

Tesis de Posgrado

Estudio sobre células de hígado de rata cultivadas en suspensión

Casanello, Delia

1970

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Casanello, Delia. (1970). Estudio sobre células de hígado de rata cultivadas en suspensión. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1355_Casanello.pdf

Cita tipo Chicago:

Casanello, Delia. "Estudio sobre células de hígado de rata cultivadas en suspensión". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1970. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1355_Casanello.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO SOBRE CELULAS DE HIGADO DE RATA CULTIVADAS EN SUSPENSION

Delia Casanello

■ 355 = -
y 2

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

FEVA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Lázaro E. Gerschenson

mis padres

I N D I C E

Indice	I
Prólogo	I
Introducción	II
Método para la extracción y el cultivo de células... ..	III
Velocidad de crecimiento	IX
Curva de crecimiento.....	X
Tiempo de replicación	XII
Estudios metabólicos.....	XVI
Actividad enzimática. Efecto del medio de cultivo..	XVII
Incorporación de leucina C ¹⁴ en proteínas.....	XIX
Oxidación de glucosa uniformemente marcada.....	XXI
Producción de glucógeno	XXIV
Producción de urea	XXVI
Efecto de hormonas	XXVII
Efecto de la insulina sobre la respiración celular.	XXVIII
Efecto de la insulina y glucagón sobre la síntesis de glucógeno.....	XXIX
Efecto de la hormona de crecimiento bovina.....	XXXI
Actividad de la glucosa 6-fosfatasa	XXXIV
Efecto de la insulina sobre las actividades espe- cíficas.....	XLIV
Efecto de la insulina y de la puromicina sobre la- actividad específica de la glucosa 6- fosfatasa.....	XLV
Conclusiones.....	XLVII
Resumen.....	LII
Bibliografía	LV

P R O L O G O

Sean mis primeras palabras de agradecimiento a todos los que hicieron posible la realización de este trabajo:

Al Dr. A. Paladini, por las facilidades que me brindó en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y - Bioquímica para la realización íntegra del mismo.

Al Dr. L. E. Gerschenson, Director de esta Tesis, que me alentó en todo momento e intervino en todas las fases como compañero y guía.

Al Dr. H. Moretto, que me orientó y colaboró técnicamente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a L.A.L.C.E.C., con cuya ayuda económica se realizó este trabajo.

A todo el personal técnico y de maestranza de la Facultad de Farmacia y Bioquímica que me brindó su ayuda.

I N T R O D U C C I O N

El presente trabajo tiene por objeto describir un método original de cultivo de células de hígado de rata en suspensión, analizar las características y viabilidad del sistema, estudiar la regulación de enzimas características de dicho órgano y el efecto de algunas hormonas sobre éstas.

Son varios los factores por los cuales pareció importante desarrollar un sistema de células de hígado cultivadas en suspensión:

Primero, porque el hígado es un órgano cuyo metabolismo y morfología están muy estudiadas pese a su complejidad, siendo entonces muy conveniente para el estudio de la dediferenciación celular, fenómeno adaptativo por el cual las células en cultivo pierden una o varias funciones y adquieren o mantienen la capacidad de crecimiento o división (1-2).

Segundo, debido a la ventaja de poseer sistemas en cultivo, que permite estudiar muchas variables externas, mucho más fácilmente - que en animales enteros y evaluar correctamente los resultados.

Tercero, el sistema del cultivo en suspensión, tiene una ventaja sobre el sistema de células en monocapa, pues evita el fenómeno de la inhibición por contacto.

Cuarto, porque en este sistema es posible extraer muestras homogéneas, lo que resulta muy conveniente para realizar estudios morfológicos y bioquímicos.

Todos estos motivos fueron suficiente acicate, para que se intentara trabajar con un sistema, que, como se verá en los próximos capítulos, resultaba prácticamente, hasta el momento, imposible de obtener.

METODO PARA LA EXTRACCION Y EL CULTIVO DE CELULAS

El primer problema que se presenta en el cultivo de células de hígado, es obtenerlas intactas y viables.

Se han intentado diversos métodos de separación y cultivo: Carvey (3) separa dos tipos celulares, parénquima y células retículo endoteliales, por el método de perfusión, con solución de Cl Na, Cl K y glucosa e incubación posterior del lóbulo hepático en una solución de hidrolisado de caseína, con posterior dispersión de las células. Por este método obtiene células parenquimatosas, las que cultiva en monocapa, en un medio sin suero. Consigue división celular y sobrevivencia de las células durante diez días. El resto del hígado perfundido lo trata con tripsina al 0,3 % en solución salina y posterior tratamiento con colagenasa al 0,01 %. De esta forma obtiene células retículo-endoteliales, las que también puede cultivar por el mismo tiempo.

Por su parte, Sandstrom (4) utiliza hígado de embrión de pollo de ocho a diez días y de embrión de rata de ocho días de gestación. Cultiva explantes y células dispersas con tripsina al 1%. El medio de cultivo lo prepara utilizando una parte de extracto embrionario y una parte de suero de caballo o una parte de extracto y una de plasma no heparinizado. Obtiene y separa cuatro tipos celulares. En general son todos de origen sinusoidal (endotelio de los sinusoides). Las células parenquimatosas pierden su habilidad de crecer "in vitro" y sólo lo hacen bajo condiciones muy especiales.

Germain y colaboradores (4) intentan hacer crecer tejido y células de hígado de rata y de embriones humanos en cámaras de difusión. Obtienen resultados positivos cuando cultivan primero en monocapa y luego utilizan al cobayo como huésped.

En rata no obtienen resultados positivos y lo mismo sucede cuando no realizan primero el cultivo en monocapa.

En 1966, Watanabe (6) cultiva explantes de hígado de rata recién nacida sobre un sustrato de colágeno y realiza estudios morfológicos en los microscopios óptico y electrónico.

Obtiene crecimiento celular. En muchos casos las células parenquimatosas crecen sobre las mesenchimáticas, tomando el aspecto de un epitelio. Al microscopio electrónico observa varios cambios, especialmente, en las mitocondrias. Son en general más pequeñas e irregulares y predomina la forma filamentosa. Decece el ergastoplasma bien diferenciado,

pareciéndose a las células de un hepatoma, posiblemente debido a la desdiferenciación.

Harris y Leone (7) extraen las células de hígado de ratón con diversas soluciones y tiempos de exposición al E.D.T A. y tetrafenilboron de Na. Observan los efectos de estas drogas sobre las mitocondrias especialmente. En general obtienen bastantes irregularidades y deformaciones, las que son atribuidas no sólo a las drogas, sino a la ausencia de algunos iones fundamentales en las soluciones de las mismas -- (Ca, Mg, K.).

Ichihara y colaboradores (8) extraen las células perfundiendo el hígado con citrato de 0,027 M o buffer de fosfato 0,02 M (ph 7.2) y dispersando las células con un homogenizador en una solución de sucrosa 0.25M en buffer de fosfato. Consiguen separar diversos tipos celulares por centrifugación a distintas velocidades. Con este material realizan diversos estudios bioquímicos, pero las células sólo sobreviven algunas horas

En 1966, Hayek y Tripton (9) miden la actividad respiratoria y la sobrevivencia de suspensiones de hígado de rata. Preparan las células perfundiendo el hígado "in situ" vía aorta dorsal con una solución de sacarosa -E. D. T. A. Mantiene a las células luego de la extracción en buffer de sacarosa con tris-HCl en medio de Waymouth con o sin suero al 30 %. Hasta ocho horas después de extraídas mantienen las células actividad respiratoria practicamente normal, resultando el medio suplementado con el suero más conveniente.

Probando diversas concentraciones de colagenasa y hialuronidasa, Howard y colaboradores (10) preparan suspensiones de células de hígado, especialmente parenquimatosas.

La concentración de hialuronidasa al 0.15 % y de colagenasa también al 0,15 %, seguida de un tratamiento mecánico, resulta ser la más conveniente, con un porcentaje del 75 % de células intactas, tanto al microscopio óptico como al electrónico. Además mantienen la actividad respiratoria endógena en presencia del 1 % de albúmina en medio de -- Hanks sin glucosa, durante ocho horas.

Los mismos autores (11), con la misma solución enzimática, preparan células de hígado de rata adulta. Obtienen del 90 al 95 % de células

las intactas, pero sólo del 70 % al 95 % son viables (método óptico). Las células respiran en medio de Hanks y en medio 199 sin agregar sustrato, con relaciones más altas que las observadas anteriormente. Las relaciones lineales se mantienen durante dos horas. Después de 25 horas en medio 199, sólo son viables el 25 % de las células y mueren todas después de tres días. Estimulan la respiración celular agregando sales de Ca. y albúmina al 1%. La glucosa no es el sustrato adecuado.-

De este comentario se desprende lo difícil que ha resultado cultivar células hepáticas y los pocos resultados positivos en los tentativas de hacerlo. Generalmente la extracción con tripsina, que es el método más utilizado en cultivo de tejidos, no resultaba en este caso. Además, cuando se lograba extraerlas, las células no eran viables, sobrevivían por poco tiempo.-

METODO DESARROLLADO

Para extraer las células se usó la droga tetrafenilboron de Na., un agente quelante del Ca, con lo que se obtuvo un método sencillo y reproducible para extraer células aisladas y viables. (12).

Se utilizaron hígados de ratas de tres a siete días de edad, de la cepa Long-Evans.

Todas las operaciones que se pasarán a describir, se realizaron en condiciones estériles.

Las ratas fueron muertas por decapitación y los hígados se diseccionaron y colocaron en cajas de Petri con 10ml de la solución disociante cuya fórmula empírica es la siguiente:

tetrafenilboron de Na	5mM (Aldrich Chemical Co.)
ClNa	11mM
SO ₄ Hg.7H ₂ O	130mM
Cl ₂ Hg.6H ₂ O	0,4mM
PO ₄ H Na ₂ .H ₂ O	0,33mM
PO ₄ H ₂ Na. H ₂ O	0,44mM
CO ₃ H Na	0.1mM
rojo fenol	0.02g/l (todas estas drogas

J.T.Baker o B. D. H.)

ph 7.2. Temperatura ambiente

El "pool" de hígados fué luego trasferido a otra cápsula de Petri y cortado cuidadosamente con bisturíes hasta obtener piezas de 1mm²

A continuación los trozos de tejido fueron colocados en un frasco Erlenmeyer y suspendidos en la solución disolvente a razón de 0.5ml por hígado.

El tejido suspendido en la solución disolvente fué agitado a 300r.p.m. con un magneto cubierto con Teflon o con vidrio Pirex, durante 20' a 37° C.

Después de este tiempo, la suspensión celular fué decantada en tubos de centrifuga de plástico, autoclavables y centrifugada a 150xg durante 10 a 15' a T° ambiente. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 10ml de medio de cultivo previamente calentado a 37°C.

Los trozos de hígado que quedaban en el fondo del frasco se suspen-

dieron en solución disociante y en proceso se ~~refrite~~ refrite 6 a 8 veces, hasta que se disocia la mayor parte del tejido. A medida que se van obteniendo las células se las junta en un "pool".

El medio de cultivo que se usó en todas las operaciones y en los cultivos subsiguientes, se preparó en el laboratorio con solución salina balanceada de Hanks (13), concentración de glucosa y vitaminas de Eagle (14) y mezcla de aminoácidos M.E.M. (15), suplementado con suero de ternero al 10% y 50.000U.I. de penicilina y 0,1 gr. de estreptomicina por litro.

El cultivo se realizó resuspendiendo a las células en el medio señalado, a razón de 2.500.000 a 3.500.000 por ml. Se lo incubó preferentemente en frascos de Pirex en un volumen de 500 ml., y se lo mantuvo en suspensión por agitación con un magneto de Teflon o de Pirex a 150r.P.m. en una incubadora a 37°C.*

En la foto N° 1, se observan las células recién extraídas:

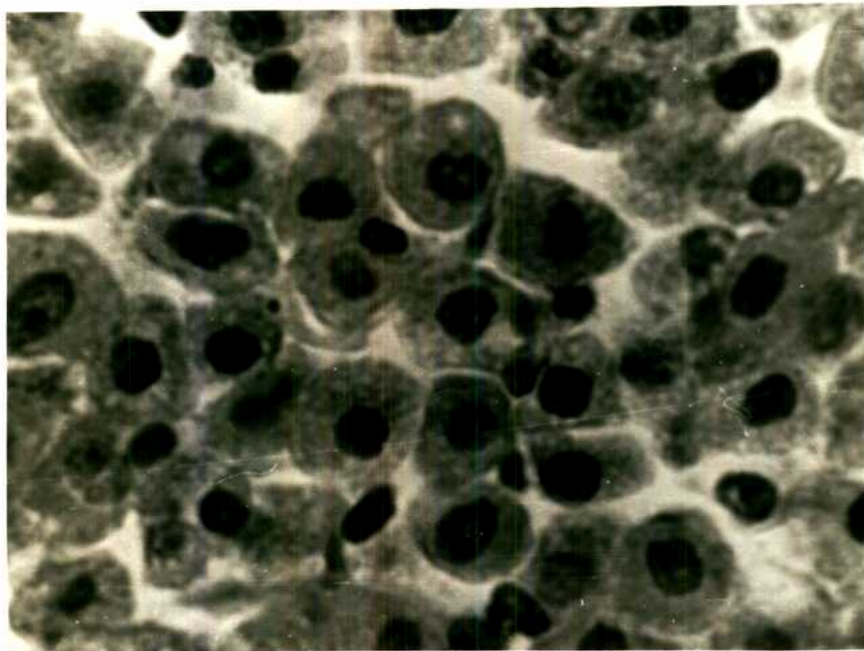


Foto 1: Células recién extraídas. Se centrifugan las células a 200 ~~x~~ x a temperatura ambiente, durante 10'. El sedimento se resuspende en formol neutro al 1% y fijado a 4°C durante 24 horas, embebido en parafina, seccionado a 2.5 μ y teñido con P.A.S. hematoxilina-eosina . 320 x

Se puede observar en las fotos que los hepatocitos son las células predominantes. Muestran su forma poliédrica original, el citoplasma, que es normalmente vacuolado presenta tal vez más vacuolos. El núcleo tiene apariencia normal.

* El medio de cultivo era cambiado en un volumen del 5% cada 48-72 horas, agregándose igual volumen de medio frasco.

