

Estudio de la proliferación hepatocelular estimulada mediante la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H. (Triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina)

M.Soriano, O.Bachs, M.R. Piñol, C. Enrich, M. Perelló y J.Domingo.
Departamento de Histología y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Casanova 143, Barcelona-36

Introducción

Basándose en las observaciones experimentales en las que se ha comprobado que los agentes circulantes en sangre actúan regulando la multiplicación hepatocelular (Bucher et al 1978), y después de probar la eficacia de distintas mezclas de sustancias en la incorporación de TdR (H^3) al DNA de los hepatocitos, J.Short et al (1972) desarrollaron un sistema experimental que se basa en la infusión de una solución que por cada 10ml. contiene 100 μ gr de triyodotironina, 150-300 mgr. de hidrolizado de caseína, 1 mgr de glucagón, y 100 U.S.P de heparina (T.A.G.H.).

Este sistema de activación posee la ventaja de no ocasionar agresión directa ni dar lugar a una pérdida de masa celular como ocurre en el caso de la hepatectomía parcial. A diferencia de lo que ocurre después de operación los cambios observados en la fase prerreplicativa de este sistema estarán más directamente relacionados con la respuesta proliferativa que en la compensación funcional a corto plazo.

Esto nos ofrece la posibilidad de conocer cuales son los sucesos concretos necesarios para la activación proliferativa, al comparar los cambios observados en la fase prerreplicativa de ambos modelos.

En este trabajo presentamos primero un estudio de la cinética de entrada a la síntesis de DNA y a la mitosis después de la activación con la solución T.A.G.H., y en segundo lugar un estudio de las variaciones de los niveles de calcio tanto en el interior de la célula como en el plasma, y su posible relación con la actividad de la enzima (Ca^{++} - Mg^{++})-ATPasa que es uno de los mecanismos responsables del transporte de calcio a través de la membrana plasmática. La actividad de este enzima se ha determinado en fracciones puras de membrana plasmática de los hepatocitos aislados a distintos tiempos después de la activación con la solución T.A.G.H..

Material y Métodos

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 5-7 semanas de edad con un peso medio corporal de 150-

200 gr. La infusión de la solución T.A.G.H. (10 ml.) conteniendo 100 μ gr de 3-3'-5 triyodotironina, 130-150 mgr. de hidrolizado de caseína, 1 mgr. de glucagón y 100 U.S.P. de heparina en 0,15 M de NaCl a pH=7,2 se realiza por la vena de la cola a un flujo constante de 3,3 ml/hora. Los controles se realizan inyectando exclusivamente la solución salina.

La síntesis de DNA in vivo se mide por la incorporación de $[H^3]$ -timidina a una dosis de 0,5 μ Ci/gr de peso corporal, siendo utilizado en la determinación de los ácidos nucleicos el método descrito por Burton (1956).

El porcentaje de células marcadas y células en mitosis se obtienen a partir de un estudio histológico utilizando el proceso autorradiográfico.

El contenido de calcio en el tejido hepático, y en el plasma, se mide por espectrofotometría de absorción atómica.

Las fracciones de membrana plasmática se obtienen según el método descrito por Bachmann et al (1977). La actividad específica de la enzima $(Ca^{++}-Mg^{++})$ -ATPasa se ha medido por el método descrito por Lotersztajn et al (1981). El contenido proteico de las fracciones puras de membrana se ha determinado por la técnica descrita por Lowry et al (1951).

Resultados

En el estudio cinético de la entrada a la síntesis de DNA, vemos que durante las primeras 52 horas después de la inyección de la solución T.A.G.H., la radiactividad asociada al DNA presenta tres picos máximos: los dos primeros muy juntos y casi de la misma intensidad uno a las 24 horas y otro a las 32 horas; y un tercer pico de menor intensidad que aparece a las 44 horas. (Figura nº 1a).

En los contajes efectuados en las preparaciones autorradiográficas vemos que el porcentaje de células marcadas a lo largo de las 52 horas estudiadas, presentan igualmente 3 picos máximos, el primero a las 24 horas, el segundo a las 36 horas, y el tercero a las 44 horas. (Figura nº 1c).

