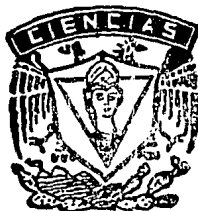


00361
29
rej.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



CUANTIFICACION DE LOS GENES DE ADN RIBOSOMAL (ADNr) DE
CEREBRO DE RATA EN DOS ETAPAS DEL DESARROLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ROSALBA SANCHEZ ALCALA LOZADA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I.- RESUMEN

II.- INTRODUCCION

III.- OBJETIVO

IV.- MATERIAL Y METODOS:

- 1.- MATERIAL BIOLÓGICO
- 2.- REACTIVOS QUÍMICOS
- 3.- PURIFICACION DE ARN_r
- 4.- PURIFICACION DE ADN
- 5.- HIBRIDACION CUANTITATIVA ADN-ARN_r

V.- RESULTADOS:

- 1.- PURIFICACION DE ARN_r
- 2.- MARCAJE RADIOACTIVO DE ARN_r
- 3.- PURIFICACION DE ADN
- 4.- HIBRIDACION CUANTITATIVA ADN-ARN_r

VI.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

VII.- REFERENCIAS

RESUMEN

El envejecimiento es un fenómeno que ocurre en todos los niveles de organización en sistemas multicelulares y plantea a la ciencia moderna una serie de incógnitas hasta ahora por resolver.

Una gran variedad de funciones fisiológicas en el hombre declinan con la edad, iniciándose esta situación entre los 30-40 años. Además, aunado a este declive, existen cambios en la capacidad proliferativa, así como alteraciones en estructuras y funciones a nivel celular y subcelular de diferentes tejidos.

Se desconoce el mecanismo por el cual es mediada la limitación intrínseca de la capacidad reproductiva celular. Una base genética es la indicada por la longevidad característica de cada especie y los resultados de diferentes estudios de cultivos celulares tanto in vivo como in vitro sugieren que el mecanismo "controlador" se basa en el número de duplicados celulares y no en el tiempo cronológico o metabólico. Se dispone de poca información acerca de cambios en los parámetros del ciclo celular con respecto a la edad. En general las fases S, G2 y M no se encuentran afectadas, pero la fase G1 se alarga en células envejecidas.

Por otro lado, otros estudios indican que la velocidad de síntesis de proteínas en los cerebros de rata, ratón y conejo disminuyen con la edad. Estos cambios se observan a varios

niveles de complejidad bioquímica y en sistemas tanto in vivo como in vitro, por lo que es muy probable que existan componentes regulatorios intracelulares.

La pregunta que nos planteamos en este trabajo fue la siguiente: ¿Es la regulación de la actividad de los genes de ADN_r un factor clave limitante en el proceso de envejecimiento? Para contestar esta pregunta se utilizó como modelo experimental el cerebro de rata por ser un sistema fundamental post-mitótico.

Con el objeto de determinar si ocurren cambios en la cantidad de ADN_r que codifica para el ARN_r durante el envejecimiento del cerebro de rata, se purificó ADN de cerebro de rata recién nacida (1 a 3 días) y de tres meses de edad. El ADN se hibridó con ARN_r.

El ARN, marcado radiactivamente (orotato-³H), se obtuvo in vivo a partir de un extracto de hígado de rata, con una actividad específica de 7950 cpm/ug. Para estimar el valor de hibridación ADN-ARN_r a saturación en forma precisa, se graficó la reacción ADN con el ARN_r en forma de línea recta extrapolando a concentraciones infinitas de ARN_r, obteniéndose como resultado, para la rata de 1 a 3 días de nacida, un valor de 138±8 genes y para la de tres meses de edad de 149±12 genes por genoma haploide, observándose un aparente incremento de 7 genes durante el desarrollo. Estos datos son semejantes a los reportados por varios investigadores, aunque también contradicen lo observado por otros. Concluimos que no es útil utilizar la relación constante del ADN_r durante el desarrollo como marcador idóneo del en-

vejecimiento en rata, ya que el número de genes ribosomales parecen no cambiar, aunque cabe la posibilidad de que en estadios más tardíos ocurran cambios en el contenido de los genes ribosomales (disminución) tal y como ocurre con la síntesis de proteínas.

INTRODUCCION

El ciclo biológico de los organismos superiores se caracteriza por fenómenos tales como: nacer, crecer, madurar, reproducirse, envejecer y morir. Los problemas del envejecimiento y de la duración de la vida plantea a la ciencia moderna toda una serie de incógnitas hasta ahora por resolver. Por ejemplo, no sabemos porqué la madreperla vive cien años, en tanto que un ratón sólo vive de tres a cuatro años, así como tampoco están claros los procesos del envejecimiento (1).

Se ha definido el término envejecimiento, como el total de los cambios que ocurren durante la vida de un individuo después de su madurez y que son comunes a todos los miembros de su especie biológica, excluyendo aquellos relacionados con los ritmos biológicos de tipo circadiano y estacional; senectud, como las manifestaciones de deterioro franco, tanto en estructura como en función, que ocurren durante el periodo de la vida y longevidad, como el tiempo de duración de la vida, en donde se considera una longevidad máxima y una media. La primera es autoexplicativa; la segunda, es el valor medio del tiempo de vida que se obtiene promediando las edades al fallecimiento de los miembros de una especie (1).

Cuando se analizan, por ejemplo, las diferentes poblaciones humanas, tanto histórica como geográficamente, es común encontrar que el valor de longevidad varía. Estos valores se van desplazando hacia edades más tardías en función del desarrollo

socioeconómico y por lo tanto, médico y sanitario de cada población particular (1). Por ejemplo, el mejoramiento en las condiciones de vida y avances en la medicina, particularmente en el control de las enfermedades infecciosas, permite simplemente que un número mayor de personas alcance lo que parece ser el límite máximo de duración de vida. Parecería que las poblaciones humanas están tendiendo a un límite de alrededor de 115 años (1).

Por otro lado, si analizamos los valores de longevidad máxima de otras especies biológicas, encontramos que una especie presenta un valor y otra especie otro valor diferente, siendo esta variación grande, hasta más de veinte veces, tan sólo comparando a los mamíferos entre sí (2). El envejecimiento en el individuo es complejo y probablemente es resultado de cambios o disminución en el número de células de órganos y sistemas que contribuyen a un fenotipo final. En el hombre el envejecimiento se manifiesta por una disminución en la masa corporal, midiéndose este parámetro como peso de grasa, masa celular o nitrógeno total corporal, iniciándose a partir de los 30-40 años de edad (3).

A nivel de órgano, se observan cambios degenerativos en tejidos, cambios que no ocurren de manera uniforme aún en células del mismo tipo de tejido, es decir, algunas células degeneran pero permanecen rodeadas por células que parecen normales. Existe una disminución de peso absoluto en cerebro, hígado, riñón y bazo (4). Sin embargo, mediciones en el peso de un órgano o tejido no siempre reflejan una pérdida de funcionalidad, ya que, por ejemplo, células del parénquima de cerebro, piel, músculo, sis-

tema digestivo, hígado, riñón, bazo y aparato reproductor que degeneran, frecuentemente son reemplazadas por sustancias intersticiales (por ejemplo colágena) que con el tiempo incrementan en cantidad y densidad (5).

La pérdida de células con el incremento en la edad es probablemente un factor que contribuye a la limitación de la longevidad, junto con una disminución en la proliferación celular (6,7) así como una disminución en la función de por lo menos algunas células de ciertos tejidos envejecidos (8,9). Así, la pérdida de células de múltiples tejidos a lo largo de la vida probablemente contribuye a una inestabilidad del organismo completo.

La mayoría de las células que constituyen al ser humano, con excepción de las nerviosas y algunas musculares, mueren, pero son reemplazadas por células nuevas las cuales mantienen al organismo; sin embargo, no lo rejuvenecen. El envejecimiento no se manifiesta en las células individuales, sino en estirpes - - celulares. Entre los seres vivos de mayor edad, encontramos árboles como las secuoyas y pinos, cuyas células vivas no tienen más de 30 años ya que en su mayor parte están constituidos por células muertas que no son necesarias para su sobrevivencia como organismos completos. Dado que las células muertas no pueden incluirse para determinar la edad, estos árboles no son más que 30 años "viejos" y son, por lo tanto, considerablemente más jóvenes que las células nerviosas más viejas de muchos seres humanos (10).

Se sabe que las células nerviosas y musculares dejan de dividirse desde temprana edad y deben perdurar mientras dura el organismo vivo. Si se destruyen accidentalmente por alguna enfermedad, no se reemplazan; pero en ausencia de enfermedad el sistema nervioso y muscular sufren una declinación constante que empieza hacia el final del periodo de crecimiento y continúa a un ritmo acelerado hasta la senectud (11). Las deficiencias funcionales en un órgano como el cerebro, se relacionan con la pérdida de células. Desde principios de la edad adulta hasta la senectud, el cerebro del varón humano normal disminuye aproximadamente 150 g. Sin embargo, la consecuencia de una ligera pérdida de neuronas no se hace notable anatómicamente debido a que otras células pueden compensarla (12). Probablemente las células empiezan a fallar funcionalmente antes de su desintegración final. Los músculos esqueléticos también pierden células y la reducción del peso es paralela a los cambios de peso característicos del cerebro (13).

El concepto de que una disminución en la capacidad de renovación celular está involucrada en el proceso del envejecimiento no es nuevo ya que a principios de 1907, Minot (14) observó que en metazoarios, la velocidad de crecimiento disminuía a través de la vida, en algunos o todos los tejidos. Los primeros trabajos realizados en 1911 por Alexis Carrel (15) sugerían que las células en cultivo eran inmortales, ya que tenía cultivos celulares de explantes de corazón de pollo crecidos durante 34 años. Fue hasta 1957 cuando Swin y Parker (16) publi-

caron resultados de cultivos derivados de una gran variedad de tejidos humanos crecidos en diferentes medios, reportando que 49 de 51 cultivos podían ser propagados únicamente de 3 a 34 pasajes. Hayflick y Moorhead (17) confirmaron este trabajo, cultivando fibroblastos de embriones normales humanos en botellas de vidrio, encontrando que sólo pueden dividirse hasta 50 doblajes celulares en un periodo de 7 a 9 meses. Posteriormente, las células sufren cambios degenerativos y mueren. Otro experimento fue el crecer fibroblastos por 20 divisiones celulares y después congelarlos durante 13 años para posteriormente descongelarlos y crecerlos, observando que después de 30 divisiones morían - - (17). Estos resultados han sido reproducidos en muchos laboratorios y han permitido proponer la hipótesis de que la capacidad reproductiva limitada de las células normales puede ser la expresión a nivel celular del envejecimiento in vitro.

Hayflick (18) divide al fenómeno del envejecimiento in vitro en tres partes: fase I.- Periodo de sobrecrecimiento celular. Fase II.- Periodo de proliferación rápida y fase III.- Periodo en donde se incrementa el tiempo para que las células alcancen su confluencia, disminuye la densidad y ocurren cambios en la forma y tamaño celular. Argumenta que ésto último es una función intrínseca de las células relacionada con el envejecimiento.

Hayflick (18) provee evidencias del envejecimiento tanto in vivo como in vitro, ya que encuentra una correlación entre la edad del donador y la capacidad reproductiva celular in vitro. Posteriormente, Martin (19), en estudios realizados en fibroblas-

tos de piel humana normal, señala una correlación significativa entre la longevidad in vitro y la edad del donador. Mas recientemente, Schneider y Mitsui (20) en experimentos similares examinaron algunos parámetros que cambian con la edad y que ocurren primero en cultivos derivados de individuos viejos, llegando a la conclusión de que el número de duplicaciones celulares es inversamente proporcional a la edad del donador.

Otro tipo de estudios que apoyan lo anterior son los cultivos provenientes de individuos con enfermedades que se caracterizan por una vejez prematura, tales como diabetes, síndrome de Down, síndrome de Hutchinscn-Gilford, síndrome de Werner, etc., en los que células parecidas a fibroblastos muestran una longevidad disminuida en comparación con la de individuos normales (21-25).

