

Efectes de la Trifluoperazina sobre la regeneració hepàtica

M. Soriano., M^aR. Piñol., M^aJ. Coll., O. Bachs., C. Enrich., i M^aD. Estadella
Departament d'Histologia i Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina,
Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona - 36.

Abstract

Trifluoperazine effect on cell proliferation during liver regeneration

Several lines of evidence suggest that calcium ions are involved in later G₁ phase of the cell cycle for the completion of pre-replicative phase and the initiation of the DNA synthesis of eucaryotic cells in vivo and in vitro.

One of the possible ways of calcium's action is to form a complex with calmodulin. In order to know the role that these complexes play in the initiation of DNA synthesis and the content of the sialic acid bound to the sinusoidal plasma membrane, we have studied the effect of Trifluoperazine (TFP) on the proliferative activation after partial hepatectomy in the rat.

Since in TFP treated rats DNA synthesis has a delay of 10-12 hours respect to the normal response observed in not treated regenerating rats, DNA synthesis is dependent on calmodulin (CDR) concentration. Apart from the delay observed on the start of DNA synthesis, TFP produce a loss of synchrony on liver cell population response.

The period of time between cytosolic CDR increase and the beginning of DNA synthesis in hepatectomized rats is 12 hours, whereas in the hepatectomized rats injected with TFP is only 6 hours. Therefore it would be reasonable to think about the existence of some ways which are CDR independent and take place parallel to the CDR dependent ones in the pre-replicative phase.

According to our results the acid sialic content is in a way dependent on CDR concentration, possibly through a calcium dependent plasma membrane neuraminidase activity.

Introducció

La realització d'una hepatectomia parcial produeix l'activació proliferativa a les cèl·lules hepàtiques normalment quiescents, de manera que aquestes inicien la replicació del DNA, en el cas de la rata, aproximadament unes 16 hores després de la intervenció quirúrgica (Grisham, 1962). És per tant, durant les primeres 16 hores després de l'hepatectomia (fase pre-replicativa) quan als hepatòcits es produeixen els canvis intracel·lulars que condueixen a la replicació del DNA.

L'estudi de la fase pre-replicativa ha conduït al coneixement de l'existència d'un cert nombre de canvis intracel·lulars clarament implicats en el desencadenament de la replicació del DNA i d'altres dels que actualment no es coneix la seva implicació en el procés d'activació proliferativa (Whitfield et. al 1980). Malgrat el coneixement d'aquesta serie de canvis intracel·lulars, existeix una gran ignorancia pel que fa a la relació causal en-

tre els diferents canvis. A més, també manca definir si les reaccions implicades en el desencadenament de la replicació del DNA s'estructuren en forma de seqüència única o bé, per el contrari existeixen diferents cadenes de reaccions que transcorren paral·leles durant la fase pre-replicativa i que finalment conflueixen per a iniciar la biosíntesi del DNA.

Els objectius d'aquest treball han estat en primer lloc l'estudi in vivo de la dependència de la biosíntesi del DNA de l'increment de la concentració citosòlica de calmodulina (CDR) que s'observa entre les 6 i les 12 hores després de l'hepatectomia parcial (MacManus et.al. 1981), i en segon lloc l'estudi de la dependència de la disminució d'àcid siàlic unit a la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica que s'observa a partir de les 6 hores post-hepatectomia d'aquesta ona de CDR. (Enrich, 1983).

Aixó s'ha realitzat injectant una droga anti-calmodulina, la trifluoperazina (TFP) 4 hores després de la intervenció quirúrgica i analitzant el retard de la disminució d'àcid siàlic i de la biosíntesi del DNA que s'ha produït.

Material i mètodes

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat rates Sprague-Dawley mascles d'un pes entre 200-250 grams.

L'hepatectomia parcial s'ha realitzat segons la tècnica descrita per Higgins i Anderson (1931) utilitzant Ketolar^R com agent anestèsic.

La biosíntesi de DNA s'ha determinat injectant timidina tritiada una hora abans del sacrifici de l'animal i mesurant l'activitat associada al DNA segons el mètode descrit per Blazsek i Gaal (1978).

La trifluoperazina ens ha estat gentilmente proporcionada per els laboratoris Smith Kline & French, i s'ha injectat intraperitonealment 4 hores després de l'hepatectomia parcial a una dosi de 60 mgr/Kg de pes corporal.