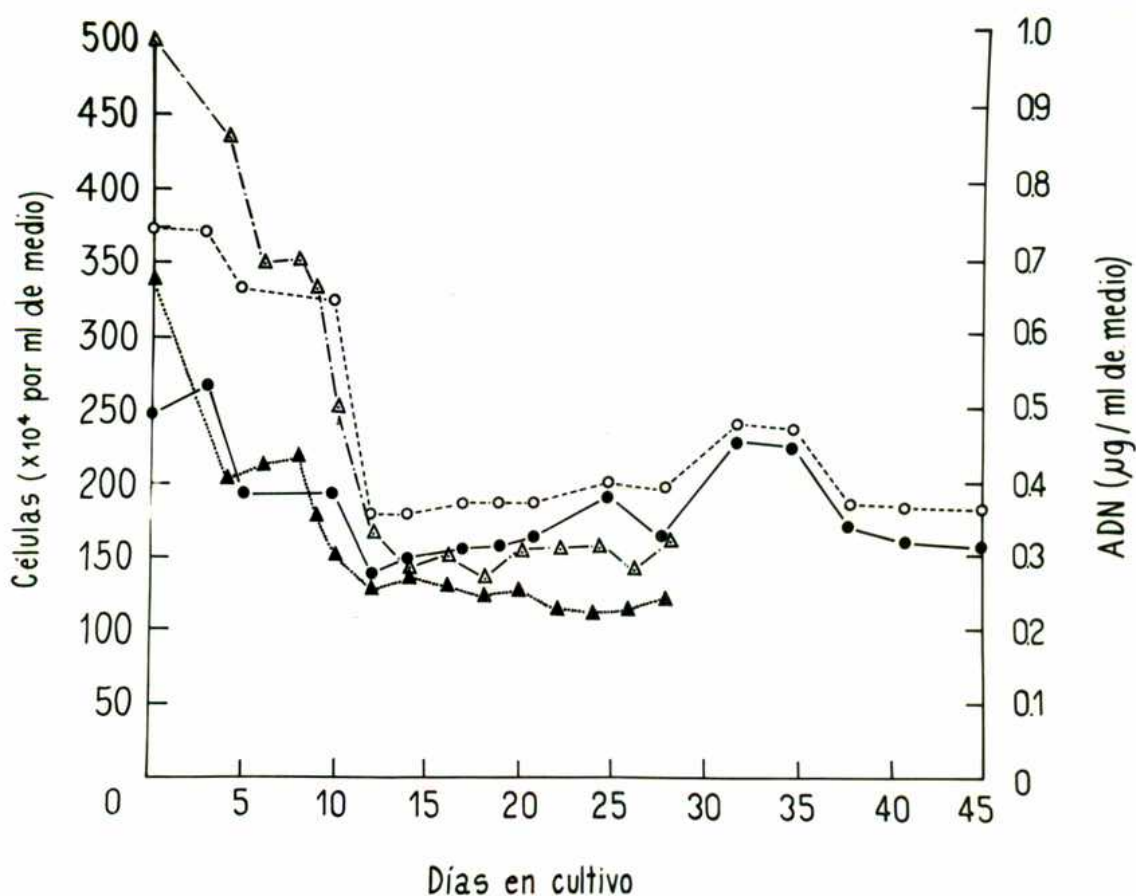
IX

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

CURVA DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento fué obtenida graficando el número de células contadas durante un determinado período de tiempo. Para contar las células se utilizó un hematocitómetro, tiñiendo a las células con cristal violeta al 0.1% en ácido cítrico 0.1M durante 10'. También fué determinado el contenido de ADN de las células durante el período de tiempo. Se midió el ADN con una modificación del método de Fleck y Munro (16)

F g. 1. Curva de crecimiento.

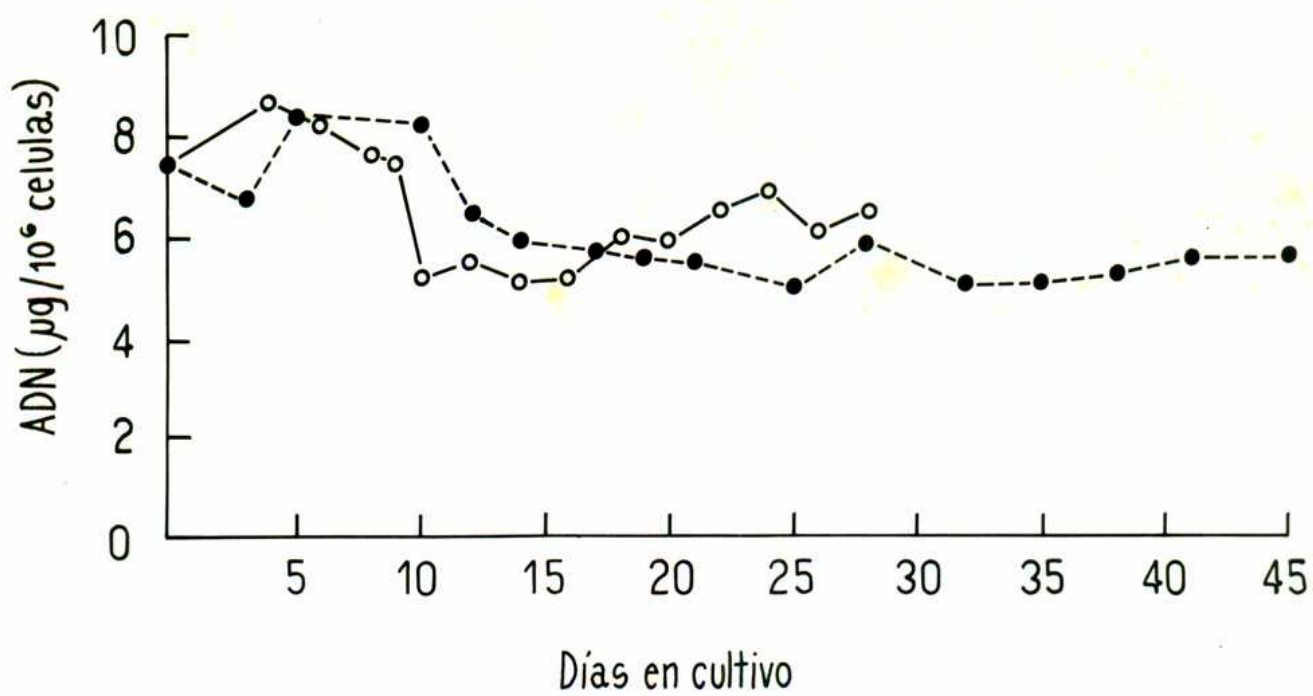


Referencias

- | | | |
|-------|----------|---------------|
| —●—●— | --▲--▲-- | Nº de células |
| -○-○- | --△--△-- | A.D.N. |

Se puede observar que el número de células decrece hasta el día 12 luego de lo cual se hace estable, con el 40% del número inicial. El ADN decrece más que el número de células.

Fig. 2 Relación ADN al número de células en el tiempo.



Referencias. Se trata de dos cultivos distintos

La cantidad de ADN por 10^6 células, es al comienzo del cultivo de $7,5\mu\text{g}$. dato similar al de los resultados obtenidos por otros autores - (17 - 18) y decrece a un promedio de $6\mu\text{g}$., probablemente indicando la transición de una población de una determinada ploidía a una de ploidía menor.

TIEMPO DE REPLICACION

Teniendo en cuenta los datos sobre la curva de crecimiento, tanto sea la obtenida por conteo como por dosaje de ADN, se puede calcular en forma aproximada el tiempo de replicación de la población celular.

En un párrafo anterior se dijo que el medio de cultivo se cambiaba en un 5% cada dos o tres días, es decir, que después de realizar esta operación veinte veces, se ha removido todo el medio. Como la realización de este procedimiento lleva alrededor de 45 días y teniendo en cuenta que el número de células y el ADN se mantienen constantes, se puede calcular que el tiempo de replicación es de 45 días, lo que resulta muy lento para los sistemas usuales de cultivo, donde la división celular se realiza cada 2 ó 3 días (17), pero es más rápido que en el hígado, donde la vida media de las células es de alrededor de 120 a 400 días (18 - 19 - 20).

También se probó otro método para determinar el tiempo de replicación, usando colchicina (21). Se usaron células de distintas edades: una semana, 13 días, un mes de cultivo.

Las dosis de colchicina usadas fueron variables: 0, $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $1,2\mu\text{g}/\text{ml}$ y $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Las dosis más eficaces fueron las de 1 y $1,2\mu\text{g}/\text{ml}$. El tiempo de incubación óptimo se encontró entre 4,5 y 6 horas.

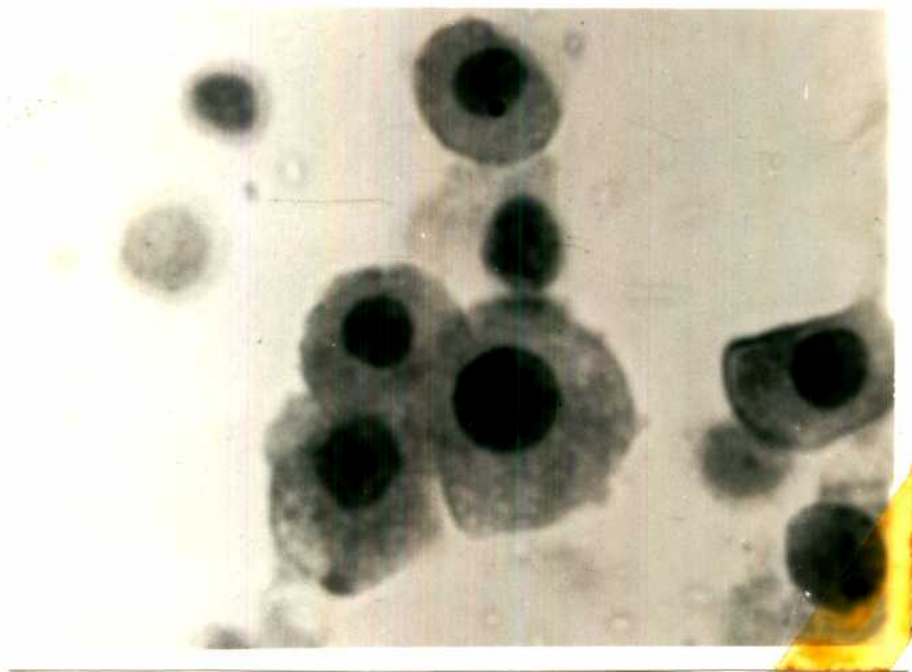
Para contar las mitosis se prepararon las células de la siguiente manera:

Lavado con solución salina balanceada a 37°C ; tratamiento hipotónico durante media hora, con dilución de la solución salina en agua destilada 1:3; fijación con formal neutro al 10% durante dos horas, a 0°C . Se realizaron extendidos sobre portas albuminizados y los mismos se secaron durante 12 horas en estufa a 37°C . Los núcleos se colorearon luego con Hematoxilina de Meyer. Para obtener el índice mitótico se contaron 2000 células.

Usando este método, el tiempo de replicación resultó para células de una semana de 60 días y para células de cultivo de un mes, de 72 días. Las discrepancias pueden deberse a varios factores: 1°) es bastante difícil distinguir las mitosis en este cultivo, lo mismo que preparar el

material para su estudio. El método empleado y ya descrito resulto ser el más eficaz. Ya se había usado con algunas modificaciones, para evaluar la actividad mitótica en cortes de hígado en regeneración (22) Por lo tanto, muchas mitosis pueden haber escapado a la observación. 2°) Se da con frecuencia el tipo de división amitótica en las células hepáticas. Si este tipo de reproducción ocurre en el cultivo, tampoco sería posible detectarlo con la colchicina.

Foto N° 2



Corresponde a un preparado de células de siete días de cultivo. Para obtenerlo se centrifugó una alícuota de 10ml de cultivo a 200xg, a temperatura ambiente, durante 10'. Se lavó el sedimento celular con solución salina balanceada a 37° C y se lo volvió a centrifugar. Se fijaron luego las células con formol neutro al 10% durante dos horas, a 0° C. Se extendieron las células sobre portas albuminizados y se secaron durante doce horas en estufa a 37° C. Se colorearon los núcleos con hematoxilina de Mayer. Las células conservan su apariencia de hepatocitos. Son redondeadas, de núcleos voluminosos en los que se puede observar el nucleolo. El citoplasma es granuloso y se presenta menos vacuolado que el

de células recién extraídas. Aumento: 400 x

Foto N° 3

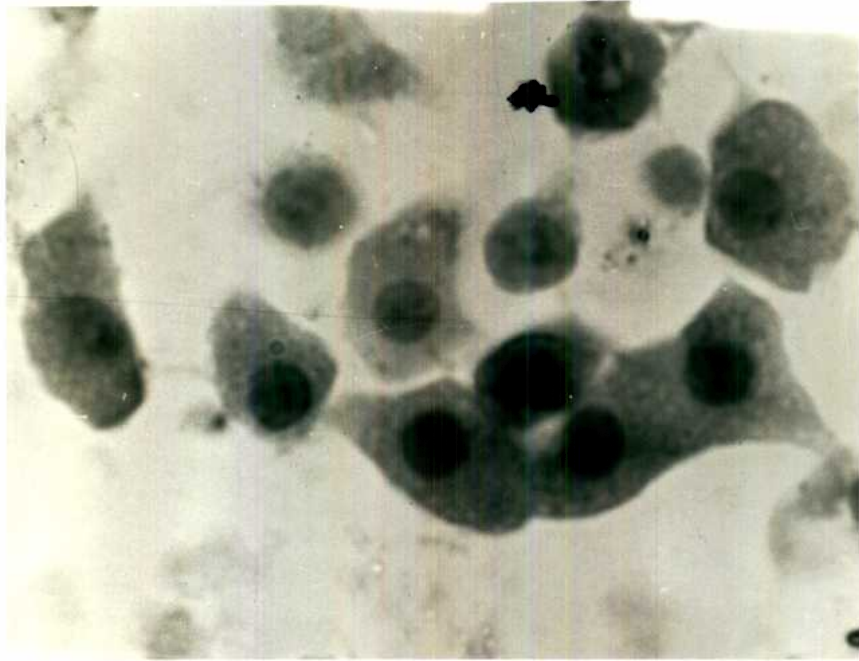
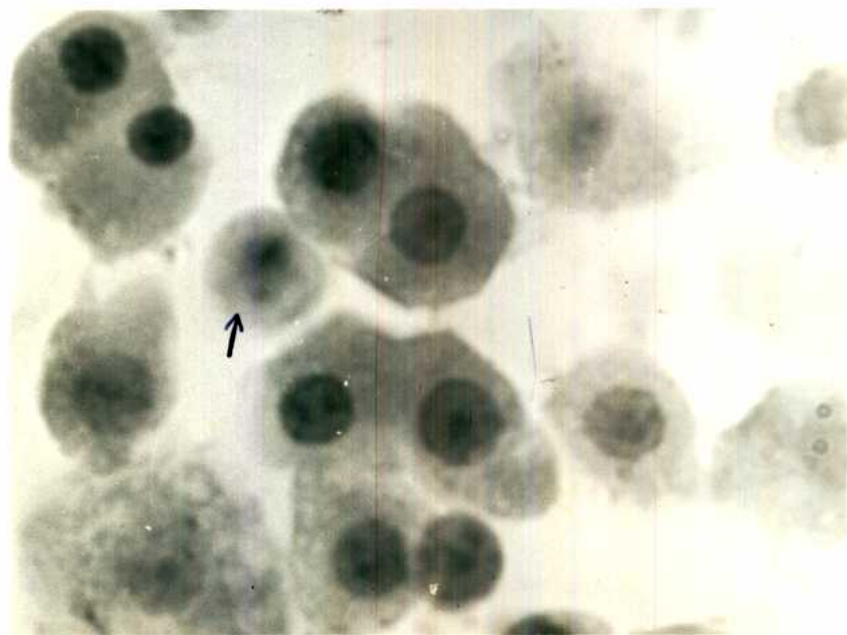


Foto N° 4



Las fotos 3 y 4 corresponden a cultivos de un mes. Los preparados se hicieron usando la misma técnica que en el caso anterior. Aparentemente se trata en su mayor parte de hepatocitos, lo que quedó revelado por microscopía electrónica. No ha cambiado mucho el aspecto de las células aunque el citoplasma se coloreó más con la hematoxilina, como se puede observar en la foto nº 3. Las flechas en ambas fotos indican figuras mitóticas. En la foto 3 se trata de una profase y en la 4 está señalada una metafase. Aumento: 400 x.

