

Morfometria del nucli cel.lular durant la regeneració hepàtica.

J. Serratosa, D. Ros\*, M<sup>a</sup>. D. Estadella, M<sup>a</sup>. J. Pujol, E. Rius i J. Domingo.  
Departaments d'Histologia i Biologia cel.lular i Física Mèdica\*. Facultat  
de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona 36

Abstract

Cell Nucleus morphometry during hepatic regeneration.

There are many evidences on the importance of nuclear growth/chromatin changes related to cell proliferation. The aim of this work was to study the nuclear morphometry of hepatocytes during regeneration in the rat by means of light and electron microscopy in order to quantify the variations of nuclear volume and chromatin condensation.

From nuclear sections of normal and partial hepatectomized rats, the mean nuclear volume was calculated. Using a stereological analysis from Saltykov, nuclear size classes were identified and quantified. The mean nuclear volume increased by a factor of 1.8 during the activation process preceding the onset of DNA synthesis although nuclei from different size classes at quiescence showed different behaviour.

The changes in the volume density of nuclear electron-dense material, measured at different times after partial hepatectomy, are closely correlated with heterochromatin measurements from other authors.

Introducció

Al fetge de rata adulta jove, els hepatòcits constitueixen el 78% del volúm parenquimàtic i es troben a un estat quiescent, és a dir, fora del cicle cel.lular, gairebé en la seva totalitat. Al practicar una hepatectomia parcial, a les poques hores els hepatòcits entren al cicle i això es pot detectar mesurant la síntesi de DNA i el percentatge de mitosi durant el procés regeneratiu. Aquesta resposta deguda a la pèrdua de massa hepàtica és produïda per quasi bé tots els hepatòcits encara que es dona una asincronia dins de la població de manera que hi ha hepatòcits que responen més aviat que altres a l'estímul. Aquesta asincronia reflexa un diferent comportament dels hepatòcits que pot produir-se tant a la transició de l'estat de quiescència a l'estat proliferatiu com al llarg del cicle cel.lular.

Es coneixen molts factors que estan implicats a la resposta proliferativa dels hepatòcits durant el procés de la regeneració (Bucher, 1963). Alguns d'ells actuen ja poc temps després d'haver-se practicat l'hepatectomia parcial i estan relacionats amb el pas de l'estat quiescent al proliferatiu. A diferents tipus cel.lulars s'ha vist que hi ha una correlació entre el volum nuclear i l'entrada a la fase S del cicle cel.lular (Yen i Pardee, 1979). Els canvis funcionals durant el cicle cel.lular probablement depenen de l'estructura de la cromatina. Estudis in vitro suggereixen que hi ha una

descondensació de la cromatina conjuntament amb l'increment de la síntesi de RNA durant la transició de l'estat de quiescència ( $G_0$ ) al proliferatiu ( $G_1$ ) i una descondensació i augment de la síntesi de DNA durant la transició  $G_1$ -S (Giaretti et al., 1982).

En aquest treball hem volgut estudiar, mitjançant tècniques morfològiques si durant la regeneració hepàtica es produïen canvis als nuclis dels hepatòcits que afectessin al seu tamany o al grau de condensació de la seva cromatina, especialment durant la fase pre-replicativa.

#### Material i mètodes

S'han emprat rates Sprague-Dawley mascles de 200-250 grams de pes i de 8-10 setmanes d'edat. L'hepatectomia parcial s'ha realitzat segons el mètode descrit per Higgins i Anderson (1931).

Per microscopia òptica s'ha incluit el teixit amb EPON i s'han fet talls d'una micra de gruix. A partir de les fotografies obtingudes s'ha mesurat la superfície dels perfils nuclears dels hepatòcits amb un analitzador semi-automàtic d'imatges KONTRON-MOP 20. Per cada punt s'han mesurat 600 seccions de nuclis (200 per animal). L'excentricitat dels perfils estava compresa entre 0.8 i 1.0 per lo que s'han considerat esfèrics. El volum nuclear així com l'obtenció dels diferents tipus de nuclis s'han estimat a partir del diàmetre mig segons el mètode de Saltykov (1957). Essencialment aquest mètode es basa en: a) determinació de les seccions de diàmetre màxim. b) distribució dels diàmetres experimentals en un histograma en classes d'interval de progressió geomètrica de raó  $10^{-0.1}$  i amb límit superior al diàmetre màxim. c) càlcul de les seccions totals generades per els diferents tipus de nuclis. El nombre de seccions  $NA_1$ , que apareixen a l'interval superior de l'histograma únicament pot venir dels nuclis més grans. Una vegada calculat  $NA_1$  es repeteix el procés pel tipus de nucli immediatament inferior i així succesivament fins que ja no quedin seccions. A partir d'aquí es pot calcular el nombre de nuclis de cada tipus per unitat de volum.