El índice mitótico nos da 2 picos máximos, uno a las 32 horas que corresponde al grupo de células que tenía su máximo de marcaje a las 24 horas, y entran en mitosis 8 horas más tarde; un segundo máximo lo encontramos a las 44 horas que corresponde a las células cuyo máximo de marcaje aparecía a las 36 horas estando asimismo 8 horas desplazado en el tiempo. Un tercer pico de menor intensidad pero claramente significativo aparece a las 24 horas pero no va precedido por ningún pico de síntesis de DNA. (figura nº 1b).

La infusión de la solución T.A.G.H. provoca una hipocalcemia, con un va-

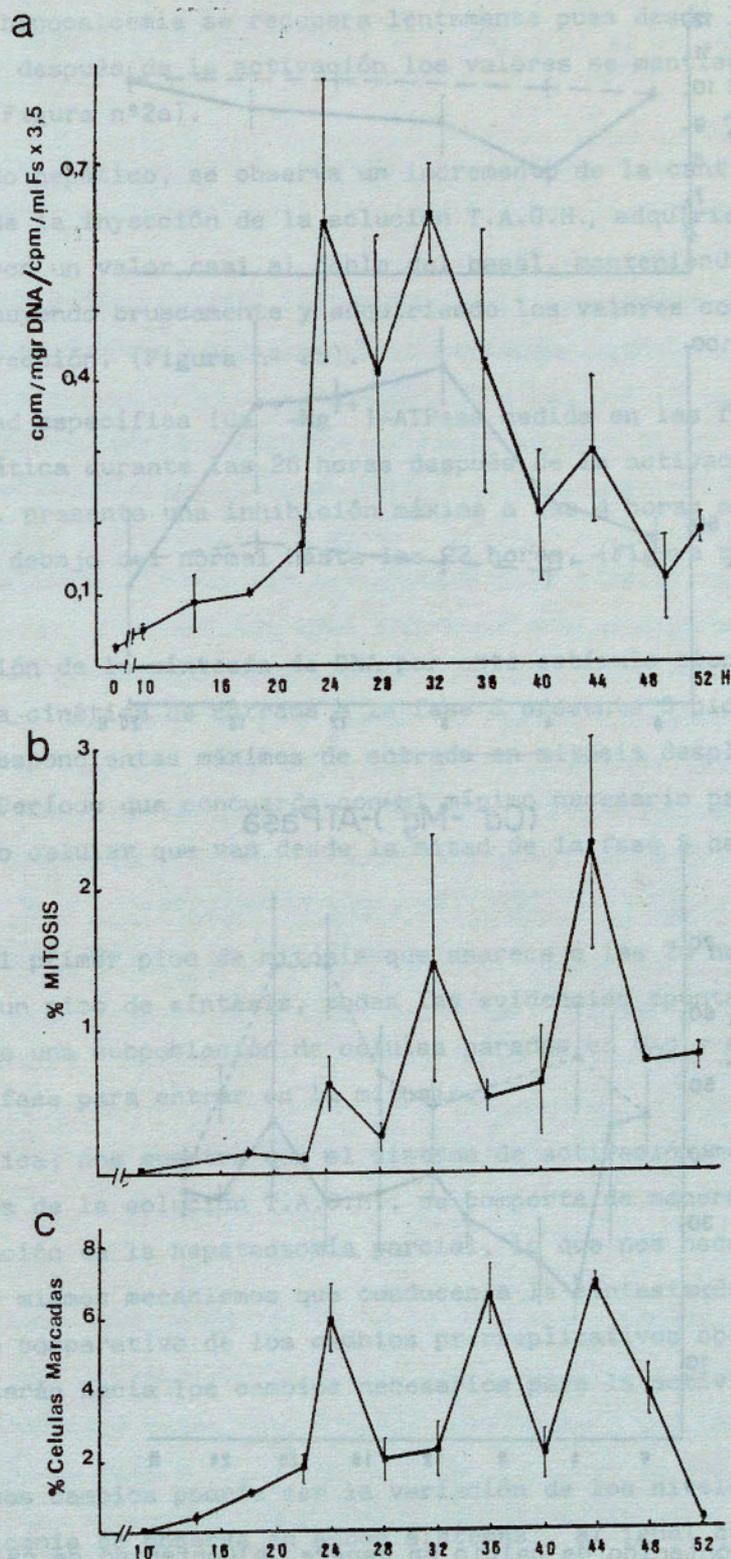


Figura n° 1: a) Radiactividad asociada al DNA durante las 52 horas después de la infusión con la solución T.A.G.H. b) Porcentaje de células en mitosis. c) Porcentaje de células marcadas.