ESTUDIOS METABOLICOS

XVII

En esta parte del trabajo se estudiarán algunos aspectos metabólicos de las células en cultivo, lo que contribuirá a poner en evidencia la efectividad del sistema.

Se informará sobre los resultados de algunas mediciones de actividades enzimáticas, incorporación de aminoácidos marcados en proteínas y de los cambios de parámetros a través del tiempo, como ser, respiración celular, concentración de glucógeno y producción de urea.

ACTIVIDADES ENZIMATICAS, EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO

Determinaciones enzimáticas. Se tomaron alícuotas de 25 a 200 ml de cultivo, centrifugados a 100 xg durante 10 a 15 min. a 5° C. se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 15ml. de solución Krebs-Ringer-fosfato (K.R.P.) (24); se centrifugaron nuevamente a la misma velocidad, tiempo y temperatura y luego se colocaron las células en 1 a 5 ml. de sacarosa 0,25 molar y buffer Tris 0,1M, pH 7,2, enfriadas en hielo. Se las homogenizó 2' en un Potter a 300r p.m. El homogenato se congeló inmediatamente y se lo guardó a 20° C. La actividad enzimática se midió durante la semana. La actividad enzimática de la glucosa 6-fosfatasa, cuyas características se deseaba conocer, se midió según la técnica de Nordlie et al. (23), excepto por el tiempo y temperatura de incubación usados: 15' y 37°C, respectivamente.

Para los ensayos con la deshidrogenasa del ácido láctico, las células fueron homogenizadas como ya se indicó y sin congelar, se centrifugó el homogenato a 10000 x g durante 20' en una centrifuga refrigerada. Las determinaciones fueron realizadas en el sobrenadante, inmediatamente, de la manera siguiente: en una cubeta de 2 ml se pipetearon sucesivamente: 1,5ml de piruvato de Na, $5 \times 10^{-3}M$, pH 7,5; 0,025 ml de DPNH, $5 \times 10^{-3}M$ y 0,05ml de sobrenadante. La proporción de la relación fué calculada por disminución de la absorción a 340m μ , en un Espectrofotómetro Beckman D. U., a 25° C. Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry y colaboradores (25).

Resultados

Las actividades de la glucosa 6-fosfatasa y de la deshidrogenasa del ácido láctico fueron medidas colocando a las células en medio de cultivo y en K.R.F., a tiempo cero, es decir, recién extraídas y 18 ho-

XVIII

ras después, también en los dos medios.

Los resultados de las mediciones están en la Tabla I:

Horas	Glucosa 6-fosfatasa *		Deshidrogenasa de ac.láctico **	
	Medio de cultivo	K.R.P.	Medio de cultivo	K.R.P.
0	a-80±4,2 (5)	c-19,2±2,6(5)	e-1984±60 (5)	g-1243±104 (5)
18	b-159,3±1,9(5)	d-16,1±1,3(5)	f-4931±280(5)	h-824±69 (5)

Tabla I

El test ⁽⁵⁴⁾ ~~fué~~ ^{fué} significativo, $p < 0,001$ para la diferencia entre a y b, e y f, g y h; a y c; b y d y f y h; y significativo, $0,005 < p < 0,01$ entre c y g

* Actividad específica - cambio en μ moles de sustrato por minuto por gramo de proteína.

** Actividad específica- cambio en μ moles (DPNH→DPN) por minuto por gramo de proteína.

Como se puede observar, la actividad específica de estas enzimas es mucho más alta en células colocadas en el medio de cultivo que en K.R.P. Cuando han sido colocadas en medio de cultivo, aumentan su actividad después de 18 horas de incubación, no sucediendo lo mismo con el Ringer.

INCORPORACION DE LEUCINA C^{14} en PROTEINAS

La síntesis de proteínas constituye una prueba más que el sistema en estudio es viable.

En este experimento se midió la biosíntesis de proteínas por la incorporación de leucina C^{14} en las mismas. Como en el caso anterior, se hicieron pruebas con células a 0 horas y 18 horas en el medio de cultivo y de la misma edad en medio salino. Se probó que, efectivamente, se trataba de una incorporación real en proteínas, al incubar con puromicina las células que habían permanecido 18 horas en el medio de cultivo.

Por los estudios de Yarmolinsky y de la Haba (70) se sabe que la fórmula de la puromicina está relacionada con la estructura del amino-acil-tRNA. El antibiótico actuaría bloqueando la síntesis de proteínas al funcionar como un análogo del amino-acil t-RNA y que lo sustituiría como aceptor del péptico carboxílico activado. La peptidil puromicina así formada sería incapaz de continuar el crecimiento de la cadena polipeptídica. Se formarían péptidos de longitud variada pero con el amino ácido N terminal apropiado en una punta y el residuo de puromicina en lugar del C terminal.

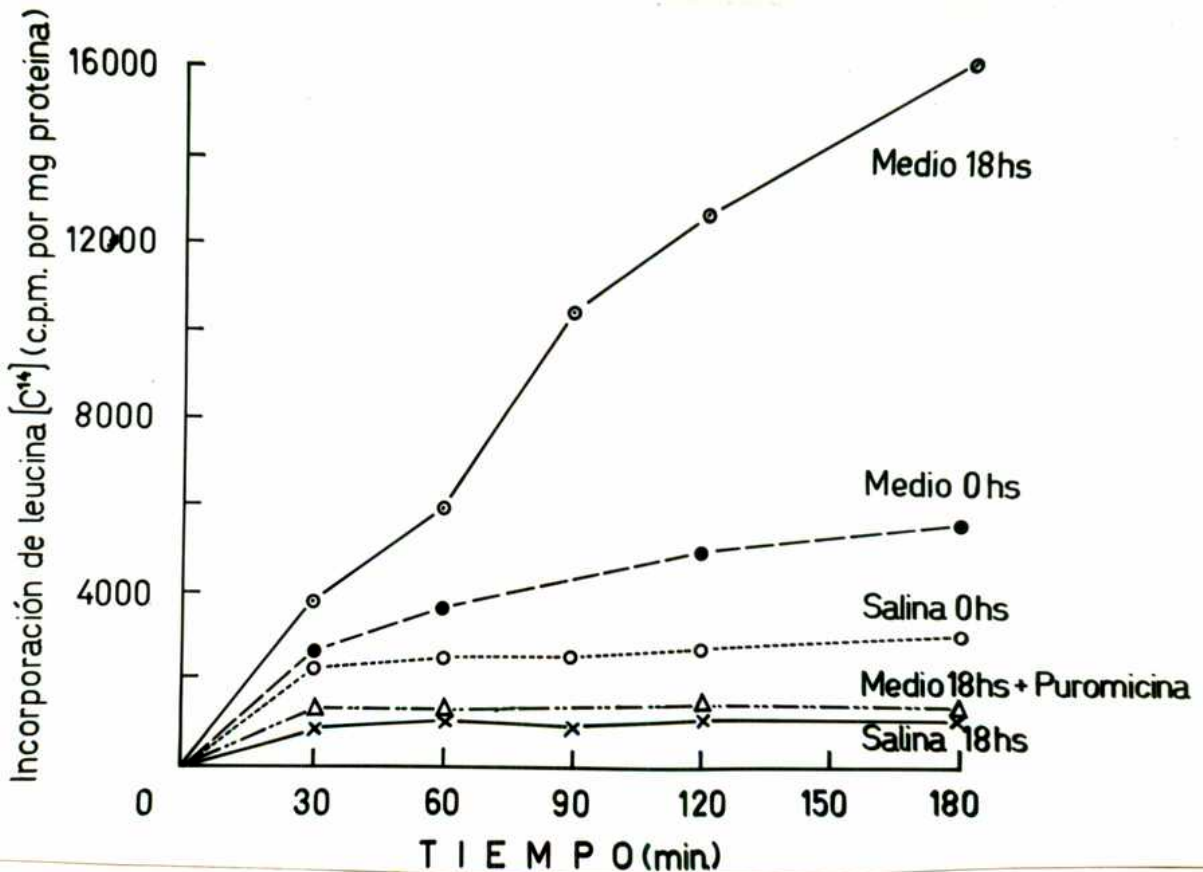
Método utilizado: Inmediatamente después de dispersadas las células, se las coloca en una concentración de $2,3 \times 10^6$ cél. por ml., en medio de cultivo o en K. R.P. con glucosa 0,0011 M. ph 7,3. Se usaron a tiempo 0, o sea, inmediatamente después de dispersadas en los medios y 18 después de la incubación.

La suspensión en el volumen deseado, fué centrifugada a 150xg, a temperatura ambiente, durante 10'. El sedimento fué resuspendido en K.R.P. con glucosa, con una concentración celular de 7×10^7 por ml. Cinco ml. de estas células fueron colocadas en frasquitos que contenían μ g de l-leucina- $U-C^{14}$ (act. esp. 300mc/ ml New England Nuclear Co) La incubación se realizó en un Dubnoff, con agitación, a 37° C. La reacción se detuvo por el agregado de 3 ml de T.C.A. al 5%, a 85°C. Luego se agregaron 5ml. de cloroformo-metanol 2:1 y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. El producto obtenido se disolvió durante un día

en 1 ml. de ácido fórmico a 37° C y su volumen colocado en una plancheta, secada y leída la radioactividad en un contador Geiger-Müller. En uno de los grupos se agregó puromicina, 5×10^{-4} M, al comienzo de la incubación. La concentración de proteínas fué determinada por el método de Lowry y Col (25).

Resultados: Están resumidos en la figura 3. Se puede observar que las células incubadas durante 18 horas en el medio de cultivo son las que incorporan mayor cantidad del aminoácido marcado. La curva aumenta su pendiente entre los puntos de 0 y 30' y entre los 60 y 90'.

Figura 3



Las del medio a 0 hora sólo aumentan la incorporación durante los primeros 30'. A partir de este momento la curva se va achatando. La curva correspondiente a la solución salina a 0 horas alcanza un "plateau" a los 30'. En las células mantenidas durante 18 horas en la solución salina no hay síntesis de proteínas y lo mismo sucede en las que se realizó la incubación con puromicina.

OXIDACION DE GLUCOSA UNIFORMEMENTE MARCADA

La medición del metabolismo constituye un aspecto importante que probaría la viabilidad del sistema en estudio. Cuando se realizaron los comentarios bibliográficos sobre los métodos que se habían utilizado para extraer células hepáticas, se mencionaron algunos trabajos (10 - 11) en los que se comprobaba la viabilidad de las células midiendo la captación de O_2 en un respirómetro de Gilson. En estos experimentos los autores obtienen valores altos aunque la respiración sólo se mantiene lineal durante dos horas. Kalant y Young (26) obtienen baja captación de O_2 cuando trabajan con células sueltas o cortes de hígado y alcanzan valores muy altos, especialmente en células aisladas, agregando succinato. Ichihara y col. (8), en el trabajo ya comentado, estudian el control de la respiración en células dispersas. Demuestran que el ciclo de Krebs es activo y que se mantiene el control respiratorio. Kalant y Miyata (27), trabajando con hígado perfundido con EDTA y citrato, comparan los resultados de la respiración con aquellos obtenidos con cortes de tejidos de órgano perfundido. En células aisladas muestran cocientes respiratorios más bajos "in vitro", glicólisis anaeróbica más baja y un incremento cuando se agrega succinato, con respecto a los cortes. Las mitocondrias aisladas de estas células e incubadas en presencia de catoglutarato, respiran en la misma forma que las mitocondrias preparadas de un hígado normal. La suspensión celular baja sus cocientes respiratorios en forma más acentuada a medida que transcurre el tiempo de incubación. Interpretan estos resultados afirmando que hay una alteración de la membrana celular después del tratamiento con EDTA y citrato, independiente del daño mecánico. Hayek y Tripton (9), en el trabajo ya mencionado, prueban diversos intermediarios del ciclo de Krebs para estimular la respiración celular. En general obtienen resultados satisfactorios.

Método utilizado en el presente trabajo

La respiración celular se midió utilizando como sustrato glucosa uniformemente marcada con C^{14} . Este método resulta mucho más sencillo, sensible y específico que los ya mencionados en el breve comentario an-

terior.

Las células fueron resuspendidas en K.R.P. (24) en una concentración de 10^7 cél./por ml. y cinco ml. de esta suspensión fueron colocados en frascos de 25 ml, de fondo chato, que contenían 1µc de glucosa-U- C^{14} (act. esp. 15,1 mc/ml New England Nuclear Co.) en un 1 ml. de solución salina. Los frascos fueron herméticamente tapados con tapones tipo vacuna reversibles que contenían un vasito de vidrio con una ventana lateral. La incubación se efectuó en un baño de agua tipo Dubnoff, a 37° C y con agitación. Después de incubadas se agrega a la suspensión celular 0,5 ml. de ácido sulfúrico al 10% y en el vasito de vidrio -- 0,2 ml. de hidróxido de Hyamina IM (Packard) en metanol. Ambas adiciones fueron llevadas a cabo utilizando jeringas y agujas. Se incubó nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación, y el vasito conteniendo la hyamina, usada como agente para captar el CO_2 (28) fué volcado cuidadosamente en un frasco para contador por centelleo que contenía 15 ml de solución centelladora (5g/ l de PPO y 0,3 g/l POPOF en tolueno) agitando y contando en un Contador de centelleo líquido. El peso seco fué obtenido centrifugando un volumen determinado de células en tubos tarados, a 500xg, a temperatura ambiente, durante 20'. El sedimento se usa en la determinación. Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry y colaboradores (25). También en este experimento, como en el anterior, se usaron células que habían sido incubadas durante 18 horas en medio salino y en medio de cultivo, lo mismo -- que células a 0 tiempo en ambos medios.