Per microscopia electrònica a partir dels talls ultrafins s'han fotografiat 100 nuclis d'hepatòcits per animal utilitzant tres animals per cada punt a un augment final de X 15000. S'ha superposat un reticle de superfície de  $16 \text{ mm}^2$  d'unitat i s'ha valorat la superfície de material electrodens respecte a la superfície total de cada nucli. Els nuclis que presentaven nuclèol se'ls hi ha restat la seva superfície de manera que el càlcul de la quantitat de material electrodens s'ha realitzat utilitzant la relació :

$$A = \frac{\text{Superfície ocupada per material electrodens}}{\text{Superfície total del nucli} - \text{Superfície nuclèol}}$$

## Resultats

### A) Estimació del volum mig i classificació dels diferents tipus de nuclis

A la figura 1A es presenta la gràfica dels volums nuclears (a) estimats a partir del radi mig calculat per el mètode de Saltykov i les corbas de síntesi de DNA (b) i de mitosi (c) presentades a un treball anterior (Serrato-sa, 1981). A les 12 hores de regeneració hepàtica es pot veure un augment considerable del volum dels nuclis respecte als valors control (1.8 vegades). Durant el període comprés entre les 12 i les 24 hores el volum continua augmentant arribant a un valor màxim a les 24 hores (2.4 vegades respecte a les 0 hores) que coincideix amb el màxim de nuclis que són a la fase S. Després, el volum va disminuint a mesura que els nuclis van passant per la mitosi (el màxim de mitosis es troba a les 29-30 hores). No obstant, el volum nuclear mig durant les 48 primeres hores de la regeneració té sempre valors més alts que els valors trobats a les 0 hores (1.6 vegades respecte al control a les 48 hores).

A la Taula I es donen els resultats obtinguts pel mètode de Saltykov de les diferents classes de nuclis i el nombre que n'hi ha de cadascun per  $\mu^3 \times 10^6$ . Per tal de comprovar la seva evolució durant el procés regeneratiu s'han normalitzat aquests valors respecte als obtinguts a les 0 hores i són els que es presenten a la taula II on s'expressa el nombre de nuclis que hi ha de cada tipus sobre un total de 257 nuclis que són els que hi ha per  $\mu^3 \times 10^6$  a les rates normals.

diàmetre	volum	0 hores	12 hores	24 hores	36 hores	48 hores
12	904	--	14	58	25	12
9.53	453	33	154	--	131	110
7.57	227	205	10	--	15	42
6.01	113	19	--	--	--	--
	Total	257	178	143	171	164

Taula I. Nombre i tipus de nuclis trobats per  $\mu^3 \times 10^6$  a les diferents hores a les que s'ha fet l'estudi. El diam. es dona en  $\mu$  i el volum en  $\mu^3$ . Per cada hora s'han utilitzat tres animals dels quals s'han mesurat 600 seccions de nuclis d'hepatòcits (200 per animal).

A la figura 1B es presenten els resultats de la taula II que poden ser observats en relació a les corbes de síntesi de DNA i de mitosi de la part superior (1A, a i b). L'evolució dels diferents tipus de volums nuclears s'ha obtingut a partir dels següents passos: 1) Període 0-12 hores. A les 0 hores

diàmetre	volum	0 hores	12 hores	24 hores	36 hores	48 hores
12	904	--	21	104	38	19
9.53	453	33	222	153	197	172
7.57	227	205	14	---	22	66
6.01	113	19	--	---	--	--
	Total	257	257	257	257	257

Taula II. Normalització dels valors presentats a la taula I. S'ha referit a 257 nuclis que és el valor trobat a les 0 hores per poder comparar la seva evolució durant el procés regeneratiu.