Existe poca información sobre cambios en los parámetros del ciclo celular en el envejecimiento. En general, las fases S, G2 y M no parecen ser afectadas in vitro, pero la fase G1 se alarga en células envejecidas (26).

Resulta interesante plantearse si células normales de diferentes animales al igual que las humanas envejecen en cultivos celulares. Las variaciones en la duración de la vida en diferentes especies son mucho mayores que las existentes entre individuos de la misma especie. Algunos autores consideran que la mosca de la fruta es vieja a los 40 días, un ratón a los 3 años, un caballo a los 30, el hombre a los 100 y ciertas tortugas a los 150 (27). Aunque solamente algunas especies han sido estudiadas,

las evidencias disponibles sugieren que hay una relación directa entre la longevidad de una especie y la capacidad de dividirse en medio de cultivo. Tenemos como ejemplos, los 10-20 doblajes para células en cultivo de rata (2.5 años), 30 doblajes para las de pollo (10 años) y 50 doblajes para las humanas (70 años) (28).

Otra relación interesante es la descrita por A. Sacher (29), quien encontró una fuerte correlación positiva entre la longevidad y el cociente resultante de dividir el peso del cerebro por el peso fresco del organismo, llevada a cabo en 85 especies de animales que variaban de tamaño, desde el ratón hasta el elefante. Estas observaciones indican que a lo largo de la evolución de los vertebrados puede haber existido una relación importante entre el incremento en la duración de la vida y el incremento relativo del tamaño del cerebro.

Por otra parte, existen algunos datos para diferentes tipos celulares normales a diferentes edades. La información resumida por Buetow (30), indica que con excepción de la piel abdominal y el epitelio gingival, en general existe una disminución del índice mitótico en relación directa con la edad en la mayoría de los tejidos.

Es importante demostrar que la disminución de la capacidad reproductiva celular depende directamente de la limitación en la reproducción y no de otros mecanismos. Por ejemplo, tejidos dependientes de hormonas pueden no reproducirse debido a una producción insuficiente de hormonas. Para solventar esta dificultad se examina la capacidad reproductora mediante una serie de

trasplantes de células marcadas en animales jóvenes consanguíneos (31). Tales experimentos in vivo han complementado los realizados en cultivos celulares. Los resultados de distintos laboratorios sobre trasplantes en serie de tejido de glándula mamaria, de piel y células sanguíneas inmaduras en ratas, indicaron que las células transplantadas envejecían y morían, igual que lo hacían en cultivos celulares. Sin embargo, en algunos casos el tiempo transcurrido hasta la muerte de las células era mayor que la duración de la vida de un animal de dicha especie. Este hecho puede explicarse porque las células transplantadas no crecen tan rápidamente como lo hacen en medio de cultivo, sino que la mayoría permanece en estado de reposo. Si crecieran al mismo ritmo que el cultivo celular, el trasplante alcanzaría en pocos meses un tamaño superior al del huésped (32).

Un fenómeno similar se observa cuando al cultivar células normales a temperatura ambiente, en lugar de hacerlo a la temperatura corporal, las células se dividen lentamente y degeneran muchos meses después de la muerte de cultivos hermanos mantenidos a la temperatura corporal. Aunque el tiempo de supervivencia aumenta, el número total de duplicaciones de la población celular incubada a temperatura ambiente no excede al correspondiente a las células incubadas a temperatura corporal (15).

Un enfoque experimental diferente para localizar y entender el mecanismo responsable de la limitada capacidad replicativa de células normales, es el descrito por Woodring Wright y L. Hayflick (33), quienes cultivaron células normales y las trataron

con citocalasina B, droga que expulsa el núcleo, el cual puede ser separado de la célula por centrifugación. Así, es posible obtener millones de células sin núcleos. Dichas células se denominan citoplastos y son viables por algunos días. En este tiempo se pueden fusionar con células normales. Para determinar si el reloj que dicta la capacidad de replicación celular se encuentra en el núcleo o en el citoplasma, fusionaron citoplastos derivados de células jóvenes a células viejas normales y viceversa; encontraron que el citoplasma parece tener poco efecto en la rapidez de envejecimiento, sugiriendo que probablemente el "reloj" se encuentre en el núcleo.

También es posible cultivar pequeños fragmentos de tejido animal intacto directamente sobre vidrio o plástico en lugar de disociar el tejido en sus células individuales. A principios de 1920 (34) se descubrió que si se cultivaban pequeños pedazos de tejido de embrión de pollo, el tiempo que el primer fibroblasto tardaba para migrar hacia la orilla del tejido explantado incrementaba con la edad del embrión. Este lapso de tiempo se denomina periodo de latencia. En 1960, Milena Soukupová de Checoslovaquia (35), utilizando explantes de corazón, hígado y riñón provenientes de ratas, encontró una correlación entre el periodo de latencia y la edad de tejido. En 1970, Roy L. Walford, Jr. y Harold Waters (36) obtuvieron 20 explantes de donadores humanos vivos cuyas edades fluctuaban desde recién nacidos hasta 80 años, encontrando que el periodo de latencia se incrementaba con la edad.

A partir del hecho comprobado de que las células normales no son inmortales, sino que tienen una capacidad limitada para dividirse, resulta importante determinar el impacto de este descubrimiento en la comprensión del proceso del envejecimiento. Actualmente existen evidencias de la existencia de algún tipo de programación en las células normales que controlaría su capacidad funcional y reproductora (37). Desde luego, no todas las células del organismo tienen la capacidad de replicarse rápidamente, sólo algunas como las de la piel, tejido hematopoyético y la cubierta del intestino. Células más especializadas, como células nerviosas, células endócrinas, células musculares, células sensoriales y algunas células del sistema inmune se dividen poco o no se dividen una vez que han alcanzado la madurez.

Algunos gerontólogos están de acuerdo en que la mayoría de los cambios importantes que ocurren con el incremento en la edad, tienen lugar en células altamente especializadas y no en células que se dividen rápidamente. Sin embargo, el mecanismo que limita la división celular en células que proliferan rápidamente, posiblemente es el mismo que limita la capacidad funcional de células especializadas que se dividen más lentamente o que no experimentan división (16).

Se han reportado cambios morfológicos y fisiológicos en cultivos de fibroblastos humanos, mucho antes de perder su capacidad de dividirse. Entre ellos tenemos cambios en la utilización de nutrientes, en la expresión y reparación del material genético, en las vías metabólicas de la célula, en la actividad de varias -

enzimas cruciales y en la morfología de la superficie celular y de los organelos intracelulares (38). Muchos de estos cambios son idénticos a los que ocurren en las células del ser humano cuando envejecen en el organismo intacto. Por lo tanto, una explicación del mecanismo a través del cual los fibroblastos humanos pierden su capacidad de dividirse, podría arrojar luz sobre los factores determinantes de las pérdidas funcionales por envejecimiento en células especializadas.

Esto induce a preguntarnos: ¿Cuáles son los mecanismos subyacentes a los cambios inducidos por el envejecimiento en la mayoría de las células?

La mayoría de los gerontólogos piensan que la respuesta puede estar en el mensaje genético, y que los cambios que ocurren en el envejecimiento pueden estar probablemente controlados por los genes. El razonamiento se basa en que el desarrollo y - - diferenciación celular, desde el huevo fertilizado hasta la maduración sexual están determinados por el aparato genético (39).

Actualmente se han generado tres hipótesis generales basadas en las propiedades de las moléculas portadoras de la información en las células, es decir ARN, ADN, así como otras moléculas como las proteínas, siendo las explicaciones más plausibles para el envejecimiento. Ellas son: 1) Zhores Medvedev (40) propone que, con el tiempo, cuando los genes son transcritos a ARN mensajero y éstos son traducidos a proteínas, la transcripción y/o traducción podría estar sujeta a un número progresivamente mayor de errores.

Estos errores pueden originar moléculas enzimáticas defectuosas y conducir a una decadencia en la capacidad funcional de la célula. Sin embargo, tal hipótesis sobre la existencia de los "errores catastróficos" ha sido sometido a prueba en varios laboratorios estudiando la síntesis proteica en células en proceso de envejecimiento y los resultados no constituyen buenas evidencias para apoyarla (41).

La acumulación de errores en un sistema biológico puede evitarse en parte por los conocidos procesos de reparación, pero este sistema como tal no actúa indefinidamente ni a la perfección. Ronald W. Hart (42), estudiando cultivos de fibroblastos de piel obtenido de diferentes animales desde la musaraña hasta el elefante y el hombre observó que eran capaces de reparar las alteraciones de su ADN causadas por radiaciones ultravioleta en medio de cultivo in vitro. La capacidad de reparación variaba en proporción directa a la duración de vida de las especies estudiadas. En posteriores experimentos (43) demostraron que la capacidad de reparación del ADN en cultivos celulares humanos normales disminuye a medida que se aproxima el límite de su capacidad de replicación.

2) Medvedev propuso la hipótesis del mensaje redundante. Se sabe que solamente el 0.2 - 0.4% de la información del ADN contenido en el núcleo celular (44) es utilizado por una determinada célula en su tiempo de vida. Es más, muchos de los genes en la molécula del ADN están repetidos en secuencias idénticas, por lo que el mensaje genético resulta altamente redundante; asimismo,

este autor propuso que las secuencias repetidas estarían normalmente reprimidas, pero cuando un gene activo es extensamente dañado, éste es reemplazado por un gene idéntico de reserva. Por lo tanto la redundancia del ADN podría proporcionar un mecanismo protector frente a la vulnerabilidad intrínseca del sistema, causada por accidentes moleculares. A través de este mecanismo se prolongaría el tiempo de supervivencia al evitar el acúmulo de un número suficiente de errores capaces de alterar el mensaje genético. Al final, sin embargo, todos los genes repetidos serían utilizados, los errores se acumularían y las deficiencias fisiológicas determinantes del envejecimiento irían apareciendo. Esta hipótesis permite predecir que las especies de vida larga deben tener más ADN redundante que las especies de vida corta. Esta hipótesis también predice que los genes redundantes funcionales disminuyen con la edad.

3). La tercera hipótesis genética del envejecimiento propone que los cambios del envejecimiento son simplemente una continuación de las señales genéticas normales que regulan el desarrollo de un animal desde el momento de la concepción a la madurez sexual. Esta hipótesis propone la existencia de "genes de envejecimiento" que se encargarían de frenar o parar las vías bioquímicas de una manera secuencial y conducirían a una expresión programada de los cambios propios del envejecimiento. El encanecimiento del pelo, menopausia, disminución de la capacidad física, son algunos de los cientos de eventos que se asocian al envejecimiento corporal. Ninguno es considerado como

enfermedad, pero tales eventos disminuyen la capacidad funcional celular e incrementan su vulnerabilidad a las enfermedades. Estos eventos bioquímicos programados genéticamente variarían en cuanto al tiempo de su expresión en diferentes tipos celulares. Por lo tanto el proceso de envejecimiento podría centrarse en unas pocas células claves (post-mitóticas) cuya velocidad de envejecimiento es rapidísimo y de mayores consecuencias.

La función de los hipotéticos "genes de envejecimiento" puede ser análoga a la disminución funcional normal y muerte celular que ocurre en algunos tejidos durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, en animales vertebrados, para el desarrollo de una extremidad es necesario la formación de millones de células y la muerte y reabsorción de millones de otras células. El destino de estas últimas células es determinado por "programadores" que operan en un momento oportuno (45). Puede suponerse que los mismos procesos continúen a través de la vida, operando a diferentes velocidades en diferentes tejidos y finalmente produzcan los cambios que conducen al envejecimiento y que aumenten la susceptibilidad a las enfermedades.

Partidarios del programa para el envejecimiento genéticamente predeterminado, argumentan que el éxito evolutivo de las especies depende únicamente de la capacidad de sus miembros para vivir el tiempo necesario para procrear y criar sus hijos. Lo que luego suceda es irrelevante para la sobrevivencia de la especie (46).

