

ACCION DEL EXTRACTO DE HIGADO DE RATONES PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADOS SOBRE LA ACTIVIDAD MITOTICA DE LOS ENTEROCITOS DEL RATON JOVEN

JOSE M. SURUR, AMADO F. BADRAN

Cátedra A de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Resumen En un trabajo anterior demostramos que el plasma de ratones adultos obtenido 36 horas post hepatectomía parcial, ejerce un efecto inhibitorio en la actividad mitótica de los enterocitos crípticos duodenales del ratón joven. En el presente trabajo se analiza la posibilidad de que dicho efecto se origine en algún factor del hígado regenerante. Para ello se estudia la acción del extracto de hígado de ratones adultos (90 días) obtenido 36 horas después de su hepatectomía parcial (70%), sobre la actividad mitótica de los enterocitos de ratones jóvenes, analizando 3 niveles celulares de las criptas duodenales. Se emplearon 36 ratones hembra de la cepa C3H/S de 27 días de edad la mitad de los cuales recibió, a las 16:00 horas, una inyección intraperitoneal de solución fisiológica, y los restantes extracto hepático (0,01 ml/g). Lotes de 8 animales de cada grupo se sacrificaron a las 08:00/16, 12:00/20 y 16:00/24 (hora del día/horas post tratamiento) previa inyección de colchicina ($2\mu\text{g/g}$) 4 horas antes. Los resultados, expresados como metafases colchicínicas por mil núcleos, demuestran que la actividad mitótica, en los animales tratados con extracto, es significativamente menor con respecto a los testigos. El efecto inhibitorio se manifiesta en los niveles celulares de 1 a 4 y de 5 a 12 células de las criptas analizadas. En el nivel superior, de 13 a 20 células, no se aprecia ninguna modificación de la actividad proliferativa. Esta inhibición de la actividad mitótica de los enterocitos de las zonas basal y media de las criptas duodenales es probablemente debido a factores hepáticos difusibles.

Palabras clave: hepatectomía, extracto hepático, proliferación celular

Los mecanismos de control de los procesos de proliferación celular, aún no han sido totalmente aclarados. Se han emitido varias teorías que postulan la presencia de factores promotores y/o inhibidores autorreguladores del crecimiento, en las poblaciones celulares^{1, 2}. Por otra parte en nuestro laboratorio hemos demostrado que el resultado de la administración del extracto hepático es función del estado de los animales recep-

tores³ y también que ejerce una acción inhibitoria sobre el índice mitótico, la síntesis y el contenido de ADN, el contenido de ARN y proteínas del hígado regenerante⁴. Del mismo modo demostramos que el plasma de ratones adultos intactos y el obtenido 36 horas después de la hepatectomía subtotal (70%) ejercen un efecto inhibitorio de la actividad mitótica de los hepatocitos y enterocitos del ratón joven⁵.

La cripta duodenal, constituye uno de los modelos más adecuados para los estudios de cinética celular, debido a que permite analizar a qué nivel se pone en evidencia un eventual efecto, empleando el modelo de Loeffler y Potten, que toma en cuenta la ubicación, el número y las series proliferativas de las *stem cells*⁶⁻⁹.

Recibido: 15-IV-1996

Aceptado: 20-XI-1996

Dirección postal: Dr. José M. Surur, Cátedra A de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Calles 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina

En el presente trabajo se estudia el comportamiento proliferativo de la población enterocítica en ratones tratados con extracto de hígado de ratones adultos, obtenido a las 36 horas después de su hepatectomía parcial, intentando establecer si el tejido hepático tiene algún grado de intervención en el efecto demostrado por el plasma de animales en similares condiciones experimentales.

Material y métodos

Animales: Se utilizaron ratones endocriados de la cepa C3H/S, colocados en condiciones de estandarización para análisis de periodicidad (los valores de la variable estudiada presentan variación circadiana). Los animales se aislaron en un cuarto «ad hoc» en cajas individuales con agua y comida ad libitum, bajo un régimen de iluminación con luz artificial directa de 06:00 a 18:00 horas, alternando con doce horas de oscuridad (de 18:00 a 06:00 hs.), a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Dadores de Extracto: 10 ratones adultos de 90 días, hepatectomizados (70%) a las 14:00, hora correcta de operación establecida previamente por nuestro grupo de trabajo¹⁰.