Resultados:

En la figura 4 están resumidos los resultados de este experimento. Es bien evidente que las células mantenidas durante 18 horas en el medio de cultivo son los únicos que tienen respiración líncal. Las de 0 hora en medio no alcanzan nunca los valores anteriores. Las células -- mantenidas en solución salina no respiran prácticamente.

Se siguió midiendo la respiración celular a través del tiempo, obteniéndose los siguientes resultados:

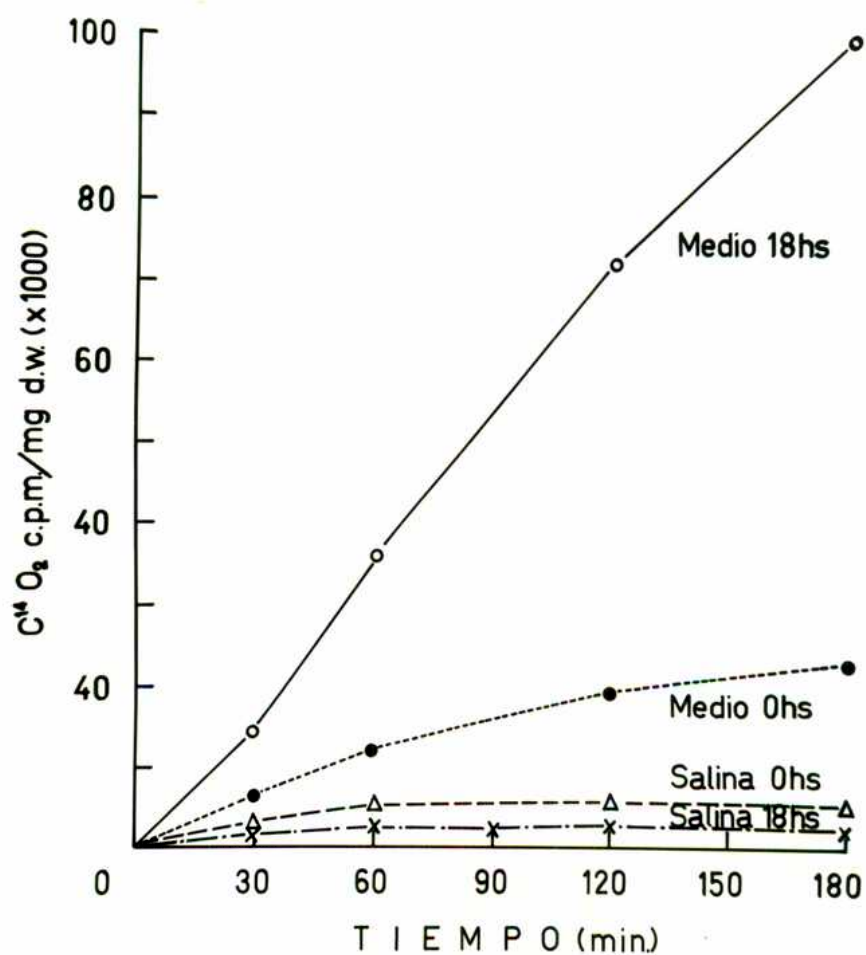
$C^{14}O_2$
e.p.m./g proteínas

0	día	-----	24.800 ± 960	(4 mediciones)
5	días	-----	24.600 ± 960	"
15	días	-----	26.000 ± 840	"
30	días	-----	14.350 ± 960	"

Se puede observar que los altos valores obtenidos después de 18 horas de cultivo, disminuyen a los valores iniciales y se mantienen hasta los 15 días. Hacia los 30 días, los valores llegan casi a la mitad. Este fenómeno es -- muy frecuente en los cultivos de tejidos. Posiblemente se trate de un cambio a metabolismo predominantemente anaeróbico.

Figura 4

Respiración celular. Efecto del medio.



Producción de glucógeno

Siendo el hígado el principal órgano de síntesis y almacenamiento de glucógeno, resulta interesante medir su producción en estas células. Fué medido por el método de Good et al. (29) y el ADN por el método ya mencionado (16).

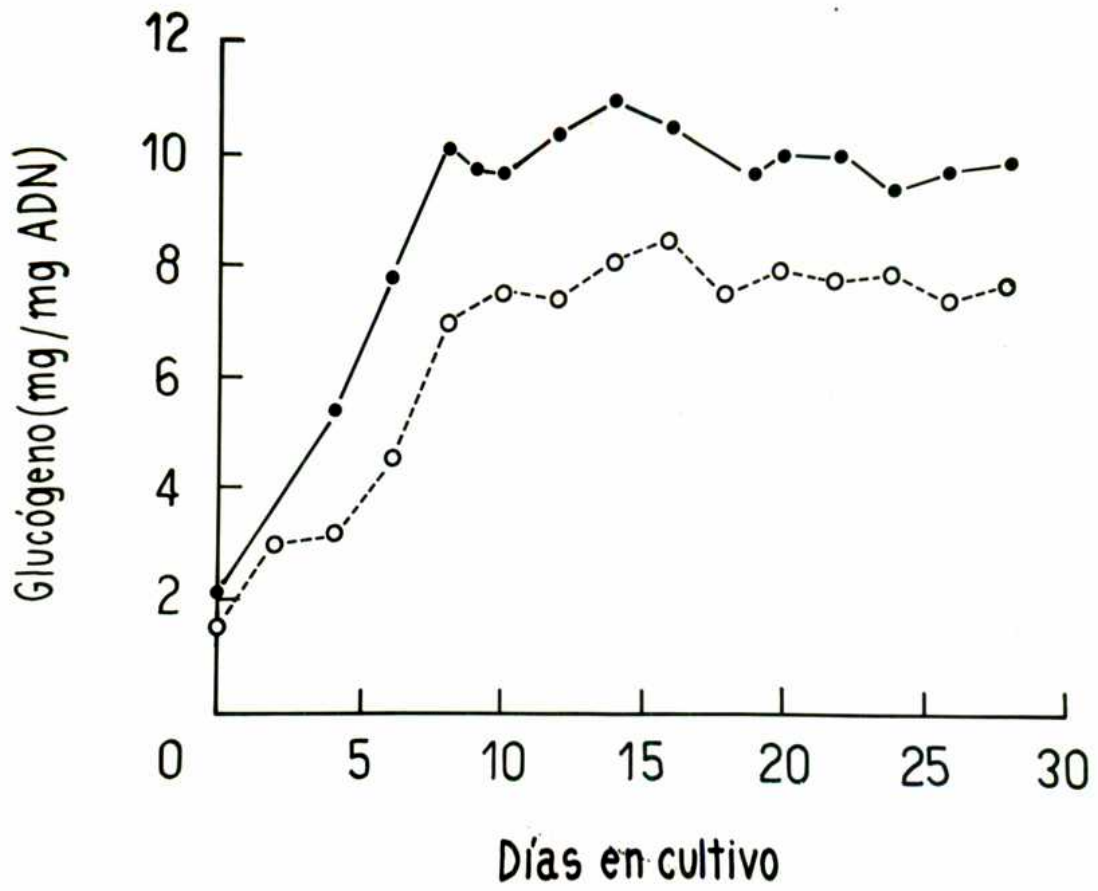
En la figura 5 se observan los resultados de estas mediciones. Fué realizada tomando como abscisa la relación mg. de glucógeno/mg. de ADN contra la ordenada que expresa el tiempo de cultivo. Se registra un aumento neto durante los primeros siete a ocho días, lo que indicaría mayor cantidad de glucógeno, y correspondería al período de estabilización de la población celular. Después de este período, la curva se mantiene prácticamente en un "plateau".

A continuación se comentarán los resultados de la medición de glucógeno en dos cultivos diferentes, que fueron designados por las letras a y b; el glucógeno está expresado como μ l de glucosa equivalente por 100 mg. de proteínas \pm error standard; la concentración de -- glucosa en el medio es de 10mM.

<u>Días de cultivo</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
0	2,6 \pm 0,2	4,2 \pm 0,2
5	12,0 \pm 0,2	
15	19,2 \pm 0,6	17,4 \pm 0,6
16		22,8 \pm 0,3
28		25,2 \pm 1,4
30	16,6 \pm 1,0	

Se puede observar que al comienzo del experimento la concentración del glucógeno es muy baja, hasta alcanzar un nivel a los 15 días que no cambia mucho a los 30 días. La brusca disminución de los primeros días puede ser explicada como debida a una adaptación de las células al nuevo medio o a la recuperación luego del tratamiento con T.P.B.

Figura 5



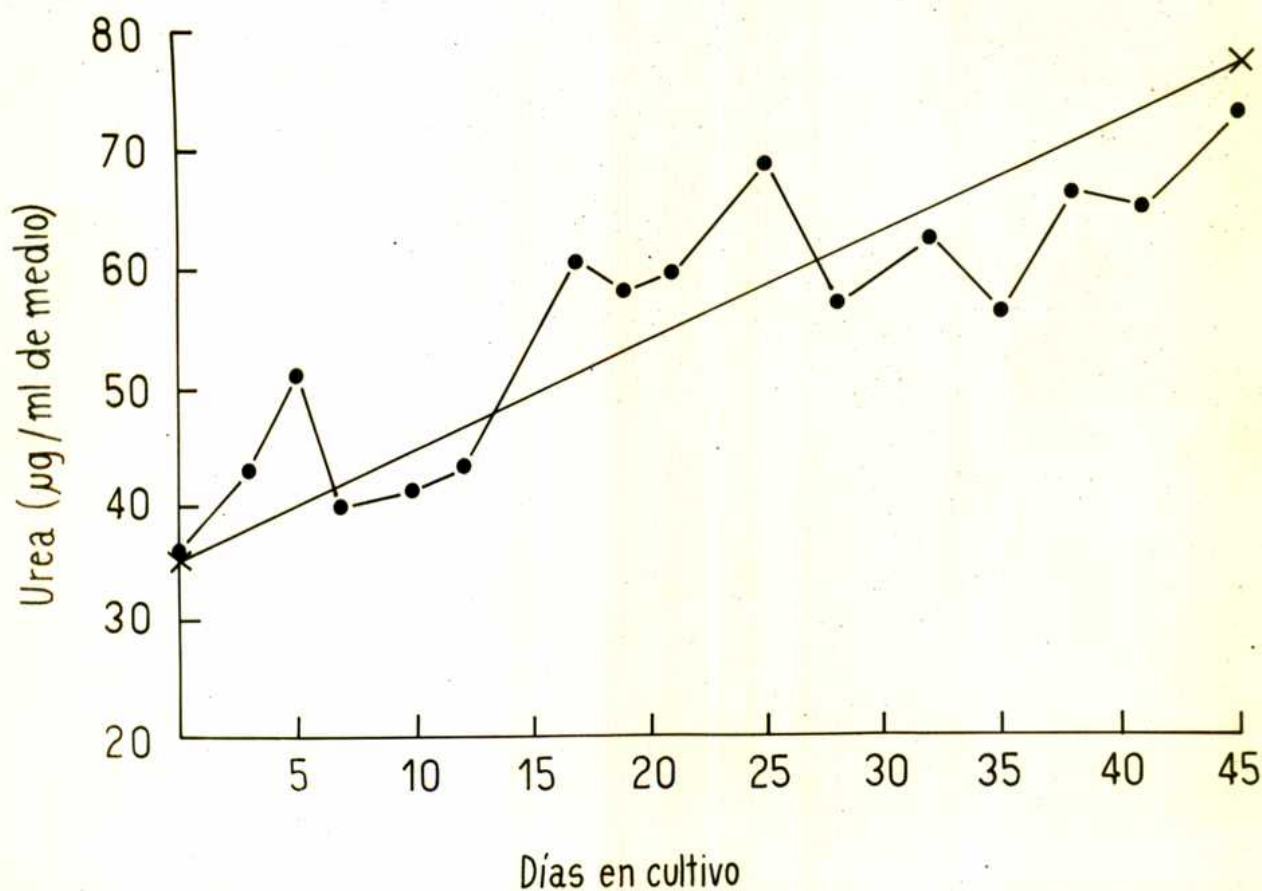
Referencias

Círculos blancos y círculos negros son dos cultivos diferentes

PRODUCCION DE UREA

Se ha indicado que el hígado es el único sitio importante de formación de urea, por lo que también parecía interesante estudiar la excreción de urea por las células hepáticas en cultivo, que darían un índice más del funcionamiento de las mismas a través del tiempo.

Se midió la presencia de urea en el medio de cultivo, por el método de Archibald (30), y los resultados se expresaron en μg de urea por ml. de medio a través del tiempo de cultivo. El resumen de los mismos está representado en la figura 6:



Se deduce de estos datos que la producción de urea es continua durante los 45 días en que se la midió, lo que indicaría que esta importante función del hígado no se ha perdido por efecto de la desdiferenciación. Además, se midieron algunas enzimas del ciclo de la urea en "pellet de células".

XXVII

EFFECTO DE HORIZONAS

La baja relación de crecimiento y la predominancia de hepatocitos, lo mismo que la uniformidad de condiciones en el cultivo en suspensión, hizo suponer que se trataba de un sistema ideal para realizar estudios hormonales. Además, si se podían hacer comparaciones con otros sistemas ya conocidos, se podría probar una vez más la eficacia del sistema.

Con tales objetivos, se midieron los efectos de tres hormonas, insulina, glucagón y hormona de crecimiento bovina, sobre funciones ya estudiadas en otros modelos.

Efecto de la insulina sobre la respiración celular.

No se sabe cual es el mecanismo de acción de la insulina, pero parece estar aceptado que permite una mejor utilización de la glucosa por los diferentes tejidos. En preparaciones más simples que el animal entero, como los órganos perfundidos o cortes de tejidos, se ha demostrado un mayor consumo de glucosa, a la vez que una mayor producción de glucógeno o de CO_2 proveniente de la glucosa (31)

En el presente experimento se midió el efecto de la insulina sobre la producción de C^{14}O_2 a partir de glucosa uniformemente marcada, utilizando los dispositivos y materiales ya descritos (respiración), agregando además insulina cristalina (Lilly), con una concentración de -- 50 mU / ml al medio de incubación.

Los resultados del experimento están en la tabla II:

Se obtiene un aumento del 20 al 30% de C^{14}O_2 con respecto a los controles, lo que estaría de acuerdo con lo establecido en otros sistemas simples, cortes de tejidos u órganos perfundidos

El uso de mayores concentraciones de insulina aumenta muy poco los resultados y de menores concentraciones introduce resultados aberrantes.

Tabla II

C¹⁴O₂ c.p.m./g prot.