hi han tres classes de nuclis amb una relació de volums 1:2:4 i a les 12 hores també es troben 3 classes de nuclis amb una relació de volums de 2:4:8. L'increment global de volum nuclear observat és de 1.8 vegades el valor control (figura 1A, a). S'ha considerat que és poc probable que un nucli passi a dues categories superiors de volum. Dels nuclis més petits ( $113 \mu^3$ ) que es troben a les 0 hores no n'hi ha cap a les 12, és a dir, el 100% han passat a una categoria superior de volum. Dels nuclis mitjans, com a mínim el 93% han passat a una categoria superior de volum i dels nuclis grans, com a màxim un 63% augmenten de volum. De manera que els nuclis petits i els mitjans a les 12 hores han augmentat més de volum que els nuclis grans. 2) Període 12-24 hores. A les 24 hores es troben dues classes de volums de nuclis en una relació de 4:8. El 100% dels nuclis petits han passat a una classe superior de volum. Dels nuclis mitjans, ho fan un 37.38% i dels grans, cap passa a una classe superior de volum ja que no apareixen classes superiors a  $904 \mu^3$ . 3) Període 24-36 hores. A les 36 hores les classes de volums són les mateixes que a les 12 hores. Cal considerar que en aquest estadi ja hi han cèl.lules que han passat per la mitosi, és a dir, que a més de l'augment de volum per part d'alguns nuclis s'ha de tenir en compte que d'altres han disminuït el seu volum com a conseqüència de la divisió cel.lular. El fet que cada nucli quan es divideix en proporciona dos fa que calgui modificar la normalització anterior per un factor de correcció  $(1+m)$  on  $m$  seria la proporció de cèl.lules que han passat per la mitosi. Considerant  $x$ , la proporció de nuclis grans que han passat per la mitosi i  $y$  la proporció de nuclis mitjans que passant a una categoria superior de volum i  $z$ , la proporció de nuclis mitjans que han passat per la mitosi, es pot plantejar un sistema d'equacions que contempli aquests factors i els resultats obtinguts durant aquest període de temps (resultats de la cinquena i sisena columnes de la taula II). S'ha trobat que únicament hi ha solucions possibles quan  $0.27 \leq m \leq 0.46$ . Aquest resultat està

d'acord amb l'índex mitòtic acumulat que hem calculat durant aquest període a partir dels resultats obtinguts de la corba de mitosis considerant que la duració d'aquesta és d'una hora. El valor  $m$ , calculat d'aquesta manera ens ha donat 0.29 i substituint-el en el sistema d'equacions es troba que el 58% dels nuclis grans (8v) es divideixen i dels mitjans (4v), un 9% es divideixen i un 4% augmenten a una categoria superior de volum.