Extracto: Sobrenadante 02:00/36 HD/HPH (Hora del Día/ Horas Posthepatectomía) del homogeneizado de hígado (1 gramo de hígado en 10 ml de agua destilada) con 10 golpes de émbolo en 30 segundos, utilizando un Potter Dual en baño de hielo, centrifugado a 4°C , a 4000 rpm, durante 10 minutos.

Receptores de solución fisiológica (SF) y extracto (E): En total se utilizaron 36 hembras jóvenes de 27 ± 2 días de edad, 6 por punto de control. La mitad de los animales, testigos internos o controles, recibió SF. La otra mitad, experimentales o tratados, recibió extracto hepático.

Diseño Experimental

Administración de extracto y solución fisiológica: Se buscó un efecto en el pasaje G1-S del ciclo celular, por lo que se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 0,01 ml de extracto o de solución fisiológica, por gramo de peso corporal del receptor, a las 16:00 horas, antes de la parte ascendente de la curva de síntesis de ADN.

Administración de colchicina: para detener las mitosis en metafase, se administraron 2 μg de colchicina (en 0,01 ml de agua destilada) por gramo de peso, por vía intraperitoneal, 4 horas antes del sacrificio de los animales.

Control: se controlaron las metafases colchicínicas en 3 niveles celulares: correspondientes a las hileras de

1-4, de 5-12 y de 13-20 de 20 criptas duodenales, (800 a 1000 células) en animales sacrificados al día siguiente en 3 puntos horarios 08:00/16, 12:00/20 y 16:00/24 (Hora del Día/horas Post tratamiento) en una franja temporal de control que abarca, durante el período de reposo (luz) de los animales la parte sincronizada de la curva circadiana de mayor actividad mitótica, con el objeto de detectar cambios de fase que puedan simular falsos resultados cuando se controla en un solo punto. Para detectar cualquier efecto se hizo la comparación (t de Student) de los valores punto por punto y de los promedios de los 3 puntos controlados en las curvas testigo y problema para cada nivel criptico.

Resultados

Los valores de la actividad mitótica de los animales testigo, muestran que la actividad proliferativa en todos los niveles cripticos es mayor a las 08:00/16, observándose un leve descenso a medida que el lapso post tratamiento se incrementa. Además se evidencia que el índice mitótico es muy bajo en la zona superficial, siendo generalmente mayor en la zona intermedia que en la basal (Tabla 1).

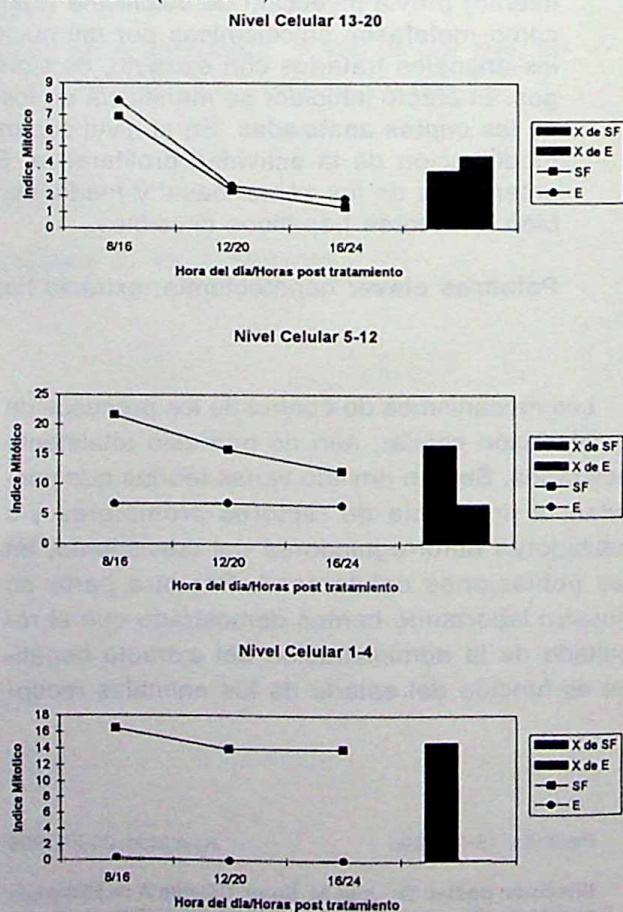


Figura 1.

