

Biosíntesis del DNA y de histonas en el hígado regenerativo e influencia del cortisol sobre este proceso⁴

Por la Dra. LIDIA ORLOVA⁵

Orlova, Lidia. *Biosíntesis del DNA y de histonas en el hígado regenerativo e influencia del cortisol sobre este proceso*. Rev. Cub. Med. 13. 1, 1974.

Se analiza en este trabajo, que la síntesis de algunas fracciones de histonas durante la preparación de la célula para dividirse, comienza antes de que empiece la síntesis de DNA, y se conocen como "histonas prematuras". Se evidencia mediante estudios experimentales, que la inyección de acetato de hidrocortisona a ratones, inhibe la actividad mitótica en la parte del hígado que se deja, así como que la hormona inhibe la incorporación de los precursores marcados del DNA y de las histonas en la fase S, provocando la inhibición de la actividad mitótica del hígado regenerativo de los ratones. El estudio del mecanismo de acción de las hormonas esteroideas es uno de los más complicados e importantes en la medicina.

Durante los últimos tiempos se han obtenido grandes éxitos en la rama de la investigación estructural y en la determinación de hormonas de fluidos biológico. Al mismo tiempo, el problema de la influencia de las hormonas en diferentes tejidos y en especial su acción a nivel molecular, se han estudiado poco. La hipótesis de la acción directa de las hormonas sobre el aparato mitótico fue propuesta por *Karlson* en 1961, éste se basó en algunos experimentos realizados con ecdizona, hormona esteroidea de los insectos.

La inyección de ecdizona en pequeñas dosis provocaba a los 15-30 minutos una inflamación típica en los cromosomas de las glándulas salivares de la larva de *Chironomus tentans*. El autor pensó que esto era el resultado de la acción directa de la ecdizona sobre el gen (*Karlson, Sekeris, 1966*).*

Como se sabe, los corticoesteroides inhiben la actividad mitótica de los tejidos proliferativos, incluyendo la actividad hepática regenerativa. El mecanismo de acción antiimitótica de las hormonas esteroideas se conoce aún.

Es posible que esté relacionado con la inhibición de la síntesis del DNA, ya que se ha demostrado que al inyectar estas hormonas, disminuye la incorporación de los precursores marcados del DNA si se

⁴ Trabajo realizado en el Instituto de Bioquímica de la Academia de Ciencias Médicas de la URSS (Dtor.: Acad. N. A. Yudaev).

⁵ Candidata de ciencias biológicas de la URSS, bioquímica consultante del Instituto de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas, Zapata y D, Vedado, La Habana. (DtO'r.: Profesor Oscar Mateo de Acosta).

compara con la incorporación en DNA de animales que no fueron inyectados.

La síntesis del DNA en los tejidos proliferativos se encuentra íntimamente relacionada con la síntesis de las histonas.

Por esto parece interesante analizar la síntesis del DNA y de las histonas en el hígado regenerativo de ratones al inyectarles corticoesteroides. Tales investigaciones podrían dilucidar el problema de conocer sobre cual etapa del ciclo mitótico actúan los corticoesteroides.

En este trabajo se investiga la incorporación de precursores marcados en DNA y las histonas del hígado regenerativo de ratones al inyectarles hidrocortisona. Los resultados se compararon con la incorporación de los precursores marcados en el DNA y las histonas de la cromatina de animales a quienes no se le suministraron preparados hormonales. En estos animales se determinó la cantidad absoluta de DNA y de histonas en los núcleos de las células hepáticas después de la hepatectomía subtotal.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron ratones con un peso de 170-180 gramo®. La hepatectomía subtotal se realizó por el método de *Higgins y Anderson*.

Se examinaron dos grupos de ratones:

1) Aquellos que recibieron cuatro días antes de la operación, acetato de hidrocortisona 2,5 mg/100 g de peso por vía intramuscular dos veces al día.

2) A este grupo se inyectó por vía IM cuatro días antes de la operación con solución fisiológica.

Los ratones se sacrificaron inmediatamente después de la operación o a las 12,5, 14, 15 y 18 horas después de la misma.

30 minutos antes del sacrificio se realizó inyección intraperitoneal de precursores marcados: timidina H³ y glicina C¹⁴ a razón de 30 a 40 Ci/100 g de peso respectivamente.

La actividad específica de la timidina-486 mCi/lmM y de la glicina 1 mCi/mM.

El hígado extirpado se perfundió en una solución fría de NaCl 0,14 M y congelado a -10°C hasta el momento de usarla.

Para la determinación de las cantidades absolutas de DNA y de histonas en los núcleos de células hepáticas, éstos fueron aislados por el método de *Chauveau*³.

El aislamiento de la desoxirribonucleoproteína de los núcleos y el fraccionamiento de las proteínas nucleicas fue hecho por el esquema *Zbarskiy y Georgiev*⁴ con algunas modificaciones descritas en nuestro trabajo⁵.

