

ANÀLISI DEL GRAU DE TRANSFORMACIÓ CEL·LULAR MITJANÇANT UN COMPTADOR ELECTRÒNIC DE PARTÍCULES : IMPORTÀNCIA PER A L'ESTUDI D'INHIBIDORS DEL CICLE CEL·LULAR

A. VILARDELL *, J. M. CASAS *, M. J. MAS * i C. M. CUCHILLO **

* Departament de Bioquímica, Facultat de Medicina U.A.B.

** Departament de Bioquímica, Facultat de Ciències U.A.B.
i Institut de Biologia Fonamental, U.A.B.

El 1957, P. Weiss ¹ proposà un model teòric per a explicar els mecanismes de control del creixement dels teixits, que es basava en l'existència de retroinhibidors negatius de la proliferació cel·lular.

El 1960, W. S. Bullough i E. B. Laurence proposaren el terme *calones* per a anomenar aquests inhibidors.²

Les característiques de les calones serien, segons W. S. Bullough ³: ser reversibles (no tòxiques), produïdes per cada teixit, i ser teixit específic però no espècie específica. Respecte a aquest últim punt, J. C. Allen i C. J. Smith ⁴ proposen l'expressió teixit preferent en lloc de teixit específic. A més, les calones gaudirien d'un mecanisme de síntesi i posterior degradació, un mecanisme de transport entre les cèl·lules, i un mecanisme de reconeixement i resposta per part del teixit específic.⁵ Per permetre la rapidesa d'aquesta resposta, la calona tindria una vida mitjana curta, amb un control estricte de la seva síntesi i degradació.

S'han fet assaigs en diferents teixits, en base a aquest concepte teòric, que semblen demostrar l'existència d'un factor que tindria característiques semblants a les descrites per la calona.

Una de les calones més estudiades és la limfocítica, la qual sembla ser un glucopèptid que pot formar complexos amb RNA de baix pes molecular.⁶ Sota aquest concepte, s'obren diferents possibilitats d'aplicació pràctica, com poden ser: el tractament de diferents tipus de neoplàsies,^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15} o bé la utilització com a agent immunosupresor;^{16, 17, 18, 19} així com d'aplicació teòrica en els processos d'envelliment,²⁰ interdependència de teixits durant el desenvolupament i diferenciació embrionaris,²¹ regeneració de teixits, omeostasi tisular, comprensió de la dinàmica del cicle cel·lular, i d'altres.

Fins a la detecció de l'activitat calònica dels extractes de diferents teixits, s'ha fet mesurant la incorporació de Timidina tritiada (3HT) a cultius cel·lulars del teixit en qüestió. Aquest mètode, a més de no detectar la inhibició a

G2, té moltes fonts d'error: dilució de la 3HT per Timidina dels extractes, fixació de la 3HT no deguda a la incorporació al DNA, acció d'enzims que modifiquin o degradin la ⁽¹⁾3HT (p.e., T Quinasa, T Hidrolasa, T Fosforilasa), o inhibició deguda a la Timidina que es pugui trobar als extractes.²²