Días	Control	Insulina
0	24 800 ± 950	29 000 ± 788
5	24 500 ± 720	31 000 ± 1140
15	26 000 ± 840	32 150 ± 837
30	14 350 ± 354	17 310 ± 462

Cada medición se hizo por cuatuplicado, más o menos el error standard. El test "t" da significativo entre los valores controles y los tratados con insulina. (p < 0,02)

Efecto de la insulina y el glucagón sobre la síntesis de glucógeno.

Los efectos de la insulina y el glucagón sobre la síntesis de glucógeno fueron descritos en animales enteros y pudieron ser explicados a través del control de la glucógeno sintetasa y del sistema de la fosforilasa; la insulina incrementa la actividad de la glucógeno sintetasa del hígado y decrece la de la fosforilasa, mientras que el glucagón tiene efectos opuestos (32 -33).

Para realizar este estudio se tomaron células del cultivo y se las centrifugó a 150xg durante 10' y a temperatura ambiente. -El sedimento celular se vuelve a centrifugar después de resuspenderlo en K.R.P., luego de la centrifugación, que se realizó con las mismas condiciones que en el caso anterior, se resuspende otra vez en K.R.P. Se agregan 4U de insulina (Lilly) cada 5 ml de volumen, y se lo incuba por tres horas. En los que se va a medir el efecto del glucagón, se les agrega 1µg/ 5 ml (Lilly) y se lo incuba por una hora más. La reacción se detiene sumergiendo los tubos en hielo. Se centrifugan a 900xg, 10' a 0°C, nuevo lavado en K.R.P. y nueva centrifugación. Se midió el glucógeno por el método ya especificado (29), lo mismo que las proteínas(25).

Los resultados están especificados en la Tabla III:

Días de cultivo	Control	Con insulina	Con glucagón
<u>a</u> 0	2,6 ± 0,2	6,0 ± 0,2 **	2,0 ± 0,2 **
<u>b</u> 0	4,2 ± 0,2	6,4 ± 0,2 **	2,8 ± 0,4 **
<u>a</u> 5	12,0 ± 0,2	20,8 ± 0,3 ***	10,4 ± 0,4 **
<u>b</u> 15	17,4 ± 0,6	24,3 ± 1,0 **	15,2 ± 0,6 **
<u>a</u> 15	19,2 ± 0,6	40,4 ± 1,6 **	20,2 ± 1,2 **
<u>b</u> 15	22,3 ± 0,3	30,6 ± 1,2 **	19,6 ± 0,3 **
<u>a</u> 30	16,6 ± 1,0	34,6 ± 1,4 **	22,2 ± 0,3 **
<u>b</u> 28	25,2 ± 1,4	42,6 ± 0,8 **	28,4 ± 1,6 **

Concentración de glucógeno (µM de glucosa equivalentes por 100mg. de proteínas ± error standard). En cada experimento se hicieron tres observaciones; a y b son dos experimentos diferentes.

** p < 0,02

Los resultados obtenidos muestran una gran similitud con la situación "in vivo", lo que permite afirmar que el sistema celular es útil para realizar estudios bioquímicos y hormonales.

EFFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA B. G. H.

Se ha establecido fehacientemente que la hipofisectomía disminuye el crecimiento de los animales y que los tratamientos con hormonas de crecimiento estimulan el crecimiento y la síntesis de proteínas y RNA en hígado de ratas y otros tejidos (34 - 35 - 36 - 37). La hormona de crecimiento afecta la habilidad de los ribosomas de hígado de rata a incorporar aminoácidos en proteínas "in vitro" (38), y ligar o trasladar el templado de RNA en hígado (39). La actividad de la polimerasa de RNA de núcleo de hígado de rata también es afectada por la hormona de crecimiento (40). En todos estos experimentos, los efectos de la hormona fueron examinados después de la inyección de la hormona en el animal; todos los intentos de demostrarlos "in vitro" con células de hígado libres fracasaron. En diafragma de rata aislado se encontró aumentada la incorporación de aminoácidos en proteínas (41 - 42).

Los estudios realizados sobre cultivos de células han enfocado el efecto de la hormona de crecimiento sobre la multiplicación celular y el contenido de proteínas (43).

En estos mismos sistemas se estudió el efecto de la hormona sobre el metabolismo de los carbohidratos y proteínas. En la cepa "L" de células, la hormona causa un incremento del número de células, aumento de la síntesis de proteínas y consumo de glucosa, acumulación de ácido láctico y cetoácidos. En los cultivos de cepas humanas se aumenta solo la consumición de glucosa y de ácido láctico. Sobre células HeLa no tiene ningún efecto. Probando hormona ovina, no se encuentra efecto sobre la cepa "L", pero sí aumento del consumo de glucosa y acumulación de ácido láctico en los cultivos humanos, sin cambiar el número de células o la síntesis de proteínas (44).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la hormona de crecimiento bovina sobre multiplicación celular o crecimiento de la población.

Se utilizó hormona de crecimiento bovina purificada (45) y desnaturalizada (46).

La hormona activa se usó en una concentración de 17,5; 25; 50; 75 y 100 μ /ml.

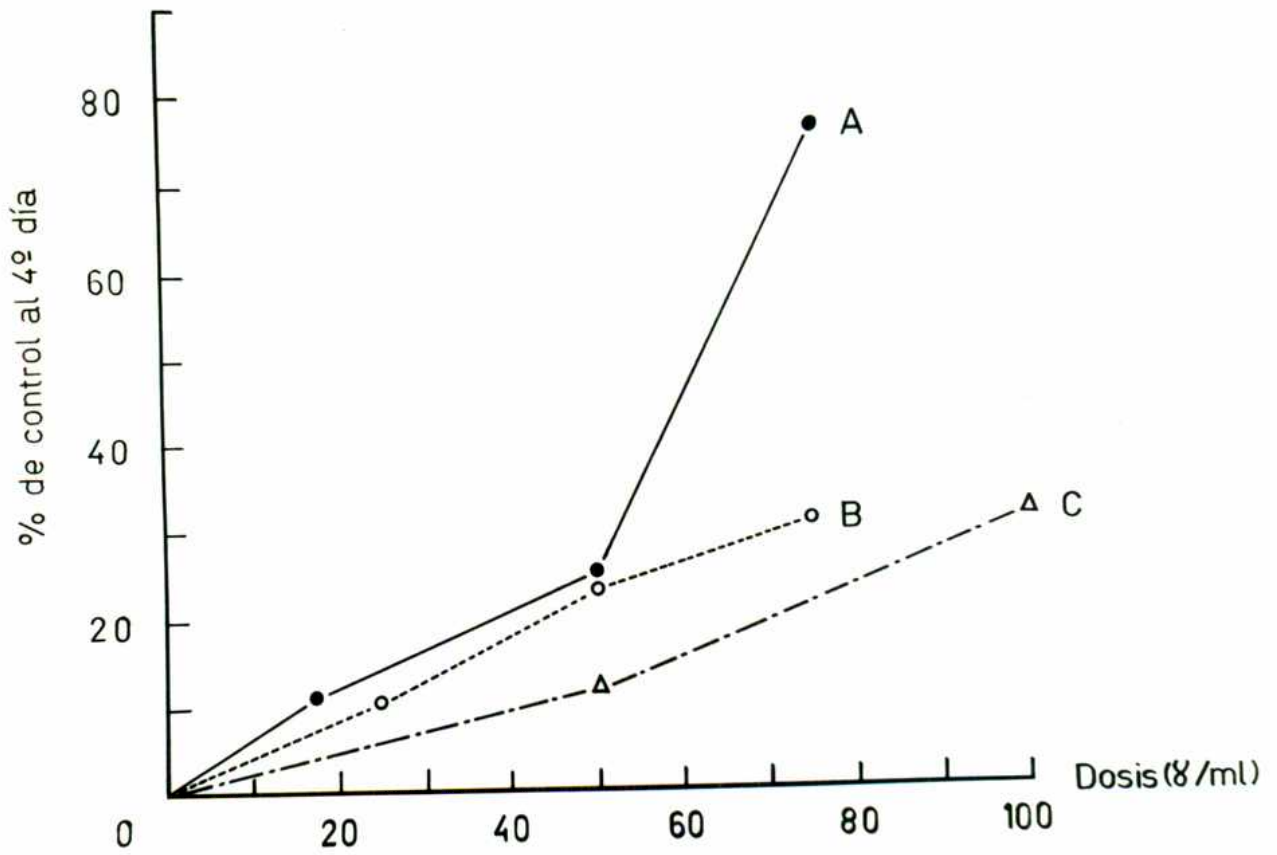
La hormona desnaturalizada se usó como control en una concentración

de 75 μ /ml. y 100 μ /ml, según el experimento. Se disolvieron los dos tipos en medio de cultivo fresco.

Se realizaron tres experimentos diferentes: A, B y C, cuyos resultados están resumidos en la figura 7. El experimento A, se realizó con células de 12 días de cultivo; el B, con células de 19 días, y el C, con células de 13 días. En los experimentos A, y B, se usó como control hormona inactivada a una concentración de 75 μ /ml, y en el C, de 100 μ /ml. Se colocaron las células en el medio con hormona a una concentración de 1,2 a 1,49 X 10⁶ células /ml. con un volumen total de 25ml. para cada tratamiento. Después de cuatro días de incubación, se contaron nuevamente las células para detectar los cambios. Los resultados de los tres experimentos fueron graficados expresando la concentración de la hormona contra el porcentaje de aumento en el número con respecto al cuarto día (cada punto se hizo por duplicado). Las diferencias entre los datos de B y C pueden deberse a variaciones no controladas hasta ahora en el cultivo. La desviación del punto de 75 μ /ml de A se debe probablemente a un error de conteo en la etapa inicial, pues los puntos finales fueron muy bien controlados. Se puede afirmar, de acuerdo con los resultados aquí presentados, que la hormona activa la división celular y que hay mayor activación cuanto mayor es la concentración usada. Es decir, que las células de hígado responden al efecto de la hormona, como ya se había encontrado en otros cultivos, aunque no en cultivos primarios de células normales como el utilizado acá.

Figura 7

Efecto de hormona de crecimiento bovina sobre el crecimiento de la población celular.

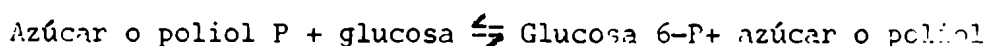
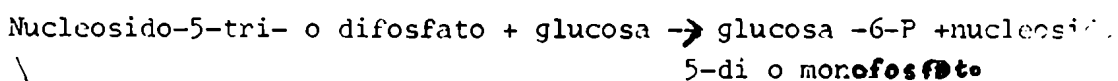
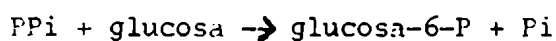
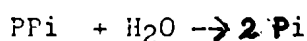
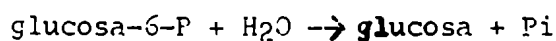


Explicación en el texto.

ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA 6 - FOSFATASA

Se tiene conocimiento que los explantes primarios de trozos de tejidos o de células difieren, bioquímicamente, del tejido original. Estos cambios pueden deberse a diferentes proporciones de crecimiento, selección de la población celular o a cambios intrínsecos de las células. Todas estas modificaciones reciben el nombre de diferenciación celular y en el caso particular del cultivo de tejidos o de células, el nombre más apropiado es de dediferenciación celular. Los cambios intrínsecos de las células se deben a procesos adaptativos que cambian las vías metabólicas del material en cultivo, debidos a ajustamientos cualitativos o cuantitativos de las enzimas; por lo tanto proveen un modelo para el estudio de la regulación de la actividad enzimática.

En este trabajo se estudiaron las enzimas microsomales D glucosa 6-fosfato fosfohidrolasa (E. C. 3. 1. 3. 9.), pirofosfato inorgánico-glucosa transferasa y pirofosfato fosfohidrolasa (E.C. 3.6.1.1). Estas tres actividades fueron atribuidas a una sola enzima multifuncional (47 a 52 y 23), que catalizaría las siguientes reacciones:



Esta enzima no puede ser purificada más allá de una precipitación con sulfato de amonio pues pierde todas sus actividades (47). Los datos existentes corresponden a experimentos cinéticos y cambio paralelos observados en preparaciones purificadas parcialmente de hígados de animales sometidos a influencias hormonales o nutritivas (23 y 47 a 52).

Determinaciones enzimáticas

Se procedió como ya se explicó en los experimentos presentados anteriormente, para determinar las tres actividades enzimáticas mencionadas. En algunos experimentos se agregó a la solución de sacarosa

deoxicolato de Na. con una concentración final del 0,2%, con lo que se consigue activación de las enzimas (23, 47 a 52)

Las actividades de la glucoquinasa y hexoquinasa fueron realizadas sin demora en un extracto crudo libre de microsomas, obtenido después de someter las células a los procedimientos ya descritos pero usando técnicas y material para homogenizar, determinar y centrifugar las enzimas, descrito por Di Pietro y colaboradores (53). Todas las actividades en imáticas se hicieron por triplicado. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col. (25).

Los valores de las constantes de Michaelis fueron calculados en gráficos convencionales dobles y recíprocos, determinados al menos en cinco puntos, en homogenatos crudos. Los gráficos fueron lineales.

Los estudios de pH fueron llevados a cabo en microsomas obtenidos por el centrifugado, lavado y homogenizado de las células como se explicó anteriormente; los homogenatos fueron centrifugados a 9000xg, luego el sobrenadante a 100000 xg y el sedimento lavado y vuelto a centrifugar y suspendido en una solución de sacarosa 0,25 M. Las determinaciones se realizaron por duplicado; las actividades fueron medidas en una serie y el pH determinado en la otra serie con un PH Metrohm.

Resultados

Tabla IV

Niveles enzimáticos inmediatamente después de la disociación del hígado y después de 40 días de incubación

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm el error standard. El número de experimentos está entre paréntesis.

Los datos representan la actividad específica, cambio en micromoles de sustrato por minuto, por gr.de proteína, determinado en homogenatos crudos.

La comparación entre I y II, II y IV, I y III y II y IV, es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en todos los grupos, según el test "t". (54).

Se puede observar que a los 40 días de cultivo la actividad de la glucosa 6-fosfatasa desciende 20,4 veces, la transferasa 2,4 veces y la

otra enzima 23 veces. La adición de desoxicolato incrementa la actividad en ambos tipos de células:

Tabla IV

	0 día		40 días	
	Desoxicolato			
	Ausente I	Presente II	Ausente III	Presente IV
D-glucosa 5-fosfato fosfohidrolasa	77,6 ± 6,2 (3)	95,4 ± 7,4 (3)	3,3 ± 0,2 (3)	4,7 ± 0,2 (3)
Pirofosfato inorgánico-glucosa - transferasa	50,3 ± 6,0 (3)	88,2 ± 9,2 (3)	20,4 ± 1,4 (3)	36,2 ± 0,3 (3)
Pirofosfato fosfohidrolasa.	73,3 ± 7,5 (3)	105,5 ± 0,2 (3)	3,2 ± 0,2 (3)	4,8 ± 0,4 (3)

En la tabla V se observa con más detalle el efecto del desoxicolato.

