

Admès que la SP té un clar efecte mitogènic, calia esbrinar en quin període del cicle cel.lular actúa. Les dades obtingudes indiquen clarament que l'efecte, al meins inicial, de la SP és en estimular a les cèl.lules en G2 a entrar en mitosi (Figures 2 i 3). Aquesta resposta és curiosament molt semblant a la que presenta l'organisme després de l'ingestió d'aliment (Baguña, 1974), si bé la resposta és menor. En aquest darrer cas, es va postular com a mecanisme estimulador el lliurament d'algún factor neurohumoral mitogènic per part de les pròpies cèl.lules intestinals o per part de les cèl.lules del plexe nerviós gastrodèrmic. Tenint en compte els resultats d'aquest treball, aquest hipotètic factor podria ésser la pròpia SP o algún factor semblant.

Agraïments

Voldria agrair a Rafel Romero l'ajut en la confecció de les gràfiques i a E. Saló les discussions mantingudes sobre el tema. aquest treball ha estat finançat, en part, per una subvenció de la CAICYT (1108/81).

Bibliografia

- BAGUÑA, J. (1974). Dramatic mitotic response in planarians after feeding, and a hypothesis for the control mechanism. J.Exp.Zool. 190, 117-122.
- BAGUÑA, J i ROMERO, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians Dugesia mediterranea and Dugesia tigrina. Hydrobiologia 84, 181-194.
- GUSTAFSSON, M.K.S., LEHTONEN, M.A.I i SUNDLER, F. (1986). Immunocytochemical evidence for the presence of "mammalian" neurohormonal peptides in neurones of the tapeworm Diphyllobothrium dendriticum. Cell.Tissue.Res 243, 41-49.
- NILSSON, J., VON EULER, A.M., i DALSGAARD, C.J. (1985). Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature 315, 61-63.
- SALO, E. (1984). Formació del blastema i re-especificació del patró durant la regeneració de les planàries Dugesia(S)mediterranea i Dugesia(G)tigrina: Anàlisi morfològica, cel.lular i bioquímica. tesi Doctoral, Univ. de Barcelona.
- SALO, E i BAGUÑA, J. (1984). Regeneration and pattern formation in planarians I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in Dugesia (G)tigrina, and a new proposal for blastema formation. J.Embryol.exp.Morphol 83, 63-80.
- SALO, E i BAGUÑA, J. (1985). El control de la proliferació a planàries: acció de neuropèptids mitògens (Substància P) i factors depenents de densitat cel.lular. Biol.Desenv. 3, 1-18.
- SALO, E i BAGUÑA, J. (1986). Stimulation of cellular proliferation and differentiation in the intact and regenerating planarian Dugesia(G)tigrina by the neuropeptide Substance P. J.Exp.Zool. 237, 129-135.

Caracterització d'un model d'hepatocarcinogènesi experimental, resultats preliminars

A. Romero (1,2), J. Domingo (1), T. Grau (2), M.D. Estadella (1)

(1) Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona.

(2) Centro de Investigación Grupo Ferrer SA, Barcelona.

Abstract

Characterization of a new model of experimental hepatocarcinogenesis, preliminary results

The main objective of this study has been to develop a carcinogenesis protocol designed to investigate the cumulative effect of several cycles of initiation and promotion on the development of preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver. Each cycle consists of an initiation step by carbon tetrachloride to stimulate cell proliferation and diethylnitrosamine given 48 hours after carbon tetrachloride, and a period of continuous promotion with phenobarbital. Irrespectively of the number of cycles, all animals have developed tumours after 16 months of promotion, but a clear relationship between the number of cycles and the number of tumours larger than 1 cm of diameter has been found. Several serological parameters commonly used in toxicological studies have been determined at the end of the treatment. Preliminary results on the cytotoxic effects and on the development of enzyme-altered areas and nodules are given.

