

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SINTESIS DE ADN EN HÍGADO Y RIÑÓN DE RATONES LACTANTES Y ADULTOS

COMPARATIVE STUDY OF LIVER AND KIDNEY DNA SYNTHESIS IN ADULT AND YOUNG MICE

Damián MOAVRO¹; Marina MARTÍNEZ¹; Marcela GARCÍA¹; Adriana GARCÍA¹; Laura ANDRINI¹; Ana María INDA^{1,2}; Ana Lía ERRECALDE¹.

1-Cátedra de Citología, Histología y Embriología "A". Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Calle 60 y 120, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.

2-CIC, Pcia. de Buenos Aires.

e-mail: mngarcia@med.unlp.edu.ar

RESUMEN. En trabajos previos hemos observado que la actividad proliferativa de numerosas poblaciones celulares del ratón lactante y joven difiere de la encontrada en el adulto. En el presente trabajo experimental, se estudia la síntesis de ADN del ratón lactante y adulto, mediante el método inmunohistoquímico de la Brdu (Bromodeoxiuridina), en las poblaciones celulares de hepatocitos y renocitos, a las 00:00 h y 16:00 h, con el objeto de establecer la correspondencia en la proliferación celular entre ambos grupos etarios. Para ello se utilizaron machos lactantes de 21 días de edad y adultos de 90 días, de la cepa C3H/S. Los resultados muestran que los valores de síntesis de ADN de los renocitos y hepatocitos en los ratones lactantes son significativamente mayores ($p < 0.001$) a los observados en los adultos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ambos puntos horarios en los órganos estudiados. Podemos concluir que estos hallazgos demuestran que, si bien en los ratones lactantes aparecen valores máximos y mínimos en la actividad proliferativa de distintas poblaciones celulares, estas aun no presentan la ritmicidad establecida para los adultos.

Palabras clave: síntesis de ADN, hígado, riñón, ratones, bromodeoxiuridina.

ABSTRACT. In previous papers we have observed that the proliferative activity of numerous cell populations of suckling and young mice was different than the observed in adults. In the present work we analyzed the DNA synthesis of suckling and adult mice, by immunohistochemistry (Bromodioxiuridine) in both hepatocytes and renocytes, at two different time points. The object of the present experiment was to establish the correlation in cellular proliferation between both groups. We used C3HS suckling male mice of 21 days old and adult mice of 90 days old. The results showed that DNA synthesis of renocytes and hepatocytes in suckling mice were significantly higher than the adults, and we didn't find statistically differences between the values of both analysed time points. We can conclude that in suckling mice we could observe maximum and minimum values but we couldn't find a circadian rhythm like those established in adults.

Keywords: DNA synthesis, liver, kidney, mice, bromodeoxiuridine.

INTRODUCCIÓN

El ciclo celular puede variar en respuesta a condiciones particulares durante diferentes estadios del lapso de vida de un individuo, por lo que sería esperable encontrar diferencias en la actividad proliferativa normal de los organismos en distintas etapas de la vida. En trabajos previos se ha establecido que la actividad proliferativa de numerosas poblaciones celulares del ratón lactante y joven difiere de la observada en el adulto (1, 2, 3, 4). Por ejemplo, podemos mencionar que los hepatocitos de ratas y células de la *pars intermedia* de la hipófisis de ratones hembra, de 14 días de edad, en estadio de lactantes, no exhiben la periodicidad circadiana que observamos en los adultos (5). Sabemos, además, que estas variaciones relativas a la periodicidad diaria dependen del momento del desarrollo ontogénico analizado y de la maduración de los mecanismos de control de la proliferación celular.

En el ratón adulto el momento de mayor actividad de síntesis de ADN (ADNs) en los hepatocitos se produce alrededor de las 00:00 hs y el de máxima actividad mitótica alrededor de las 16:00 hs (6, 7). Tomando como base estos antecedentes, en el presente trabajo experimental, se estudia la ADNs del ratón lactante y adulto, mediante el método inmunohistoquímico de la Brdu (Bromodeoxiuridina), en las poblaciones celulares de hepatocitos y renocitos, en los puntos horarios antes mencionados, con el objeto de establecer la correspondencia en la proliferación celular entre ambos grupos etarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones: Se utilizaron machos lactantes de 21 días de edad y adultos de 90 días, de la cepa C3H/S. Los lactantes se mantuvieron junto a sus madres mientras que los adultos de 75 días de edad se colocaron en cajas

individuales en una sala de ritmos, durante 15 días, bajo condiciones de estandarización para análisis de periodicidad.

Diseño experimental: Se utilizaron 26 ratones en total, 13 lactantes y 13 adultos. En cada uno de los grupos los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 2 lotes y sacrificados a las 00:00 y 16:00 hs respectivamente. El sacrificio se realizó al día 21 de nacidos en los lactantes y a los 15 días de estandarización en los adultos. Durante el sacrificio se extrajeron el hígado y el riñón de cada animal. Estos órganos se procesaron de la forma descripta anteriormente.