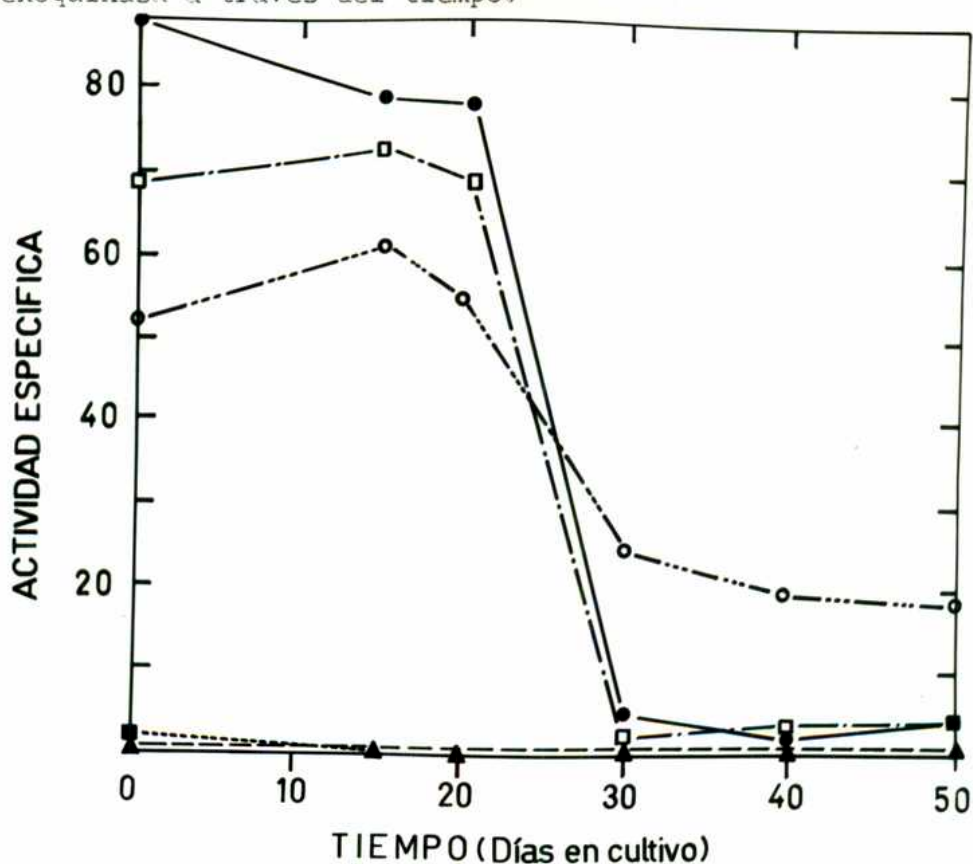
Estos datos se calcularon con los de la tabla IV

Tabla V

	Proporción de 0 a 40 días		Efecto del desoxicolato (% de incremento)	
	Desoxicolato		Días en cultivo	
	Ausente	Presente	0	40
glucosa 5-fosfatasa	20,4	20,2	22,9	23,6
pirofosfato inorgánico-fosfotransferasa	2,4	2,4	73,6	77,4
pirofosfato fosfohidrolasa	22,9	24,0	41,2	40,6

Se puede ver que el desoxicolato incrementa las tres actividades con un porcentaje igual ya sea a los 40 como al día 0 y las relaciones de actividad entre los 0 y 40 días son los mismos con respecto a la ausencia o presencia del detergente.

En la figura 8 se observan con más detalle los cambios descritos anteriormente y se incluyen las actividades de la glucokinasa y hexoquinasa a través del tiempo.



Referencias

- — Pirofosfato-glucosa fosfotransferasa ● — Glucosa 6-fosfatasa
 □ — glucosa 6-fosfato-fosfohidrolasa ■ — Glucoquinasa ▲ — Hexoquinasa

Actividad específica: cambio en micromoles de sustrato por minuto, por gramo de proteína.

Cada punto es el valor medio de tres determinaciones.

En esta figura se observan las modificaciones que sufren las tres enzimas estudiadas, más la glucokinasa y hexoquinasa durante un período bastante largo de tiempo, 50 días. Las actividades decrecen recién en forma apreciable después de día 20° y después del día 30° casi no hay cambios significativos. Los niveles de hexoquinasa son despreciables y no varían y después del día 15° no se detecta actividad glucoquimásica, que siempre, es de hacer notar, es muy bajo, se diría insignificante.

Los resultados de los estudios cinéticos realizados sobre estas tres enzimas, están resumidos en la Tabla VI

Constantes de Michaelis

Días en cultivo	Glucosa 6-fosfatasa	Pirofosfato inor-glu-fosfotrans.		Pirofos-fosfohid
	$K_{\text{glucosa 6-fosfato}} \text{ (mM)}$	$K_{\text{ppi}} \text{ (mM)}$	$K_{\text{glucosa}} \text{ (mM)}$	$K_{\text{ppi}} \text{ (mM)}$
0	$1,63 \pm 0,11 \text{ (4)}$	$3,40 \pm 0,30 \text{ (4)}$	$96,6 \pm 3,3 \text{ (3)}$	$3,15 \pm 0,36 \text{ (3)}$
30	$1,70 \pm 0,09 \text{ (4)}$	$3,37 \pm 0,27 \text{ (4)}$	$100,6 \pm 9,5 \text{ (3)}$	$3,23 \pm 0,31 \text{ (3)}$
40	$2,65 \pm 0,22 \text{ (4)}$	$3,36 \pm 0,35 \text{ (4)}$	$95,6 \pm 9,8 \text{ (3)}$	$3,20 \pm 0,24 \text{ (3)}$
50	$2,77 \pm 0,23 \text{ (4)}$	$3,38 \pm 0,43 \text{ (4)}$	$98,3 \pm 7,2 \text{ (3)}$	$3,10 \pm 0,49 \text{ (3)}$

Los datos representan valores medios \pm el error standard. Las comparaciones entre los grupos de 0 ó 30 días vs. 40 ó 50 días en cultivo fueron significativas estadísticamente.

(Aplicando el test "t" (54) con $p > 0,05$)

La afinidad de la glucosa 6-fosfatasa por la glucosa 6-fosfato es la única que cambia y esto sucede después de 30 días en cultivo. Para las otras enzimas no hay cambio de afinidad a través del tiempo de cultivo.

En la tabla VII se observa el efecto del desoxicolato de Na. sobre las constantes de Michaelis: (K_m glucosa 6-fosfato (mM) de la glucosa 6-fosfato-fosfohidrolasa).

Días en cultivo	Desoxicolato	
	Ausente	Presente
0	1,72 \pm 0,14 (4)	1,70 \pm 0,19 (4)
40	2,36 \pm 0,23 (4)	2,69 \pm 0,23 (4)

(Los mismos detalles que en la tabla VI)

El tratamiento con desoxicolato no tiene efecto sobre las constantes de Michaelis, ya se trate de células de 0 y de 40 días.

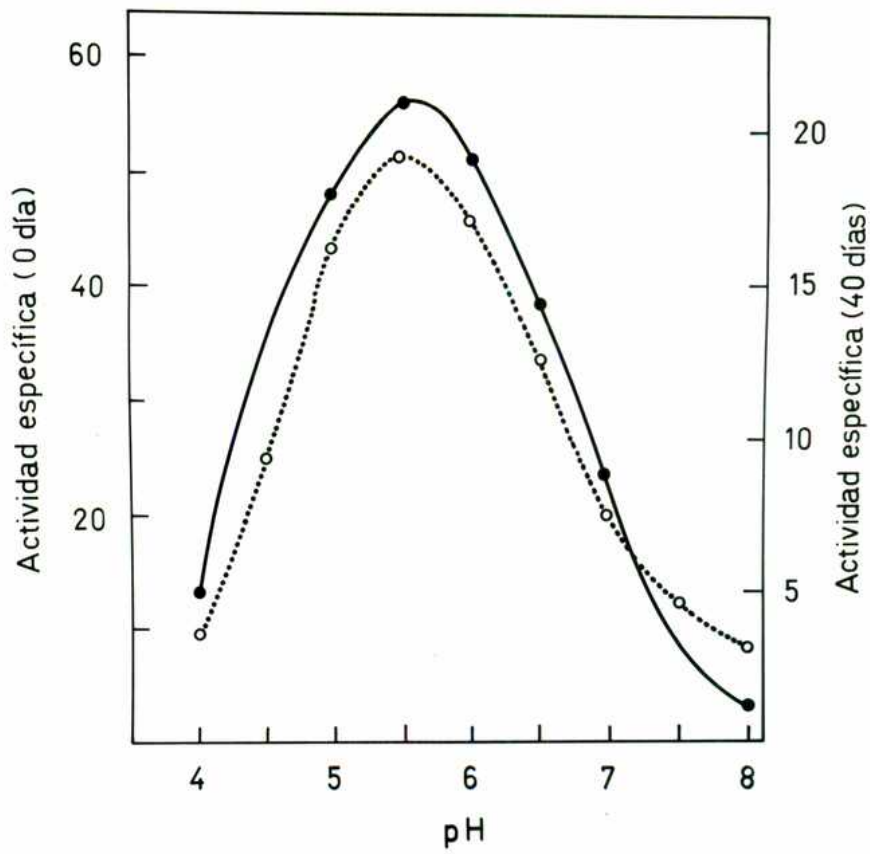
Para que sea más segura la identidad entre la glucosa 6-fosfata del día 0 y la de 40 días de cultivo, se realizó el estudio de la influencia del pH sobre su actividad:

En la figura 9 se pueden apreciar los resultados (la actividad específica como en los casos anteriores):

Las curvas son similares, con pH óptimos idénticos.

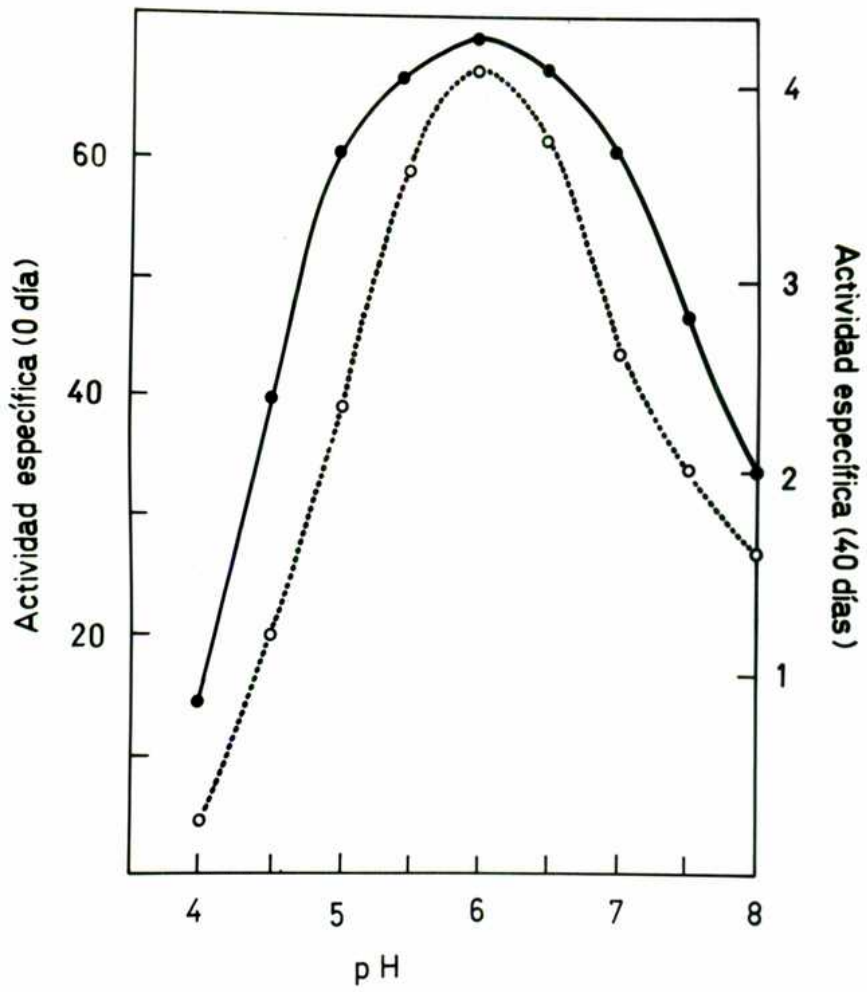
Un estudio similar se hizo con la pirofosfato-inorgánico-glucosa fosfotrasferasa.

Corresponden a los datos presentados en la figura 10.- Tampoco aquí se encontró ninguna diferencia.

Figura 9Referencias:

- 0 día
- 40 días

Figura 10



Referencias:

- 0 día
- 40 días

De todos estos estudios realizados se puede sacar una conclusión importante que estaría en desacuerdo con la opinión de los autores que estudiaron a la glucosa -5-fosfatasa. Debido a las diferentes relaciones de disminución de las tres actividades enzimáticas a través del tiempo de cultivo, podría tratarse de dos o tres enzimas y no de una sola. Si se considera que la enzima es multifuncional, los cambios observados podrían ser el resultado de alteraciones en su estructura que la afectarían de modo que su cinética fuese diferente.

La menor disminución de la actividad fosfotransferasa puede explicarse como un mecanismo compensador para la fosforilación de la glucosa, que no puede deberse a una actividad glucoquinásica, ya que esta enzima necesita de la presencia de insulina, que no se encuentra en el medio de cultivo y de una concentración de glucosa superior (49,55,56). Además, la enzima tiene muy bajos niveles a la edad de los animales usados en este estudio.

La disminución de la afinidad de la glucosa 6-fosfatasa por su sustrato puede interpretarse como un mecanismo para prevenir la liberación de glucosa, y favorecer su metabolismo hacia otras vías.

Se ha visto que agregando desoxicolato no se afecta la disminución de la actividad específica o el cambio de afinidad por el sustrato; estos resultados son muy diferentes a los obtenidos por Nordlie y colaboradores en ratas ayunadas, diabéticas o adrenalectomizadas. En estas últimas, los detergentes abolían el incremento de actividad observado cuando se las trataba con cortisona (50, 57) mientras que se aumentaba la diferencia entre los altos valores de animales diabéticos con respecto a los normales (50,57).

En ratas ayunadas no cambiaba el nivel de pirofosfato inorgánico-glucosa-fosfotransferasa, mientras que las otras dos estaban aumentadas. Estos valores aumentaban con desoxicolato y el detergente afectaba algunos cambios en las constantes de Michaelis de estas enzimas (56).