TABLA 1.— Ensayo del extracto de hígado de ratones 36 horas posthepatectomía, sobre la actividad mitótica de los enterocitos duodenales

HD/HPI	Nivel Celular	Metafasas colchicínicas por mil núcleos			% V
		SF $\bar{X} \pm ES$	P <	E $\bar{X} \pm ES$	
8/16	13 - 20	6,9 \pm 0,6	NS	7,9 \pm 0,7	+ 14
	5 - 12	21,6 \pm 0,4	0,001	6,7 \pm 1,1	- 69
	1 - 4	16,4 \pm 1,2	0,001	0,3 \pm 0,3	- 98
12/20	13 - 20	2,3 \pm 0,3	NS	2,6 \pm 0,2	+ 19
	5 - 12	15,7 \pm 0,2	0,001	6,8 \pm 0,3	- 52
	1 - 4	13,9 \pm 0,4	0,001	0	-
16/24	13 - 20	1,3 \pm 0,2	NS	1,8 \pm 0,4	+ 49
	5 - 12	12,1 \pm 0,6	0,001	6,4 \pm 0,7	- 47
	1 - 4	13,9 \pm 1,6	0,001	0,1 \pm 0,1	- 99
8+12+16	13 - 20	3,5 \pm 0,7	NS	4,4 \pm 0,2	+ 25
	5 - 12	16,5 \pm 1,1	0,001	6,6 \pm 0,1	- 59
	1 - 4	14,7 \pm 0,7	0,001	0,1 \pm 0,1	- 99

Referencias

HD/HPT: hora del día / horas post tratamiento

 $\bar{X} \pm ES$: media aritmética \pm error estándar

(8+12+16): Promedio de los valores de los tres puntos estudiados

SF: solución fisiológica

E: extracto de hígado

P: valores de significación de las diferencias

V%: porcentaje de variación con respecto al valor testigo

El extracto ensayado provoca una evidente disminución de la actividad mitótica de las células correspondientes tanto al nivel de 1-4 como al nivel de 5-12 células de las criptas duodenales. La significación de las diferencias en ambas zonas alcanza un valor estadístico de $p < 0,001$. La magnitud de esta inhibición de la actividad proliferativa es muy notable en el nivel de 5-12 (entre el 50 y 70%) y es casi absoluta en el nivel de 1-4 células (99%). Por el contrario no se observa ningún efecto en la región más superficial de la cripta, nivel celular de 13 a 20. Este fenómeno inhibitorio se puede apreciar tanto al comparar puntualmente los valores de actividad mitótica, como así también al comparar el promedio de los valores de la franja temporal de control (figura 1).

Discusión

Estos resultados sugieren la existencia, en el extracto de hígado, de factores inhibidores de la proliferación de los enterocitos, que pueden corresponder a productos elaborados por cualesquiera de las aproximadamente 20 poblaciones celulares que constituyen el tejido hepático¹¹. Además se debe considerar que las células blanco, correspondientes a cada zona de la cripta, son células con diferentes grados de diferenciación⁶, debido a que se encuentran en distintos estadios del ciclo vital de los enterocitos; es altamente probable que constituyan subpoblaciones diferentes, cada una de ellas con distinta capacidad de respuesta a estímulos similares. Esta hipótesis se vería apoyada por la respuesta dife-

rente de la zona superficial, cuando se compara con las restantes.

No obstante, aun cuando un mismo factor puede poseer distintos grados de afinidad o de latencia para cada subpoblación, lo que daría por resultado respuestas diferentes, no puede descartarse la posibilidad de que se trate de distintos factores con acción específica sobre células correspondientes a poblaciones o subpoblaciones diferentes.

En cualquiera de las situaciones supuestas se debe aceptar que el/los factores responsables ejercen el efecto inhibitor en la zona basal de las criptas y no en la zona superficial.

Por otro lado, si se tiene en cuenta la longitud temporal del ciclo reproductivo celular, y considerando que los animales recibieron el extracto a la hora 16:00 y fueron controlados 16, 20 y 24 horas posteriores al tratamiento, podemos afirmar que los factores que se encuentran en el extracto hepático ejercerían su acción en el pasaje G1-S del ciclo celular¹², y que mantienen su efecto por lo menos durante todo el tiempo controlado.

El efecto que se define en este trabajo es similar al resultado, previamente descrito por nosotros, que se observa al tratar los animales con plasma de ratones obtenido 36 horas después de la hepatectomía por lo que consideramos como altamente probable que el efecto se debe a los mismos factores que, producidos por el hígado regenerante, pasan a la sangre (Factores difusibles). No obstante no se puede descartar que los mismos puedan ser el resultado de mecanismos de producción indirecta por otros tejidos o, alternativamente, el resultado del incremento de secreción de alguna glándula endocrina¹³.