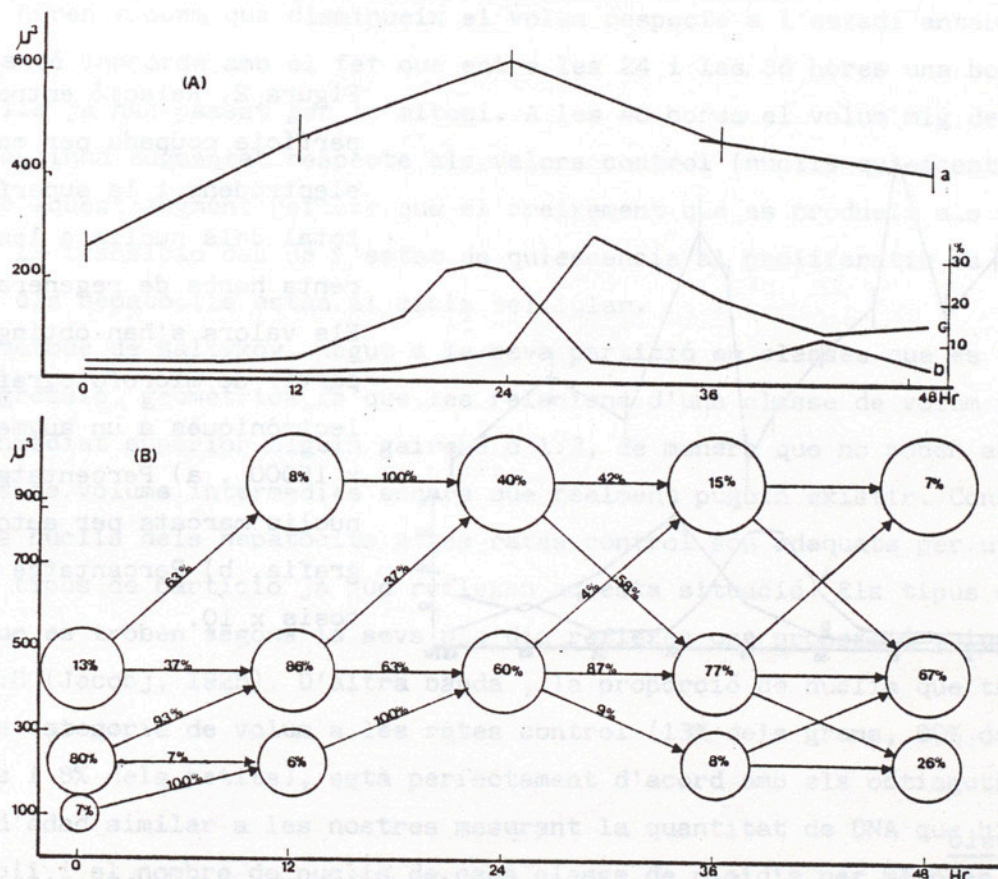


Figura 1. (A) : a) Corba que representa el volum nuclear calculat a partir del radi mig trobat a les diferents hores pel mètode de Saltykov. Al'abscissa hores de regeneració i a l'ordenada el volum en  $\mu^3$ . b) Corba de síntesi de DNA. A l'ordenada percentatge de nuclis marcats trobat per autorradiografia. c) Corba de mitosis. A l'ordenada percentatge de mitosis  $\times 10$ .

(B) : Evolució dels volums nuclears. Les rodones indiquen els diferents tipus de nuclis segons el seu volum nuclear en  $\mu^3$  (ordenada). Dins de cada cercle s'indica el % de nuclis que hi ha de cada tipus. Amb les fletxes, el % de nuclis de cada categoria de volum que pot haver passat a una categoria diferent o que es mantenen a la mateixa que tenien. Aquest esquema s'ha elaborat a partir dels resultats de la taula II seguint els passos explicats al text.

B) Valoració de la quantitat de material electrodens als nuclis durant la regeneració

A la figura 2 es donen els resultats obtinguts conjuntament amb les corbes de DNA i de mitosis. Es pot observar una disminució del material electrodens durant les sis primeres hores i un augment que retorna als valors control entre les 6 i les 12 hores. A partir d'aquest moment, es produeix una altra disminució que concorda amb la síntesi de DNA i un augment en el període que correspon al màxim de cèl.lules que es troben en mitosi.

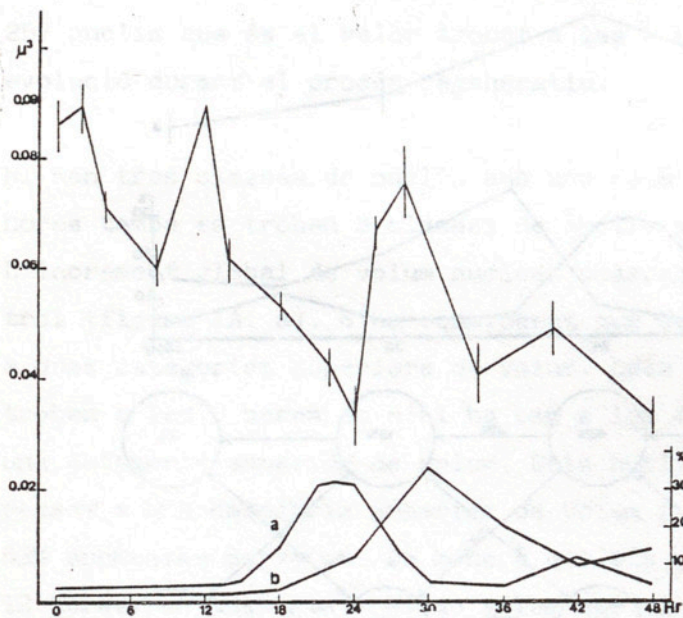


Figura 2. Relació entre la superfície ocupada per material electrodens i la superfície total dels nuclis a les diferents hores de regeneració. Els valors s'han obtingut a partir de microfotografies electròniques a un augment de  $\times 15000$ . a) Percentatge de nuclis marcats per autorradiografia. b) Percentatge de mitosis  $\times 10$ .