EFFECTO DE LA INSULINA SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS

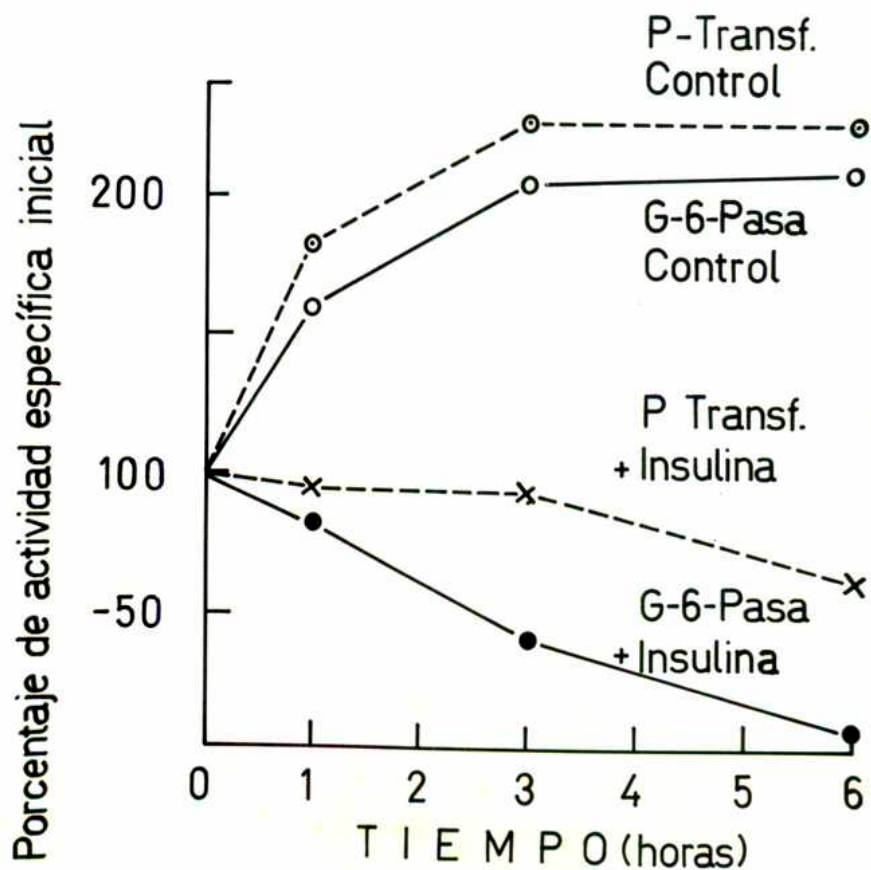
Se tenía interés en saber cómo respondían las células en cultivo y en especial las enzimas estudiadas, al efecto del agregado de insulina al medio de cultivo.

Se sabe que la glucosa 6-fosfatasa tiene un alto nivel en animales diabéticos y baja sus niveles por efecto del agregado de insulina (58)

Otro punto importante que se quería investigar y que probaría la no identidad de la enzimas en estudio, era referente a la cinética de la posible "represión" de las dos enzimas.

Para realizar este experimento se agregó una concentración de hormona igual a la usada en los experimentos sobre utilización de glucosa U-C¹⁴ y se procedió a medir la actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa y de la pirofosfato inorgánico- fosfotrasferasa durante un período breve de tiempo.

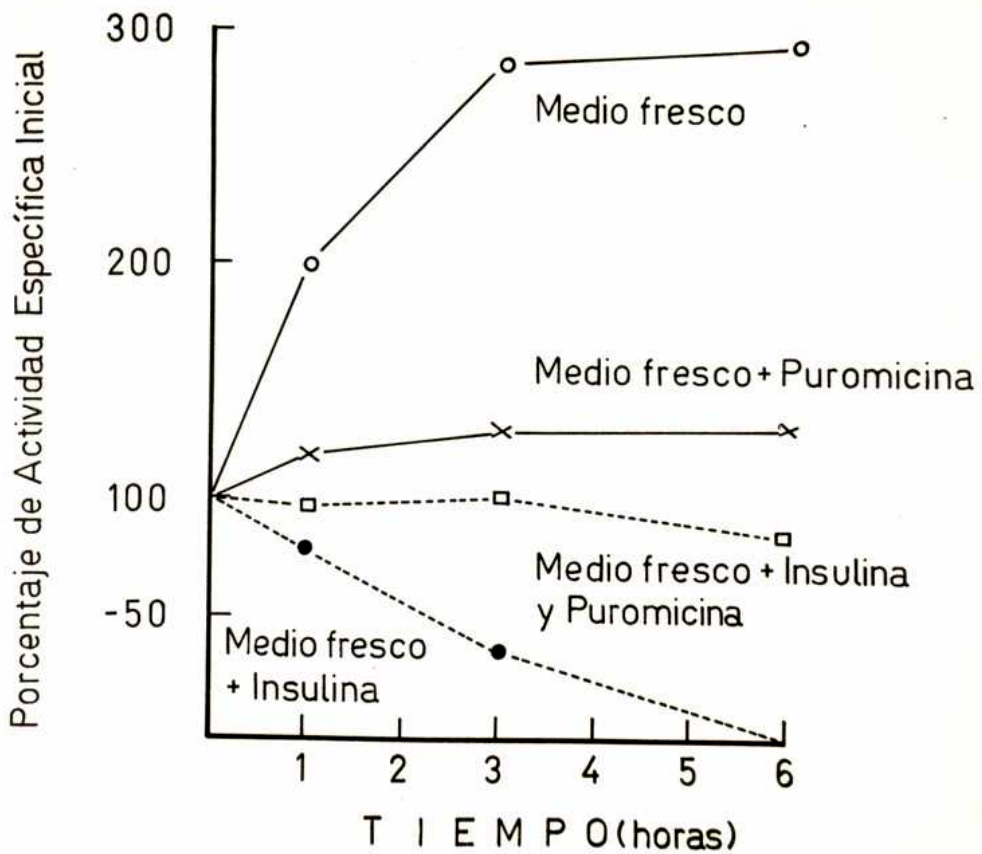
Los resultados están representados en la figura 11, en donde la actividad específica está expresada como en las ocasiones anteriores, en los que se calculó el porcentaje con respecto a la actividad inicial.



Las dos respuestas son parecidas, aunque la actividad específica de la glucosa 6-fosfatasa está más afectada. Después de seis horas de incubación, esta última conserva sólo un 8% de la actividad inicial, mientras que la otra enzima, a ese mismo tiempo, tiene todavía el 60% de esa actividad.

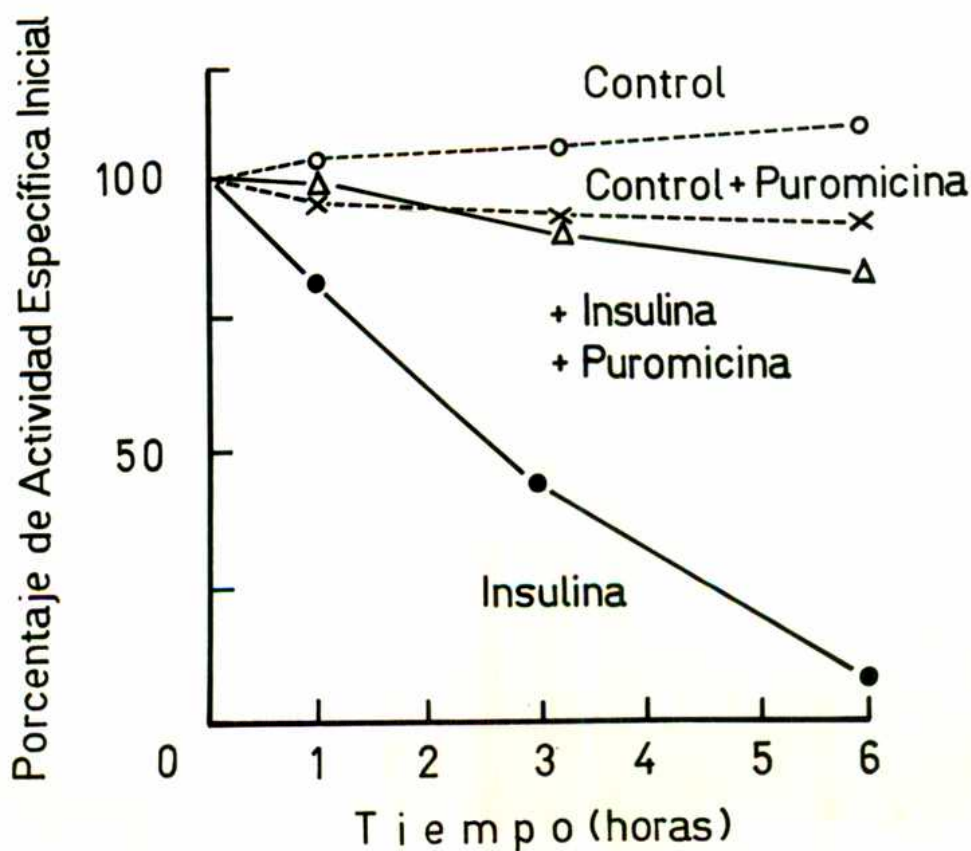
EFFECTO DE LA INSULINA Y DE LA PUROMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA 6- FOSFATASA.

Este experimento fué realizado utilizando células en cultivo a las que se coloca en medio frasco. En estas condiciones se les agregaba ya sea puromicina, insulina o ambas, en las mismas concentraciones en que se las había utilizado en experimentos anteriores. Se midió luego la actividad específica de la glucosa 6- fosfatasa en todas las variables anotadas y se expresaron los resultados en el gráfico que figura a continuación: (La actividad específica expresada como en los casos anteriores).



Como se puede observar, la actividad de la enzima en células colocadas en medio frasco aumenta notablemente durante las tres primeras horas del experimento, posiblemente debido a un aumento de la síntesis de proteínas totales producido por la renovación completa del medio -

de cultivo, no modificándose luego hasta las seis horas en que duró la observación. Cuando se agrega puromicina al medio de cultivo se observa que la actividad de la enzima aumenta muy poco y se mantiene prácticamente como al comienzo del experimento, lo que estaría indicando - que en el primer caso hubo síntesis "de novo", lo que se impide por el efecto de la puromicina y la actividad remanente se debe a la enzima preformada; en el caso del agregado de insulina al medio de incubación se repite, como en el experimento anterior, la disminución de la actividad enzimática hasta casi 0 al final del experimento, lo que estaría indicando que no hay síntesis y también posiblemente hay una inactivación de la enzima preformada o aumento de la degradación (69). Lo que realmente sorprendió fué el resultado que se obtuvo cuando en el medio de cultivo hay puromicina e insulina; se observa que la actividad específica de la enzima es levemente menor que en el caso de la puromicina sola, sin ser significativa, pero mayor y significativa en el caso de la insulina. Estos mismos resultados se obtienen cuando se trabaja con células en las que no se les ha renovado totalmente el medio de cultivo al comienzo del experimento.-Se observan en el siguiente gráfico:



CONCLUSIONES

XLVIII

El objeto de este trabajo era encontrar un sistema de cultivo primario que permitiese estudiar el fenómeno de la desdiferenciación celular y el sistema obtenido de células hepáticas parece ser lo suficiente viable, como se ha podido comprobar por las experiencias de mediciones enzimáticas, incorporación de leucina C^{14} en proteínas y - las mediciones de respiración celular. Con estos experimentos quedó establecido también que resulta mucho más eficaz el medio de cultivo que la solución salina de Krebs (K. R. P.) para realizar los estudios y que las células necesitan un período de aproximadamente dieciocho horas para restablecerse. Por estudios morfológicos también se comprobó que la mayor parte de las células obtenidas son hepatocitos, hecho que quedó revelado no solo por estudios realizados con el microscopio óptico, sino también con el electrónico. No se presentaron aquí las fotografías, pues algunas dificultades de orden técnico, usuales en células cultivadas, no han sido solucionadas todavía.-

Cuando se estudió la curva de crecimiento, se encontró que durante los primeros diez a doce días hay una notable ~~disminución~~ disminución de la población celular, comprobado por el conteo y el contenido de DNA. Después de este período ambos se hacen constantes. Se supone que durante este tiempo mueren muchas células, seguramente por efectos de la extracción y la adaptación de las mismas al nuevo medio.

El tiempo de replicación es bastante lento, si se lo compara con otros sistemas de cultivo, pero resulta rápido si se lo compara con el de las células hepáticas "in situ" (18-19-20). A través del tiempo de cultivo las células siguieron conservando su aspecto de hepatocitos y predominaron sobre otros tipos celulares.

Se comprobó también que la respiración celular, medida por la oxidación de glucosa $-U-C^{14}$, tiene una recuperación bastante acentuada durante las primeras 18 horas de cultivo, pero luego las cifras bajan hasta los valores encontrados en los primeros momentos y se mantienen hasta los quince días aproximadamente. Luego de este período vuelven a bajar. Este fenómeno es bastante común en sistemas de cultivo de células; posiblemente se trate del cambio de un metabolismo de tipo aeróbico a otro predominantemente anaeróbico, debido a las condiciones del cultivo.

La producción de glucógeno y urea, características del hígado, no se afectaron por el fenómeno de la desdiferenciación, por lo menos durante el tiempo en que fueron medidas.

Para estudiar el fenómeno bioquímico de la desdiferenciación se eligieron tres enzimas que participan en el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono. Estas enzimas microsomales fueron descritas como una sola, multifuncional (23, 47 2 52). Por los resultados obtenidos en este trabajo, se duda de esta afirmación, pues se ha observado que presentan diferentes relaciones de disminución de actividades a través del tiempo de cultivo.

Otro hecho que confirmaría este resultado es la diferente respuesta de las enzimas a la insulina.

Se ha encontrado también que la fosfotrasferasa disminuye menos su actividad a través del tiempo de cultivo y esto podría explicarse como un mecanismo compensatorio para la fosforilación de la glucosa, ya que no se ha encontrado actividad glucoquinásica, como se discutió anteriormente. Así mismo hay una tendencia a la disminución de la liberación de glucosa, por el aumento de la K_m para glucosa 6-fosfato, por la enzima glucosa 6-fosfatasa.

Resultó también interesante comprobar en que forma respondían las células cultivadas al estímulo hormonal. Se estudiaron tres hormonas, insulina, y glucagón, relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono y hormona de crecimiento bovina, relacionada con el metabolismo general. Las células responden a la B.G.H. en la forma esperada y ya comprobada en otros sistemas celulares parecidos y hay una relación de respuesta con la concentración de la dosis probada.

Con la insulina se hicieron varios experimentos y los resultados obtenidos están de acuerdo con lo esperado. En algunos casos se probó glucagón, observándose una reversión de los experimentos con insulina, como en el caso de la producción de glucógeno.

