

## ACTIVIDAD MITOTICA DE LOS ENTEROCITOS DE LAS CRIPTAS DUODENALES EN RATONES PORTADORES DE UN HEPATOCARCINOMA

JUAN C. REYNA<sup>1,2</sup>, CLAUDIO G. BARBEITO<sup>1,2</sup>, AMADO F. BADRÁN<sup>2,3</sup>, FÉLIX R. MORENO<sup>1,2,3</sup> †

<sup>1</sup> Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, <sup>2</sup> Instituto de Embriología, Biología e Histología, Facultad de Ciencias Médicas, <sup>3</sup> Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

**Resumen** La presencia de tumores injertados en el ratón generalmente provoca modificaciones de la proliferación de sus poblaciones celulares normales. En el presente trabajo se analiza la actividad mitótica (AM) de los enterocitos de las criptas duodenales del ratón injertado con el hepatocarcinoma ES12a. Se utilizan ratones C3H/S hembras de 28 días de edad, estandarizados para análisis de periodicidad, distribuidos en dos grupos: testigos y portadores del tumor injertado. Animales de ambos grupos se reparten en seis lotes [ $n = 6-10$ ] que se sacrifican cada cuatro horas después de recibir una dosis de 2  $\mu\text{g/g}$  de colchicina. Muestras de duodeno se fijan en formol tamponado al 10% y se procesan para la determinación de la actividad mitótica. Se controlan, por animal, los enterocitos correspondientes a 20 criptas, seccionadas longitudinalmente, registrando las células en metafase y su localización topográfica. A partir de estos valores se determinan los índices mitóticos (metafases colchicínicas  $\times 1000$  núcleos) de toda la cripta y de cada zona previamente establecida. Con estas cifras se define la  $X \pm \text{SEM}$  de cada lote. Las diferencias a comparar se analizan utilizando la prueba de "t" de Student. Los resultados demuestran que la presencia del tumor ES12a ejerce tanto un efecto inhibitorio sobre la AM de los enterocitos, como un desfaseamiento de la curva circadiana de este parámetro de crecimiento.

**Palabras clave:** células troncales, criptas duodenales, hepatocarcinomas, ritmos mitóticos

En las criptas de Lieberkühn, glándulas tubulosas simples alojadas en la capa mucosa del intestino, se cumplen principalmente funciones generativas –que permiten reponer todas las células epiteliales perdidas por el órgano– y de secreción exocrina, endocrina y paracrina. Los citados aspectos funcionales tienen diversas manifestaciones entre las que se destacan una elevada actividad mitótica (AM) con significativas variaciones temporales y sectoriales, y el reconocimien-

to tanto de células indiferenciadas como de varios linajes celulares. Los antedichos aspectos confieren a las criptas una gran utilidad en aquellos estudios que analizan aspectos cinéticos de la reproducción y diferenciación celular<sup>1</sup>.

Las criptas intestinales del ratón adulto están tapizadas por unas 250 células epiteliales. La observación de secciones longitudinales de las criptas permite el análisis, desde la profundidad hacia la superficie, de unas 25 filas celulares por hemicripta<sup>2</sup>. En su fondo se encuentran las células de Paneth, cuyo número va aumentando desde el duodeno hacia el íleon<sup>3</sup>. Por encima de éstas se localizan entre 1 y 4 hileras de células troncales, o "stem cells", que tienen la capacidad de dar origen a los otros tipos celulares sin perder por ello su potencialidad autorrenovadora. El

Recibido: 4-VI-1997

Aceptado: 16-VII-1997

† Falleció el 11-XII-1996

**Dirección postal:** Dr. Juan Carlos Reyna, Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Calle 60 y 118, 1900. La Plata, Argentina.



ciclo celular de las células troncales se completa en 24 horas y su descendencia comprende tanto a nuevas células troncales como a la primera generación de las denominadas células en tránsito<sup>4</sup>. Estas últimas se reproducen cada 12 horas<sup>4</sup> y se ubican inmediatamente por encima de las células troncales, de la fila 5 a la 12. Las primeras generaciones de células en tránsito tienen, como las células troncales, capacidad clonogénica y pueden repoblar totalmente la cripta si se dañan las células troncales.<sup>5</sup> Por último los enterocitos localizados en los tramos más superficiales de las criptas, a partir de la hilera 13, presentan un mayor grado de diferenciación y un menor potencial proliferativo<sup>4, 5</sup>.