Introducció

El desenvolupament neoplàsic és un procés multifàsic. Aquest concepte està basat en els estudis epidemiològics a l'home - relació incidència de càncer i edat - i, també, en les investigacions sobre carcinogènesi experimental (Berenblum, 1974; Foulds, 1975 & Burch, 1976). Els experiments de transfecció d'oncogens a fibroblastes normals recolzen també aquesta hipòtesi. Newbold & Overell (1983) troben que la transformació dels fibroblastes normals per transfecció de l'oncogen EJ c-Ha-ras només es produeix si les cèl·lules han estat previament immortalitzades mitjançant un carcinògen químic. Land et al. (1983) demostren la transformació de les dites cèl·lules per la transfecció conjunta pels oncogens myc i ras. Tant a la patologia humana com als estudis de carcinogènesi als diferents models animals, l'aparició de tumors va precedida per un seguit de canvis pre-neoplàsics que afecten a la diferenciació cel·lular (alteracions del patró de marcadors citoquímics) i a l'activitat proliferativa (canvis hiperplàsics). Les dades experimentals no són, però, encara suficients per a permetre una descripció del desenvolupament neoplàsic

en forma d'una seqüència precisa d'etapes (Emmelot & Scherer, 1980).

L'hepatocarcinogènesi química experimental als rosegadors ofereix interessants avantatges per a l'anàlisi del desenvolupament neoplàsic de -gut a l'existència de diversos marcadors citoquímics de diferenciació que sofreixen alteracions durant el procés i permeten la identificació de clons cel·lulars (Emmelot & Scherer, 1980; Pitot & Sirica, 1980; Tatema-tsu et al., 1983). L'existència d'una etapa d'iniciació clarament separada de l'etapa de promoció a l'hepatocarcinogènesi ha estat provada per Pitot et al. (1978).

Diversos procediments d'hepatocarcinogènesi química a la rata han sigut utilitzats per diferents autors, Emmelot & Scherer (1980) en fan una revisió. Per una banda, hi ha els tractaments d'administració contínua de carcinogen i, per altre, els procediments en els que el carcinogen és administrat de forma puntual (una sola dosi) o en períodes de pocs dies. Aquest últim tipus de tractament és el més interessant de cara a estudiar els efectes promotors que -al ser administrat el carcinogen iniciador de manera puntual o molt concentrada en el temps -queden clarament separats de la iniciació.

En treballs anteriors (Estadella et al., 1983, 1984a, 1984b) utilitzant una pauta carcinogènica derivada de la de Pitot et al. (1978) que consisteix en l'administració d'una dosi única de dietilnitrosamina 24 h després d'una hepatectomia parcial seguida d'una promoció contínua amb fenobarbital, s'ha trobat una correlació positiva entre el creixement dels clons cel·lulars amb alteracions enzimàtiques i el nombre d'aquestes últimes. L'administració d'una segona tanda de dietilnitrosamina 30 o 50 setmanes després de la primera dosi dona lloc a l'aparició de sub-clons dintre dels focus primaris (Estadella et al., 1984b).

El principal objectiu del present treball ha estat l'establiment d'un model de carcinogènesi dirigit a investigar l'efecte acumulatiu de diferents cicles d'iniciació i promoció en el desenvolupament de lesions pre-neoplàsiques i neoplàsiques al fetge de rata. L'iniciador emprat és la dietilnitrosamina administrada en dosi única - a cada cicle - 48 h després d'una dosi necrogènica de tetraclorur de carboni. El fenobarbital ha sigut administrat de forma contínua com a promotor. Els resultats que es presenten corresponen a una caracterització preliminar del model a nivell histològic i serològic, incloent aspectes metodològics relatius a la quantificació de lesions.

