control mantenidos en medio exento de suero, ya a partir de las 8 h del inicio del experimento (Figs. 63, 64B y 65), lo que concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos en los que la eliminación del suero provocaba un descenso significativo de la actividad ADH1 y ADH4, siendo más acusado para ADH1 (Fig. 64A).

Por otra parte, se observaron diferencias en el efecto producido por los distintos isómeros de AR en la expresión de ADH1 y ADH4. En general, los niveles de mRNA de ADH1 aumentaron tras 48 h de tratamiento. Este incremento fue más evidente (4-5 veces) para los isómeros *todo-trans* y *9-cis*. Por el contrario, los niveles de mensajero de ADH4 resultaron disminuidos tras la incubación con isómeros de AR, desde el

principio del experimento (Figs. 63, 64B y 65). La expresión del gen de ADH3 no se vio afectada por ninguno de los isómeros de AR, de forma que los niveles de mensajero se mantuvieron constantes a lo largo del experimento (Figs. 63 y 65).

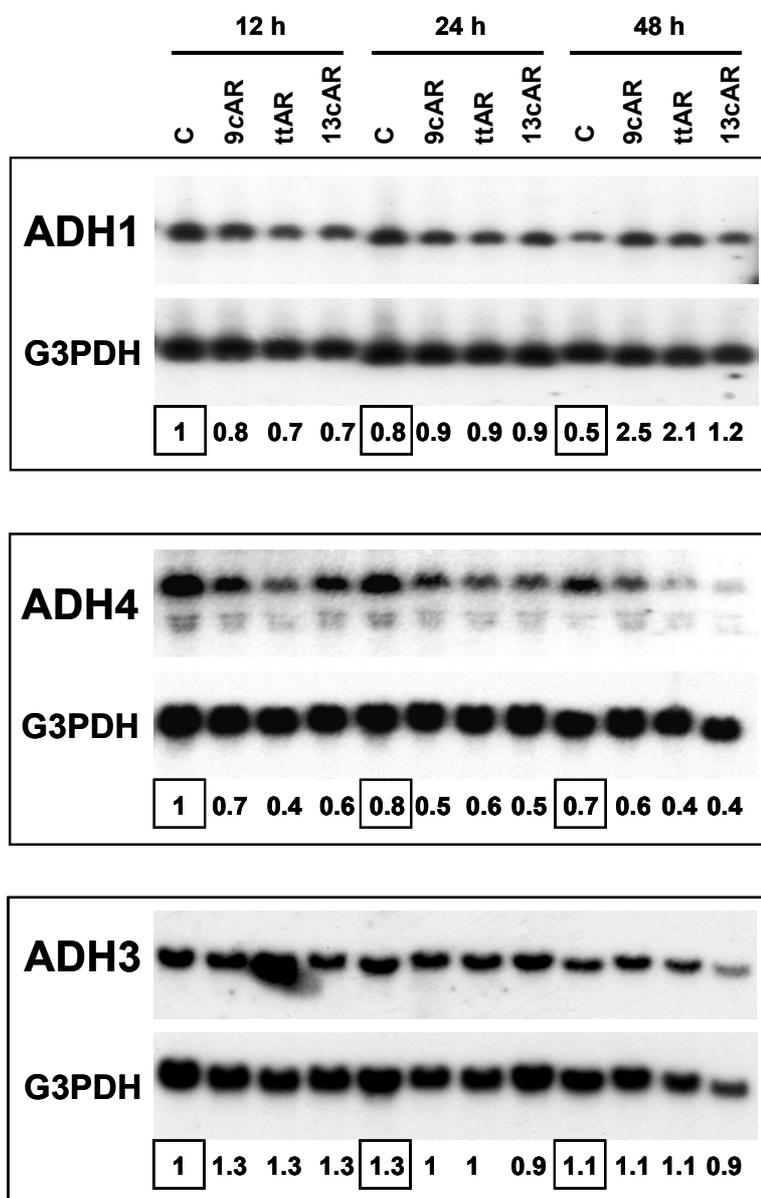


Figura 63. Análisis por transferencia *Northern* del mRNA de la ADH en las células H4IIEC3 tratadas con ácido retinoico. La hormona fue añadida a una concentración final de 1 μ M al medio de cultivo exento de suero. Después de diferentes periodos de tiempo de incubación, se extrajo el RNA poliA⁺ y se examinó por transferencia *Northern*. En el carril C, se aplicó el RNA de los cultivos al inicio del experimento y, por tanto, no tratados con retinoico. La densidad óptica relativa (cpm/mm²) de cada banda se indica en la base de cada autorradiografía, tomándose como valor 1 el del carril C, a las 12 h de tratamiento.