Una gran variedad de procedimientos experimentales puede provocar modificaciones, tanto cuantitativas como cualitativas, del patrón proliferativo de poblaciones celulares normales. Entre las mismas se encuentran las radiaciones, radiomiméticos, antimetabolitos, desnutrición y portación de tumores<sup>2, 5, 6</sup>. Referente a los cambios detectados en relación al último punto nosotros hemos descrito, en animales con carcinomas hepatocelulares y mamarios, modificaciones cuantitativas y cualitativas de la AM a nivel de los hepatocitos del hígado<sup>7, 8</sup>, de las células del estroma renal cortical<sup>9</sup>, de los queratinocitos linguales<sup>8</sup> y epidérmicos<sup>10</sup> y de las células acidófilas de la pars distalis<sup>11</sup>. No hemos encontrado en la bibliografía consultada datos —en portadores de tumor— concernientes a la AM de los enterocitos de las criptas en un período circadiano. Para conocer la evolución de dicha expresión del crecimiento del epitelio duodenal, en animales portadores de un tumor implantado, se realizó el experimento que se describe.

Se utilizaron 87 ratones hembras endocriados, pertenecientes a la cepa C3H/S, provenientes del bioterio del Instituto de Embriología, Biología e Histología de la FCM-UNLP. Desde el nacimiento y hasta el destete —día 21— los ratones permanecieron con sus madres en una sala (sala de cría), sometidos a un régimen de iluminación normal —luz fluorescente de 40 w. de 06:00 a 18:00 horas; oscuridad de 18:00 a 06:00— y temperatura ambiente de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , siendo importante que todos los animales recibieran una misma intensidad lumínica. En el vigesimoprimer día las crías se separaron de las madres y se colocaron en un cuarto ad-hoc (sala de ritmos), en condi-

ciones de estandarización que comprendieron: alojamiento en jaulas individuales, agua y alimento ad libitum, temperatura ambiente de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y las condiciones de iluminación previamente mencionadas. Los animales se repartieron en dos grupos: I) Intactos que se utilizaron como controles [ $n = 44$ ]; II) Portadores [ $n = 43$ ], que se injertaron subcutáneamente con el hepatocarcinoma pobremente diferenciado ES12a (E:Espontáneo, S: originado en la cepa C3H/S, 12: 12<sup>do</sup> tumor hepático originado en forma espontánea en nuestro laboratorio, a: primera *sublínea* derivada del tumor original). Al cumplir 28 días de edad ratones de ambos grupos se distribuyeron en 6 lotes [ $n = 6-10$ ] y se sacrificaron por decapitación y sangría cada 4 horas a partir de la medianoche tras recibir una dosis de  $2 \mu\text{g/g}$  de peso corporal de colchicina IP 4 horas antes, para detener las mitosis en metafase. Muestras de duodeno se fijaron en formol tamponado neutro al 10%, incluyeron en parafina, cortaron en micrótomos de deslizamiento a  $5 \mu\text{m}$  de espesor y colorearon con H-E. Las secciones se observaron microscópicamente bajo objetivo de inmersión con 1000X de aumento, revisando por cada animal 20 criptas cortadas longitudinalmente. En cada cripta se controló el total de núcleos celulares, el número de núcleos en metafase y su ubicación. Con estos datos se determinó el índice mitótico [metafases colchicínicas por 1.000] del total de enterocitos de la cripta y de cada sector considerado: filas 1-4, 5-12 y 13-20. Los valores de cada lote y grupo se expresaron por la media aritmética  $\pm$  SEM. La significación de las diferencias entre las medias a comparar se analizó aplicando la prueba de "t" de Student.

Los resultados muestran (Tabla 1) que la AM de los testigos exhibe una variación circadiana de sus valores con un máximo de 241 al mediodía y un mínimo de 174 a las 16:00 hs, el valor promedio diario es de 203.

Los animales portadores del tumor injertado, también muestran una AM circadiana, pero con el valor máximo de 96 a las 08:00 y el valor mínimo de 75 a las 16:00 hs, siendo el valor promedio diario de 86. La AM de los portadores es significativamente menor que la de los testigos tanto en su valor promedio como en todos los puntos horarios controlados.

Por otra parte, como se observa en la Tabla 2, la actividad proliferativa más intensa se pro-



TABLA 1.- Actividad mitótica de los enterocitos de las criptas duodenales (Metafases colchicínicas por 1.000)

Hora	Testigos $\bar{X} \pm ES$	n	Portadores $\bar{X} \pm ES$	n	p
00:00	190,23 $\pm$ 3,24	6	84,25 $\pm$ 4,59	10	< 0,001
04:00	211,29 $\pm$ 28,59	7	89,30 $\pm$ 8,97	7	< 0,010
08:00	207,17 $\pm$ 13,61	7	96,46 $\pm$ 5,49	7	< 0,001
12:00	240,73 $\pm$ 14,74	7	82,51 $\pm$ 9,94	6	< 0,001
16:00	173,77 $\pm$ 11,44	9	75,43 $\pm$ 7,85	6	< 0,001
20:00	195,98 $\pm$ 14,29	8	87,20 $\pm$ 10,94	7	< 0,001
p	08-16 < 0,050		12-16 < 0,010		
$\bar{X}$ 24 hs	203,20 $\pm$ 6,96	44	85,93 $\pm$ 3,15	43	< 0,001