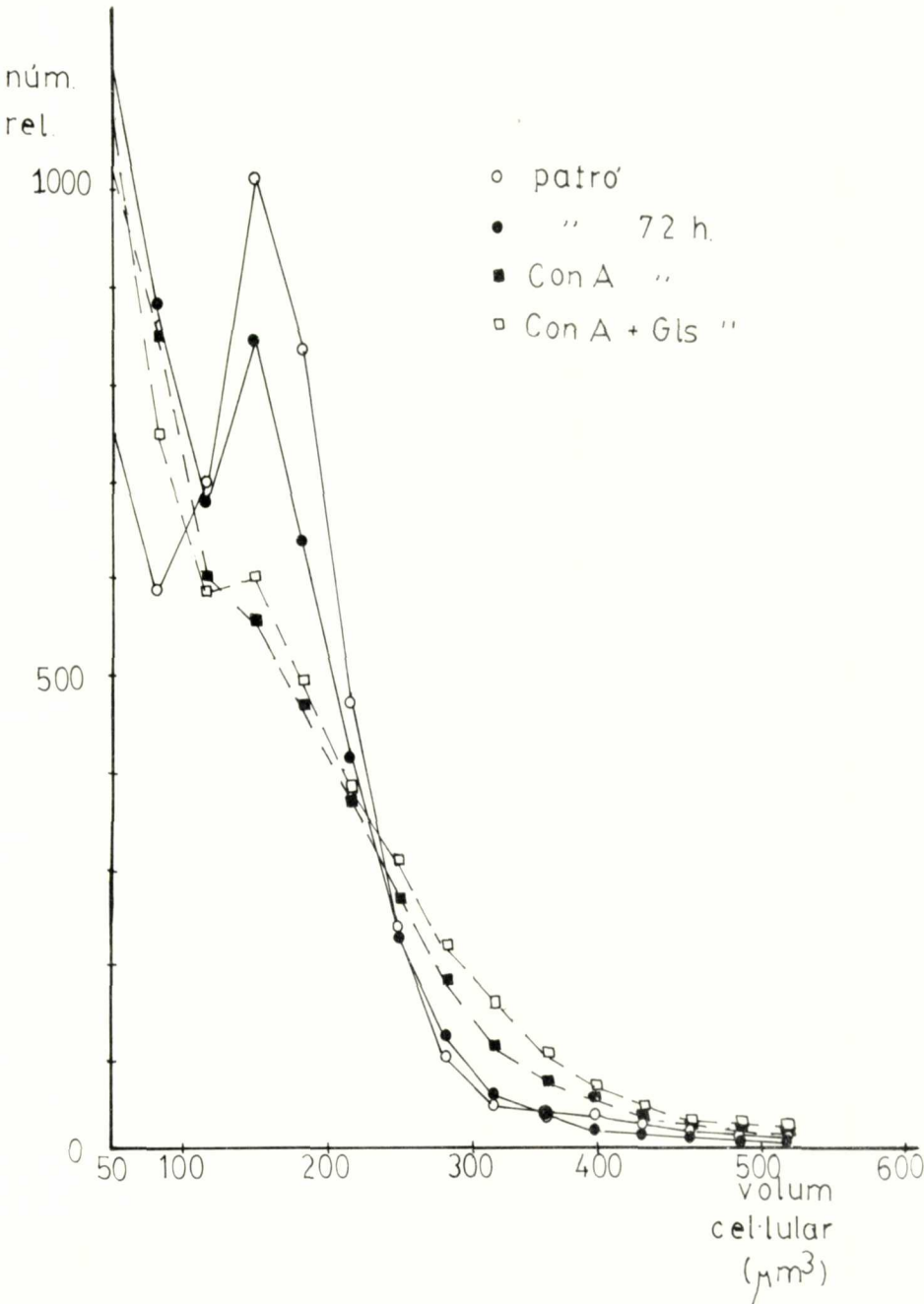
Es feia, doncs, necessària la utilització d'una tècnica que pogués superar aquestes crítiques. S'escollí, en aquest sentit, la mesura de la distribució volumètrica de cultius de limfòcits, com un sistema ideal per a l'estudi de la transformació limfocítica, ja que, com és sabut, el volum celular augmenta durant el pas de la cèl·lula al llarg del cicle celular.

En un primer pas això es va fer per observació directa al microscopi òptic,²³ però aquest sistema, a més de ser lent i feixuc, obligava a classificar les cèl·lules en uns pocs grups segons la seva grandària, donant lloc a una baixa sensibilitat del mètode. S'ha de tenir en compte que el procés de transformació és gradual, i això fa difícil en molts casos adjudicar les cèl·lules a un grup o un altre.

Actualment aquest seguiment es fa mitjançant un comptador electrònic de partícules Coulter Counter model ZBI, que permet d'obtenir la corba de distribució de volums de les cèl·lules en pocs minuts i gran precisió. Aquest aparell compta els impulsos elèctrics produïts quan una partícula passa a través de l'orifici d'una sonda submergida a la dissolució que volem analitzar, deguts al canvi de resistència en el camp elèctric existent entre un elèctrode situat a l'interior de la sonda i un altre a l'exterior. Aquests impulsos són d'intensitat proporcional al volum de la partícula, això ens permet saber el nombre total de partícules dintre d'uns marges de volums determinats, i com es distribueixen entre aquests marges segons la seva grandària.

Aquesta tècnica presenta també alguns inconvenients a l'hora d'analitzar la dinàmica d'un cultiu de limfòcits. En primer lloc, els limfòcits no s'obtenen mai totalment lliures d'altres tipus de partícules. Tot i que la seva separació a partir de sang perifèrica desfibrinada en gradient de Ficoll més Urografin a una densitat de 1.080 g/cc permet separar-los amb un grau de puresa al voltant del 90 % respecte de la resta de leucòcits, i que els eritròcits són separats quasi totalment, sempre queda una certa quantitat dels esmentats eritròcits, així com cèl·lules en procés de destrucció i plaquetes. Tots aquests components formen un pic a grandàries inferiors al dels limfòcits (vegeu gràfica) que pot, en certes condicions, arribar a tapar aquest últim pic.

Per altra part, com que els limfòcits obtinguts es troben en fase Go o de repòs, cal provocar-ne la transformació. Això s'ha fet habitualment en els estudis que empren 3HT, amb mitògens del tipus de la PHA, Con A o bé PWM principalment segons es volgués estimular selectivament els limfòcits T o B. Aquestes lectines, com és sabut, a part de l'efecte mitogènic, presenten també efectes leucoaglutinants; això fa que sigui necessari trobar un mètode per a desfer aquests acúmul·ls a fi i efecte de poder comptar les cèl·lules i obtenir llur distribució volumètrica. Això s'ha intentat resoldre afegint, poc abans del comptatge del cultiu, un competidor específic de la lectina usada. En el cas de la PHA es pot usar la N-acetil-Galactosamina i per la Con A la N-acetil-glucosamina. En ambdós casos el resultat és el mateix. L'exemple que s'exposa en la gràfica és el cultiu esti-



mulat amb ⁽²⁾8 µg. de Con A per ml de cultiu durant 72 h., al qual s'ha afegit N-acetil-glucosamina.