Las tres hipótesis sobre el envejecimiento se aplican igualmente tanto a células animales normales cultivadas, como a células que envejecen en el organismo intacto. Estas hipótesis no son excluyentes y pueden operar simultáneamente. Sin embargo, se conocen dos tipos celulares animales que escapan inevitablemente a la vejez y muerte; éstas son las células cancerosas y las células germinales (47). Es interesante especular si las células cancerosas y las células germinales (óvulo y espermatozoide) podrían librarse del envejecimiento a través de un mecanismo común. De hecho, la forma en que la información genética es intercambiada entre virus que causan cáncer y células animales, podría ser análoga a cuando se fusiona el óvulo y el espermatozoide intercambiando información genética. La alteración de la información genética en el organismo (mediada por virus, agentes carcinogénicos o radiaciones ionizantes) podría originar una célula cancerosa. El rearreglo de información genética (meiosis) en la génesis del óvulo y el espermatozoide o el proceso de fusión de estas células, volverían a poner en marcha el mecanismo que controla el número de divisiones celulares. De esta forma aunque los distintos miembros de una especie estarían programados para morir, la especie sobrevivirá. Un ser humano sería el camino a través del cual las células germinales producirían nuevas células germinales inmortales.

La relación precisa entre pérdida replicativa y diferenciación no es completamente entendible, así como la interfase entre desarrollo, diferenciación y envejecimiento aún es difusa. No

obstante la pérdida de capacidad replicativa de las células crecidas in vitro, este fenómeno no es fácilmente extrapolable a organismos intactos envejecidos.

El dogma central de la genética molecular establece que la información genética fluye del ADN al ARN y de éste a proteínas (48). En él se definen tres procesos principales de la preservación y transformación de la información genética. El primero de ellos es la replicación o copia del ADN para formar moléculas hijas idénticas. El segundo es la transcripción, proceso mediante el cual, el mensaje genético de ADN es transcrito en forma de ARN mensajero para ser llevado a los ribosomas. El tercero es la traducción, proceso por el cual el mensaje genético es descifrado en los ribosomas, donde el ARN se utiliza como matriz dirigiendo la secuencia aminoácida específica durante la biosíntesis - - proteica.

La síntesis de proteínas es el resultado de una serie de eventos bioquímicos acoplados y que ha sido ampliamente estudiado en mamíferos (49) y se lleva a cabo en cuatro etapas principales. La primera etapa denominada de activación, se lleva a cabo en el citoplasma, los aminoácidos son esterificados a sus correspondientes ARNt a expensas de la energía del ATP. En la segunda etapa, que se llama de iniciación, el ARN mensajero, que es portador del mensaje genético que especifica la secuencia de aminoácidos y el primer aminoacil-ARNt o iniciador, se unen a la subunidad menor del ribosoma en un proceso que requiere tres proteínas específicas denominadas factores de iniciación (IF-1,

IF-2, IF-3) así como GTP y Mg^{++} . La subunidad ribosómica mayor se adhiere entonces para formar un ribosoma funcional, listo para la siguiente etapa.

La tercera etapa se denomina de elongación. En ella la - - cadena polipeptídica se prolonga por adición secuencial de nuevos aminoacilos, que son enzimáticamente transferidos desde los - ésteres aminoacil-ARNt, cada uno de los cuales se ha unido al ribosoma respondiendo a un codón o triplete de bases específicas del ARN mensajero. Para la elongación de la cadena son indispensables dos proteínas o factores de elongación (EF-T y EF-G). Después de la formación de cada nuevo enlace peptídico, el ribosoma se desplaza a lo largo del ARN mensajero para situar al codón siguiente en posición de alinear al nuevo aminoacil-ARNt, proceso que requiere energía suministrada en forma de GTP. La última etapa de la síntesis proteica es la terminación, que es cuando la cadena polipeptídica se ha completado, cosa que ocurre cuando se alcanzan señales adecuadas de terminación en el ARN mensajero. Entonces el producto es liberado del ribosoma de acuerdo con un proceso que también requiere proteínas específicas llamadas factores liberadores (50).

Aunque el mecanismo fundamental involucrado en el deterioro fisiológico en relación por la edad en mamíferos aún no se ha elucidado, es importante establecer la relación de síntesis y degradación de macromoléculas con funciones especializadas y eventos deteriorativos en el organismo envejecido. Obviamente, una disminución en la síntesis de proteínas tendría efectos de

deterioro sobre la capacidad funcional de la célula. Aunque los datos disponibles son algunas veces contradictorios, la mayoría de los investigadores han observado una disminución progresiva de la síntesis de proteínas totales relacionadas con la edad, en casi todos los sistemas estudiados (para revisión ver Ref. 51). La actividad general de la fracción subcelular pH 5, conteniendo ARN de transferencia y aminoacil-ARNt sintetasa no cambia en función de la edad (52). La disminución de la síntesis de - - proteínas es independiente del ARN mensajero (53). La actividad de ribosomas lavados es también independiente de la edad (54), así como su actividad de enlace de poli U (55). Más aún, las propiedades fisicoquímicas de los ribosomas no cambian (56). Sin embargo, se ha encontrado una disminución en la actividad de factores de iniciación y/o elongación durante la traducción (57) y una disminución en la adhesión ribosoma-ARN mensajero (58).

Hay que insistir que los múltiples componentes que intervienen en el proceso del envejecimiento están todavía poco comprendidos y el problema se complica más por la heterogeneidad celular y diferencias regionales en cuanto a la velocidad de desarrollo del cerebro. En general, una vez que las células post-mitóticas son capaces de diferenciarse se inicia el proceso de envejecimiento y éste ocurre en el último periodo de vida prenatal de la rata. La maduración del sistema nervioso central en la rata se realiza de manera heterocrónica (proporcionalmente y en etapas diferentes) durante el primer periodo post-natal, caracterizado por el aumento de tamaño de las neuronas, células

de la glia y mielinización. Todas las neuronas se diferencian antes del nacimiento y así, cada neurona es tan vieja como la rata misma, aunado a que el número de neuronas decrecen con la edad, ya que las células muertas no son reemplazadas. La consecuencia de una pequeña pérdida de neuronas no se hace evidente a nivel anatómico debido a que otro tipo de células nerviosas (ejemplo: glia) pueden compensarlas. Sin embargo, otro tipo de cambios sí son evidentes, tales como atrofia generalizada y pérdida de peso o tamaño del cerebro, los cuales son muy - - difíciles de cuantificar a nivel celular o histológico (59).

Estas variaciones correlacionan con el alto grado de variación observadas en múltiples mediciones bioquímicas en función de la edad, realizadas tanto in vivo como in vitro. Mediciones de síntesis de proteínas durante el desarrollo y maduración del cerebro de rata (60,61,62,63) y de ratón (53,64) han revelado una disminución en la síntesis de proteínas hasta de un 30-40%, comparando a organismos de 2 meses de edad con recién nacidos. De 2 meses a 10.5 meses, la síntesis proteica disminuye solamente un 11% (65) y se reduce a un 9% entre 16.5 y 22.5 meses de edad.

Si se mide la síntesis total de ARN por incorporación de precursores radiactivos, se observa que existe una disminución en función de la edad. Esto se ha realizado en fibroblastos humanos (66) y en varios órganos y tejidos de animales de experimentación (revisión Ref. 67). En forma similar a la síntesis de proteínas, se ha observado una disminución en la síntesis de ARN de 30-40%

comparando a organismos recién nacidos con animales de 2 meses de edad. A partir de los 2 meses hasta los 24 meses se observa una disminución del 10%.

Resultados similares se han observado al medir la actividad de los factores de iniciación y/o elongación en cerebro de rata y ratón (57) en donde la disminución es muy marcada en los primeros días de nacimiento hasta los 2 meses, a partir del cual, la actividad de estos factores permanecen casi constantes hasta los 2 años de edad de la rata.

Por otra parte, es claro que en la mayoría de los organismos eucariotes los genes ribosomales se encuentran reiterados de 100 a 500 veces, agrupados en regiones organizadas del cromosoma. Estos genes son transcritos por la ARN polimerasa en una molécula precursora del ARN que es procesada para dar origen a las especies ribosomales 18S (presente en la subunidad ribosomal 40S) y 5.8S y 28S (presente en la subunidad ribosomal 60S). Estos genes han recibido considerable atención debido al papel central que sus productos juegan en los procesos de síntesis de proteínas (68).

Usualmente se considera que la mayoría, si no es que toda la información genética contenida en el ADN de animales superiores, permanece sin cambios y se conserva a través de los procesos del desarrollo y diferenciación conduciendo al organismo adulto. Sin embargo, evidencias recientes han demostrado excepciones a esta regla. Se han observado cambios en el número de genes - ribosomales (ADNr) por genoma haploide en ovocitos de anfibios

(69), insectos (70) y peces (71), en embrión de trigo (72) y durante la regeneración del cristalino en Triturus (73). Además, hay evidencias de que algunos organismos tienen diferente cantidad de genes de ARN ribosomal en diferentes estados de desarrollo, como la reportada por Henning y Meer (74) en mosca adulta, embrión completo y glándulas salivales de larva. Ritossa (75) ha reportado que en Drosophila melanogaster la cantidad de genes que codifica para ARN ribosomal es mucho mayor en el tercer estado larvario del desarrollo que en el adulto. La amplificación de genes específicos es considerado por muchos investigadores como un mecanismo que permite una muy alta velocidad de síntesis de proteínas durante estados cruciales del desarrollo, proporciones que raramente se requieren en el estado adulto del organismo (76).

Que la cantidad de genes que codifican para el ARN ribosomal (ADNr) pueda ser un hecho clave en la limitación de las funciones de organismos, está implícito en el descubrimiento de mutantes deficientes de ADNr. Por ejemplo, la mutante deficiente de ADNr de Drosophila, denominada bobbed, se encuentra afectada en su vigor, es decir, muestra una viabilidad reducida, baja fecundidad, un lento desarrollo, una longevidad reducida y un número de defectos anatómicos (77,78). También se ha reportado en plantas (79) que deficiencias en ADNr, afecta el vigor.

Entre eucariotes superiores, se han estudiado ampliamente mutantes de Xenopus laevis que poseen únicamente el 35% del contenido normal diploide del ADNr, sintetizando alrededor del 50%

del ARN normal (80). Tal disminución reduce el vigor de estos individuos a tal grado que mueren antes de completar los - - primeros estados de desarrollo.

En mamíferos poco se conoce acerca de la diferencia en la cantidad de genes de ADN_r existentes en tejidos en relación con el incremento en la edad. Sin embargo, se han reportado evidencias de una disminución de estos genes que ocurre en varios tejidos post-mitóticos de organismos envejecidos. Por ejemplo, la cantidad de ADN_r proveniente de hígado, riñón, cerebro, corazón y músculo esquelético de perro Beagle, es idéntico en tejidos jóvenes, pero disminuye durante el envejecimiento de estos animales en tejidos post-mitóticos como corazón, músculo esquelético y cerebro (81,82). Otras observaciones como las reportadas por Johnson (83), indican que una pérdida de ADN_r ocurre en el miocardio humano durante el envejecimiento (84).

Todos estos antecedentes nos llevan a plantear la hipótesis de que la regulación de la expresión de genes ribosomales puede ser un factor limitante clave en el proceso del envejecimiento del organismo. En este estudio se escogió el cerebro de rata, por ser un sistema fundamentalmente post-mitótico, en el cual la posible existencia de un cambio en la cantidad de genes ribosomales podría ser demostrado bajo condiciones de crecimiento y diferenciación celular normal y además por existir en la literatura datos importantes sobre la síntesis de sus macromoléculas (52-57).

Con el objeto de cuantificar los genes ribosomales (ADNr) se utilizaron 2 edades diferentes, es decir, ratas recién nacidas (1-3 días) y ratas de 90 días de edad. Es importante señalar que no se considera en estado de vejez en el término usual a la rata de 90 días de edad. Sin embargo, basándonos en los datos mencionados anteriormente, en donde la cinética de la síntesis de macromoléculas (tales como proteínas, ARN y factores de iniciación y/o elongación) sugieren diferencias bioquímicas importantes entre el cerebro del animal desde su nacimiento hasta los 60 días de edad por una parte y aquel de 60 días de edad hasta el momento de la muerte por otra parte, hemos asumido que los posibles mecanismos responsables del envejecimiento del cerebro de la rata podrían empezar a manifestarse desde los 60 días de edad del animal. Por lo tanto, a partir de los 60 días podría detectarse algún cambio cuantitativo importante a nivel del ADN ribosomal con respecto al recién nacido y ello podría reflejar de alguna forma la participación que dichos genes ribosomales tendrían en el proceso del envejecimiento del cerebro de rata.

