

Papel das histonas na divisão e diferenciação celular.

I — Estudo das diferenças percentuais entre histonas de fígado normal de rato e de tumor ascítico de Ehrlich \*

PAULO C. A. PREZA  
ERNANI T. PIRES  
MARIA CRISTINA A. FIALHO  
FERNANDO G. MELLO  
MAURO C. FARIA

\* Do Laboratório de Bioquímica do Serviço de Pesquisa e Experimentação do Instituto Nacional de Câncer e do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas da U.E.G. Rio de Janeiro, G.B.

---

**SUMARIO**

---

A extração de histona de fígado normal de rato e de células ascíticas de Ehrlich, por CM-Celulose, evidenciou variações nítidas nas percentagens das frações fx, f2 e f3. A fração fx, não histona, apresentou maior percentagem nas células tumorais, enquanto nestas mesmas células houve uma diminuição da percentagem das frações f2 e f3.

São discutidas as implicações destas diferenças no mecanismo de controle da divisão celular.

---

**SUMMARY**

---

Histone fractions from normal rat liver has shown quantitative variations when compared to those extract from Ehrlich ascitis tumor cells. The fx fractions is percentually increased in Ehrlich tumor, while fractions f2 and f3 are increased in the normal liver.

Possible implications of these findings in the regulation of cell division are discussed.

---

**PAPEL DAS HISTONAS NA DIVISÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR. I — ESTUDO DAS DIFERENÇAS PERCENTUAIS ENTRE HISTONAS DE FÍGADO NORMAL DE RATO E DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich**

---

O papel das histonas na divisão celular e nos processos de diferenciação constitui-se num dos temas de maiores discussões em *Biologia* (1, 6, 17).

As histonas são proteínas básicas encontradas em núcleos de células somáticas animais e vegetais. Esta basicidade é conferida pelo grande teor dos aminoácidos lisina e arginina. Em função das quantidades desses aminoácidos, alguns autores (4, 9, 13) classificam-nas em cinco grupos, assim especificados: fla e flb, histonas ricas em lisina; f2a e f2b, histonas menos ricas em lisina e f3, histonas ricas em arginina.

Sua síntese é discutida (2, 15); entretanto, admite-se hoje que esta proteína está ligada ao DNA (11) exercendo aí um papel chave nos processos de transcrição em RNA e na divisão celular.

Vários são os trabalhos que discutem as diferenças qualitativas e quantitativas entre os núcleos histonas de diversos tecidos (3, 5, 7, 12, 16, 18).

Propomo-nos, neste trabalho, ao estudo das diferenças percentuais entre histonas de fígado de rato e de tumor ascítico de Ehrlich, separadas por cromatografia em Carboxi-Metil-Celulose (CM-Celulose).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados ratos endogâmicos, da estirpe "U" de nosso laboratório, como doadores de fígado.

O tumor ascítico foi colhido 10 a 15 dias após o transplante por via intraperitoneal, em camundongos machos do tipo SW55.

A separação dos núcleos celulares foi realizada pelo processo descrito por Hogeboom (8) e a histona total foi obtida após a hidrólise do material nuclear por HCl 0,1 M durante duas horas em temperatura ambiente (14).

A separação das diversas frações da núcleo histona em coluna de CM-Celulose foi realizada pelo método de Johns et al (10) com as seguintes modificações: a histona total dissolvida em HCl 0,1 M, foi dialisada durante 48 horas contra um tampão de acetato de Na 0,1 M, pH 4,2 (a) e, então, aplicada sobre uma coluna de CM-Celulose (14 cm de comprimento e 1,8 cm de diâmetro) e diluída da seguinte maneira: f1 com uma solução tampão de acetato de Na 0,17 M,

pH 4,2 e NaCl 0,42 M (b); f1b com uma solução tampão de acetato de Na 0,17 M, pH 4,2 e NaCl 1 M (c); f2 com uma solução de HCl 25 mM (d) e f3 com uma solução de HCl 50 mM (e). Cada cromatografia foi feita com 32 mg de histona total.