Material i Mètodes

- 1- Animal d'experimentació : Rata Sprague-Dawley (C-D) holoxènica. Mascle de 180 g a l'inici de l'experiència.
- 2- Model experimental de carcinogènesi : Es basa en un cicle que consta d'una estimulació de la proliferació cel.lular hepàtica mitjançant l'administració de 5ml/kg per os d'una solució de tetraclorur de carboni al 50% en oli d'oliva. A les 48 hores, injecció intraperitoneal de 100 mg/kg de dietilnitrosamina, coincidint l'administració del carcinògen amb la síntesi de DNA de l'ona d'activació proliferativa. Set setmanes després, es comença l'administració crònica de fenobarbital sòdic a l'aigua de beguda (0,05%) com a promotor.
Aquest cicle dona origen a diferents pautes :
 - Pauta A : 1 cicle amb un temps total de promoció de 16 mesos.
 - Pauta B : 2 cicles amb un interval de 8 mesos entre les 2 dosis de carcinogen. Temps total de promoció 16 mesos.
 - Pauta C : 3 cicles amb un interval de 1,5 o de 8 mesos entre les dosis de carcinogen. Temps total de promoció 16 mesos.
- 3- Observació macroscòpica : Autopsia completa dels animals amb extracció de mostres dels principals òrgans i teixits. Examen macroscòpic i fotografia del fetge, quantificació de les lesions a partir dels esquemes i fotografies.
- 4- Una part de les mostres de fetge ha estat congelada amb isopentà - nitrogen líquid per a l'estudi histoquímic. Una altra part, fixada en formaldehid i processada per inclusió en parafina.
- 5- Amb les mostres congelades s'han realitzat talls seriatos al criomicrotom de 6 micrometres que han estat utilitzats per l'assaig histoquímic dels següents enzims : Glucosa-6-fosfatasa (Wachstein & Meisel, 1956). ATPasa canalicular i 5'nucleotidasa (Wachstein & Meisel, 1957). L'estudi morfològic d'àrees enzim-deficients s'ha fet sobre ampliacions fotogràfiques emprant un planímetre semi-automàtic.
- 6- Les mostres incloses en parafina han estat destinades a l'estudi histopatològic.
- 7- Determinació de paràmetres bioquímics serològics : Abans del sacrifici dels animals, prèvia lleugera anestèsia amb éter, s'han obtingut mostres de sang per extracció per la jugular. A la Taula I on figuren les dades dels paràmetres serològics, es donen els mètodes corresponents a les determinacions analítiques.

Resultats

El fet de que tant el tetraclorur de carboni com la pròpia dietilnitrosamina a les dosis utilitzades provoquin necrosi del parènquima hepàtic ha estat causa de mortalitat d'alguns animals. S'han observat dos tipus de morts al llarg de les pautes de tractament, per una banda, aquelles que per diferents causes han tingut lloc en períodes intermitjos a les administracions del carcinogen i que generalment, han sigut degudes a fracàs hepaàtic per preència de tumors o altres causes cròniques. Per altra banda, les morts d'animals que acabaven de rebre una dosi de carcinogen. Aquestes últimes han sigut degudes en tots els casos a necrosi massiva hepàtica (Figura 1).