Técnica inmunohistoquímica: 1 hora antes del sacrificio se les inyectó intraperitonealmente a todos los animales una solución de 5-bromodeoxiuridina (Sigma) en una dosis de 50 mg/kg. Los cortes obtenidos se marcaron con el Ac Bu20a, previo tratamiento en horno microondas (2x 5 mín., 750 w) con buffer citrato pH 6. Para la detección se utilizó el Sistema Envision y se realizó el revelado con diaminobencidina (DAB). Por último, se contrastó con una coloración suave de hematoxilina, observándose de color marrón los núcleos de las células marcadas positivamente.

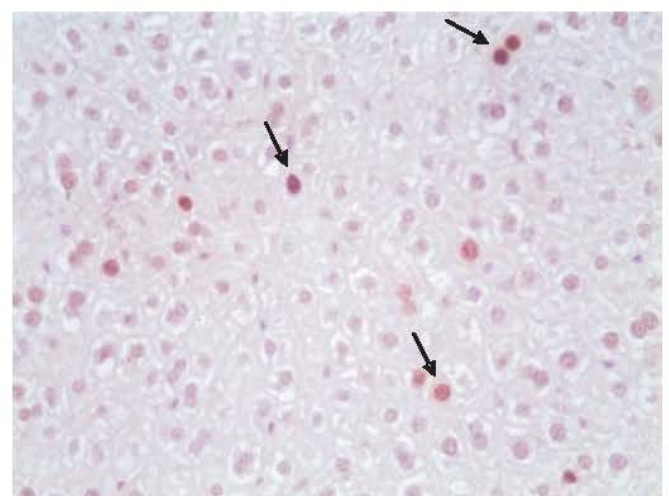


Figura 1. Síntesis de ADN. Las flechas indican núcleos de hepatocitos marcados con Brdu. 40 X.

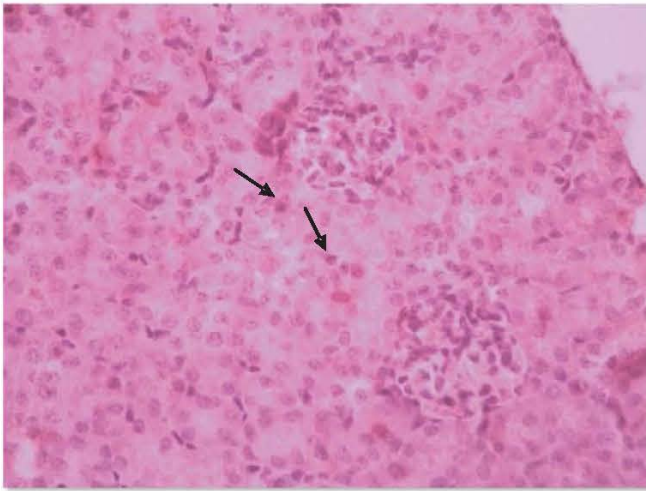


Figura 1. Síntesis de ADN. Las flechas indican núcleos de renocitos marcados con BrdU. 40 X.

Tratamiento estadístico: A partir de la observación de los preparados (con una magnificación de 100 X) se calculó el índice de ADNs de cada muestra y la $X \pm ES$ de cada lote.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el *Student t Test*. Se consideraron significativas las diferencias $p < 0.05$.

RESULTADOS

Como observamos en las tablas y gráficos los valores de ADNs de los renocitos y hepatocitos en los ratones lactantes son significativamente mayores ($p < 0.001$) a los observados en los adultos en ambos puntos horarios analizados.

Hora del día	Lactantes	(n)	Adultos	(n)	P
0:00	30.1 ± 3.9	6	1.04 ± 0.1	6	0.001
16:00	38.3 ± 2.5	7	0.1 ± 0.01	6	0.001

Tabla 1. ADNs en renocitos de ratones lactantes y adultos.

Hora del día	Lactantes	(n)	Adultos	(n)	P
0:00	34.3 ± 8.5	6	0.1 ± 0.0	6	0.001
16:00	24.7 ± 4.7	7	0.4 ± 0.1	6	0.001

Tabla 2. ADNs en hepatocitos de ratones lactantes y adultos.

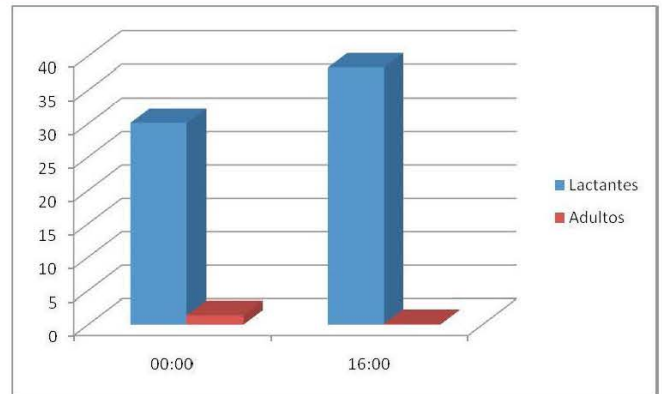


Gráfico 1. Comparación entre los valores de ADNs en renocitos de ratones lactantes y adultos.