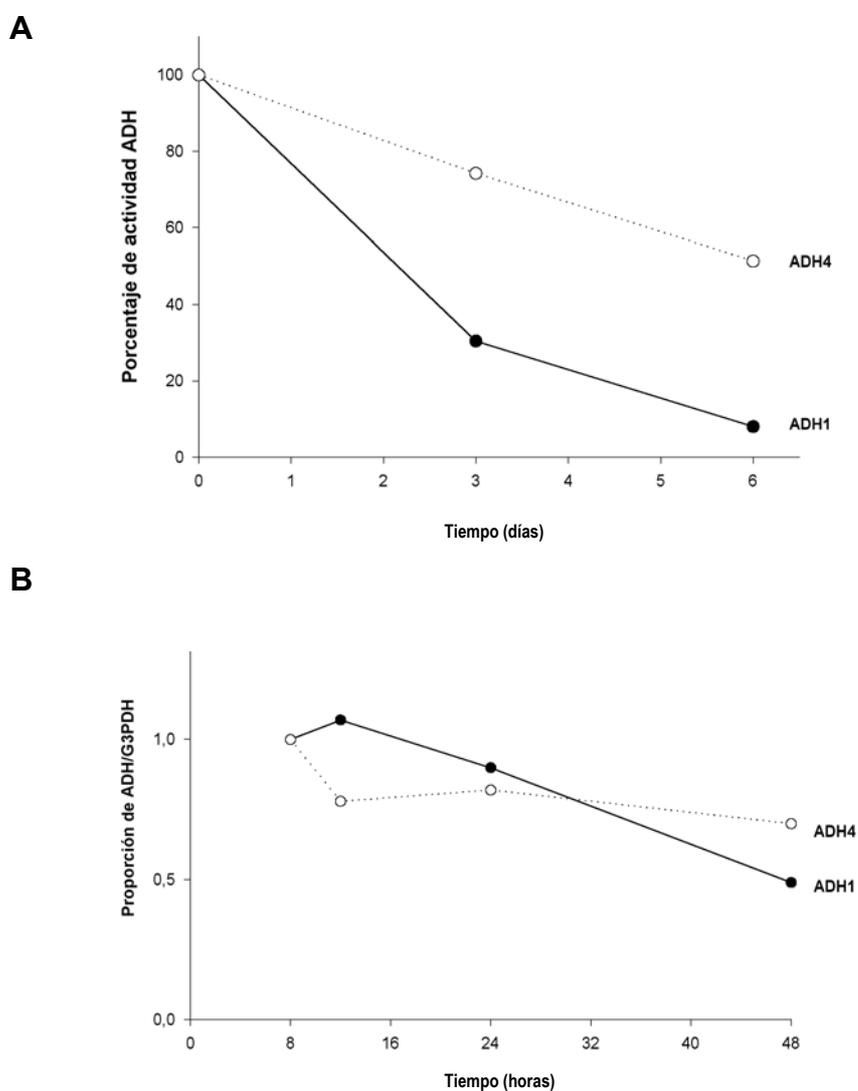


Figura 64. Efecto de la eliminación del suero en el medio de crecimiento sobre el nivel de actividad (A) y de mRNA (B) de la ADH. En la gráfica (A) Cada punto representa el % de la actividad ADH determinada como la media de cinco frascos de cultivo. Actividad ADH medida con etanol 10 mM (ADH1) o con etanol 500 mM en presencia de 4-MP 0,5 mM (ADH4). En la gráfica (B), se representa la relación entre la densidad óptica de las bandas de ADH y las del control interno G3PDH obtenidas por transferencia *Northern*. Los valores a las 12, 24 y 48 h están basados en los datos de la Fig. 63.