Se podría especular que el modo de acción de las hormonas que afectan a los organismos superiores es análoga a la de los inductores o represores específicos de los microorganismos.

En 1960, Clever y Karlson (59) postularon que el efecto primario de la ecdisona de los insectos es alterar la actividad de genes espe-

cíficos. Poco después, Clever (60) confirmó que la hormona **activaría** algunos genes, se sintetizaría ARN y proteínas, los que a su vez activarían a otros genes a través de procesos citoplasmáticos. Karlson (61) demostró "in vitro" que la ecdisona ejerce su acción al nivel de los cromosomas e induce síntesis de ARN mensajero, lo que produce a su vez síntesis de enzimas. Las hormonas aparecen entonces como inductores. La naturaleza del represor en los organismos superiores todavía no ha sido ~~elucidada~~ elucidada. Hasta el momento se piensa que podrían ser las histonas. Kidson y Kirby (62), resumen una serie de trabajos en los que se demuestra el efecto de las hormonas sobre la síntesis de proteínas, especialmente de ARN de rápido recambio (insulina, hormona de crecimiento cortisona, estrógenos, andrógenos y tiroides).

También destacan el hecho de la inducción de enzimas específicas por hormonas (triptófano pirrolasa, que se realizaría a nivel de la transcripción).

Se sugiere que la síntesis de ARN de rápido "turnover" puede ser regulada de igual forma que la síntesis de ARN bacteriano. Demuestran que ese ARN no es ribosómico y proponen la teoría de que las hormonas interactuarían con proteínas represoras de alguna manera alostérica, lo que alteraría la síntesis de ARN mensajero específico. Las hormonas corticoides fueron muy estudiadas, en particular en su relación con el metabolismo de los hidratos de carbono y su acción gluconeogénica, antagónica con la insulina. Con respecto al cortisol y su efecto sobre la síntesis de ARN mensajero (63) se comparó su acción con los co-represores e inductores de los sistemas bacterianos, por su rápida respuesta. En otros trabajos se afirma la suposición de que el efecto primario de las hormonas corticoides es estimular la producción de ciertas especies de ARN y la síntesis "de novo" de enzimas gluconeogénicas (64).

También fueron estudiadas las hormonas androgénicas y se ha comprobado "in vitro" que núcleos y ribosomas de próstata de rata de animales castrados y tratados con testosterona, son más ricos en ARN mensajero que los obtenidos de animales castrados, sin tratamiento hormonal (65).

Todos estos experimentos, realizados con diferentes hormonas y en diferentes tejidos animales, ponen de manifiesto, aunque todavía no comprobado fehacientemente, que las hormonas podrían actuar como inducto-

res o represores en el sentido bacteriano.

El modelo bacteriano podría ayudar a explicar los experimentos realizados con insulina y puromicina sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, pensando, en este caso particular, que la insulina es un apo-represor (66-67-68), que en los organismos superiores no es necesariamente sintetizado en la misma célula, sino que podría pensarse que ciertos órganos, las glándulas de secreción interna, se han especializado para sintetizar inductores o represores, que son las hormonas. Una vez llegado a la célula el apo-represor, se uniría al represor, que sería una sustancia de bajo peso molecular que se ha sintetizado en la célula y se impediría así la síntesis de la enzima. Cuando está presente la puromicina no podría actuar. Este sería un control de síntesis de enzimas utilizando el modelo bacteriano. Pero también se han encontrado sistemas degradativos intracelulares que reducen las proteínas a nivel de aminoácidos. Toda la información de cómo ocurre esto y su control, es rudimentaria (69), pero se sabe que existen proteasas intracelulares u otras enzimas inactivantes, tal vez asociadas a los lisosomas.

Estos sistemas actuarían en organismos complejos y la explicación a nivel del gen está todavía lejos de poder probarse. En el caso particular de este trabajo, si la insulina inhibiese la síntesis de la enzima, tendría un efecto igual al de la puromicina; por lo tanto, la hormona o inhibe la síntesis o aumenta la degradación; si sólo aumenta la degradación, podría hacerlo activando alguna proteasa específica o pegándose a la enzima y alterando su conformación, de manera que pueda ser utilizada como sustrato de esas proteasa específicas. Al agregar puromicina al medio con hormona, se inhibe la síntesis de esas proteasas y resultaría anulado el efecto de la insulina.

M. G. G. G.

Hayao Ferschenon

DE Y N - BIBLIOTECA

1355--

ej-2

Rec. 17. 1855

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO SOBRE CELULAS DE HIGADO DE RATA CULTIVADAS EN SUSPENSION

Delia Casanello

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

- 1970 -

R E S U M E N

Se describe un método original de extracción y cultivo de células hepáticas en suspensión.

Fueron extraídas del hígado con una solución salina de tetraetilborato de Na. y cultivadas con medio de cultivo preparado en el laboratorio, con solución salina balanceada de Hank, vitaminas y glucosa de Eagle y mezcla de aminoácidos MEM. Se suplementó con suero de ternero al 10% y antibióticos. Con la extracción se obtuvieron preferentemente hepatocitos.

Se realizaron estudios sobre el crecimiento de la población celular, medido por el conteo de células y el contenido de ADN. Se determinó el tiempo de replicación celular usando colchicina. Se pudo comprobar que a través del tiempo de cultivo sobrevivían los hepatocitos, no encontrándose prácticamente otro tipo celular.

Se probó el efecto del medio de cultivo para determinar diversas funciones: respiración celular, actividades enzimáticas, incorporación de aminoácidos en proteínas. Asimismo, se midió la producción de urea y glucógeno a través del tiempo de cultivo, comprobándose que estas dos funciones primordiales no se habían modificado.

Con el objeto de verificar la posibilidad de utilizar el sistema para estudios hormonales y bioquímicos de regulación, se midió el efecto de dos hormonas, insulina y glucagón, sobre la respiración celular y la biosíntesis de glucógeno. Las células respondieron en la forma esperada. También se probó la hormona de crecimiento bovina sobre el incremento de la división celular, obteniéndose resultados positivos.

Para estudiar bioquímicamente el proceso de desdiferenciación celular, se midieron diversas constantes bioquímicas de tres enzimas relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono: glucosa 6-fosfatasa, pirofosfato inorgánico-glucosa fosfotrasferasa y pirofosfato-fosfohidrolasa. Estas tres acciones fueron atribuidas a una sola enzima multifuncional, afirmación que está en divergencia con los resultados obtenidos en este trabajo. Las tres enzimas tienen diferentes relaciones de disminución de actividad a través del tiempo de cultivo; además la actividad fosfotrasferasa está poco disminuida, con respecto a las otras dos, y se deduce de esto una tendencia a la fosforilación de la glucosa, no considerada como actividad

glucoquinásica, ya que no existe insulina en el medio de cultivo. midieron también las constantes de Michaelis y se determinó una disminución de la afinidad de la glucosa 6-fosfatasa por su sustrato, interpretándose como un mecanismo para prevenir la liberación de glucosa.

Además se probó el efecto de la insulina sobre la actividad específica de la glucosa 6-fosfatasa y fosfotrasferasa y el efecto de la insulina y puromicina sobre la primera. A ese respecto se especula con la teoría de que las hormonas actúan como inductores o repressores en términos bacterianos.

Clawson

B I B L I O G R A F I A

- 1 - Grobstein, C. en "The Cell", Ac.Press, vol I, 1959: 438
- 2 - Champy, C. Bibliographie Anatomique, 23, 1913: 184
- 3 - Garvey, J.S. Nature, 191, 1961: 975
- 4 - Sandstrom, B. Expl. Cell Research, 57, 1965: 552
- 5 - Germain, G.S., H. Schneider and E.E. Murhead, Expl. Cell Res.,
43, 1966: 493
- 6 - Watanabe, R., Expl. Cell Res., 42, 1966: 685
- 7 - Harris, C.C. and Leone, Ch.A., J. Cell Biol., 28, 1966: 405
- 8 - Ichihara, A., K.A. Adachi, J. Dsikuhara and J. Takada,
J. Biochemistry, 157, 1965: 696
- 9 - Hayek D. H. and Tripton, J.R., J. Cell Biol, 29, 1966: 405
- 10- Howard, R., B. Christensen, A. Kent, F.A. Gebbs and L.A. Pesch
J. Cell Bio., 35, 1957: 675
- 11- Howard, R.B. and K.L.A. Pesch, J. B. Chemistry, 243. 1968: 3105
- 12- Rappaport, C. and G.B. Howze, Proc. Soc. Expl. Bio. and Med.
121, 1966: 1010
- 13- Hanks, J.H. and R.E. Wallace, Proc. Soc. Expl. Bio. and Med.
71, 1949: 196
- 14- Eagle, H., Science, 122, 1955: 501
- 15- Eagle, H. Science, 130, 1959: 432
- 16- Fleck, A. and H.N. Munro, Bio. Bioph. Acta, 55, 1962: 571
- 17 - Bender, M.A. and Prescott, D.M. Exptl. Cell. Res, 27, 1962: 224.
- 18- Buchenan, D.L., Arch. Biochem. Biophys., 94, 1961: 501
- 19- Mc. Donald, R.A., Arch Intern. Med., 107, 1961: 335
- 20- Swick, R. W., A.L. Koch and T. Handa, Arch, Biochim. Biophys,
63, 1956: 226
- 21- Sawicki, W. and J. Kieler, Acta Path. Microb. Scand., 72(1), 1968.
- 22- Echavellanos, S.M. and I. Sadnik, Stain Tech., 39, 1964: 289.
- 23- Nordlie, R.C. and W.J. Arion, en "Method in Enzimology, Wood, W.
(ed.), 9, 1966: 619
- 24- Krobs, H.A. and L.V. Egleston, Biochem. J., 34, 1940: 442
- 25- Lorry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and P.J. Randall,
J. B. Chemistry, 193, 1951: 265

- 26 - Kalant, H. and F.O. Young, *Nature*, 179, 1957: 816.
- 27 - Kalant H. and R. Miyata, *Bioch. J.*, 86, 1963: 336.
- 28 - Snyder, F. and Godfrey, P., *J. Lipid Res.*, 2, 1961: 195.
- 29 - Good, C., H. Cramer and M. Somogy, *J. Biol. Chem.*, 100, 1935: 485.
- 30 - Archibald, R.N., *J. Biol. Chem.*, 157, 1945: 507.
- 31 - Niemeyer, H. en "Bioquímica". Ed. Intermédica. Bs.As. Arg., 1968: 317.
- 32 - Steiner, D.F., *Nature*, 204, 1964: 1171.
- 33 - Sutherland, E.W., and T.W. Rall, *Pharmacol. Rev.*, 12, 1960: 265.
- 34 - Simpson, M.E., H.M. Evans and C.H. Li, *Growth*, 13, 1949: 151.
- 35 - Talwar, G.P., N.G. Panda, G.S. Scarin and A.J. Tolani, *Biochem. J.*, 32, 1962: 173.
- 36 - Korner, A., *Biochem J.*, 74, 1960: 462.
- 37 - Korner, A. *Biochem. J.*, 92, 1964: 449.
- 38 - Korner, A., *Biochem. J.*, 91, 1961: 292.
- 39 - Korner, A. and J.M. Gumbley, *Nature*, 209, 1966: 505.
- 40 - Pegg, A.E. and A. Korner, *Nature*, 205, 1965: 904.
- 41 - Kostyo, J.L. and E. Knobil, *Endocrinology*, 65, 1959: 525.
- 42 - Manchester, K.L. and F.G. Young, *J. Endocrinology*, 18, 1959: 381.
- 43 - Moon, H.D., V. Jantoft and Ch. Li, *Endocrinology*, 70, 1962: 31.
- 44 - Maca, R. and J.F. Foley, *J. Endocrinology*, 39, 1967: 321.
- 45 - Dellacha, J.M. and M. Somenberg, *J. Biol. Chem.* 239, 1964: 1515.
- 46 - Faiferman, I., Tesis de Doctorado. Fac. Farm. y Bioquímica, Un. de Bs. As. 1967.
- 47 - Nordlie, R. C. and W.J. Arion, *J. Biol. Chem.*, 239, 1964: 1680.
- 48 - Arion, N.J. and R.G. Nordlie, *J. Biol. Chem.*, 239, 1964: 2752.
- 49 - Nordlie, R.G. and N.J. Arion, *J. Biol. Chem.*, 240, 1965: 2155.
- 50 - Nordlie R.G. N.J. Arion and E.A. Glende Jr., *J. Biol. Chem.* 240, 1965: 3479
- 51 - Nordlie R.C. and D.G. Lygre, *J. Biol. Chem.*, 241, 1966: 3136.
- 52 - Arion W.J. And R.G. Nordlie, *Bio. Bioph. Res. Comm.* 20, 1965: 606.
- 53 - Di Pietro, D.L. and S. Weinhouse, *J. Biol. Chem.* 235, 1960: 2542.
- 54 - Fisher, R.H. and F. Kates, *Statistical Tables for Agricultural, Biological and Medical Res*, 1953.
- 55 - Salas, M., K. Viñuela and A. Sols, *J. Biol. Chem.*, 238, 1963: 3535.
- 56 - Niemeyer, H., N. Pérez and R. Codoced, *J. Biol. Chem.*, 242, 1967: 860.

- 57 - Nordlie, R.G. and R.E. Snoke, *Bio. Bioph. Acta*, 148, 1967:222.
- 58 - Nordlie, R.C., W.S. Arion, T.L. Hanson, J.R. Gilsford and R.N. Horne, *J. Biol. Chem.* 243, 1968.
- 59 - Clever, V. and P. Karlson, *Exptl. Cell Res.* 20, 1960: 623.
- 60 - Clever V. *Science*, 146, 1964: 794.
- 61 - Karlson, P., en "*Endocrine Genetics*", Spekket, S. .(ed),
Cambridge and the University Press, 1967:67.
- 62 - Kidson, C. and K.S. Kirby, *Nature*, 203, 1964: 599.
- 63 - Kidson, Ch. *Bio. Bioph. Res. Comm.*, 21, 1965 : 283.
- 64 - Weber, C., S.K. Srivastava and R.L. Singal, *J. Biol. Chem.*, 240,
1965: 750.
- 65 - Liao, S., *J. Biol. Chem.* 240, 1965: 1236.
- 66 - Mahler, H.R. and E.H. Codes, en "*Biological Chemistry*", Harper
and Row (publ.) New York and London, 1966:814.
- 67 - Ptashne, M., *Proc. N. Ac. Sc.*, 57, 1967: 306.
- 68 - Gilbert, W. and B. Muller - Hill, *Proc. N. Ac. Sc.*, 56, 1967: 1891.
- 69 - Schimke, R.T., *Nat. Canc. Inst. Monograph*, 27, 1967:801.
- 70 - Yarmolinsky, M.B. and G.L. de la Haba, *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*
45, 1959: 1721.