

Estudi de la cinètica d' entrada a la fase S dels hepatòcits de rates de 10 dies induïda per la injecció subcutània d' una solució alcalina de caseïna.

E. Rius, M.J. Coll, J. Serratosa, D. Estadella, M.J. Pujol i J. Domingo.

Departament d' Histologia i Biologia Cel·lular. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Casanova 143. Barcelona-36.

Introducció

Un nou mètode d' activació de la proliferació hepatocel·lular va ser descrit per Nadal (1970). En rates Wistar de 8-10 dies la injecció subcutània d' una solució alcalina de caseïna determina l' aparició d' una ona d' hepatòcits que, de manera sincrònica, inicien la síntesi de DNA. L' índex S dels hepatòcits és del 4% en els animals control. En els injectats amb caseïna, baixa lleugerament les primeres 12 hores i comença a incrementar-se a partir de les 15 hores. A les 18 assoleix els valors màxims (20%). Es manté fins a les 23-24 hores i a continuació baixa fins a valors inferiors als controls, mantenint-se així durant un llarg període (120 hores). L' ona de síntesi de DNA ve seguida d' una ona mitòtica que té un pic màxim a les 27 hores. Un resultat similar es produeix quan injecten altres productes no relacionats químicament amb la solució de caseïna, però que igual que aquesta produeixen una reacció inflamatòria local en el lloc de la injecció.

Hem reproduït aquest sistema de sincronització en el nostre laboratori utilitzant rates Sprague-Dawley. Els resultats que presentem en aquest treball corresponen a la caracterització cinètica de la resposta proliferativa obtinguda. Hem mesurat la incorporació de H^3 -Timidina al DNA del fetge a diferents temps després de la injecció de la solució de caseïna i també l' índex S i l' índex mitòtic a dos temps en que la radiactivitat està incrementada (20 i 24 hores).

Material i Mètodes

Utilitzem rates Sprague-Dawley de 8- 10 dies que pesen uns 19-23 g.

La sincronització l'hem fet segons la pauta descrita per Nadal. Al temps $t=0$, un grup d'animals reben una injecció subcutània d'una solució que conté 3,5% de caseïna en NaOH 0,3%, a una dosi de 20 μ l/ g. de pes corporal. El grup d'animals que serveixen com a controls són injectats amb la mateixa dosi de suero fisiològic. La distribució d'animals tractats i control la fem de manera que per cada determinació tinguem un grup d'animals tractats amb caseïna i un grup control, procedents tots ells de la mateixa mare. Després de la injecció, els animals es deixen amb la mare fins el moment del sacrifici.

A diferents temps després del tractament, les rates són injectades amb H^3 -Timidina d'activitat específica 5 Ci/ mM, a la dosi de 0,5 μ Ci/ g. de pes corporal i sacrificades per decapitació mitja hora després. S'extreu el fetge i s'agafen mostres per a la determinació de la radiactivitat associada al DNA i per a la determinació histològica de l'índex S i l'índex mitòtic.

Per la determinació de la radiactivitat específica, el DNA és extret i quantificat segons el mètode de Schneider (1945), modificat per Burton (1956). Les comptes per minut de la fracció d'àcids nucleics són mesurades mitjançant comptador de centelleig líquid.

L'índex S i l'índex mitòtic són mesurats a partir de talls de 4-5 μ m. sotmesos a una autorradiografia segons la tècnica convencional. Baserga (1969). El nombre de cèl.lules marcades i el nombre de mitosis l'hem determinat comptant de 5000 a 6000 cèl.lules a cada mostra.

Resultats

-Radiactivitat específica del DNA- Al determinar la radiactivitat específica del DNA es troba molta variabilitat, tant entre animals no germans com entre diferents experiments. Per tal de compensar aquesta variabilitat, la radiactivitat específica del DNA dels diferents animals s'expressa relativament a la mitja dels animals control germans. Expressem la variació d'aquesta relació a les diferents hores després de la injecció. (Fig. 1). La radiactivitat específica del DNA dels animals injectats amb caseïna es manté propera als controls durant les primeres 8 hores. A les 12 hores està lleugerament per sota dels valors control. A partir de les 15-16 hores s'observa un increment progressiu que arriba al màxim a les 22 hores, en que assoleix valors que són el doble dels controls. A partir de les 24 hores comença a disminuir, a les 28 arriba als valors control i segueix disminuint. A les 36 hores els valors estan encara per sota dels controls. Els valors individuals dels animals control es desvien poc de la seva mitja (± 1 per definició).