OBJETIVO

Aunque no existe un acuerdo unificado sobre los mecanismos del envejecimiento, se considera que los cambios en la concentración de las macromoléculas responsables de almacenar la información genética juegan un papel importante en la etiología de los procesos deteriorativos relacionados con la edad.

Con objeto de analizar el papel del ADNr en las diferentes etapas de desarrollo, en este trabajo se cuantificaron los genes del ADNr de cerebro de rata recién nacida y de 3 meses de edad y se utilizó la siguiente metodología:

- 1.- Se aisló y se purificó ADN
- 2.- Se marcó radiactivamente ARNr
- 3.- Se aisló y purificó ARNr
- 4.- Se utilizaron técnicas de hibridación ADN-ARNr para cuantificar los genomas de ADNr.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.- Se utilizaron ratas de la cepa Long Evans con un peso promedio de 230 gramos. El hígado de estos animales fue usado como fuente de ARNr. También se utilizaron ratas de la cepa Wistar, tanto recién nacidas (1-3 días) como de 3 meses de edad. El cerebro de estos animales fue usado como fuente de ADN. Las ratas se mantuvieron en el bioterio con periodos alternos de luz y oscuridad de 12 horas c/u, alimentadas con Nutrimientos Purina del Laboratorio Chow. La duración máxima de vida de esta cepa es de aproximadamente 3.5 años.

REACTIVOS QUÍMICOS Y MATERIALES.- Para destruir a las ribonucleasas contaminantes el material de vidrio se horneó a 120°C durante 12 horas. Las soluciones fueron esterilizadas en autoclave por 15 minutos. Al fenol destilado fresco se le agregó 0.1% de hidroxiquinolina como antioxidante y se saturó con Tris 0.01M pH 7.4, NaCl 0.1M, EDTA 0.01M. Las bolsas de diálisis se trataron a ebullición en carbonato de sodio al 5% durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada a temperatura ambiente y se hirvieron por 15 minutos más en agua destilada. Posteriormente se llevaron a ebullición en EDTA 0.05M por 15 minutos y por último se enjuagaron varias veces con agua destilada a temperatura ambiente para liberarlas de ribonucleasas y de cationes contaminantes.

La pronasa (pronasa E tipo XIV Sigma) se usó a concentración de 10 mg/ml disuelta en SSC (NaCl 0.15M, citrato de sodio - -

0.015M), incubándola durante 2 horas a 37°C. Para digerir al ARN se utilizó ribonucleasa (tipo I-A Sigma) a una concentración de 10 mg/ml, disuelta en agua y previamente hervida durante 5 minutos.

La formamida se desionizó con una resina mixta al 5%, intercambiadora de iones, tipo AG 501-X8 de porosidad media. Se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y después se filtró. El agua utilizada fue bidestilada y tratada con dietilpirocarbonato para controlar RNasa.

PURIFICACION DE ACIDO RIBONUCLEICO (85).- Generalmente se usó una rata para c/u de las diferentes condiciones de marcaje. La metodología consistió en realizar una hepatectomía de un lóbulo con peso aproximado de 2.0 gr. y 12 horas después de operar se le inyectó intraperitonealmente 1 mCi de ácido orótico-³H disuelto en Tris 0.1M pH 7.0. Se sacrificó al animal 24 horas después con un golpe en la nuca. Para desangrarla se le cortó la cabeza con una guillotina. Se extrajo el hígado rápidamente y éste se colocó en la solución TKM (Tris 0.05M pH 7.4, KCl 0.1M y acetato de magnesio 0.003M) a 4°C.

El hígado se cortó en pequeños fragmentos y se pesó - - agregándose 2.5 volúmenes (P/V) de la solución TKM. Se - - homogeneizó en un homogenizador Potter-Elvehjem, a 4°C, dando 8 golpes.

El homogenado se centrifugó a 20,000 g durante 20 minutos a 4°C (para precipitar membranas, núcleos, células completas, - mitocondrias y lisosomas, quedando en el sobrenadante ácidos - -

nucléicos, ribosomas y proteínas solubles). Al sobrenadante se le agregó 1/10 del volumen de desoxicolato al 5%, pH 7.4, y se agitó durante 10 minutos a 4°C centrifugándose a 30,000 g por 20 - - minutos. El sobrenadante se centrifugó a 100,000 g durante 3 - horas a 4°C y el precipitado o pastilla ribosomal se resuspendió en TKM ajustando la densidad óptica aproximadamente a 5 mg/ml de ARN (1 D.0 a 260 nm = 42 µg/ml de ARN).

Para extraer las proteínas de la solución ribosomal se añadieron 2 volúmenes de fenol saturado agitándose durante 30 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó 20 minutos a 10,000 g y se obtuvieron 2 fases y una interfase que corresponde del fondo a la superficie del tubo: a) solución fenólica, b) interfase que es proteica, y c) solución acuosa con ácidos ribonucleicos. De la solución acuosa de ácidos ribonucleicos se extrajeron proteínas nuevamente de 2 a 3 veces con fenol. Los ácidos ribonucleicos de la solución acuosa se precipitaron adicionando 1/10 de volumen de acetato de potasio 5M pH5.2 y 2 volúmenes de etanol al 95% pre-enfriado a -20°C y se incubó a -20°C durante 12 horas; el precipitado se separó centrifugando a 10,000 g por 20 minutos y se lavó de 2 a 3 veces con etanol absoluto pre-enfriado a -20°C. El precipitado previamente secado se resuspendió en un mínimo volumen de agua bidestilada y se leyó a 260 nm en el espectrofotómetro para cuantificación.

Las especies ribosomales mayores (28S y 18S) fueron - - separadas de las moléculas pequeñas por centrifugación en - - gradientes isocinéticos de sacarosa (5-20%) preparados en Tris

0.010M pH7, LiCl 0.05M y Sarcosyl al 0.1%. Estos gradientes fueron preparados con 6 ml de sacarosa al 20% en el recipiente de mezclado y 12 ml al 5% en el recipiente de reserva. Se utilizaron tubos de polialómero para el rotor SW 27.1 Beckman, colocando 150 ug de ARNr en la superficie de la sacarosa diluida (5%). Después de centrifugarlos a 130,000 g, 13 horas a 4°C, los gradientes se fraccionaron manualmente, mediante un orificio practicado en la parte inferior del tubo realizado con una aguja hipodérmica. Fracciones de 0.5 ml fueron analizadas a través de alicuotas de 10 ul, secadas sobre papel Whatman 1 y colocadas en tolueno, PPO 0.4%, Popop 0.0125% para ser analizadas en un contador de centelleo líquido Beckman. El ARN obtenido en los picos de interés fue precipitado con acetato de potasio 0.2M, pH 5.0 y 2 volúmenes de etanol y después resuspendido en 1.0 ml de agua con dietilpirocarbonato.

PURIFICACION DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.- Se siguió el método de Marmur (86) con algunas variaciones. Se sacrificaron 20 ratas de cada edad, cortándoles la cabeza, extrayendo el cerebro (sin cerebelo) y colocándolo en la solución SSC 0.1X. Se cortaron en fragmentos pequeños y se homogeneizaron en 2.5 volúmenes (P/V) de SSC a 4°C (es importante dar sólo 5 pasadas al romper las células para no romper los núcleos celulares). El homogenado se centrifugó a 2,000 g durante 5 minutos, repitiéndose este paso dos veces más. Los tres precipitados obtenidos se resuspendieron en SSC en relación de 5 ml/g de tejido.

Posteriormente se agregó lentamente 1/2 volumen de Sarcosyl al 2% en SSC y se incubó a 37°C durante 15 minutos. después se añadió 1/10 de pronasa y se incubó a 37°C durante dos horas.

A esta mezcla se le añadió 1 volumen de fenol saturado, se agitó rotatoriamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Y se centrifugó a 5,000 g, 15 minutos. Se obtuvo la fase acuosa y se repitió el paso por fenol de 2 a 3 veces. A la fase acuosa se le agregó cloroformo: isoamilico (24:1) en relación de 2 - - volúmenes, se agitó durante 15 minutos a 4°C, se centrifugó a 5,000 g 15 minutos, repitiéndose este paso de 2 a 3 veces. La fase acuosa obtenida se dializó por 12 horas en SSC 0.1X a 4°C con 3 ó 4 cambios de la solución de diálisis.

A la solución dializada se le agregó ribonucleasa en - - concentración final de 0.1 mg/ml, incubándose durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se extrajo con fenol de 2 a 3 veces y con cloroformo: isoamilico, de 2 a 3 veces como se describió anteriormente. La solución acuosa se dializó 12 horas contra SSC 0.1X a 4°C con tres a cuatro cambios de la solución de diálisis y se leyó en el espectrofotómetro a 260 nm (D.O a 260 nm = 50 µg/ml de ADN).

HIBRIDACION CUANTITATIVA ADN-ARN.- Se hizo de acuerdo a la metodología de Gillespie (87). El ADN se trató con hidróxido de sodio 0.5N a 37°C por 40 minutos, para separar las hebras del ADN. Posteriormente, se neutralizó con NaH_2PO_4 , 0.5M en SSC 10X a 4°C. Una vez separadas las hebras, el ADN se fijó en filtros Milipore HA MK.024.12, con diámetro de 24 mm y tamaño de poro de

0.45 μm . El tratamiento fue el siguiente: primero se hidrataron los filtros en agua bidestilada, después se colocaron en SSC 6X durante 20 minutos.

Los pasos siguientes se realizaron en un aparato de - - filtración (Millipore) equipado con diez pozos y conectado al vacío. En cada uno de los pozos se colocó el filtro previamente hidratado, se añadió 1 ml de SSC 6X y 3 ml de ADN hidrolizado (200 μg); se filtró en forma muy lenta. Después se agregaron 5 ml de SSC 6X y se filtró muy lentamente. Enseguida se añadió 15 ml - de SSC 6X, tres veces y se filtró rápidamente. Se cerró el vacío, se obtuvieron los filtros y se colocaron sobre toallas de papel para quitar el exceso de SSC 6X. Posteriormente se pasaron a - - toallas secas y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se colocaron en un horno al vacío a 65°C durante tres horas para fijar el ADN al filtro.

La hibridación se llevó a cabo en diferentes viales de plástico, colocando 1 ml de formamida desionizada al 50% en SSC 5X al cual se le añadió el ARN marcado radiactivamente en concentraciones que variaban desde 0-50 μg ; se agitó y se colocó el filtro de Millipore con el ADN fijado. Así, en cada vial de - - plástico se incubó durante 5 horas a 50°C, agitando cada 30 minutos. Posteriormente se lavaron los filtros en SSC 2X en proporción de 300 ml por cada 10 filtros, realizándose dos - - lavados. Después se lavaron los filtros en el aparato de filtración conectado al vacío, con 45 ml de SSC 2X por cada lado del filtro, realizándose dos veces. En otro vial limpio se - -

colocaron los filtros y se le agregó 5 ml de ribonucleasa en - - concentración de 10 µg/ml en SSC 2X, incubándose 20 minutos a - 27°C; con este proceso se eliminó al ARN que no hibridó con el ADN. Posteriormente se procedió a lavar nuevamente con SSC 2X como se indicó anteriormente. Se secaron 15 minutos con luz infrarroja y se contó la radioactividad de cada filtro sumergido en Tolueno-PPO. Después de contar la radioactividad de los filtros radiactivos ARNr-ADNr, éstos fueron usados para la determinación cuantitativa de ácido desoxiribonucleico por el método de Burton (88).

Para ello, los filtros se trataron con éter, se secaron y se les añadió ácido perclórico 0.5N, se calentaron a 70°C durante 30 minutos. En el método de Burton se usa una solución "A" formada de difenilamina (1.5 g), ácido acético (100 ml) y ácido sulfúrico concentrado (1.5 ml), y de una solución "B" compuesta de acetaldehído (16 mg/ml). De la solución "B" se toma 0.1 ml por cada 20 ml de la solución "A". Una vez hecha la mezcla, se le agrega 1-ml por cada 0.5 ml de la solución problema (ADN), se agita y se incuba durante 17 horas a 30°C. Después se lee en el colorímetro a 600 nm. Como estándar para la elaboración de la curva patrón se utilizó ADN de timo de ternera, pesado y leído a 260 nm.