L'aïllament de les fraccions de membrana plasmàtica sinusoïdal s'han realitzat utilitzant el mètode descrit per Wisher i Evans (1975).

El contingut d'àcid siàlic unit a la membrana plasmàtica s'ha mesurat emprant la tècnica descrita per Aminoff (1961).

El contingut proteic de les mostres de membrana plasmàtica s'ha mesurat segons el mètode de Lowry et.al. (1951).

La determinació de la concentració citosòlica de calmodulina s'ha realitzat utilitzant la tècnica descrita per Sharma i Wang (1979).

Resultats

L'estudi cinètic de l'entrada a la síntesi de DNA mostra que els animals control als quals s'ha injectat solució salina 4 hores després de l'operació, presenten una corba amb dues onades: la primera que va des de les 20 a les 28 hores i té un màxim a les 24 hores; i la segona va de les 32 a les 48 hores i té el màxim a les 36 hores (Figura 1a). Aquesta corba la considerarem com a patró normal de referència.

Quan a les rates hepatectomitzades se'ls hi injecta TFP 4 hores després de l'operació, la corba obtinguda és molt diferent a la corba patró. Els valors es mantenen propers als valors control fins a les 24 hores, punt a partir del qual comencen a augmentar donant una única ona en la que els valors màxims són aproximadament un terç respecte al primer pic de la corba patró, però que es manté en el temps.

Comparant l'àrea de la primera onada de la corba de referència amb l'obtinguda en aquest segon cas, es veu que són pràcticament iguals, la qual cosa indica que el tractament amb TFP produeix un retard a la síntesi de DNA a més d'una pèrdua de sincronia que produeix una corba més ampla i plana. (Figura 1a).

Les rates a les quals s'ha injectat solució salina 4 hores després de l'hepatectomia parcial tenen una concentració alta de CDR en el citosol hepàtic des de les 8 a les 12 hores post-hepatectomia parcial, baixant aquesta concentració a valors control a les 16 hores.

A les rates que han sigut injectades amb TFP 4 hores després de una hepatectomia parcial trobem una concentració de CDR al citosol que es manté baixa des de les 8 a les 16 hores i que s'incrementa de manera significativa respecte al control a les 20 hores post-hepatectomia.

La acció de la TFP produeix un retard de 10 hores en l'increment de la concentració de CDR (Figura 1b).

El contingut d'àcid siàlic unit a la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica, baixa a les 6 hores post-hepatectomia parcial, mantenint-se en valors inferiors als control fins a les 20 hores. (Figura 2).

Quan les rates hepatectomitzades son tractades amb TFP, el valor d'àcid siàlic es manté a nivells control fins a les 12 hores, baixant a les 16 hores. Aquest descens mostra un retard de 10 hores respecte al obtingut a les rates hepatectomitzades que no han estat tractades amb TFP.