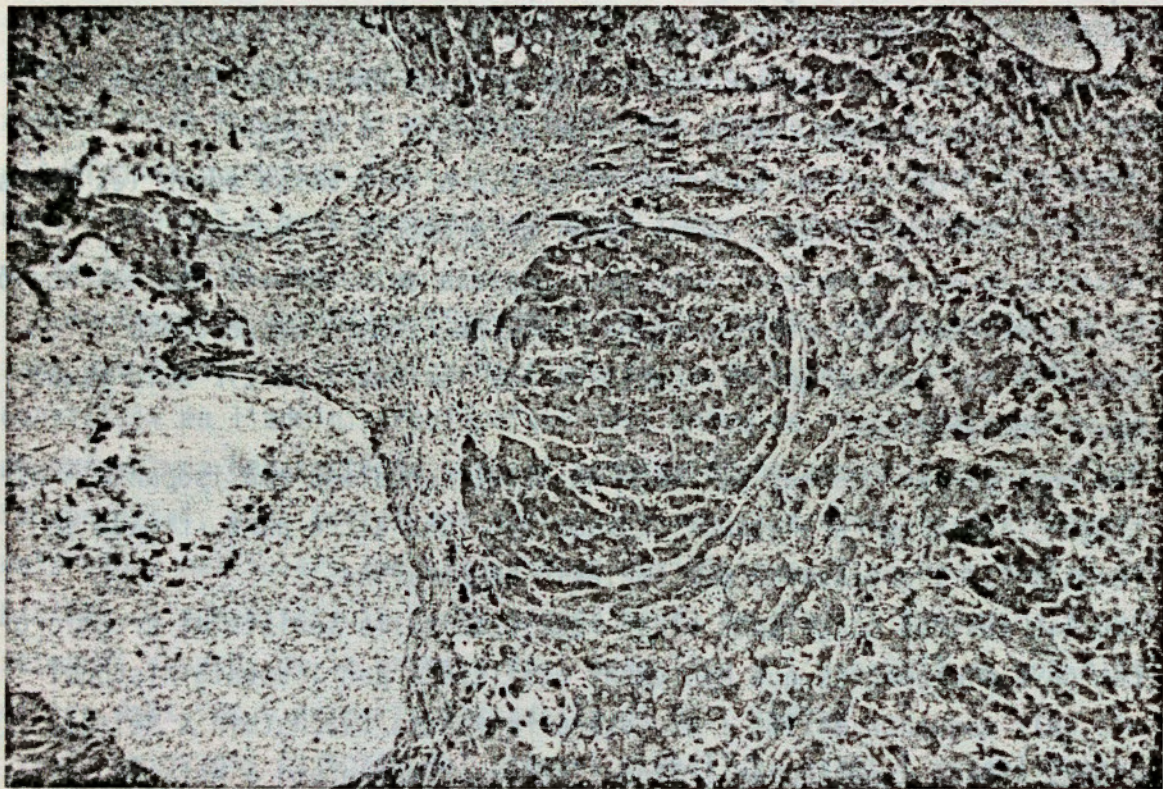


Figura 1 : Fetge, necrosi massiva produïda a la tercera administració de carcinogen. S'observa l'existència d'un nòdul d'estructura histològica més conservada, la qual cosa indica una necrosi més recent que la resta. H-E, x75.

L'efecte letal produït està relacionat amb el nombre de cicles d'administració de carcinogen i de forma negativa amb el temps transcorregut entre els mateixos. La mortalitat immediata a la primera administració del carcinogen ha estat nul·la. A la segona administració la mortalitat ha

estat d'un 10% quan l'interval entre ambdues era de 45 dies. Si el període transcorregut entre la primera i la segona dosi ha sigut de 8 mesos no hi ha hagut mortalitat. En el cas de 3 dosis separades 45 dies, la mortalitat immediatament després de la 3^a dosi ha sigut del 38%.

Perl que fa a l'eficàcia en la inducció de tumors, ha estat del 100%. Tots els animals estudiats fins al moment, independentment del nombre de cicles, han desenvolupat tumors. El grau de evolució de les lesions neoplàsiques està relacionat amb el temps de promoció, mentre que el nombre de tumors ho està amb el nombre de cicles :

Als 12 mesos de promoció, havent rebut 2 cicles separats entre si 8 mesos, no es van apreciar lesions macroscòpiques i es va tenir que recorre a l'estudi microscòpic per a la detecció de nòduls. Als 13 mesos de promoció amb les mateixes condicions experimentals anteriors, es van observar en un cas metàstasis a diafragma d'origen encara no estudiat i un carcinoma renal molt evolucionat, però les formacions nodulars a fetge eren de pocs milímetres i no protuberants. En canvi, a partir dels 16 mesos, en els 13 animals estudiats s'han observat tumors de diàmetre superiors al centímetre i alguns de dos o tres. Aquests grans hepatomes coexistien amb altres formacions nodulars més petites.

Per aproximar una quantificació d'aquests hepatomes de gran volum, s'ha fet un comptatge macroscòpic d'aquells amb diàmetres superiors a un centímetre. Segons aquesta forma de quantificació, sembla existir una relació directa entre el nombre d'aquests tumors i el de cicles de tractament amb carcinògen. Els resultats són els següents : A la pauta A, es troba una mitjana de 2 tumors per animal, excepte un cas en el que era de 7 (el nombre d'animals estudiat ha estat de 4). A la pauta B (4 animals estudiats), la mitjana és de 7 tumors per animal aproximadament. A la pauta C (3 animals estudiats), la mitjana és de 6 tumors per animal. No hi ha, per tant, diferència significativa entre el nombre de tumors entre les pautes B i C. A les Figures 2 i 3 es mostren els fetges de dos animals representatius d'aquests dos nivells d'afectació.