RESULTADOS

PURIFICACION DE ARNr.- La purificación de las especies mayores del ARNr se llevó a cabo a partir de precipitados polisomales obtenidos por centrifugación diferencial, que después de desproteinizarse se separaron en gradientes isocinéticos de sacarosa de 5-20%. En la Fig. 1 se muestra el perfil de separación del ARNr obtenido en el gradiente. Para la hibridación se utilizaron las fracciones de la 12 a la 20 (indicado con corchetes horizontales), se juntaron y se precipitaron con etanol. El precipitado se secó y se resuspendió en 1 ml de agua. A esta mezcla que contiene los ARNr 28S y 18S se les determinó la concentración y se cuantificó la radiactividad. Los datos encontrados se muestran en el Cuadro I.

MARCAJE RADIATIVO DEL ARNr in vivo.- Se utilizaron tres diferentes componentes radiactivos (uridina 5-³H, orotato-³H y adenosina 5' trifosfato-³²P) intermediarios en la biosíntesis de ácidos nucleicos. El experimento consistió en aplicar a la rata una inyección intraperitoneal de 100 µl de uridina 5-³H (57.5 Ci/mol; 1 mCi/ml) en 500 µl de Tris 0.1M pH 7.4; 10 días después de la inyección se sacrificó a la rata y se procedió a la purificación del ARNr. Al contar la radiactividad en el ARNr extraído no se encontró marca, lo que indica que el resultado fue negativo, es decir, no hubo incorporación de uridina 5-³H.

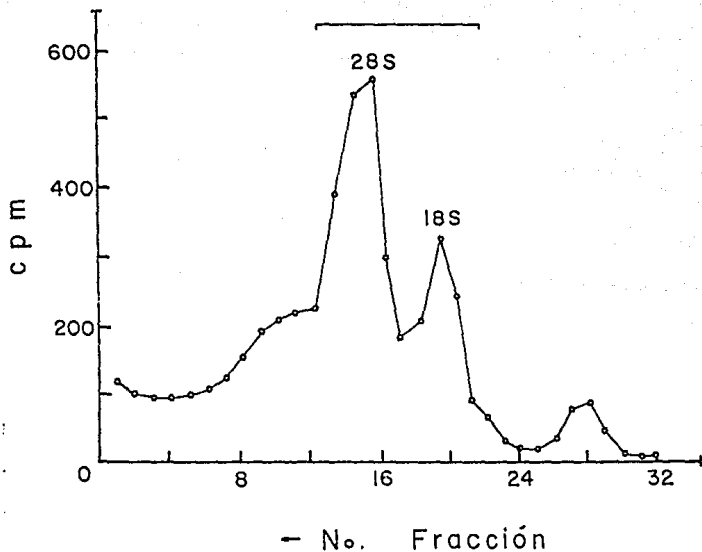


Figura 1.- Gradiente preparativo de 5-20% de sacarosa. La flecha indica la dirección de la sedimentación; el corchete horizontal indica el material usado para la hibridación, el cual comprende de las fracciones 12 a la 20. Las condiciones están descritas en los métodos.

Cuadro I.- Marcado del ácido ribonucléico ribosomal.

Isotopo	260/230	260/280	mg ARN totales	μg ARNr g tejido	Actividad especifica cpm/ μg
Uridina 5- ³ H	1.90	1.75	5.10	800	-
ATP- ³² P	2.20	1.82	6.50	810	120
Orotato- ³ H	2.30	1.80	7.80	816	920
Orotato- ³ H	1.98	1.87	4.88	976	2040
Orotato- ³ H	2.23	1.85	5.30	946	7950

Las relaciones de absorbencia corresponden a la relación típica espectrofotométrica. La recuperación del ARNr en todos los experimentos es similar y el ARNr marcado radiactivamente sólo se obtuvo con orotato -³H. En cambio, con uridina 5-³H y ATP-³²P no se encontró incorporación de la marca.

En el caso de adenosina 5' -trifosfato ³²P, se usaron 2 mCi en 1 ml de Tris 0.1M pH 7.4. Se inyectó intraperitonealmente y al día siguiente se sacrificó a la rata y se purificó el ARNr. La incorporación de este compuesto fue baja.

En otro experimento paralelo, el orotato-³H (2 mCi) se inyectó intraperitonealmente y al día siguiente se sacrificó la rata y se purificó el ARNr. La actividad específica obtenida fue mayor que en el caso anterior, pero aún fue poca incorporación de orotato -³H. Los resultados se muestran en el Cuadro I. Los dos últimos datos corresponden a ratas hepatectomizadas con un lóbulo de 1.9 g y 2.0 g respectivamente; 12 horas después de la operación se les inyectó orotato-³H; 24 horas después de la

inyección se procedió a la extracción y purificación del ARNr. Las actividades específicas obtenidas fueron mayores que las obtenidas en las condiciones anteriores. Para los experimentos de hibridación se decidió utilizar el ARNr (rotato-³H) con actividad específica de 7950 cpm/mg.

En el Cuadro I podemos ver la relación de absorbencias 260/230 y 260/280 nanómetros, estos valores corresponden a la relación típica espectrofotométrica esperada, ya que son indicativas del grado de pureza de los ácidos nucleicos con respecto al contenido de proteínas. Las cantidades totales de ARNr obtenidos expresada como µg ARNr/g tejido en los diferentes experimentos fue muy variable, sin embargo, las recuperaciones son similares en todas las purificaciones realizadas.

PURIFICACION DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO.- En el Cuadro II se muestran los datos que corresponden al ADN purificado del cerebro de ratas recién nacidas y de 3 meses de edad. Las relaciones de absorbencia 260/230 y 260/280 corresponden a la relación típica espectrofotométrica esperada, con excepción de dos valores en la relación 260/230 que se salen de dicho rango (de 1.61 y 1.76) y que corresponde a las muestras de 3 meses de edad, estos valores nos indican que las muestras no fueron totalmente desproteneizadas. Las cantidades totales de ADN son expresadas en mg. Los valores de recuperación de ADN son expresados en µg de ADN/g de tejido. En el Cuadro II se observan que son muy similares en las diferentes purificaciones, así como en ambas edades estudiadas.

Cuadro II.- Purificación de ADN de cerebro de rata.

Edad	260/230	260/280	mg ADN totales	µg ADN/g. de tejido
3 meses	1.61	1.56	46	1337
3 meses	1.76	1.71	42	1220
3 meses	2.30	1.78	40	1354
1 día	2.20	1.70	30	1420
1 día	2.50	1.87	34	1139
2.5 días	1.93	1.72	35	1122

Las purificaciones del ADN se hicieron de cerebros de rata recién nacida (1-3 días) y de 3 meses de edad. La relación 260/230 en las primeras purificaciones (3 meses) nos indica que el ADN contenía proteína. La recuperación del ADN expresada como µg ADN/g de tejido fue en 6.3% mayor en la rata de 3 meses de edad, aunque esta diferencia no es significativa.

HIBRIDACION CUANTITATIVA ADN-ARNr. Con el objeto de conocer la capacidad de retención del filtro Millipore HA MK.024.12, se variaron las concentraciones del ADN y los resultados encontrados se muestran en el Cuadro III.

Los resultados encontrados indican que el porcentaje de retención en el filtro es muy variable (30-80%) dependiendo de la cantidad de ADN añadido. Si se adicionan concentraciones de ADN de 40-100 µg, el porcentaje de retención varía de 60-80%, sin embargo, cuando se colocaron de 200-500 µg de ADN, el porcentaje disminuyó de 60 a 30%, que corresponde alrededor de 100 µg de ADN retenido.

Cuadro III.- Fijación de diferentes concentraciones de ADN sobre el filtro Millipore.

µg de ADN								
añadidos	40	60	80	100	200	300	400	500
µg de ADN								
retenidos	24	43	49	83	130	144	108	135
% retención								
de ADN	60	73	62	83	65	48	27	27

Las mediciones del ADN añadido como retenido en el filtro se hicieron empleando la técnica de Burton (86). Para los experimentos de hibridación ADN:ARNr se decidió usar 200 µg de ADN añadidos al filtro.

Una vez que el ADN se fijó al filtro Millipore la reacción de hibridación ADN-ARNr se llevó a cabo en la solución SSC 5X y formamida al 50% a 50°C con el fin de obtener un apareamiento con alta especificidad de bases (80%) y con una pérdida mínima del ADN fijado al filtro (89). Además, cuando el ADN se incubaba con un exceso de ARNr, la reacción se comporta asintóticamente al acercarse a valores aparentemente saturantes (90), ya que se alcanza una meseta a las 3,5 horas, por lo que se incubó durante 5 horas y así se obtuvo la máxima hibridación detectada a través de la marca radiactiva sobre el filtro.

Los resultados de las reacciones de hibridación ADN-ARNr de cerebro de rata de recién nacido y de tres meses de edad - - corresponden al promedio de tres experimentos (por duplicado cada uno de ellos). Para obtener la cantidad (μg) de ARNr hibridados se tomó la actividad de 7950 cpm/ μg y para calcular el % de ADN hibridado, se midió la cantidad de ADN retenido al filtro por el método de Burton (88) después de haber contado la radiactividad del ARNr hibridado. La relación μg ARNr hibridado/ μg ADN total \times 100 es igual al % de hibridación. Los resultados se muestran en el Cuadro IV.

Las fórmulas utilizadas para ajustar las rectas por mínimos cuadrados fue: $Y_i = AX_i + B$

y para desviación estandar:

$$\left(\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - (AX_i + B)]^2}{n} \right)^{1/2}$$

En la figura 2 se muestra la curva de hibridación ADN-ARNr obtenida hasta saturación del ADN con el ARNr de cerebro de rata recién nacida y de tres meses de edad. En ella se observa que a medida que se incrementa la concentración del ARNr se obtiene una meseta a 3 μg de ARN añadido. El valor de saturación puede estimarse visualmente; sin embargo, existen evidencias de que en las asociaciones ADN-ARN (91,92) su velocidad se limita por la frecuente colisión de secuencias complementarias del ADN.

Cuadro IV. Resultados de la reacción de hibridación ADN-ARNr de cerebro de rata recién nacida y 3 meses de edad, calculados por dobles recíprocas (93).

RECIEN NACIDA

μg ARNr añadidos	% hibridación	μg ARN % hibridación
0.1	0.005622 \pm 0.00075	18.5630 \pm 1.5376
0.25	0.009348 \pm 0.0012	26.5424 \pm 1.7985
0.50	0.01348 \pm 0.0016	39.8414 \pm 2.7336
0.75	0.0131422 \pm 0.00095	53.1406 \pm 2.6686
1.50	0.01670 \pm 0.00036	93.038 \pm 3.9746
3.00	0.01727 \pm 0.0006	172.8324 \pm 3.2931

3 MESES DE EDAD

0.1	0.005966 \pm 0.00088	18.232 \pm 3.0449
0.25	0.009956 \pm 0.001378	25.3055 \pm 3.0984
0.50	0.013246 \pm 0.0015	37.0946 \pm 3.5156
0.75	0.015286 \pm 0.0013	48.8838 \pm 3.8158
1.50	0.01820 \pm 0.0017	84.2513 \pm 4.7298
3.00	0.0193557 \pm 0.0009	154.9864 \pm 6.5976

Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos por duplicado. Para obtener el % de hibridación se tomó en cuenta los μg de ARNr incorporado / μg de ADN \times 100. Los datos de la tercera columna son el promedio de los 3 experimentos. El error es la desviación estandar ajustando las rectas por mínimos cuadrados.