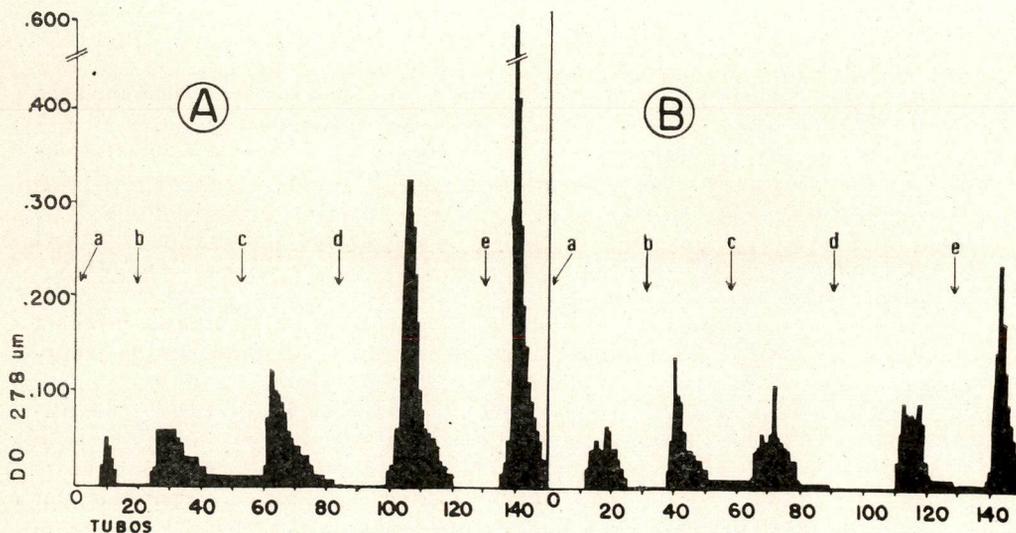
## RESULTADOS

A fig. 1-a mostra a cromatografia de histona extraída do núcleo de fígado de rato e a fig. 1-b a de histona extraída de tumor ascítico de Ehrlich.

Nos gráficos notamos a presença de um pequeno pique nos primeiros tubos. A proteína existente ali é descrita por Johns et al (10) como sendo núcleo de proteínas mais ácidas que as histonas.

A fig. 2 mostra a percentagem de cada fração correspondentes ao fígado de rato normal e ao tumor de Ehrlich. Estas percentagens são referidas à proteína total de três cromatografias de histona de fígado e de duas de tumor ascítico de Ehrlich.

Fig. 1 — Diagrama da cromatografia em coluna de CM-celulose de núcleo histona extraída de fígado de rato normal (A) e extraída de tumor ascítico de Ehrlich (B). As setas mostram o local da mudança dos tampões especificados no texto. Cada cromatografia foi feita com 32 mg de histona total. Cada tubo continha um volume médio de 3 ml.



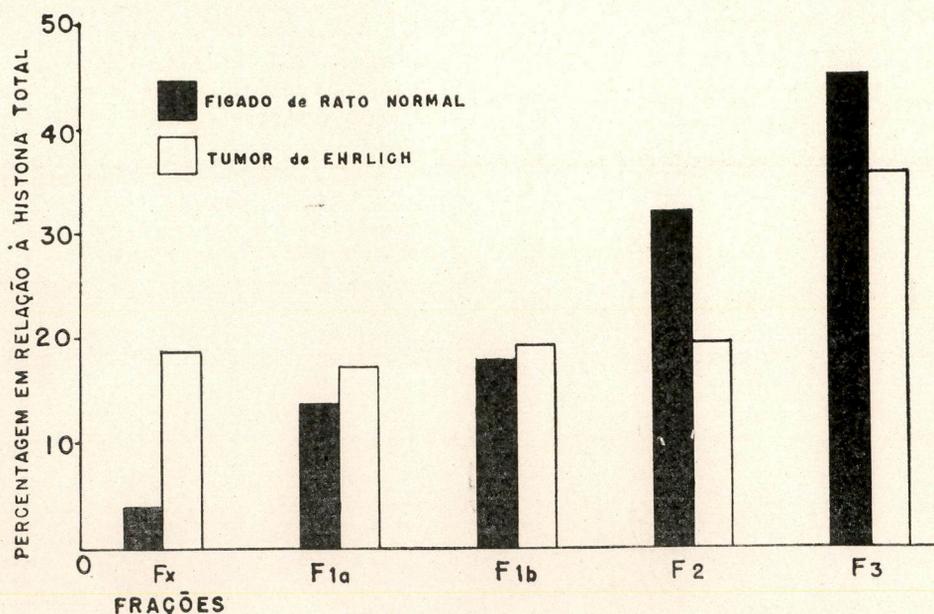


Fig. 2 — Percentuais das frações da núcleo histona de fígado de rato normal (barras cheias) e de tumor ascítico de Ehrlich (barras tracejadas), relativos à 96 mg e 64 mg, respectivamente, de histona total.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A velocidade de divisão celular varia de um órgão para outro. Sendo a histona uma provável reguladora dos processos de divisão celular, tecidos com velocidade de reprodução diferente apresentariam diferenças quantitativas entre as frações de histona.