La cantidad de DNA y de histonas se determinaron según su contenido por núcleo.

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente por el método *Student*. La cantidad de células que presentaban mitosis fueron determinadas en los dife-rentes períodos regenerativos.

El aislamiento de la cromatina fue realizado por el método de *Marushige y Bonner*. Las histonas de la cromatina fueron extraídas con HCl 0,2 N.

El precipitado se disolvió en NaOH 0, 1 N. En esa fracción se determinó el contenido de DNA por el método de *Schmidt y Thannhauser* modificado por *Sjirine*.

La cantidad de histonas en el extracto ácido fue determinada por *Loury*⁶.

El conteo de la radiactividad del DNA y de las histonas se realizó en un contador

de centelleo tipo Packard. La radiactividad específica se expresa como impulso por minuto por mg de proteína o de DNA.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el proceso de regeneración hepática en los animales que no recibieron hidrocortisona, se halla un máximo de actividad mitótica 28 horas y media después de la hepatectomía.

En los que recibieron tratamiento con hidrocortisona no encontramos aumento de la actividad mitótica en las 54 horas que siguieron a la operación.

En el Cuadro I se ven los resultados de los experimentos: determinación cuantitativa del DNA y de histonas en los núcleos de células hepáticas intactas y regenerativas. Las determinaciones de las cantidades de DNA y de proteínas fue hecha en la fracción DPN (desoxirribonucleoproteido).

La cantidad absoluta de DNA en los núcleos de las células del hígado regenerativo 15 horas después de la hepatectomía, todavía no presentaba aumento en tanto las histonas habían aumentado 1, 4 veces.

Para determinar el principio de la síntesis del DNA y de histonas, se realizaron varios experimentos utilizando la incorporación de precursores marcados en el DNA y las histonas durante el comienzo de la regeneración hepática de ratones.

La velocidad de incorporación de timidina en DNA (Cuadro II) comienza a aumentar 14 horas después de la operación, mientras que la incorporación de glicina en las histonas aumenta bruscamente 12 horas y media después de la hepatectomía. Estos resultados permiten decir que la síntesis de las histonas comienza 1,5 horas antes que la síntesis del DNA, es decir, se sintetizan las llamadas

“histonas prematuras”.

Luego se comparó la síntesis del DNA y de las histonas en las células del hígado regenerativo, en animales inyectados y no inyectados con hidrocortisona (Cuadro III).

Se ve un aumento en la incorporación de glicina en 5 veces 12,5 horas después de la operación en los ratones tratados con cortisona, es decir, en igual forma que aquellos que no fueron tratados. Después de este tiempo en los ratones tratados se produce un pequeño aumento en la incorporación de la glicina a las histonas, en tanto en los animales no tratados, este aumento sigue siendo brusco, de forma tal que 15 horas después de la operación el aumento de la incorporación de glicina ha aumentado 8 veces.

La incorporación de timidiina, marcada en las 15 horas después de la operación, aumentó un 31% en los animales con la hormona, en tanto en los animales sin hormona aumentó 2,5 veces.

Podemos expresar que la incorporación de los precursores marcados en las histonas y el DNA de la cromatina del hígado regenerativo de ratones tratados y no tratados, son diferentes.

En los ratones tratados, la síntesis del DNA no tiene lugar en la fase S (fase síntesis DNA) del ciclo mitótico como de costumbre, en los ratones no tratados la síntesis de una parte de las histonas comienza antes de la reduplicación de DNA al igual que en los tratados.

Existen otras fracciones de las histonas que se sintetizan en los ratones no inyectados en la fase S conjuntamente con el DNA que no se sintetiza en los inyectados.

Parece ser que la hormona dificulta la transición de la célula del período G (pre-sintético) de la interfase al período S.

CUADRO I
CANTIDAD DE DNA E HISTONAS EN LA FRACCION DNP
DE LOS NUCLEOS DE LAS CELULAS DEL HIGADO

Tiempo después de la operación en horas	DNA	Histonas
	10 - 4 mg/núcleo m + S E	10 - 4 mg/núcleo m + S E
0	0,095 ± 0,020	0,166 ± 0,009
12,5	0,091 ± 0,020	0,180 ± 0,016
15,0	0,086 ± 0,031	0,261 ± 0,023
18,0	0,114 ± 0,006	0,280 ± 0,008

CUADRO II
LA INCORPORACION DE C¹⁴ GLICINA EN LAS HISTONAS Y DE H³ TIMIDINA EN
DNA DEL HIGADO REGENERATIVO DE LOS RATONES (SE INYECTO 40 μCi DE
GLICINA Y 30 μCi DE TIMIDINA POR 100 g DE PESO).
SE MUESTRAN LOS IMP/MIN/MG DE HISTONA Y DE DNA

