

Creixement i fenotip enzimàtic dels illots hiperplàsics induïts al fetge de rata per administració de dietilnitrosamina.

M.D.Estadella, M.J.Pujol, J.Serratosa, E.Rius i J.Domingo

Departament d'Histologia i Biologia Cel.lular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona-36

Introducció

El desenvolupament de focus microscòpics d'hepatòcits amb fenotips enzimàtics alterats durant la carcinogènesi hepàtica i la probable implicació d'aquests focus en l'origen de tumors hepàtics, ha estat descrit per diferents autors en els darrers anys. Emmelot, Scherer (1980).

Els assatjos bioquímics i histoquímics durant la carcinogènesi química en el fetge de rata, indiquen la pèrdua de varies activitats enzimàtiques pròpies de l'adult, així com la reexpressió d'activitats enzimàtiques fetals als focus hiperplàsics, nòduls i als hepatomes. Sato et al. (1981). La pèrdua d'activitat glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) i adenosín-trifosfatasa canalicular (ATPasa) així com l'adquisició d'activitat gamma-glutamyl-transpeptidasa, han estat descrites com alteracions simples o bé combinades. Pugh, Goldfarb (1978).

Degut que en el nostre estudi administrem una sola dosi de carcinògen, possiblement en els clons, les cèl.lules modificades estan sincronitzades en el procés d'iniciació, per tant el tamany dels illots en un moment determinat es pot relacionar directament amb la seva velocitat de creixement. Els assatjos histoquímics que hem realitzat inclouen els enzims: G6Pasa, ATPasa i 5'nucleotidasa. Hem determinat el fenotip enzimàtic dels diferents illots deficients i els hem caracteritzat morfomètricament.

Material i Mètodes

Es varen utilitzar rates mascles Sprague-Dawley d'aproximadament 200g. de pes. La pauta d'inducció carcinogènica que es va seguir esta basada en la descrita per Pitot et al. (1978) i va ésser la següent: hepatectomia parcial i a les 24 hores injecció per via intraperitoneal de 40 mg/kg de dietilnitrosamina. Vuit setmanes després administració continua de fenobarbital al 0,05% a l'aigua de beguda durant 35 setmanes. Els animals varen rebre 6 injeccions de 0,5 μ Ci/g de timidina tritiada a intervals de 30 minuts, 48 hores abans de ser sacrificats. Unes mostres del fetge varen ser congelades amb isopentà i nitrogen líquid i unes altres varen ser incloses en parafina per tal d'estudiar l'índex S.

Els enzims estudiats varen ser: G6Pasa segons el mètode de Wachstein i Meisel (1956), ATPasa i 5'nucleotidasa, Wachstein i Meisel (1957). Les preparacions histoquímiques per cadascun dels tres enzims varen ser fetes sobre grups de tres talls seriatos de 5μ , realitzats a diferents nivells del fetge congelat. De cada preparació histoquímica es va fer una ampliació fotogràfica i sobre aquestes ampliacions es varen dibuixar els illots amb deficiència enzimàtica. La superposició de les tres fotografies de cada nivell, corresponents a les tres tincions histoquímiques ens va permetre classificar el fenotip de cada illot segons la combinació de deficiències enzimàtiques.

Per cada fenotip enzimàtic varem mesurar els següents paràmetres: fracció volumètrica dels illots enzim-deficients, nombre d'illots enzim-deficients per cm^2 de fetge, tamany mig dels illots, distribució de freqüències dels diferents fenotips i percentatge d'illots que tenen una secció més gran de $0,1 \text{ mm}^2$. Per a calcular aquests paràmetres, la superfície de les seccions dels illots i del teixit estudiat varen ser mesurades amb un analitzador d'imatges Kontron MOP 20 i es varen aplicar els mètodes morfomètrics usuals. Weibel (1966). (Veure figures 1 i 2).

En els talls estudiats per autorradiografia es va mesurar l'index S a l'interior dels illots hiperplàsics i al teixit normal.

Resultats

L'estudi s'ha realitzat sobre 8 rates. La superfície total de fetge estudiada fou de $3.115,11 \text{ mm}^2$ i el nombre total d'illots trobats de 1.746.