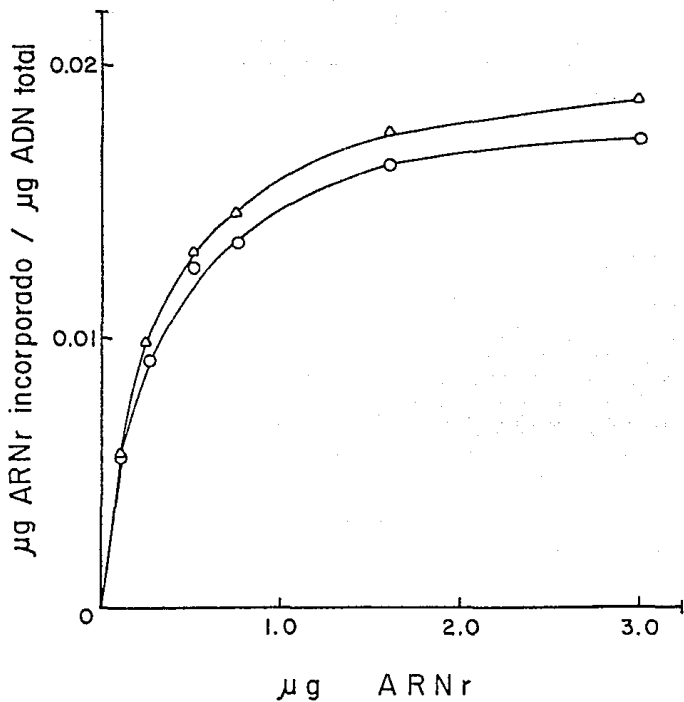


Figura 2.- Curvas de saturación de hibridación de ADN-ARN ribosomal de cerebro de rata. Curva de saturación de recién nacido (O). Curva de saturación de rata de 3 meses de edad (Δ).

Como el número de sitios del ADN complementario disminuye por la hibridación, la reacción se realiza de forma progresivamente más lenta, de tal forma que la hibridación es completa únicamente a tiempos infinitos o a concentraciones infinitas de ARNr. Además, cuando el ARNr contiene secuencias poco complejas (número total de pares de bases en secuencias no repetidas) las concentraciones de ADN y ARN para la hibridación pueden ser altas y el punto de saturación puede ser calculado de la curva y representa un valor de saturación exacto. Sin embargo, cuando el ARN contiene muchas secuencias repetidas, un acercamiento al valor de saturación es imposible debido a la forma asintótica de la curva y por la misma razón un cambio en la concentración del ARNr, puede cambiar la interpretación visual de la misma. Por tal motivo, Bishop (93) reportó un método alternativo para estimar el valor de hibridación ADN-ARNr a saturación, que consiste en graficar la reacción en forma de dobles recíprocas entre $1/\%$ hibridación contra $1/\text{ARNr}$, obteniéndose una línea recta en los cuales el valor de saturación se obtiene extrapolando a concentraciones infinitas de ARNr.

En la figura 3 se muestra la gráfica de saturación ADN-ARNr de cerebro de rata recién nacida y de tres meses de edad, en forma de dobles recíprocas y además realizando ajuste de las rectas por mínimos cuadrados. Así, la recta obtenida permite calcular en forma precisa, el punto de saturación a concentración infinita. El inverso de la pendiente de la recta corresponde al porcentaje de hibridación en saturación, obteniendo valores para

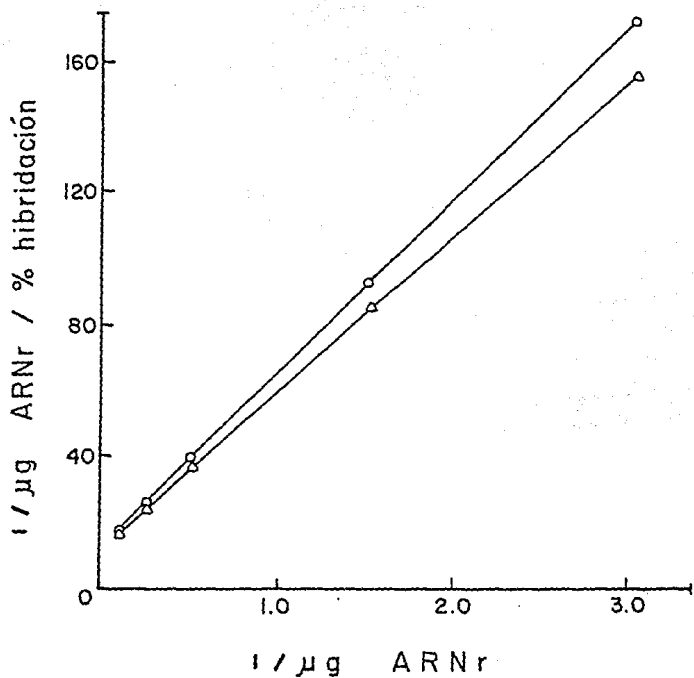


Figura 3.- Ajuste de las rectas por mínimos cuadrados de la curva de saturación de ADN-ARN ribosomal de cerebro de rata (91) - ADN purificado de recién nacido (O) y ADN purificado de 3 meses de edad (Δ).

recién nacido de $0.0185 \pm 0.00094\%$ de hibridación y de $0.020 \pm 0.0013\%$ para la rata de 3 meses de edad.

Para calcular el número de genes de ARNr por genoma haploide, se utilizó un peso molecular del genoma del 1.86×10^{12} (94) y un peso molecular combinado para las especies de ARN total ($28S+18S+7S+5S$) de 2.48×10^6 (95,96). Asumiendo el peso de un par de bases = 660, convertimos ambos pesos moleculares a pares de bases y realizamos las siguientes operaciones:

$$\frac{\text{p.b. del genoma total} \times \% \text{ hibridación}}{100} = \text{p.b. de ADNr}$$

100

$$\frac{\text{p.b. del ADN ribosomal}}{\text{p.b. del ARN ribosomal}} = \# \text{ de genes}$$

$$\text{p.b. del ARN ribosomal}$$

donde p.b. significa pares de bases, obteniéndose como resultado para la rata recién nacida 138 ± 8 genes y para la de 3 meses de edad de 149 ± 12 genes por genoma haploide. Cuantitativamente en cada experimento se obtiene un mayor número de genes por genoma en ratas de 3 meses de edad comparado con animales recién nacidos. Análisis de los datos por Student, obtenemos valores de 1.5×10^{-3} para rata recién nacida y de 1.97×10^{-3} para la de 3 meses de edad, indicándonos que no son significativos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se ha reportado que durante el desarrollo prenatal y hasta el envejecimiento corporal, los valores de los siguientes parámetros: velocidad de síntesis de proteínas, velocidad de síntesis de ARN y actividad de los factores de elongación durante el desarrollo de la rata (específicamente del cerebro), disminuyen drásticamente hacia los primeros 30 días de edad y posteriormente disminuyen paulatinamente hasta la muerte del organismo (54,57,60).

Con el conocimiento de que el ARNr presenta un papel central en la síntesis de proteínas y de que ésto es de vital importancia para la subsistencia de cualquier organismo, se considera importante determinar si existe alguna relación entre el envejecimiento y el número promedio de genes ribosomales en mamíferos (cerebro de rata). Cualquier diferencia en la cantidad de estos genes podría reflejar una posible relación entre ARNr y envejecimiento celular y corporal.

Existen algunas controversias en cuanto a la determinación del número de genes ribosomales, ya que distintos investigadores reportan diferentes valores para el mismo organismo. Birnsteil y col. (96) comentan en su revisión que algunas de estas discrepancias quizá se expliquen por diferencias en los métodos de hibridación utilizados, aunque es más probable que se deba a contaminación en las preparaciones de ARNr con ribonucleótidos de bajo peso molecular, que se encuentran en abundancia e hibridan

en forma muy eficiente con el ADNr.

En relación a este problema, en este trabajo se debe mencionar que la manera como se purificaron las especies ribosomales mayores provenientes de un precipitado polisomal secundario a un sobrenadante libre de núcleos el cual posteriormente se pasó por un gradiente de sacarosa, suprime la posibilidad de una contaminación con ARNr 7S y 5S ya que estas especies pequeñas sedimentan muy separadas de las especies mayores de ARNr. Seguramente que nuestra preparación de ARN (28S y 18S) está contaminada con algo de ARN mensajero ya que son de peso molecular variable, pero esta contaminación se puede considerar despreciable para fines de cuantificación de los genes ribosomales debido a que se encuentran en baja concentración (1-2%), que están codificados por genes únicos y por su elevada complejidad. Para precisar con números esta afirmación, supongamos hipotéticamente una contaminación con la totalidad de mensajeros de la célula.

$$\text{ARN total} = \text{ARNr } 80\% + \text{ARN } 7\text{S y } 5\text{S } 20\% + \text{ARNm } 1\text{-}2\%.$$

En un precipitado polisomal el ARNr aumentaría casi al 100% y con esta base el mensajero se enriquecería de un 2% a un 3%. Dado que el ARNm está codificado por secuencias únicas, la cuantificación de genes ribosomales, estimada en esta situación, habría que corregirla por la cantidad de 3-4 genes mensajeros.

En cuanto al método de extracción y purificación del ADN empleado, éste fue el de Marmur (86) por ser útil para reducir al mínimo la pérdida o ganancia selectiva de secuencias del ADN, así como para garantizar la eliminación de proteínas contaminantes

que pudieran interferir en la hibridación. Además, valores de las relaciones 260/230 y 260/280, nos indican el grado de pureza y los resultados obtenidos en relación a contaminantes proteicos corresponden a una relación típica espectrofotométrica de alta pureza.

Por otra parte, generalmente el marcaje del ARNr en experimentos in vivo en el animal completo constituye un problema debido a la baja eficiencia de incorporación de la marca. Cuando se utilizó uridina 5-³H como marcador, los resultados fueron negativos. Estos resultados podrían explicarse debido a que la rata se sacrificó 10 días después de la inyección, y que es importante considerar que la vida media del ARNr es de 4.125 días. Por ende, este tiempo habría sido suficiente para dos recambios del ARNr y así la eliminación de la marca.

Al marcar con ATP-³²P, se obtuvo una actividad específica baja, debido probablemente a que se inyectó poca radiactividad y también porque el ATP no sólo es intermediario de la biosíntesis de ácidos nucleicos, sino también de otras vías metabólicas.

Sólo cuando se usó orotato-³H y además en condiciones de hepatectomía parcial del animal con el fin de aumentar la incorporación de marcaje, fue posible obtener un ARNr con una alta actividad específica para llevar a cabo los experimentos de hibridación.

Un problema frecuentemente mencionado en experimentos de hibridación ADN-ARN es obtener ya sea ADN o ARN con radiactividad específica suficientemente alta. Esta alta especificidad es par-

ticularmente difícil de alcanzar en experimentos in vivo usando al animal completo debido a la baja eficiencia de incorporación de la marca. Sin embargo, debe mencionarse que entre sus principales ventajas se tiene que es un método rápido, simple y, principalmente, muy económico.

Aunque el marcaje también puede hacerse in vitro, ya sea por síntesis enzimática del ADN o del ARN con sus respectivas polimerasas y en presencia de nucleótidos marcados, se han encontrado algunas desventajas como son la disponibilidad de enzimas y moldes altamente puros, dando como resultado baja fidelidad de copias no uniformes (97). Otro método consiste en marcar a los ácidos nucleicos directamente por modificaciones químicas como halogenaciones, fotoreducción y alquilación. Los principales problemas son que el marcador no se introduce al azar, sino que reacciona exclusivamente con citosina, son poco estables, se pega excesiva marca no específica al filtro y hay baja actividad específica (98). De acuerdo con estos antecedentes de marcaje radiactivo de ADN o ARNr in vitro, preferimos usar el método de marcaje in vivo usando el animal completo.

Por lo que se refiere a la hibridación, el ADN desnaturalizado se inmovilizó sobre el filtro para evitar su renaturalización e impedir una disminución en la hibridación ADN-ARNr. Se ha reportado (89) que las condiciones de hibridación utilizadas dan menos del 0.8% de reacción cruzada y además, los filtros fueron sometidos a lavados exhaustivos. Es por ésto que se tiene la seguridad que el híbrido formado y retenido haya sido

específico para el ARNr y es por ello, que el híbrido formado no fue analizado.