Es pot observar que la corba que resulta d'afegir N-acetil-glucosamina per a desfer els acúmul, indica un augment de cèl·lules a la zona de volums superiors al pic de limfòcits, respecte del patró sense Con A a 72 hores i del patró amb Con A i sense N-acetil-glucosamina. Això indica que hi ha una fracció de cèl·lules que han augmentat llur grandària respecte del patró sense Con A.

Tanmateix, el nombre de cèl·lules en el cultiu amb Con A tractat amb N-acetil-glucosamina, tot i essent més elevat que el de Con A sense el glúcid, no arriba al comptatge del cultiu sense Con A, la qual cosa indica que el trencament d'acúmul no ha estat total.

Per altra part, hi ha l'inconvenient que s'ha de realitzar un comptatge per cada interval de volums que vulguem analitzar. Això imposa una limitació quant al marge de volums a considerar i al nombre d'interval·ls que es podran comptar dins d'aquest marge, perquè treballem amb volums de cultiu reduïts i no és convenient allargar massa estona el temps de comptatge de cada mostra.

Aquests inconvenients s'han intentat resoldre, per una part amb l'ús d'antígens com a substàncies mitogèniques. Això implica, però, una resposta més petita per part dels limfòcits, ja que només una petita part resulten estimulats. El darrer inconvenient es pot resoldre fàcilment amb l'ús d'un Chanalyzer acoblat al comptador de partícules. Aquest aparell permet de comptar les partícules dintre d'un gran nombre d'interval·ls al mateix temps.

Malauradament, per la realització d'aquest tipus de treballs ens trobem amb greus problemes d'infraestructura que dificulten l'obtenció de dades, i que van des de la no existència d'un subministrament regular de sang, fins a qüestions del tipus de la fiabilitat del medi de cultiu, car les característiques d'aquest presenten una forta dependència del lot de fabricació.

Malgrat tot, creiem que aquesta tècnica resulta idònia, no solament per l'estudi de l'efecte d'estimulació i inhibició de diferents substàncies sobre un cultiu cel·lular, ans també per tots aquells treballs que necessitin un seguiment del progrés de les cèl·lules al llarg del seu cicle cel·lular.

BIBLIOGRAFIA

1. WEISS, P. i KAVANAV, J.L. (1975): *J. Gen. Physiol.* 41, 1-47.
2. BULLOUGH, W.S. i LAURENCE, E.B. (1960): *Proc. Royal Soc. B* 151, 517-536.
3. BULLOUGH, W.S. (1962): *Biol. Rev.* 37, 307-342.
4. ALLEN, J.C. i SMITH, C.J. (1979): *Biochem. Soc. Trans.* 7, 584-592.
5. BULLOUGH, W.S. (1971): *Agents & Actions* Vol. 2/1, 1-7.
6. HOUCK, J.C. i al. (1977): *Science* 196, 896-897.
7. BULLOUGH, W.S. i LAURENCE, E.B. (1968): *Eur. J. Cancer* 4, 587-594.
8. RYTÖMAA, T. i KINIEMI, K. (1968): *Eur. J. Cancer* 4, 595-606.
9. MOHR, U. i al. (1968): *Nature (London)* 220, 134-139.
10. RYTÖMAA, T. i KIVINIEMI, K. (1970): *Cell Tis. Kinet.* 1, 329-340.
11. RYTÖMAA, T. i al. (1976): *Scand. J. Haem. Suppl.* 27, 5-28.

12. HOUCK, J.C. i DOUGHERTY (1974): Chalcones: a tissue specific approach to mitotic control. Medcon Press. N. Y.
13. THORNLEY, A.L. i LAURENCE, E.B. (1975): *Int. J. Biochem.* 6, 313-320.
14. BULLOUGH, W.S. (1973): *Natn. Cancer Inst. Mon.* 38, 99-107.
15. BULLOUGH, W.S. i DEOL, J.U.R. (1971): *Symp. Soc. Exp. Biol.* 25, 225-275.
16. GARCÍA GIRALT, E. i al. (1972): *J. Immunol.* 109, 878-880.
17. KIGER, N. i al. (1972): *Transplantation* 14, 448.
18. GARCÍA GIRALT, E. i al. (1973): *Natn. Cancer Inst. Monogr.* 38, 125-129.
19. KIGER, N. i al. (1973): *Natn. Cancer Inst. Monogr.* 38, 135-146.
20. BULLOUGH, W.S. (1971): *Nature* 229, 608-610.
21. MAHARAJAN, V. i BABA, B.K. (1976): *Ind. J. Exp. Biol.* 14, 324-325.
22. KASAHARA, T. i al. (1976): *J. Immunol.* 116, 1251-1256.
23. Pendent de publicació.

Agraïments: Agraïm a la Fundació N. F. de Roviralta la concessió d'una ajuda per a l'adquisició d'utillatge científic.