Taula I : Fracció volumètrica ocupada pels illots. Tamany mig dels illots. Percentatge d'illots que tenen una secció més gran de $0,1 \text{ mm}^2$.

Fenotip G A 5	Fracció vol. (%)	Tamany mig (mm^2)	% d'illots > $0,1 \text{ mm}^2$
- + +	$0,93 \pm 0,42$	$0,06 \pm 0,03$	13,86
+ - +	$0,71 \pm 0,31$	$0,06 \pm 0,02$	15,55
+ + -	$0,54 \pm 0,20$	$0,07 \pm 0,03$	20,00
- - +	$0,56 \pm 0,32$	$0,10 \pm 0,05$	33,51
- + -	$0,17 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,04$	40,00
+ - -	$0,22 \pm 0,24$	$0,06 \pm 0,03$	17,86
- - -	$1,64 \pm 1,72$	$0,32 \pm 0,34$	53,23

G = glucosa-6-fosfatasa, A = adenosín trifosfatasa i 5 = 5'nucleotidasa
(+) activitat enzimàtica normal, (-) activitat enzimàtica deficient.

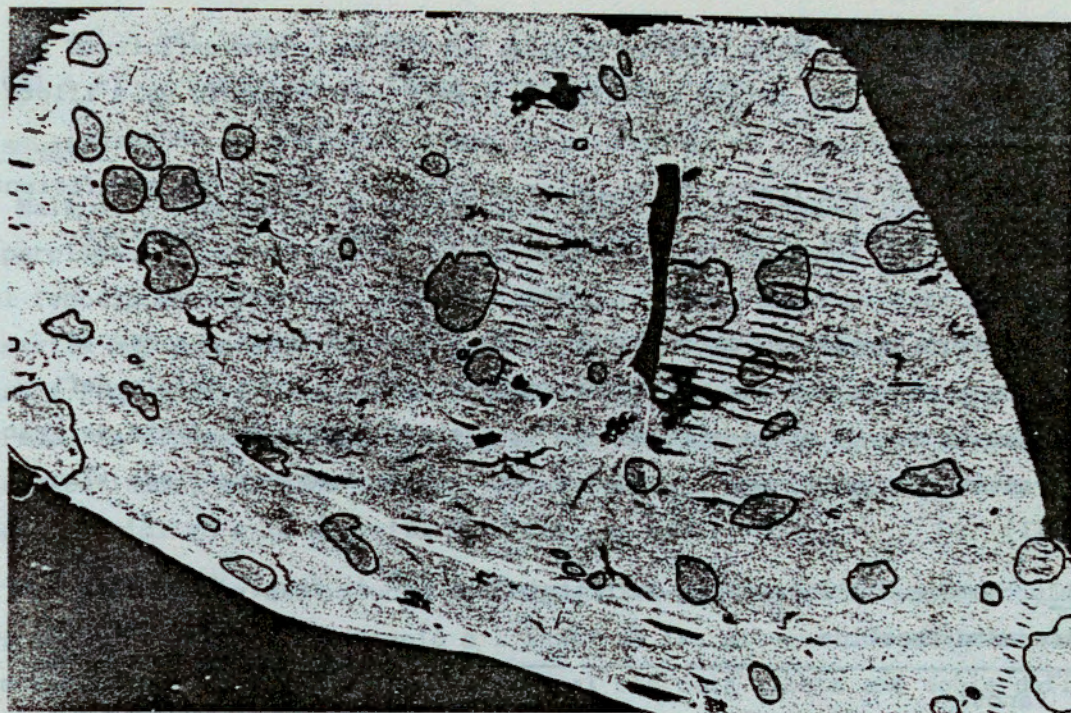


Figura nº 1: Fetge de rata després del tractament carcinogènic explicat al text. Tinció específica per a la ATPasa canalicular. Negatiu fotogràfic: 12,5 x. El contorn dels illots enzím-deficients està resseguit.