Para este trabalho, a escolha de células de fígado de rato e células ascíticas é justificada pela grande diferença de frequência de divisões celulares. As células do tumor ascítico de Ehrlich multiplicam-se muito mais rapidamente que as células hepáticas normais.

Alguns pontos interessantes podem ser discutidos neste estudo, observando-se a figura 2.

Inicialmente, fazemos notar a diferença existente no que se refere à fração fx. As

células de Ehrlich têm esta fração aumentada. Este fato pode ser proveniente de uma contaminação por proteína citoplasmática, quando da extração da histona total da célula do tumor. Não está, no entanto, afastada a hipótese de que esta fração possa estar, de algum modo, ligada ao controle do processo de divisão celular.

Por esta mesma figura podemos notar que a histona rica em lisina (f1) não sofre variações no que se refere a sua quantidade.

As frações f2 e f3, apresentam modificações nítidas em seu percentual: estão diminuídas no tumor de Ehrlich. Este fato é bastante nítido, embora suas implicações, ainda hoje, sejam objeto de discussão.

É plano de nosso laboratório fazer um estudo das núcleo-histonas de diversos tecidos que tenham velocidade de divisão celular diferentes, visando a obtenção de um maior número de dados que possibilitariam conclusões mais objetivas.

---

**BIBLIOGRAFIA**

---

- 1 — BONNER, J. & HUANG, R. C.: Histones as specific repressors of chromosomal RNA synthesis. Ciba Foundation Study Group nr. 24. 18, 1966.
- 2 — BLOCH, D. P., in J. Bonner and P.O.P. Ts'o eds, The nucleohistones holden-day. San Francisco, 1964.
- 3 — CRAMPTON, C. F.; STEIN, W. H. & MOORE, S.: Comparative studies on chromatographically purified histones. J. Biol. Chem., 225: 363, 1957.
- 4 — DAVISON, P. F.: Chromatography of histones Biochim. J., 66: 708, 1957.
- 5 — DAVIS, J. R. & BUSCH, H.: Chromatographic analysis of radioactive cationic nuclear proteins of tissues of tumor-rearing rats. Cancer Res. 20: 291, 1960.
- 6 — GOODWIN, B. C.: Histones and reliable control of protein synthesis. Ciba Foundation Study Group nr. 24: 68, 1966.
- 7 — HNILICA, L.; JOHNS, E. W. & BUTLER, J. A. V.: Observation on the species and tissue specificity of histones. Biochim. J., 82: 123, 1962.
- 8 — HOGBOON G. H.: Isolation of liver cell nuclei in an aqueous medium in Methods in Enzymology. First Edition. N. Y. Academic Press. New York, 1955.
- 9 — JOHNS, E. W.: Studies on histones: 7 — Preparative methods for histone fractions from calf thymus. Biochim. J., 92: 55, 1964.
- 10 — JONS, E. W.; PHILIPS, D.M.P.; SIMSON, P. & BUTLER, J.A.V.: Improved fractionations of arginine-rich histones from calf thymus. Biochim. J., 77: 631, 1960.
- 11 — MARUSHIGE, K. & BONNER, J.: Template properties of liver chromatin. J. Molec Biol., 15: 160, 1966.
- 12 — NEELIN, J. M. & CONNELL, G. E.: Zone electrophoresis of chicken erythrocyte histone in starch gel. Biochim. Biophys. Acta, 31: 539, 1959.
- 13 — PHILLIPS, D. M. P. & JOHNS, E. W.: A study of the proteinase content and the chromatography of thymus histones. Biochim. J., 72: 538, 1959.
- 14 — PALAU, J. & BUTLER, J. A. V.: Histone of trout liver. Biochim. J., 100: 779, 1966.
- 15 — REID B. R.; STELLWAGEN, R. H. & COLE, R. R.: Further Studies on the biosynthesis of very lysine-rich histone in isolated nuclei. Biochem. Biophys. Acta, 155: 593, 1968.
- 16 — STARBUCK, W. C. & BUSCH: Kinetics of incorporation of L-arginine U-C14 into nuclear proteins of tumor and other tissues in vitro. Cancer Res., 20: 891, 1960.
- 17 — SHERBERT, G. V.: Effects of histones and other inhibitors on embryonic development. Ciba Foundation Study Group nr. 24: 81, 1966.
- 18 — VENDRELY, R.; KNOBLOCH, A. & MATSUDAIRA, H.: A comparative biochemical study of nucleohistones from different vertebrates. Nature, 181: 343, 1958.