Resultados

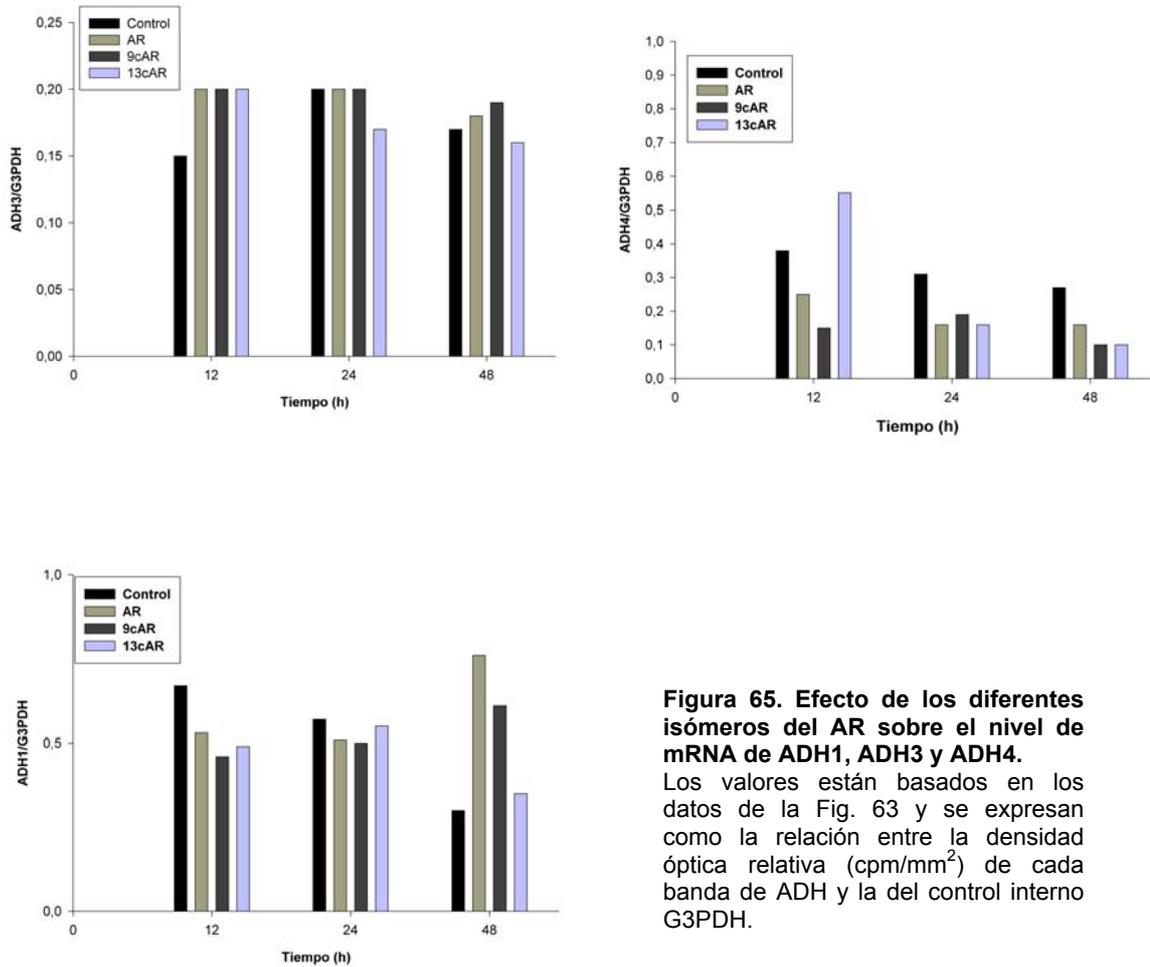


Figura 65. Efecto de los diferentes isómeros del AR sobre el nivel de mRNA de ADH1, ADH3 y ADH4.

Los valores están basados en los datos de la Fig. 63 y se expresan como la relación entre la densidad óptica relativa (cpm/mm^2) de cada banda de ADH y la del control interno G3PDH.