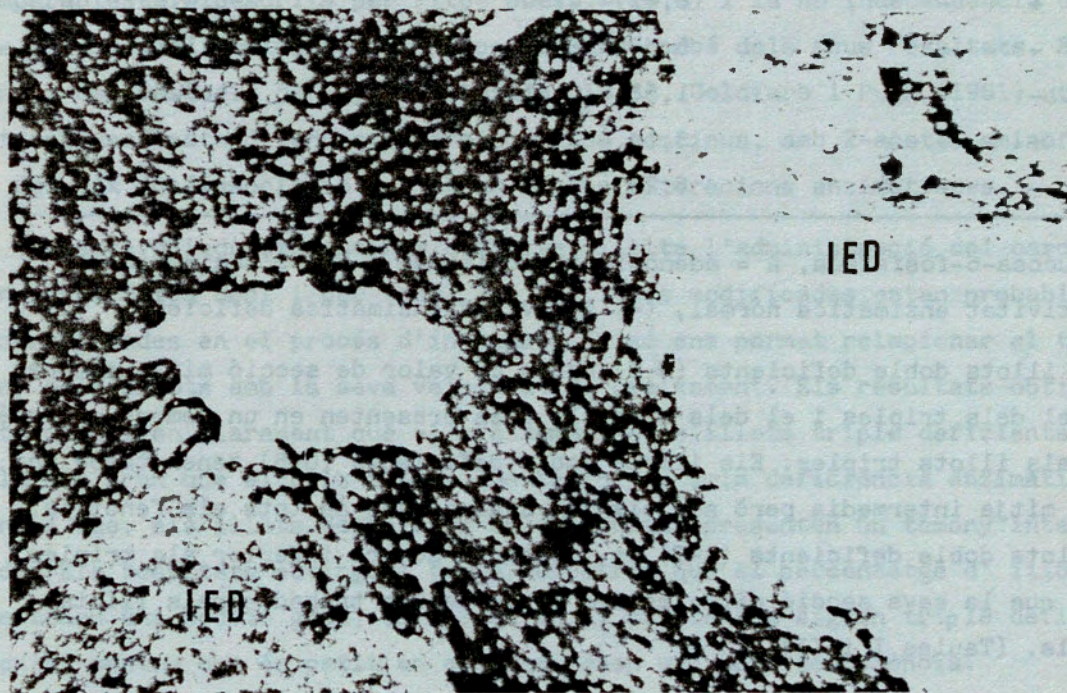


Figura nº 2: Material igual al de la figura nº 1. Tinció específica per a la G6Pasa. Microfotografia 200 x. S'observen dos illots enzím-deficients (IED)

La major fracció de volum hepàtic ocupada per illots enzim-deficients la presenten els illots amb triple deficiència seguit a continuació dels illots amb una sola deficiència i de la combinació doble deficient en G6Pasa i ATPasa (G-A) essent les fraccions ocupades pels altres illots doble deficients ATPasa i 5'nucleotidasa (A-5) i G6Pasa i 5'nucleotidasa (G-5) inferiors. (Taula I).

Els illots que presenten deficiència en un sol enzim tenen una secció mitja petita però son els més nombrosos mentre que els illots triple deficients tenen la secció mitja més gran de tots els fenotips estudiats malgrat que es presenten en un nombre inferior a les combinacions senzilles. (Taula I i II)

Taula II : Nombre d'illots enzim-deficients per cm^2 de fetge. Percentatge dels diferents fenotips.

Fenotip			nº illots/ cm^2	% dels fenotips
G	A	5		
-	+	+	15,92 \pm 6,28	28,52
+	-	+	13,29 \pm 4,43	24,68
+	+	-	8,47 \pm 4,90	14,89
-	-	+	5,56 \pm 2,47	11,11
-	+	-	1,53 \pm 0,41	2,86
+	-	-	3,14 \pm 2,44	6,41
-	-	-	5,29 \pm 3,62	11,51

G = glucosa-6-fosfatasa, A = adenosín trifosfatasa i 5 = 5'nucleotidasa (+) activitat enzimàtica normal, (-) activitat enzimàtica deficient.

Els illots doble deficients (G-A) donen un valor de secció mitja comprès entre el dels triples i el dels senzills i es presenten en un nombre gairebé igual als illots triples. Els illots doble deficients (G-5) tenen també una secció mitja intermedia però són els menys nombrosos de tots els fenotips. Els illots doble deficients (A-5) es troben en nombre inferior als triples mentre que la seva secció mitja es del ordre de les trobades pels illots senzills. (Taula I i II).