Otro factor que debe considerarse como posible explicación a las discrepancias mencionadas en cuanto al número de genes de ARNr es la forma numérica como se manejan las curvas de hibridación a saturación. Cuando el ADN se incubaba con un exceso de ARNr, la reacción se comporta asintóticamente al acercarse a valores aparentemente saturantes (93,99); ésto significa que si bien se aproxima al valor de saturación, nunca se alcanza. Para solucionar este problema se recomienda graficar la función en términos recíprocos (100), pues la recta así obtenida permite calcular en forma precisa, el punto de saturación a concentración infinita.

El número de genes obtenidos en este trabajo por el método de dobles recíprocas fue de 138 ± 8 para cerebro de rata recién nacida y de 149 ± 12 para la de 3 meses de edad. Estos resultados indican que no existen diferencias significativas en estos dos estados de desarrollo. Si comparamos el número de genes obtenidos en este trabajo con lo reportado por otros autores, nuestros resultados concuerdan con los de algunos investigadores, ya que aunque no los cuantificaron en función de la edad, sí los midieron en diferentes tejidos post-mitóticos de rata y ratón (100,101). Los valores oscilaron entre 142-163 genes ribosomales. Estudios realizados por Gaubatz y col (90) en hígado y cerebro de ratón (35-49 días), por ejemplo, reportan 114 genes para cerebro y 84 genes para hígado, pero cuando cuantificaron en ratón de

710-188 días los genes ribosomales tanto para hígado como para cerebro su resultado fue de 114 genes, es decir, no encuentran diferencias en la cantidad de genes ribosomales en función de la edad. Lo mismo sucede para hígado y cerebro humano de individuos que variaban de 2.5 meses a 70 años de edad. Los datos indican que no hay diferencias significativas en la cantidad de genes ribosomales en función de sexo, tejido y edad, reportándose como promedio 185 genes (90).

Sin embargo, nuestros resultados y los mencionados anteriormente están en desacuerdo con las observaciones reportadas por Johnson y col. (81,82), quienes señalan que en corazón, músculo esquelético y cerebro del perro Beagle y en músculo cardiaco humano (83) cuyas edades variaban de 3 meses a 76 años, los genes ribosomales presentan una disminución en el porcentaje de hibridación durante el envejecimiento, siendo este porcentaje 7 veces mayor en el músculo cardiaco del perro que en el miocardio humano, señalando una correlación proporcional en la edad de ambas especies en condiciones óptimas. Esta discrepancia podría ser debida a la especie de mamífero o al tipo de tejido estudiado o bien a los diferentes métodos usados en la preparación del ADN y a las técnicas de hibridación o a todos los factores mencionados. Ellos reportan tanto para tejido de perro Beagle como para humano un alto porcentaje de hibridación, valores que sugieren que el híbrido formado no es específico para ARNr, ya que se conoce que el ARN al hibridar con ADN es extremadamente sensible a pequeños residuos de proteínas adheridas al ADN, los cuales se incrementan

en función de la edad (102,103), y a contaminantes de ARN de bajo peso molecular.

El hecho de que el descenso de la síntesis de proteínas en cerebro de rata empieza desde el periodo prenatal, podría no tener importancia; sin embargo, nos plantea una paradoja: 1) cualquier sistema celular que disminuya su síntesis de proteínas, empieza también a disminuir su proliferación y consecuentemente también inicia su envejecimiento (104); 2) la velocidad de síntesis de proteínas en cerebro de rata empieza a disminuir desde el periodo prenatal y alcanza lentamente valores asintóticos hacia los 30 días (54). Por otro lado, a esta edad la rata se encuentra en el inicio del desarrollo pleno de su vida. Esto nos conduce a dos importantes consideraciones: al concepto del tiempo de envejecimiento y los estadios ontogénicos en los que los probables mecanismos del envejecimiento empiezan a operar. El envejecimiento ha sido definido como los cambios que ocurren después que el individuo alcanza la edad madura (1). Siguiendo este concepto, se ha afirmado que los cambios que se manifiestan antes de la madurez, no deben ser considerados como parte del envejecimiento sino como maduración del individuo. Cuando uno observa al individuo joven, al adulto y al viejo, este concepto parece ser muy aceptable. Sin embargo, la diferenciación celular nos ha enseñado que los caracteres diferenciativos (una proteína o una función) aparecen como resultado de una larga serie de eventos regulatorios que empiezan con gran anterioridad a la manifestación de los caracteres diferenciativos (105). Es más, la

diferenciación manifiesta, constituye la última etapa de la historia celular y una célula diferenciada, en condiciones naturales, es prácticamente una célula muerta desde el punto de vista de proliferación celular.

La autoenucleación de eritrocitos expone de manera muy obvia esta conducta celular. Si la característica biológica fundamental es la reproducción, un individuo que alcanza la madurez sexual es un individuo indispensable desde el punto de vista biológico poblacional, puesto que la población ya ha elaborado un individuo capaz de reproducirse. Las neuronas y los miocitos parecen distinguirse de otras células diferenciadas por su característica de permanecer funcionales durante un largo periodo en el estado diferenciado; sin embargo, lo anterior no debe interpretarse erróneamente en lo que se refiere a cuándo una célula y por extensión un organismo, ha escogido caminos alternativos como son la diferenciación o la multiplicación.

En función de lo anterior, si un cambio aparece en el individuo joven o aún prenatalmente y continúa en el adulto y en el senil, no es razonable excluirlo de entre los posibles mecanismos de envejecimiento. La velocidad de la síntesis de proteínas en cerebro disminuyen exponencialmente desde el desarrollo embrionario tardío hasta la senectud y se hace asintótica alrededor de la madurez. Esta curva va en forma paralela a la de la velocidad de crecimiento en mamíferos, la cual presenta el valor máximo hacia la mitad del desarrollo intrauterino (105). En cultivos celulares bajo condiciones normales, existe una disminución en la prolifera-

ración celular dependiente de la edad. Este decaimiento ha sido bien documentado (17,18). Si estos procesos suceden en las células constituyentes de un organismo, el recambio celular se suspenderá y la existencia del organismo dependerá totalmente del tiempo de sobrevivencia de sus células en diferenciación final. Basados en estas consideraciones se podría pensar que existen mecanismos celulares probablemente dentro de un programa epigenético (estados fenotípicos que son producidos por cambios en la expresión genética durante el desarrollo) que controlan la velocidad del envejecimiento, es decir, el organismo desaparece porque tiene un programa de autodestrucción de la misma manera que posee otros de crecimiento, de morfogénesis y de diferenciación y de esta manera no necesita cambiar el número de genes ribosomales del cerebro de la rata durante toda su vida.

REFERENCIAS

- 1.- Comfort, A., The Biology of senescence. Churchill, - Livingtone, Edinburgh. 1979.
- 2.- Rockstein, M., Chesky, J.A. y Sussman, M.L., Comparative - biology and evolution of aging. Handbook of the biology of Aging. (Finch, C.E., and Hayflick, L. Eds). Vand Nostrand Reinhold Co. New York. 1977.
- 3.- Shock, N.W., Ageing of homeostatic mechanisms, in Cowdry's Problems of Ageing, 3rd. ed. Lansing A.I., Ed. Williams and Williams, Baltimore, 1952.
- 4.- Rossman, I., Anatomic y body composition changes with aging. Handbook of the Biology of Aging. Finch, C.E. and Hayflick, L., Eds., Reinhold, New York, 1977.
- 5.- Finch, C.E. y Hayflick, L. Eds., Handbook of the Biology of Aging. Van Nostrand Reinhold, New York. 1977.
- 6.- Buetow, D.E., Cellular content and cellular proliferation changes in the tissue and organs of the aging mammal, in Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body, Camerón C.L. and Thrasher, J.D. Ed. Academic Press, New York. 1971.
- 7.- Camerón, I.L. y Thrasher, J.D., Cell renewal and cell loss the tissues of mammals. Interdisciplinary Top. Gerontol. 10, 108, 1976.
- 8.- Norris, A.H., Lundy, T. y Shock, N.W., Trends in Selected indices of body composition in men between the ages of 30 and 80 years. Ann. N.Y. Acad. Sci. 110:623, 1963.
- 9.- Strhler, B.L., Time, Cells and Aging, 2nd ed. Academic Press, New York. 1977.
- 10.- Hadorm, E., Dynamics of determination. Symp. Soc. Dev. Biol. 21:85, 1966.
- 11.- Cairns, A. y Constantinides, P., Mast cells in human atherosclerosis. Sciences, 120:31, 1954.
- 12.- Gardner, E., Decrease in human neurons with age. Anta. Rec. 77, 529, 1940. Citada en (5).
- 13.- Gutmann, E. y Hanzliková, V., Motor unit in old age. Nature (London) 209:921, 1966.

- 14.- Minot, C.S., The problem of age, growth and death, Pop. Sci. Mon. 193, 1907. Citada en (2).
- 15.- Carrel, A., On the permanent life of tissue outside of the organism. J. Exp. Med., 15:516, 1912. Citada en (5).
- 16.- Swim, H.E. y Parker, R.F., Culture characteristics of human fibroblast propagated serially. Am. J. Hyg. 66:235, 1957.
- 17.- Hayflick, L. y Moorhead, P.S., The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 25:585, 1961.
- 18.- Hayflick, L., The cellular basis for biological aging in Handbook of the Biology of aging. Finch, C.E. and Hayflick, L. Eds. Van N.R. Cincinnati, 1977.
- 19.- Martín, G.M., Sprague, C.A. y Epstein, C.J., Replicative life-span of cultivated human cells, Lab. Invest. 23:86, 1970.
- 20.- Shneider, E.L. y Mitsui, Y., The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73:3584, 1976.
- 21.- Goldstein, S., Littlefield, S. y Soeldner, J.S., Diabetes Mellitus and aging: diminished plating efficiency of cultured human fibroblast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 65:155, 1969.
- 22.- Vracko, R. y Beneditt, E.P., Restricted replicative life span of diabetic fibroblast in vitro: its relations to microangiopathy. Fed. Proc., 34:68, 1975.
- 23.- Vracko, R. y McForland, B.H., Lifespans of diabetic and non-diabetic fibroblast in vitro. Exp. Cell Res., 129:345, 1980.
- 24.- Schneider, E.L. y Epstein, C.J., Replication rate and lifespan of culture fibroblast in Down's syndrome. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141:1092, 1972.
- 25.- Tice, R.R. y Schneider, E.L., In vitro aspects of human genetic disorders which feature accelerated aging, Interdisc. Top. Gerontol., 9:60, 1976.
- 26.- Yanisheusky, R., Mendelsohn, M.L., Mayall, B.H. y Cristofalo, V.J., Proliferative capacity and DNA content of aging human diploid cells in culture: A cytophotometric and autoradiographic analysis, J. Cell Physiol., 84:165, 1974.
- 27.- Hayflick, L., The cell biology of human aging. Scientific American. 242:58, 1980.

- 28.- Cameron, I.L. y Thrasher, J.D., Cell renewal and cell loss in tissues of aging mammals. Interdiscipl. Top. Gerontol. 10:108, 1976.
- 29.- Sacher, G.A., 9th Int. Congr. Gerontol, Symposia Reports, 2: 374, 1972.
- 30.- Buetow, D.E., Cellular content and cellular proliferation changes in the tissue and organs of the aging mammal, in Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian body. Cameron, I.L. and Thrasher, J.D. Ed. Acad. Press New York, 1971.
- 31.- Daniel, G.W., Cell longevity in vivo, in Handbook of the Biology of Aging Finch, C.E. and Hayflick, L. Eds. Van Nostrand Reinhold, Cincinnati, 1977.
- 32.- Krohn, P.L., Review lectures on senescence. II. Heterochronic transplantation in the study of aging. Proc. R. Soc. ser. B. 157:128, 1962.
- 33.- Hayflick, L., Progress in cytoogerontology. Mech, Ageing Dev. 9:353, 1979.
- 34.- Ellis, R.S., Norms for some structural changes in the human cerebellum from birth to old age. J. Comp. Neurol. 32:1, 1970.
- 35.- Soukupová, M., Holecková, E. y Hneukovsky, P., Changes of the latent period of explanted Tissue during Ontogenesis. Aging in Cell and Tissue Culture. Edit. F. Holecková, V.J. Cristofalo, New York. Plenum Press, 1970.
- 36.- Walford, R.L., The Immunologic theory of Aging. Copenhagen, Ejnør Munksga ad. 1970.
- 37.- Good, P.I., Aging in mammalian cell populations-a review. Mech Ageing Dev. 4:239, 1975.
- 38.- Shock, N.W., Systems integration in Handbook of the Biology of Aging. Finch, C.E. and C.E. and Hayflick, L. Eds. Van Nostrand Reinhold, New York. 1977.
- 39.- Lansing, A.I., General biology of senescence. Handbook of aging and the individual: Psychological and biological aspects. Ed. Birren. Chicago. University of Chicago Press, 1959.
- 40.- Medvedev, Z.H., Protein Biosynthesis and Problems of - Heredity, Development and Ageing. New York. Plenum Press, 1959.