-Índex S i índex mitòtic- L'índex S dels hepatòcits de les rates injectades amb caseïna és del 10%, tant a les 20 com a les 24 hores. En els controls és d'un 4% (Taula I). L'índex mitòtic a les 20 hores és pràcticament igual en els caseïnats i en els controls. A les 24 hores és lleugerament superior en els caseïnats (0,6%) que en els controls (0,2%).

La comparació dels resultats individuals amb la mitja dels controls de la mateixa mare, tal i com ho hem fet en el cas de la radiactivitat específica indica que a les 20 i 24 hores l'índex S en els caseïnats és 2,3-2,8 vegades el valor dels controls, mentre que l'índex mitòtic que no és significativament diferent a les 20 hores s'incrementa 2,7 vegades a les 24 hores (Taula I).

T	I _S %	I _M %	I _S (relatiu)	I _M (relatiu)	n
20h. cas.	10,18 ± 2,57	0,07 ± 0,05	2,32 ± 0,90	0,65 ± 0,40	5
20h. sal.	4,65 ± 1,12	0,11 ± 0,06	1,00 ± 0,18	1,00 ± 0,59	7
24h. cas.	10,70 ± 3,00	0,62 ± 0,22	2,80 ± 0,76	2,74 ± 0,65	5
24h. sal.	3,74 ± 0,80	0,22 ± 0,10	1,00 ± 0,21	1,00 ± 0,50	4

Taula I: Índex S (I_S) i índex mitòtics (I_M) dels hepatòcits de rates injectades amb solució de caseïna (cas.) o amb solució salina (sal.).

I_S relatiu = I_S (valors individuals) / I_S (mitja controls germans).

I_M relatiu = I_M (valors individuals) / I_M (mitja controls germans).

n = nombre de fetges comptats.

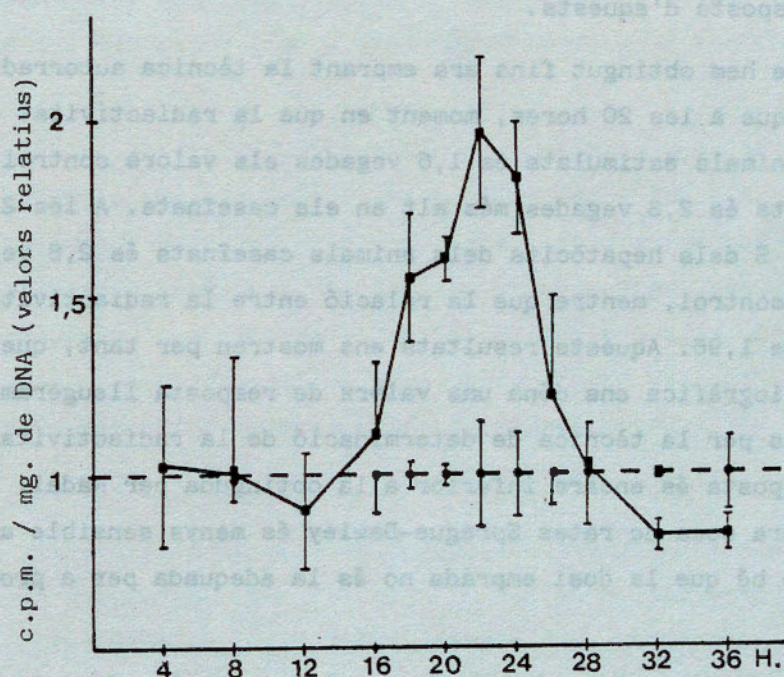


Figura 1: Comptes per minut per milígram de DNA en valors relatius

$\frac{\text{c.p.m./ mg. de DNA (valors individuals)}}{\text{c.p.m./ mg. de DNA (mitja controls germans)}}$ a les diferents hores després

de la injecció de solució de caseïna o de solució salina. ■ Caseïna ● Salina.