Hem trobat que la proporció d'illots, que tenen una secció superior a $0,1\text{mm}^2$, més elevada correspon als triples deficients mentre que les proporcions més baixes les presenten les deficiències senzilles i la doble deficiència (A-5) (Taula I).

El valor del index S trobat a l'interior dels illots hiperplàtics es de 0,021 i el corresponent al fetge normal es de 0,006.

Discussió

Malgrat l'abundància d'estudis sobre alteracions enzimàtiques als focus hiperplàtics o hepatomes, durant la carcinogènesi hepàtica, la determinació del fenotip enzimàtic per assatjos histoquímics en talls seriatos ha estat descrita per pocs autors. Pitot et al. (1978), Pugh i Goldfarb (1978), Goldfarb i Pugh (1981). Els enzims estudiats per aquests autors han sigut la G6Pasa, la ATPasa i GGTA₂. Nosaltres hem incorporat en aquest treball la 5'nucleotidasa, enzim no estudiat anteriorment i hem seguit una pauta carcinogènica similar a la descrita per Pitot et al. (1978).

Hem calculat la distribució de freqüències per les deficiències dobles i triples, assumint una associació a l'atzar de les alteracions enzimàtiques i hem trobat que els valors observats en el cas dels illots amb doble deficiència són inferiors als calculats, mentre que en el cas dels illots amb triple deficiència el valor observat és gairebé igual al calculat. Podem, doncs, deduir que les alteracions enzimàtiques en el nostre model no són independents. Els nostres resultats de la distribució de freqüències són comparables als descrits per Pitot et al. (1978) i la no independència de les alteracions enzimàtiques, es pot deduir també dels seus resultats. En canvi, dels estudis de Pugh i Goldfarb (1978), Goldfarb i Pugh (1981) utilitzant una pauta d'inducció carcinogènica continua, amb 2-acetil aminofluorè, es dedueix una associació a l'atzar de les alteracions enzimàtiques.

La pauta d'inducció que hem utilitzat limita l'administració del carcinogen a una única dosi i per tant, les cèl.lules modificades estan probablement sincronitzades en el procés d'iniciació. Aixó ens permet relacionar el tamany dels illots amb la seva velocitat de creixement. Els resultats obtinguts demostren clarament que el creixement dels illots triple deficient és molt més gran que el dels illots que tenen una sola deficiència enzimàtica mentre que, els illots deficients en dos enzims presenten un tamany intermedi. Els resultats obtinguts també demostren que el percentatge d'illots que tenen una secció gran, és elevat en el cas de que siguin triple deficients, mentre que és petit en els que tenen una sola deficiència.

Podem dir, per tant, que com més gran és el nombre d'alteracions enzimàtiques d'un illot, més gran es la seva velocitat de creixement.

Per explicar els possibles mecanismes que provoquen alteracions enzimàtiques i el desenvolupament dels tumors, cal tenir en compte que el carcinogen,

a més d'interaccionar amb el DNA, pot també fer-ho amb altres molècules, com poden ser proteïnes no histones, que al estar modificades poden induir una reprogramació genètica responsable d'una activació de la proliferació i de les alteracions enzimàtiques.

Bibliografia

- EMMELOT P., SCHERER E. (1980). The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 605, 247-304.
- GOLDFARB S.; PUGH T.D. (1981). Enzyme histochemical phenotypes in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer research* 41, 2092-2095.
- PITOT H.C., BARSNESS L., GOLDSWORTHY T., KITAGAWA T. (1978). Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature* 271, 456-457.
- PUGH T.D., GOLDFARB S. (1978). Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. *Cancer research* 38, 4450-4457.
- SATO K., HATAYAMA I., HOSHINO K., IMAI F., TSUCHIDA S., SATO T., NISHIMURA K., TATEMATSU M., ITO N. (1981). Enzyme deviation patterns in primary rat hepatomas induced by sequential administration of two chemically different carcinogens. *Cancer research* 41, 4147-4153.
- WACHSTEIN M., MEISEL E. (1956). On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem* 4, 592.
- WACHSTEIN M., MEISEL E. (1957). Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 27, 13-23.
- WEIBEL E.R., KISTLER G.S., SCHERLE W.F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.* 30, 23-48.