### Discussió

Hem comprovat que quan es fa un estudi comparatiu del volum mig dels nuclis dels hepatòcits, qualsevol dels mètodes que hi ha per estimar aquest valor a partir de seccions que provenen de cossos esfèrics, tots donen els mateixos valors relatius. Per tant, tots són adequats. Presentem únicament els valors obtinguts pel mètode de Saltykov ja que aquest permet classificar en diferents classes de volums les seccions que provenen de poblacions d'esferes de diferents tamany, que és el cas dels nuclis dels hepatòcits on és sap que hi ha nuclis  $2n$ ,  $4n$ ,  $8n$  (Jacobj, 1925) i que hi ha una relació directe entre el grau de ploïdia i el volum que tenen aquests diferents tipus de nuclis.

Es pot veure que hi ha un gran increment del volum nuclear a les 12 hores de regeneració (1.8 vegades el valor control). Aquest increment es produeix abans que els nuclis comencin a sintetitzar DNA, a la fase pre-replicativa. De manera que el pas de l'estat de quiescència dels nuclis al de síntesi de DNA vé caracteritzat per un augment considerable del volum nuclear. Es creu

que l'augment de volum nuclear es deu fonamentalment a l'acumulació neta de proteïnes (Lloyd et al., 1982). Entre les 12 i les 24 hores continua augmentant el volum mig dels nuclis. Durant aquesta fase, l'augment seria atribuïble principalment a la síntesi de DNA que té el seu punt màxim entre les 22 i les 24 hores. De manera que els resultats obtinguts de l'anàlisi morfològica concorden perfectament amb la cinètica de síntesi de DNA dels nuclis. A les 36 hores trobem que disminueix el volum respecte a l'estadi anterior i això també concorda amb el fet que entre les 24 i les 36 hores una bona part de nuclis ja han passat per la mitosi. A les 48 hores el volum mig dels nuclis continua augmentat respecte als valors control (nuclis quiescents). Pensem que aquest augment reflexa que el creixement que es produeix als nuclis durant la transició des de l'estat de quiescència al proliferatiu es manté mentre els hepatòcits estàn al cicle cel.lular.

El mètode de Saltykov, degut a la seva partició en classes que es troben en progressió geomètrica, fa que les relacions d'una classe de volum respecte l'inmediat superior siguin gairebé d'1:2, de manera que no poden apareixer classes de volums intermedies encara que realment puguin existir. Considerem que els nuclis dels hepatòcits a les rates control són adequats per utilitzar aquest tipus de partició ja que reflexen aquesta situació: Els tipus de nuclis que es troben segons la seva ploïdia reflexen una proporció volumètrica 2:4:8 (Jacob, 1925). D'altra banda, la proporció de nuclis que trobem de cada categoria de volum a les rates control (13% dels grans, 80% dels mitjans i 8% dels petits), està perfectament d'acord amb els obtinguts per rates d'edat similar a les nostres mesurant la quantitat de DNA que hi ha per nucli i el nombre de nuclis de cada classe de ploïdia per mètodes microespectrofotomètrics (Carriere, 1969). Això ens fa pensar que la partició és bona. A les 12 hores també hi han tres tipus de nuclis i tots han crescut passant a una relació volumètrica de 2:4:8, però no ho han fet de la mateixa manera: els petits el 100%, els mitjans el 93% mentre que els grans únicament el 63%.

A les 24 hores, solament es troben dues categories de volum. Aquí, una bona part dels nuclis estàn sintetitzant DNA i és evident que hi hauràn nuclis que estaràn entre  $2n$  i  $4n$  i altres entre  $4n$  i  $8n$ , però que el mètode de partició no pot classificar com a tals. De qualsevol manera, també queda reflexat que els nuclis es comporten diferentment segons el seu tamany: Tots els petits han passat a una categoria superior de volum mentre que dels grans cap ho ha fet ja que no hem trobat seccions superiors a 12 micres de diàmetre. A les 36 hores, cal considerar la reducció de volum deguda a la divisió cel.lular. En efecte, els resultats estimats així ho reflexen ja que tornen

a apareixer tres tipus de volums de nuclis amb una proporció 2:4:8. Dels nuclis que eren més grans a les 24 hores, el 58% s'han dividit i dels mitjans el 9%. Aquesta proporció relativament baixa podria ser explicada per l'existència dins la classe 4v de nuclis 8n que no han respost a l'estímul.