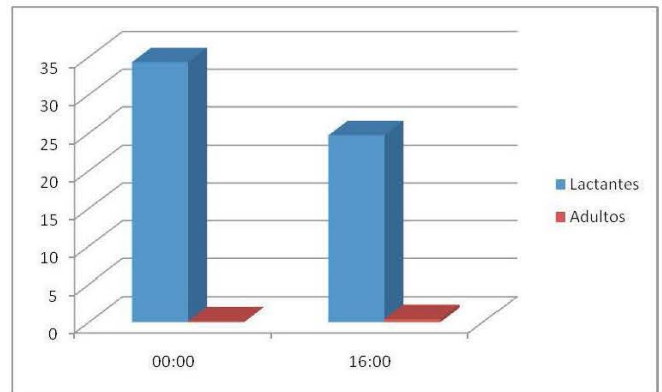


Gráfico 2. Comparación entre los valores de ADNs en hepatocitos de ratones lactantes y adultos.

CONCLUSIONES

Como observamos en los resultados, los ratones machos lactantes de la cepa C3H/S poseen una elevada actividad de ADNs en las poblaciones celulares de hepatocitos y renocitos en comparación a los valores hallados en los adultos. Esto podría deberse a que a tan temprana edad encontramos un mayor nivel sérico en las hormonas y factores de crecimiento lo que desencadena un aumento en la proliferación y desarrollo celular (8). Entre los factores involucrados, podemos mencionar a miembros de varias familias de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento para hepatocitos (HGF),

el factor de crecimiento semejante a insulina (IGFs), el factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) entre otros, todos involucrados en la proliferación hepática y renal (9,10).

En el presente trabajo, en los hepatocitos de ratones lactantes, la mayor actividad proliferativa se encontró durante la medianoche mientras que en el riñón se observó a las 16:00 h, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Barbeito *et al.* (5) encontró que ratones hembras de 14 días de edad, también de la cepa C3H/S, las células epiteliales de la *pars intermedia* de la hipófisis, presentan una tendencia a establecer un ritmo con una actividad mayor durante la medianoche, aunque las diferencias temporales en los valores de actividad mitótica no fueron estadística-

mente significativas. El mismo autor, estudiando los enterocitos del duodeno de ratones machos de la cepa C3HS, de 14 días de edad, observó un pico en la actividad mitótica a las 12:00 h (11). Estos hallazgos demostrarían, que si bien en los ratones lactantes aparecen valores máximos y mínimos en la actividad proliferativa de algunas poblaciones celulares, estas aun no presentan la ritmicidad establecida para los adultos; lo que podría deberse a la falta de maduración del eje hipotálamo-hipofisiario, responsable del establecimiento de los ritmos circadianos en el organismo (12).

AGRADECIMIENTOS

A Javiera Marini por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbeito CG, Catalano VA, Flamini MA, *et al.* (1999). Age influence in epidermal cell proliferation. *Cs Morfol*; 3:17-24.
2. McNicol AM, Penman ID, Duffy AE. (1989). Age related variation in circadian rhythms of mitosis in the adrenal cortex of the male rat. *J Endocrinol*; 120: 307-10.
3. Reyna JC, Barbeito CG, Moreno FR, *et al.* (1997). Mitotic activity of duodenal - crypt enterocytes in mice bearing a transplanted hepatocarcinoma. *Medicina (Bs As)*; 57: 708-12.
4. Savignone CA, Barbeito CG, Flamini MA, *et al.* (1998). Sexual dimorphisms in the proliferation of submaxillary glands epithelial cell from adult mouse: a preliminary report. *Biocell*; 22: 83.
5. Barbeito CG, Surur JM, Badrán AF. (2000). Mitotic activity of the *pars intermedia* in the female mouse: age - associated variations in proliferation rate and circadian periodicity. *Chronobiol Int*; 17: 751-56.
6. García MN. (2005). Estudio de la síntesis de ADN de poblaciones celulares hepáticas, duodenales, linguales y del tumor ES12a en ratones. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP.
7. Errecalde AL, Inda AM, García AL. (1995). Ritmos circadianos en la proliferación celular. *Cs Morfol*; 1: 33-39.
8. Gattone VH, Sherman DA, Hinton DA, Fu-Weng N, Topham RT, Klein RM. (1992). Epidermal Growth Factor in the neonatal mouse salivary gland and kidney. *Biol neonate*; 61: 54-67.
9. Scheving LA, Tsai TH, Scheving LE. (1987). Circadian-dependent response in DNA synthesis to epidermal growth factor in spleen, bone marrow and lung and mitotic index of corneal epithelium in ad-libitum fed and fasted CD2F1 mice. *Prog Clin Biol Res*; 227: 181-91.
10. Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997). Liver regeneration. *Science*; 276: 60-66.
11. Barbeito CG, González N, Badrán AF. (2003). Sex - and age - related temporal variations in intestinal-epithelium proliferation in the suckling mouse. *Chronobiol Int*; 20: 37-47.
12. Barbason H, Herens C, Robaye B, Milis G, Sulon J, Bouzahzak B, Van Cantfort J. (1995). Importance of cell kintetics rhythmicity for the control of cell proliferation and carcinogenesis in rat liver. *In vivo*; 9: 539-48.