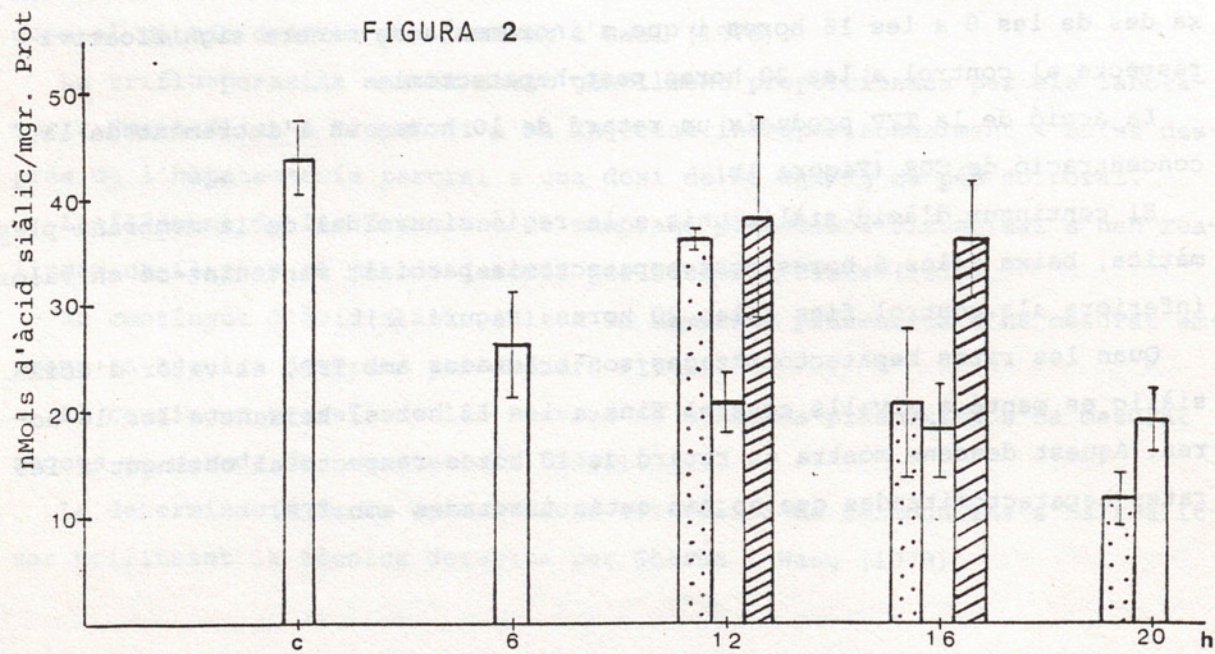
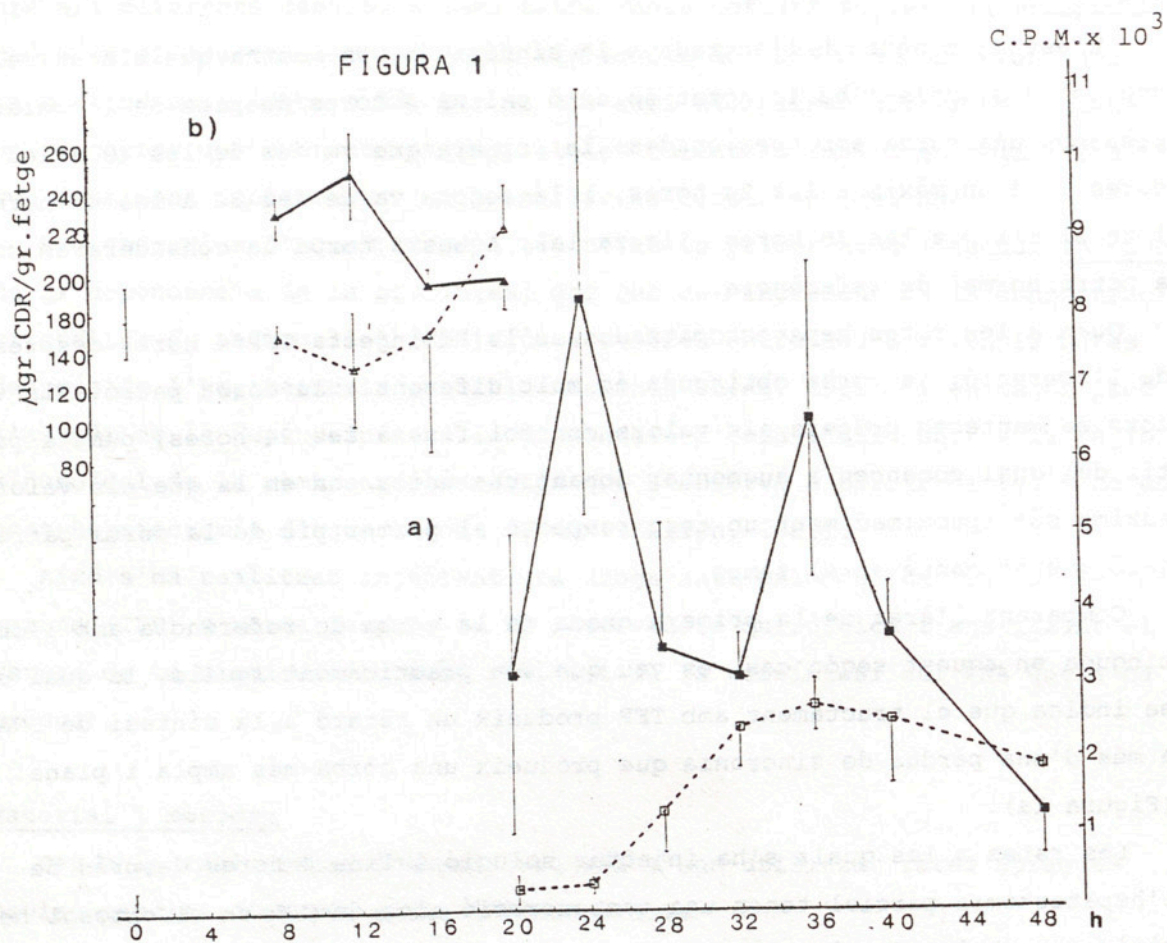