Respecte a la quantificació del material electrodens s'observa com a un estadi molt inicial després de l'hepatectomia hi ha una gran disminució que té el seu mínim valor a les 6 hores. Entre les 6 i les 12 hores hi ha un increment que condueix a valors semblants als control a les 12 hores. Aquests canvis es donen, per tant, abans de la síntesi de DNA, mentre que la disminució d'aquest material a partir d'aquest moment coincideix amb la síntesi de DNA. El material nuclear electrodens es compon essencialment de cromatina condensada o heterocromatina. Briane et al. (1978), a partir de cromatina extreta de rates normals i regenerants i mitjançant un assaig d'accessibilitat de la cromatina a la RNA polimerasa troben que a les 6 hores després de l'hepatectomia parcial hi ha una eucromatinització. A les 12 hores la quantitat d'eucromatina disminueix, per tornar a augmentar entre les 16-20 hores. La similitud d'aquests resultats amb els nostres demostre que hi ha una bona correspondència entre ambdós mètodes- funcional i morfològic- de quantitzar l'estat conformacional de la cromatina.

La subdivisió del procés d'activació proliferativa de cèl.lules quiescents en una primera etapa d'activació o d'adquisició de competència proliferativa (entrada al cicle cel.lular des de l'estat de quiescència) i a una segona de progressió cap a la fase de síntesi de DNA troba suport experimental en els estudis sobre l'evolució del contingut cel.lular de RNA i de la sensibilitat de la cromatina a la desnaturalització àcida (Darzynkiewicz et al., 1980) i també en les relacions entre activació proliferativa, cicle centriolar i factors de creixement (Tucker i Pardee, 1982). En el cas de la regeneració hepàtica, dues ones d'acumulació d'AMP cíclic amb màxims a les 4 i a les 12 hores marquen les corresponents etapes. Els nostres resultats sobre la morfometria del nucli de l'hepatòcit durant la regeneració concorden aproximadament amb aquest esquema: el creixement de volum nuclear entre les 0 i les 12 hores - clarament independent de la síntesi de DNA-, i del cicle de relaxació-condensació de la cromatina en el mateix interval correspondrien a la primera etapa i la relaxació de la cromatina a partir de les 12 hores a la segona. L'increment durant les primeres 12 h. podria ser explicat primerament per una relaxació de la cromatina i després per acumulació de RNA i proteïnes, doncs, durant aquesta etapa la síntesi de RNA augmenta considerablement (Fujikoa et al., 1963). Durant el període estudiat (48 hores) el volum nuclear no retorna als valors propis dels hepatòcits quiescents, la qual cosa concorda amb



el manteniment de l'estat de competència proliferativa fins al restabliment de la massa hepàtica inicial.

### Bibliografia

- BRIANE D., JALOUZOT R., GONTCHAROFF M. (1978). Variation du taux d'euchromatine au cours de la régénération du foie de rat. Biologie Cellulaire 31, 1, 1-6.
- BUCHER N.L.R. (1963). Regeneration of mammalian liver. Int. Rev. Cytol., 15, 245-300.
- CARRIERE R. (1969). The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. Int. Rev. Cytol., 25, 201-277.
- DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., MELAMED M.R. (1980). New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. Cytometry. 2, 98-108.
- FUJIOKA M., KOGA M., LIEBERMAN I. (1963). Metabolism of ribonucleic acid after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 238, 3401-3406.
- GIARETTI A., GAIS P., JUTTING U., RODENACKER K., DORMER P. (1983). Correlation between chromatin morphology as derived by digital image analysis and autoradiographic labeling pattern. Analytical and Quantitative Cytology. 2, 79-89.
- HIGGINS G.M., ANDERSON R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rats following partial surgical removal. Arch. Pathol., 12, 186-202.
- LLOYD D., POOLE R.K., EDWARDS S.W. (1982). The cell division cycle. Academic Press.
- SALTYKOV S.A. (1967). The determination of the size distribution of particles in an opaque material from a measurement of the size distribution of their sections. In Proceedings of the 2nd International congress for Stereology, Chicago, P. 163. Springer-Verlag, Berlin.
- SERRATOSA J. (1981). Caracterización de la entrada a la síntesis de DNA y a la mitosis durante la regeneración hepática en la rata: posible papel de la membrana plasmática del hepatocito en su control. Tesina, Universidad de Barcelona.
- TUCKER R.W., PARDEE A. B. (1980). Primary cilia and their role in the regulation of DNA replication and mitosis. In Cell Growth, Plenum Press. New York and London. P.365-376.
- YEN A., PARDEE A. (1979). Role of nuclear size in growth initiation. Science, 204, 1315-1317.