Con el presente experimento, no estamos en condiciones de poder determinar cual o de que tipo es el agente productor del efecto inhibitor. No obstante la mayoría de estos productos han sido homologados a factores de crecimiento aislados por biología molecular (TGF α , TGF β , etc.) o a otros productos reguladores del crecimiento y diferenciación celular, como son los protooncogenes, de conocida relevancia en la regeneración hepática^{14, 15}.

Summary

Action of liver extract from partially hepatectomized mice on the mitotic activity of young mouse enterocytes

We have previously demonstrated that adult mouse plasma obtained 36 hours post partial hepatectomy has an inhibitory effect on the mitotic activity of enterocytes from young mouse duodenal crypts. In this paper we investigate whether this effect is derived from any regenerating liver factor.

Accordingly, we studied the action of adult mouse (90 days old) liver extract obtained 36 hours after partial hepatectomy (70%), on the mitotic activity of young mouse enterocytes, considering 3 cellular levels of the duodenum crypts. Thirty six C3H/S inbred female mice (27 days old) were employed. Half of them received at 16:00 hour an intraperitoneal injection of saline and the other half received liver extract (0.01 ml/g). Animals from each group were sacrificed at 08:00/16, 12:00/20 and 16:00/24 (time of day/hours post treatment). All the animals received an intraperitoneal dose of colchicine (2 μ g/g) 4 hours before sacrifice.

The results are expressed as colchicine metaphases/1000 nuclei and show that the mitotic activity is significantly lower in the animals treated with the extract than in the controls. This inhibiting effect is observed at the levels from 1 to 4 and from 5 to 12 cells of the analyzed crypts. At the superficial level from 13 to 20 cells there is no modification of the proliferative activity. This inhibiting effect on the mitotic activity of duodenum enterocytes from the basal and intermedial zone of the crypts is probably due to a liver diffusing factor.

Bibliografía

1. Weiss P. Self-regulation of organ growth by its own products. *Science* 1952; 115: 487-8.
2. Bulloug WS. Mitotic and functional homeostasis, a speculative review. *Cancer Res* 1965; 25: 1683-727.
3. Echave Llanos JM, Bordin CI. The growth effect of a regenerating liver homogenate as a function of the responsiveness of the receptor. *Naturwissenschaften* 1963; 50: 201.
4. Echave Llanos JM, Epele ME, Surur JM. Acción

- inhibidora del homogenado total de hígado de ratones adultos, sobre el índice mitótico, síntesis de ADN, contenido ADN-ARN-Proteínas, materia seca, en hígado en regeneración. *Rev Soc Argent Biol* 1973; 2: 234-45.
5. Surur JM, Surur DM. Acción del plasma de ratones adultos 36 horas después de la hepatectomía; sobre la actividad mitótica de enterocitos crípticos duodenales en estudio sectorial. *Rev Soc Cs Morfol La Plata*. 1995; 1: 67-74.
 6. Loeffler M, Stein R, Potten CS. Intestinal cell proliferation. A comprehensive model of steady state proliferation in crypt. *Cell Tissue* 1984; 19: 627-46.
 7. Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci* 1988; 10: 45-62.
 8. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001-20.
 9. Potten CS. The role of stem cells in the regeneration of intestinal crypts after cytotoxic exposure. Chemically induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment, New York: Wiley-Liss; 1991; 155-71.
 10. Souto M, Echave Llanos JM. The circadian right time for hepatectomy in the study of liver regeneration. *Chronobiol Int* 1985; 2: 169-75.
 11. Echave Llanos JM. Liver tissue growth factors and circadian rhythms in liver regeneration. Control of cellular growth in adult organism. New York: Academic Press, 1967; 209-20.
 12. Echave Llanos JM, Badran AF, Moreno FR. Inhibiting effect of a hepatoma extract on the mitotic rate regenerating liver. *Virchows Arch Zell Path* 1986; 51: 17-9.
 13. Echave Llanos JM, Gomez Dumm CL, Surur JM: Growth hormone release after hepatectomy. *Experientia*. 1971; 27: 574.
 14. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factor and cancer. *Cancer Res* 1986; 46: 1015-29.
 15. Thompson NL, Meadl LB, Goyette M, Fausto N. Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res* 1986; 46: 3111-7.

- - -

A few observations and much reasoning lead to error; many observations and a little reasoning to truth.

Pocas observaciones y mucha especulación llevan a error; muchas observaciones y poca especulación a la verdad.

Alexis Carrel (1873-1944)