Respecte dels diferents tipus histològics de tumors i la seva incidència, els resultats són encara preliminars ja que l'estudi histopatològic realitzat fins ara només inclou els dos animals sacrificats abans dels 16 mesos. A més dels hepatomes observats, que semblen de diferents tipus tumorsals, s'han observat altres tumors d'origen diferent amb o sense metastatzació hepàtica : Un limfoma ben classificat que infiltrava el fetge. Un carcinoma renal. Lesions papilomatoses cutànies en alguns animals .

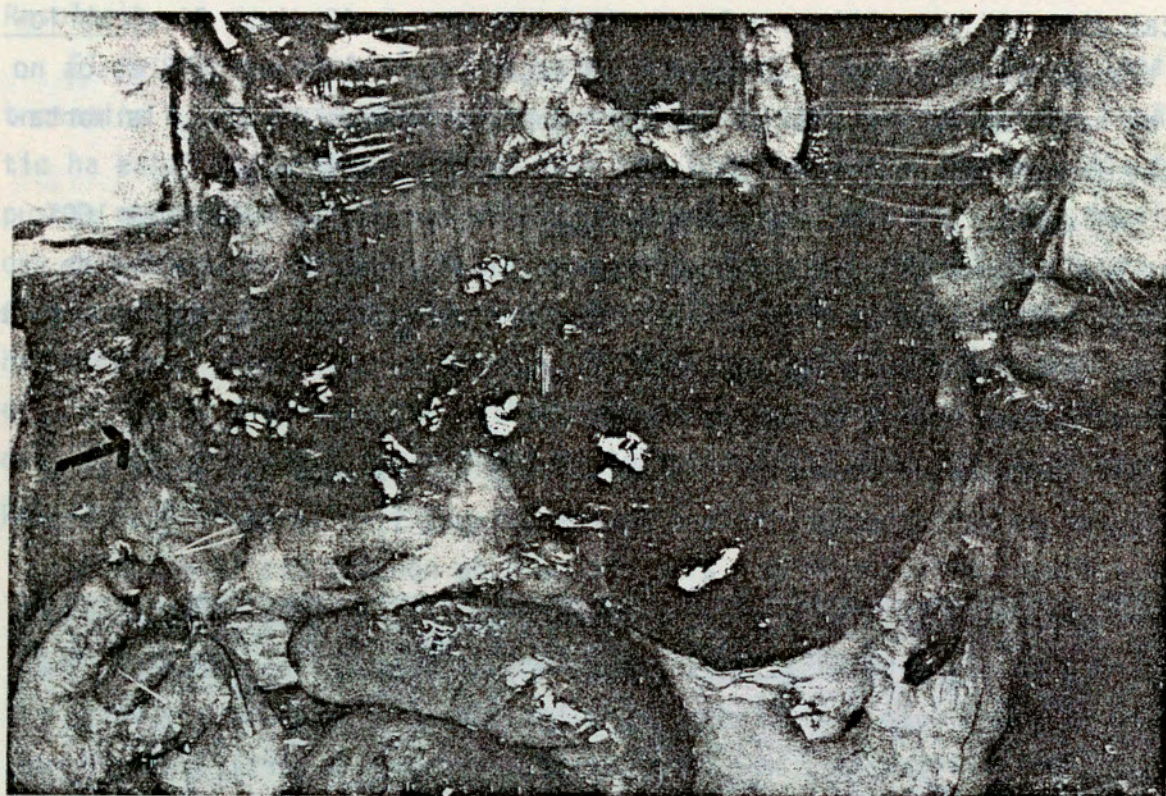


Figura 2 : Fetge d'un animal de la pauta carcinogènica A (1 cicle). S'observa un tumor d'uns 2 cm de diàmetre a la part esquerra de la fotografia.