Figura 1: a) radiactivitat associada al DNA expressada en c.p.m. Rates hepatectomitzades injectades amb solució salina 4 hores després de l'operació (■). Rates injectades amb TFP 4 hores després de l'operació. (□).

b) Concentració de CDR citosòlica, en mgr CDR/gr. fetge. Rates hepatectomitzades injectades amb solució salina 4 hores després de l'operació (▲). Rates hepatectomitzades injectades amb TFP 4 hores després de l'operació. (△).

Figura 2: Contingut d'àcid siàlic de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica expressat en nmols d'àcid siàlic/mgr. Prot. Rates hepatectomitzades injectades amb solució salina 4 hores després de l'operació (barra llisa). Rates injectades amb TFP 4 hores després de l'operació (barra puntejada). Laparatomies (barras ombrejada).

Conclusions.

Dels resultats obtinguts podem concloure el següent:

La iniciació de la síntesi de DNA és depenent de CDR, demostrat per el fet de que al mantenir baixa la concentració de CDR provocada per la injecció de la droga, s'obté un retard en el inici de la síntesi de DNA de unes 10-12 hores acompanyat de una perdua de sincronia del estimul.

Per altra banda, després d'una hepatectomia parcial en condicions normals, la concentració de CDR comença a pujar a les 4 hores (MacManus et.al. 1981) i la síntesi de DNA s'inicia a les 16 hores es a dir amb un interval de 12 entre ells. Però si s'injecta TFP 4 hores després de l'hepatectomia parcial els valors de CDR no comencen a pujar fins a les 20 hores i la síntesi de DNA s'inicia a les 26 hores post-hepatectomia; en aquest cas el interval de temps entre ambdues s'ha reduït a 6 hores.

L'hipòtesi per explicar aquesta reducció del interval entre ambdues seria l'existència de diferents canals de reacció necessaris per l'inici de la síntesi de DNA que transcorren paral·lelament durant la fase pre-replicativa. En el cas de no ser dependents de calmodulina, els seus productes s'anirien acumulant a la cèl.lula, i en el moment que la concentració de CDR fós l'adequada estarien avançats molts dels passos necessaris per l'inici de la síntesi de DNA amb la conseqüent reducció de temps.

El contingut d'àcid siàlic de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica sembla que també depèn de la concentració de CDR, ja que l'administració de TFP produeix un retard en la seva disminució després d'una hepatectomia. Es possible que aquesta disminució d'àcid siàlic sigui deguda a l'increment de l'activitat de neuraminidases dependents de calci i calmodulina.

Bibliografia

- * GISHAM I.W (1962).Morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: Autoradiography with thymidine-H³. Cancer Res.22, 842-849.
- * WHITFIELD J.F.,BOYNTON A.L., MACMANUS J.P.,RIXON R.H., SIKORSKA M.,TSANG B, WALKER P.R. (1980).The role of calcium and cycle AMP in cell proliferation Ann. New York Acad Sci 339, 216-240.
- * MACMANUS J.P.,BRACELAND B.M.,RIXON R.H.,WHITFIELD J.F.,MORRIS M.P.,(1981) FEBS Letters, 133,99-102.
- * ENRICH C. (1983). Estudio de la membrana plasmática de la región sinusoidal del hepatocito durante la regeneración. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- * HIGGINS G M.,ANDERSON R.M.,(1931). Experimental Pathology of the liver. Arch. Pathol. 12, 186-202.
- * BLAZSEK T., GAAL D. (1978). Endogenous thymic factors regulating cell proliferation and analisis of then mechanism of action. Cell tissue kinet. 11, 265-272.
- * WISHER M.H.,EVANS W.H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte membrane. Biochem. J. 146, 375-388.
- * AMINOFF D . (1961). Methods for the quantitative estimation of N- acetylneuraminic acid and their application to hydrolisates of sialomucoid. Biochem J. 81, 384-392.
- * LOWRY O.H., WANG J.H.,(1951). Protein measuremen with the folin phenol reagen. J. Biochem. 193, 206-209.
- * SHARMA R.H., WANG J.H., (1978). Preparation and assay of the calcium dependent modulator protein. Adv. Cyclic Nucleot.Res. 10, 187-198.