$\bar{X} \pm ES$ : Media aritmética  $\pm$  error standard; n: Tamaño de la muestra; p: Probabilidad de la diferencia

TABLA 2.- Estudio sectorial de la actividad mitótica de las criptas duodenales (Metafases colchicínicas por 1.000)

Tramo	Testigos $\bar{X} \pm ES$	Portadores $\bar{X} \pm ES$	p	% de inhibición
a (hileras 1-4)	164,46 $\pm$ 8,84	75,23 $\pm$ 4,16	< 0,001	54
b (hileras 5-12)	274,70 $\pm$ 11,35	104,38 $\pm$ 4,23	< 0,001	62
c (hileras 13-20)	151,14 $\pm$ 5,09	73,17 $\pm$ 3,72	< 0,001	52
d (total de la cripta)	203,20 $\pm$ 6,97	85,93 $\pm$ 3,15	< 0,001	58
	a-b < 0,001	a-b < 0,001		
	a-c NS	a-c NS		
	b-c < 0,001	b-c < 0,001		

$\bar{X} \pm ES$ : Media aritmética  $\pm$  error standard; n: Tamaño de la muestra; p: Probabilidad de la diferencia

duce en la zona de las hileras 5-12 alcanzando un valor de 275 en los testigos y de 104 en los portadores. En cambio los valores de los testigos (164) y de los portadores (75) correspondientes a las filas 1-4, son similares a los de la zona comprendida entre las filas 13-20 (151 para los testigos y 73 para los portadores).

Este análisis sectorial de la AM demostró que la inhibición de la proliferación celular en los animales portadores supera al 50% en los 3 segmentos analizados, alcanzando idéntica significación estadística ( $p < 0,001$ ).

De los resultados obtenidos del grupo control surge que, en nuestras condiciones experimentales, el ratón hembra normal a los 28 días de edad presenta a nivel de las criptas duodenales un ritmo circadiano de la actividad mitótica cuyo valor máximo se localiza al mediodía. Estos resultados son similares a los reportados para esta variable en ratones machos jóvenes<sup>12</sup>, aunque los promedios de los valores obtenidos por nosotros son levemente superiores.

Considerando que los animales utilizados, obtenidos por endocría, son de la misma cepa y



edad, estuvieron sometidos a condiciones similares de estandarización incluyendo la alimentación (alimento balanceado Ganave rata/ratón), pero de distinto sexo, este hallazgo sugiere que es altamente probable que exista una influencia hormonal que exprese un cierto grado de dimorfismo sexual<sup>12</sup>. Esta suposición confirmaría previas observaciones realizadas en nuestro laboratorio, aunque en otras poblaciones celulares, donde el dimorfismo sexual se ha expresado como diferencias en la actividad proliferativa del parénquima de la glándula submaxilar y de la pars distalis de la hipófisis.

La información sobre la actividad mitótica recogida en este experimento permite afirmar que en las criptas duodenales de los portadores: 1) se conserva el ritmo circadiano de la variable analizada; 2) se presenta un desfaseamiento de la acrofase (punto horario de máxima actividad mitótica del ciclo; 3) hay una evidente disminución del índice mitótico de la totalidad de la glándula, tanto del promedio diario como en todos los puntos horarios y 4) dicha disminución se registra en los tres sectores considerados. Estas observaciones sugieren que los mecanismos determinantes de la periodicidad circadiana de los enterocitos siguen aún operando en los portadores, pero con alteraciones que se manifiestan por el desfaseamiento del pico. En cambio la existencia de valores más bajos se debería a un efecto inhibitorio sobre la actividad mitótica de los enterocitos. En el animal control tanto la magnitud como la localización circadiana de la variable analizada expresan el interjuego de un importante número de mecanismos regulatorios entrelazados en que participan, entre otras sustancias, hormonas, factores de crecimiento y receptores celulares, para algunos de los cuales se han descrito también variaciones circadianas<sup>13</sup>.

Con base en la información anteriormente citada, consideramos como altamente probable que las poblaciones celulares normales de los portadores del tumor ES12a se encuentran en un contexto alterado de señales moleculares relacionadas al crecimiento. Estas señales perturbadoras de la proliferación celular podrían provenir de las células tumorales y/o de los tejidos normales del animal. En ese marco se puede postular que las células del tumor ES12a producen y liberan al medio extracelular, y por consecuencia a la circulación sanguínea, un factor inhibitorio de la mi-

tosis que podría tratarse del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ )<sup>14</sup>, polipéptido cuya producción ha sido detectada en diversos tumores<sup>14</sup> y que ejerce un poderoso efecto inhibitorio sobre la multiplicación de los enterocitos<sup>15</sup>.