Discussió

Segons els resultats obtinguts, la variació de la radiactivitat específica del DNA en els animals tractats amb caseïna, segueix una cinètica molt semblant a la descrita per Nadal. Es manifesta una lleugera baixa fins les 12 hores, un increment a partir de les 15-16 hores, un màxim cap a les 21-24 hores i una posterior disminució per sota dels valors control. Però la magnitud d'aquesta resposta és, en el nostre cas, inferior ja que els valors en els punts màxims són solament el doble dels valors control, mentre que en els resultats descrits per Nadal, utilitzant la tècnica autorradiogràfica, obté en els punts màxims uns valors 5 vegades més elevats que els controls. Aquest fet podria ser degut a que la tècnica de determinació de la radiactivitat associada al DNA no fos tant sensible com la autorradiografia per determinar les variacions de síntesi del DNA dels hepatòcits. Això, es podria explicar per el fet de que en el fetge hi ha a més dels hepatòcits altres poblacions cel·lulars (cèl·lules de von Kuppffer, endotelials, etc.), la resposta de les quals possiblement, no coincideixi amb la dels hepatòcits, i que al estar presents en les mostres, ens enmascari la resposta d'aquests.

Els resultats que hem obtingut fins ara emprant la tècnica autorradiogràfica, indiquen però, que a les 20 hores, moment en que la radiactivitat específica del DNA dels animals estimulats és 1,6 vegades els valors control, l'índex S dels hepatòcits és 2,3 vegades més alt en els caseïnats. A les 24 hores, el valor de l'índex S dels hepatòcits dels animals caseïnats és 2,8 vegades el valor de l'índex S control, mentre que la relació entre la radiactivitat específica del DNA és de 1,96. Aquests resultats ens mostren per tant, que, si bé la tècnica autorradiogràfica ens dóna uns valors de resposta lleugerament superior als obtinguts per la tècnica de determinació de la radiactivitat específica, aquesta resposta és encara inferior a la obtinguda per Nadal. Això pot indicar que la nostra soca de rates Sprague-Dawley és menys sensible a aquest tipus d'inducció, o bé que la dosi emprada no és la adequada per a produir una resposta màxima.

Els resultats de la determinació dels índex mitòtics a les 20 i 24 hores, donen resultats en quant el temps també concordants amb els descrits per Nadal; mentre a les 20 hores l'índex mitòtic encara està baix, cap a les 24 començarien ja a aparèixer les primeres mitosis corresponents a les cèl·lules que cap a les 15-16 hores han iniciat la fase S.

Bibliografia

- BASERGA R., MALAMUD D. (1969). In "Autoradiography. Techniques and Application". Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers, Inc. New York. Chapter 2.
- BURTON K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315-323.
- NADAL C. (1970). Controle de la multiplication et de la polyploidie des hépatocytes du rat. Wilhelm Roux' Archiv. 166, 136-149.
- SCHNEIDER W.C. (1945). Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. J. biol.Chem. 161, 293.

Material i Mètodes

Les ratons utilitzats eren de la varietat Sprague-Dawley, pesant 100 g. Els ratons eren allotjats a un local amb temperatura constant de 22°C i amb llum natural. Els ratons eren alimentats amb una dieta estandaritzada i amb aigua potable a llibre. Els ratons eren sacrificats amb un cop de guillotina i els seus cossos eren congelats a -20°C fins a l'ús. Els ratons eren sacrificats a les 24 hores després de la injecció intraperitoneal de 0,5 ml d'una solució de 10% de formalina. Els ratons eren sacrificats a les 48 hores després de la injecció intraperitoneal de 0,5 ml d'una solució de 10% de formalina. Els ratons eren sacrificats a les 72 hores després de la injecció intraperitoneal de 0,5 ml d'una solució de 10% de formalina. Els ratons eren sacrificats a les 96 hores després de la injecció intraperitoneal de 0,5 ml d'una solució de 10% de formalina. Els ratons eren sacrificats a les 120 hores després de la injecció intraperitoneal de 0,5 ml d'una solució de 10% de formalina.