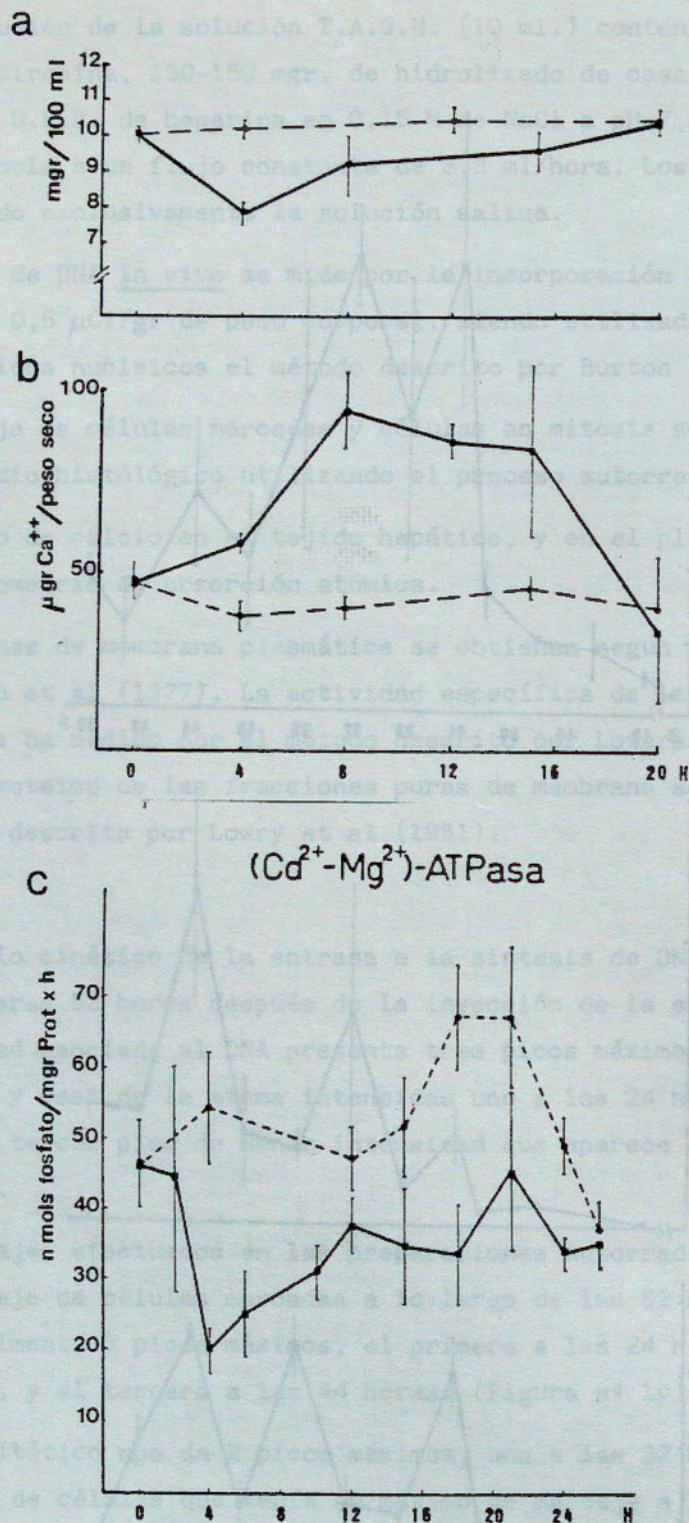


Figura n° 2: a) Contenido de calcio en sangre .b)Contenido de calcio en hígado.c)Actividad específica de la enzima (Ca⁺⁺-Mg⁺⁺)-ATPasa en las fracciones de membrana plasmática.(-----) Ratas inyectadas con solución salina. (—) Ratas inyectadas con solución T.A.G.H.

lor mínimo a las 4 horas de la inyección, la disminución es del orden de dos unidades. Esta hipocalcemia se recupera lentamente pues desde las 6 horas hasta las 20 horas después de la activación los valores se mantienen por debajo de lo normal. (Figura nº2a).