La demostración en el presente trabajo de la persistencia de la variación circadiana mitótica de los enterocitos, así como del desfaseamiento del pico surgen como datos que deberán tenerse en cuenta para evitar efectos indeseables en aquellos tratamientos basados en la utilización de agentes antitumorales con acción selectiva sobre alguna de las fases del ciclo celular de tumores.

## Summary

*Mitotic activity of duodenal-crypt enterocytes in mice bearing a transplanted hepatocarcinoma*

Tumors grafted into mice may modify the proliferation of normal cell populations. In this paper, we have studied the evolution of mitotic activity (MA) in duodenal-crypt enterocytes of ES12a hepatocarcinoma-bearing mice; a total of 87 28-day-old female animals of the C3H/S strain were used after standardization for circadian-periodicity analysis. The mice were distributed into two groups: those remaining intact and those receiving tumor grafts. Each group was then divided into six batches ( $n = 6-10$ ), one of which was sacrificed every 4 h over a period of one day. A dose of colchicine (2  $\mu\text{g/g}$ ) was administered to each animal 4 h before killing. Samples of duodenum were fixed in 10% (v/v) buffered formalin and processed for assessment of mitotic activity. The number and topographic localization of the colchicine-arrested metaphases were recorded among the enterocytes within 20 longitudinal sections of the duodenal crypts in each animal. From these data the mitotic indices over the total crypt-cell population as well as within each previously-established zone were determined along with  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  for each experimental group. The statistical significance of the differences among the data were analyzed by Student t test. The results show that the presence of ES12a tumor inhibits the mitotic activity of the duodenal-crypt enterocytes and produces an apparent temporal shift in the peak and trough within the circadian curve for this growth parameter.

## Bibliografía

1. Leblond CP. The life history of cells in renewing systems. *Am J Anat* 1981; 160: 113-58.



2. Potten CS. Regeneration in epithelial proliferative units as exemplified by small intestinal crypts. *Regeneration of vertebrate sensory receptor cells* 1991; *Ciba Foundations Symposium* 1991; 160: 54-76.
3. Chwalinski S, Potten CS. Crypt base columnar cells in ileum o BDF1 male mice. Their numbers and some aspects of their proliferation. *Am J Anat* 1988; 186: 397-406.
4. Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10: 45-62.
5. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001-20.
6. Potten CS, Keller M, Rew DA, Roberts SA. Proliferation in human gastrointestinal epithelium using bromodeoxyuridine in vivo: data for different sites proximity to a tumour, and poliposis coli. *Gut* 1992; 33: 524-9.
7. Badrán AF, Moreno FR, Echave Llanos JM. Liver regeneration in mice bearing a transplanted hepatoma. *Rev Esp Oncología* 1986; 31: 591-600.
8. Catalano VA, Barbeito CG, Savignone CA, Badrán AF, Moreno FR. Mitotic activity of the liver and tongue in mice bearing a transplanted mammary carcinoma. *Analecta Veterinaria* 1996; 16: 18-22.
9. Barbeito CG, Moreno FR, Badrán AF. Mitotic activity analysis of the cortex from Es12a tumour bearing mouse kidney. *Ciencias Morfológicas* 1996; 2: 39-47.
10. Badrán AF, Catalano VA, Moreno FR. Epidermic mitotic activity in normal and EA34 mammary carcinoma bearing mice. *Com Biol (Bs As)* 1993; 11: 152.
11. Moreno FR, Barbeito CG, Badrán AF, Echave Llanos JM. Proliferation of pituitary adenocytes on ES2 tumor-bearing mice. *Com Biol (Bs As)* 1992; 10: 336.
12. Errecalde AL, Inda AM, García AL. Circadian rhythms in cell proliferation. *Ciencias morfológicas*. 1995; 1: 33-9.
13. Scheving LA, Tsai TH, Cornet LE, Fexers RJ, Scheving LE. Circadian variation of epidermal growth factor receptor in mouse liver. *Anat Rec* 1989, 224: 459-65.
14. Massague J. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
15. Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, Moses HL. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 1578-82.

- - - -

La primera cualidad del investigador es la *vocación* auténtica y profunda. Se despierta generalmente en contacto con los hechos y con los buenos maestros. Se reconoce por el entusiasmo y la perseverancia. El buen investigador científico está enamorado de la verdad y dedica su vida a encontrarla y hacerla triunfar. Su gloria es verla resplandecer respetada por todos.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

Misión y responsabilidad del investigador científico, 1961

Conferencia reproducida en *Ciencia e Investigación* 1996; 49: 105-10