Tiempo después de la operación en horas	IMP/MIN/MG Histona	IMP/MIN/MG DNA
	0	625
615		3,118
670		3,800
Promedio	636	3,566
12,5	3,300	3,223
	3,250	3,250
	3,220	3,220
Promedio	3,263	3,224
14,0	4,324	5,073
	4,388	5,847
	4,300	3,978
Promedio	4,334	4,965
15,0	5,200	10,100
	5,150	13,440
	5,000	12,970
Promedio	5,116	12,136

CUADRO III

100 POR CIENTO DE INCORPORACION DE C¹⁴ GLICINA EN HISTONAS Y DE H³ TIMIDINA EN DNA DE HIGADO REGENERATIVO DE LOS RATONES. (SE INYECTO 40 μCi DE GLICINA Y 30 μCi DE TIMIDINA POR 100 g DE PESO)

EN DIFERENTES TIEMPOS

Tiempo después de la operación en horas	% de incorporación en histona	% de incorporación en DNA
0	100	100
12,5	540	103
14,0	573	138
15,0	585	131
18,0	613	153

SUMMARY

Orlova, Lidia. *DNA and historie biosynthesis in the regenerative liver and cortisol influence on this process.* Rev. Cub. Med. 13: 1, 1974.

It is analysed in ilis work that the synthesis of so-me bis oñe fractions, which are known as “prematuró histones”, during the preparation of the eell to become divid'ed, begins before ihe DNA synthesis. It is showed, by experimental studies, that the injectio'n of hydrocortisone acetate to mice inhibits the mitotic activity in the part of the liver which is ileft, as well as that the hormo'ne inhibits ths incorporaron of DNA and histone labelled precursors in the S phase, and provokes inhibition of the mitotic activity of the mice's regenerative liver.

RESUME

Orlova, Lidia. *Iiiosynthese du DNA et de l'histone dans le foie en régénération, et l'influence du cortisol dans ce processus.* Rev. Cub. Med. 13: 1, 1974.

La synthese de quelques fractions des histones pendant la preparation de division de la cellule, commence avant la synthese du DNA, elles sont connues comme “histones préma- turées”. Il est évident que l'injection d'acétate d'hydrocortisone á des souris, inhibe l'activité mitotique dans la partie du foie qui reste, et que l'hormone inhibe l'incorporation des precurseurs marqués du DNA, et des histones á la phase S, ce qui entrainj l'inhibitiow de l'activité mitotiqus du foie en régénération des souris.

РЕЗЮМЕ

Орлова Л. ВНОЧНТЕС ННК h mctohob b pereHepaTopHoii ne^eHH h B03fleñc'r- Biiie K0pTH30jia Ha stot nponecc. Rev. Cub. Med. 13: 1, 1974.

В падоТе npoBO,miTCH aHajni3 ciiHTesa HeicoTopHX ípanruni thctohob. CTaBHT— CII Bonpoc O TOM, -ITO yKa3aHHHii CHHTe3, B Te-geHHe I I O T O B K H KJieTKH K nejieMHO, Ha^HHaeTCH ho Ha^ajia ciiHTe3a iHK. 3th SpaKpuni 3HaKOMy ksk npe;,ineb pe Mehhh e ructOHu". nocpejicTBOM 3Kcnepi,eHTajiBHhx ii3yHeHiiii pe- jiaeTCH o^ieBiiiiHHH, hto BBeaemie aiiieTata rjimp0K0pTii30Ha mhihbhm noxaBjraeT MiiTOTiraeckyia aKTiiBHocTB b octaBjieHHoii nactii neveria. Tarase OTMe^aeTCH, mjo ropwoH nopaBjHeT npiiB.ne^eHie npejmiiymiix c OTMeTKoi JIHK a thctohob ("a3H S , BB3tiBaH HHrHóHpOBaHiie MiiTOTüHeCKO® fleHTejiBHOCTh pereHepaTüB- hoh ne^ern y MuuiBei.

BIBLIOGRAFIA

1. —*Karlson, P., Sekeris, C.* Acta Endocrin. 1966, 53, 505.
2. —*Higgins, G., Anderson, R.* Arch. Pathol. 1931, 12, 186.
3. —*Chauveau, Y.* et al. Exptl. Cell Res. 1956, 11, 317.
4. —*Harsky, Georgiev, G.* Biokhimiia, 1959, 24, 192.
5. —*Orlova, L.* et al. Obchaya Biología, 1969, 30, 332.
6. —*Spirin, A.* Biokhimiia, 1958, 23, 656.
7. —*Loury, O.* et al. J. Biol. Chem. 1952, 196, 111.
Rev. Culi. Med. 13: 27-36, Ene.-Feb. 1974.

INSTITUTO DE