- 41.- Orgel, L.E., The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 49:517-521, 1963.
- 42.- Hart, R.W. y Setlow, R.B., Correlation between DNA excision-repair and life-span in a number of mammalian species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71:2169-2173, 1974.
- 43.- Hart, R.W. y Turturro, A., Evolution of life span in placental mammals. In moder biological theories of aging. Edited H.R. Warner. Raven Press, New York. 1987.
- 44.- Medvedev, Z.H., Exptl. Gerontol. 7:227, 1972.
- 45.- Saunders, J.W., In: Topics in the biology of aging. Ed. Krohn. New York: Interscience. 1966.
- 46.- Smith, J.R., Spiering, A.L. y Pereira-Smith, P.M., Is cellular senescence genetically programmed? Basic Life Sci. 42:283-294, 1986.
- 47.- Hayflick, L., Current theories of biological aging. Federation Proc. 34:9-13, 1975.
- 48.- Lehninger, A.L., Bioquímica 2^a edición. Ed. Omega. 1978.
- 49.- Haselkorn, R. y Rothman-Denes, L.B., Protein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 4:397-438, 1975.
- 50.- Schatz, G. y Mason, T.L., The biosynthesis of mitochondrial proteins. Ann. Rev. Biochem., 43:51-81, 1974.
- 51.- Makrides, S.C., Protein synthesis and degradation during aging and senescence. Biol. Rev. 58:343-422, 1983.
- 52.- Gilbert, B.E., Ribosomal activity in prenatal mouse brain. J. Neurochem. 31:171-176, 1978.
- 53.- Johnson, T.C. y Belytschko, G., Alteration in microsomal protein synthesis during early development of mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 62:844-851, 1969.
- 54.- Gilbert, B.E., Regulation of prenatal and postnatal protein synthesis in mouse brain. J. Neurochem. 35:176-182, 1980.
- 55.- Lerner, M.P. y Johnson, T.C., Regulation of protein synthesis in developing mouse brain tissue: *In vitro* binding of template RNA to brain ribosomes. J. Neurochem. 18:193-201, 1971.

- 56.- Johnson, T.C., Physical-chemical properties of mammalian brain ribosomes during neural development. Text. Rep. Biol. Med. 31:331-344, 1973.
- 57.- Castañeda, M., Vargas, R. y Galván, S., Stagewise decline in the activity of brain protein synthesis factors and relationships between this decline and longevity in two rodent species. Mech. Ageing Dev. 36:197-210, 1986.
- 58.- Egilmez, N.K. y Rothstein, M., The effect of aging on cell-free protein synthesis in the free-living nematode Tubatrix aceti. Biochem. Biophys. Acta, 840:355-363, 1985.
- 59.- Rockstein, M., Development and aging in the nervous system. Academic Press, Inc. New York, 1973.
- 60.- Murthy, M.R. y Rappoport, D.A., Biochemistry of the developing rat brain. V. Cell-free incorporation of L-(1-¹⁴C)-leucine into microsomal protein. Biochimica et Biophysica Acta, 95:121-131, 1965.
- 61.- Yamagami, S., Fritz, R. y Rappoport, D.A., Biochemistry of the developing rat brain. VII. Changes in the ribosomal system and nuclear RNAs. Biochem. Biophys. Acta, 129:532-547, 1966.
- 62.- Andrews, T.M. y Tata, J.R., Protein synthesis by membrane-bound and free ribosomes of the developing rat cerebral cortex. Biochem. J. 124:883-889, 1971.
- 63.- Barra, H.S., Rodriguez, J.A., Arce, C.A. y Caputto, R., A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (¹⁴C) arginine by a ribonuclease-sensitive and (¹⁴C) tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. J. of Neurochem. 20:97-108, 1973.
- 64.- Lerner, M.P. y Johnson, T.C., Regulation of protein synthesis in developing mouse brain tissue: *in vitro* binding of template RNA to brain ribosomes. J. of Neurochem. 18:193-201, 1971.
- 65.- Dwyer, B.E., Fando, J.L. y Wasterlain, C.G., Rat brain protein synthesis declines during post-developmental aging, J. of Neurochem. 35:746-749, 1980.
- 66.- Chen, J.J., Brot, N. y Weissbach, H., RNA and protein synthesis in cultured human fibroblast derived from donors of various ages. Mech. Ageing Dev. 13:285-295, 1980.
- 67.- Richardson, A., Birchenall-Sparks, M.C. y Staecker, J.L., Aging and transcription. In review of biological research in aging. Vol. 1. M. Rothstein. A.R. Liss, New York, 1983.

- 68.- Perry, R.P. y Kelley, D.E., Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes. *J. Mol. Biol.* 35:37-60, 1968.
- 69.- Donald, D.B. e Igor, D., Specific gene amplification in oocytes. *Science*, 160:272-279, 1968.
- 70.- Ritossa, F.M., Malva, C., Boicinelli, E., Graziani, H. y Polito, L., The first step in the magnification of DNA complementary to ribosomal RNA in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 68:1580-1584, 1971.
- 71.- Vincent, W.S., Halverson, H.O., Chen, H.R. y Shin, D., Ribosomal RNA cistrons in single and multinucleolate oocytes, *Biol. Bull.*, 133:441, 1968.
- 72.- Chen, D. y Osborn, D.J., Ribosomal genes and DNA replication in germinating wheat embryos. *Nature*, 355:336-364, 1970.
- 73.- Collins, J., Applications of Ribosomal acid Cistrons in the Regenerating lens of *Triturus*. *Biochemistry*, 11:1259-1263. 1972.
- 74.- Henning, W. y Meer, B., Reduced polyteny of rRNA cistrons in giant chromosomes of *D. hydei*, *Nat. New Biology*, 233:70-72, 1971.
- 75.- Ritossa, F.M., Atwood, K.C. y Spiegelman, S., A molecular explanation of the bobbed mutants of *Drosophila* as partial deficiencies of rDNA, *Genetics*, 54:819-834, 1966.
- 76.- Miller, L. and Knowland, J., Reduction of rRNA synthesis and rRNA genes in a mutant of *X. laevis* which organizes only a partial nucleolus. II. The number of rRNA genes in animals of different nucleolar types. *J. Mol. Biol.* 51:329-338, 1970.
- 77.- Ritossa, F.M., Atwood, K.C., Lindsley, D. y Spiegelman, S., On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA, *Proc. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 23:449-474, 1966.
- 78.- Grove, D., Nair, K.G. y Zak, R., Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. III Chances in DNA content, the relative contribution of polyploidy and mitotic activity, *Cir. Res.*, 25:463-472, 1969.
- 79.- Timmis, J.N. e Ingle, J., Environmentally Induced changes in rRNA gene redundancy. *Natl. New. Biol.*, 244:235-236, 1973.

- 80.- Miller, L. y Knowland, J., The number and activity of rRNA genes in Xenopus laevis carrying partial deletions in both nucleolar organizers. Biochem. Genet., 6:65-73, 1972.
- 81.- Johnson, R. y Strehler, B.L., Loss of genes coding for rRNA in aging brain cells. Nature, 240:412-414, 1972.
- 82.- Johnson, R., Chrisp, C. y Strehler, B.L., Selective loss of rRNA genes during the aging of post-mitotic tissues. Mech. Ageing. Dev., 1:183-198, 1972.
- 83.- Johnson, L.K., Johnson, R.W. y Strehler, B.L., Cardiac hypertrophy, aging and changes in cardiac rRNA gene dosage in man. J. Mol. Cell. Cardiol., 7:125-133, 1975.
- 84.- Strehler, B.L., Chang, M. y Johnson, L.K., Loss of hybridizable rDNA from human post-mitotic tissue during aging: I-age-dependent loss in human Myocardium II-Age-dependent loss in human cerebral cortex-hippocampal and somato sensory cortex comparision. Mech. Ageing Dev., 11:371-382, 1979.
- 85.- Moldave, K., Preparation of RNA from mammalian ribosomes. Methods Enzymol. 12:607-608, 1968.
- 86.- Marmur, J.A., Procedure for the isolation of Deoxyribonucleic acid from Micro-organisms. J. Mol. Biol., 3:208-218, 1961.
- 87.- Gillespie, D. y Spiegelman, S., A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a Membrane. J. Mol. Biol., 12:829-842, 1965.
- 88.- Burton, K., A study of the conditions and mechanisms of the Diphenylamine reactions for the colorimetric estimation of Deoxyribonucleic Acid. Biochem. J., 62:315-323, 1956.
- 89.- McConaughy, B., Laird, C. y McCarthy, B.J., Nucleic Acid reassociation in formamide. Biochemistry, 8:3289-3295, 1969.
- 90.- Gaubatz, J., Prashad, W. y Cutler, P.G., Ribosomal RNA gene dosage as a function of tissue and age for mouse and human. Biochem. Bioph. Acta, 418:358-375, 1976.
- 91.- Gillespie, D. y Spiegelman, S., A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J. Mol. Biol., 12:829-842, 1965.
- 92.- Birnstiel, M.L., Sells, B.H. y Purdom, I.F., Kinetic complexity of RNA molecules. J. Mol. Biol., 63:21-39, 1972.

- 93.- Bishop, J.O., Robertson, F.W., Burns, J.A. y Melli, M.L., Methods for the analysis of Deoxyribonucleic Acid-Ribonucleic Acid Hybridization data. *Biochem. J.*, 115:361-370, 1969.
- 94.- Laird, C., Chromatid structure: relationship between DNA content and nucleotide sequence diversity. *Chromosoma*, 32:378-406, 1971.
- 95.- Attardi, G. y Amaldi, F., Structure and synthesis of Ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 39:183-226, 1970.
- 96.- Birnsteil, M.L., Chipchase, M. y Speirs, J., The ribosomal RNA cistrons en *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 11:351-389, 1971.
- 97.- Melli, M. y Pemberton, R., *Nature (London) New Biol.* 236:172, 1972.
- 98.- Gaubatz, J. y Cutler, R.G., Hybridization of Ribosomal RNA labeled to high specific radioactivity with dimethyl sulfate. *Biochemistry*, 14:760-765, 1975.
- 99.- Bishop, J.O., Robertson, F.W., Burns, J. y Melli, M., Methods for the analysis of Deoxyribonucleic Acid-Ribonucleic Acid Hybridization data. *Biochem J.*, 115:361-370, 1969.
100. Weinberg, R.A. y Penman, S., Processing of 45 S nucleolar RNA., *J. Mol. Biol.*, 47:169-178, 1970.
101. Stevenin, J., Semeé, J., Jacob, M. y Mandel, P., Determination de la fraction du Genome Codant pour les RNA ribosomiques et messagers dans le cerveau du Rat adulte. *J. Mol. Biol.*, 33:777-795, 1968.
102. Smith, K.C., *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acid*. Ed. Wang, SY. Academic Press. New York. 1975.
103. Cutler, R.G., Protein and other adducts to DNA: their significance to aging, carcinogenesis and radiation biology. Ed. Smith, K.C. Plenum Press, New York. 1975.
104. Gilbert, B.E. y Johnson, T.T., Fetal development: the effects of maturation on in vitro protein synthesis by mouse brain tissue. *J. Neurochem.* 23:811-818, 1974.
105. Sinclair, D., *Human growth after birth*. Oxford University Press, London. 1978.