En el tejido hepático, se observa un incremento de la cantidad de calcio a las 4 horas de la inyección de la solución T.A.G.H., adquiriendo su máximo a las 8 horas con un valor casi el doble del basal, manteniéndose hasta las 15 horas, disminuyendo bruscamente y adquiriendo los valores control a las 20 horas de la inyección. (Figura nº 2b).

La actividad específica $(Ca^{++}-Mg^{++})-ATPasa$ medida en las fracciones de membrana plasmática durante las 26 horas después de la activación con la solución T.A.G.H. presenta una inhibición máxima a las 4 horas manteniéndose en valores por debajo del normal hasta las 22 horas. (Figura nº 2c).

Discusión

La iniciación de la síntesis de DNA por este estímulo tiene lugar a las 16-18 horas. La cinética de entrada a la fase S presenta 3 picos máximos, estando sus correspondientes máximos de entrada en mitosis desplazados 8 horas en el tiempo. Período que concuerda con el mínimo necesario para recorrer las fases del ciclo celular que van desde la mitad de la fase S hasta el inicio de la mitosis.

Respecto al primer pico de mitosis que aparece a las 24 horas sin estar precedido por un pico de síntesis, todas las evidencias apuntan al hecho de que se trate de una subpoblación de células paradas en $G_0/2$ y solo requieren salir de esta fase para entrar en la mitosis.

Esta cinética, nos muestra que el sistema de activación mediante la infusión endovenosa de la solución T.A.G.H., se comporta de manera similar al sistema de activación de la hepatectomía parcial, lo que nos hace pensar que desencadenan los mismos mecanismos que conducen a la síntesis de DNA. Por lo que el estudio comparativo de los cambios prerreplicativos observados en ambos nos orientarán hacia los cambios necesarios para la actividad proliferativa.

Uno de estos cambios podría ser la variación de los niveles de calcio; ya que la hipocalcemia se observa en ambos sistemas, al igual que la inhibición de la actividad específica de la $(Ca^{++}-Mg^{++})-ATPasa$. Si superponemos las gráficas del contenido hepático de calcio y la actividad de la enzima $(Ca^{++}-Mg^{++})-ATPasa$, concuerdan estrechamente pudiendo deducir que la acumulación de calcio puede ser debida en parte a una disminución de una salida de calcio al espacio extracelular por una inhibición de la bomba encargada de su extracción.

Estos resultados concuerdan con el modelo postulado por Whitfield et al (1982) en el que se considera necesaria una acumulación intracelular de calcio para que se produzca la iniciación de la replicación del DNA.

Bibliografía

- *BUCHER NLR, PATEL U and COHEN S.(1978) Hormonal factors concerned with liver regeneration. In "Hepatotropic Factors" Ciba Foundation symposium 55. Ed. Elsevier north Holland p. 95-110.
- *SHORT J, BROWN R.F, HUSAKAVA A, GILBERTSON J.R, ZEMEL R; AND LIEBERMAN I. (1972). Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. The J. Biol. Chem 247, 1757-1766.
- *BURTON K .(1956) A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. vol 62, 315-323.
- *BACHMANN W, HARMS E, HASSELS E, HENNINGER H and REUTTER W.(1977). Studies on rat liver plasma membranes . Biochem J.166, 455-462.
- *LOTERTZTAJN S, HANOUNE J, and PECKER F.(1981). A high affinity calcium stimulated magnesium dependent ATPase in rat liver plasma membrane.J. Biol. Chem 256,11209-11215.
- *LOWRY O.H.,ROSENBROUGH N.J.,FARR A.L.and RANDALL R.J.(1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent.J. Biol. Chem 193, 265-275.
- *RIXON R.H.and WHITFIELD J.F. (1982) An early mitosis determining event in regenerating rat liver and its possible mediation by prostaglandins or thromboxane. J. of cellular physiology 113,218-288.