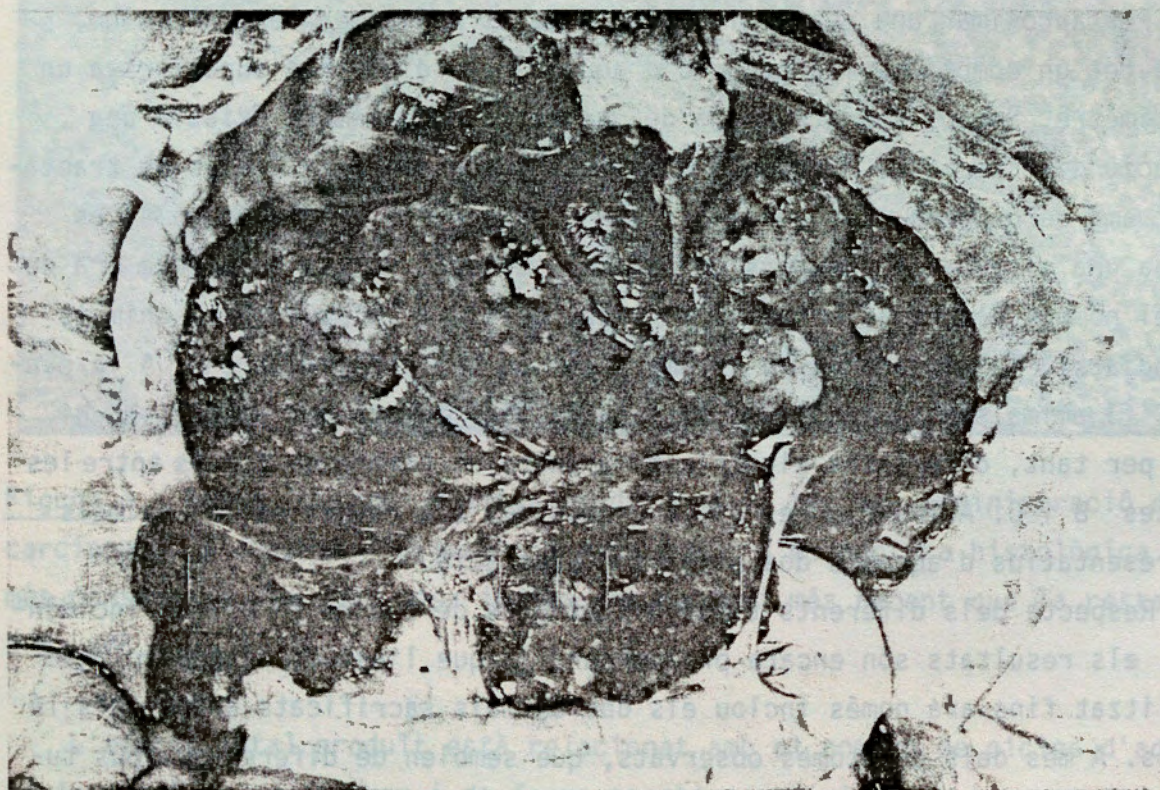


Figura 3 : Fetge d'un animal de la pauta carcinogènica C (3 cicles). S'observen tumors de diferent aspecte i volum, a més de molts nòduls.

Un tumor testicular. S'han vist nòduls pulmonars en alguns animals d'origen encara no determinat.

L'estudi histoenzimològic es troba en fase inicial mostra una gran abundància d'àrees enzim-deficients en tots els animals tractats. A la major part de seccions histològiques s'observen àrees confluents originades per la fusió d'illots enzim-deficients. Per superposició de perfils corresponents als talls seriatos assajats amb els tres mètodes histoquímics (glucosa-6-fosfatasa, ATPasa canalicular, 5'nucleotidasa), es pot comprovar l'existència de freqüents illots i tumors doble o triple deficients. Tanmateix, s'han observat alguns nòduls de fenotip hiperactiu, amb reacció positiva superior a la del parènquima normal. Actualment s'estan valorant els paràmetres de fracció de volum hepàtic afectat per a cada deficiència enzimàtica així com la corresponent a les deficiències dobles i triples. A les Figures 4, 5 i 6 poden observar-se algunes imatges de les preparacions histoquímiques. La Figura 4 és un negatiu fotogràfic ampliat obtingut projectant directament la preparació sobre el paper fotogràfic, aquesta classe d'imatge és utilitzada a l'estudi morfomètric. En el cas de la Figura 4, s'observa un gran nòdul ben limitat i altres focus enzim-deficients també clarament individualitzats que no ofereixen cap dificultat de identificació. En altres preparacions, però, s'observen àrees confluents no clarament diferenciables del patró normal que presenta un cert grau d'heterogeneïtat a la reacció histoquímica, essent impossible en molts casos la identificació d'illots individualitzats.

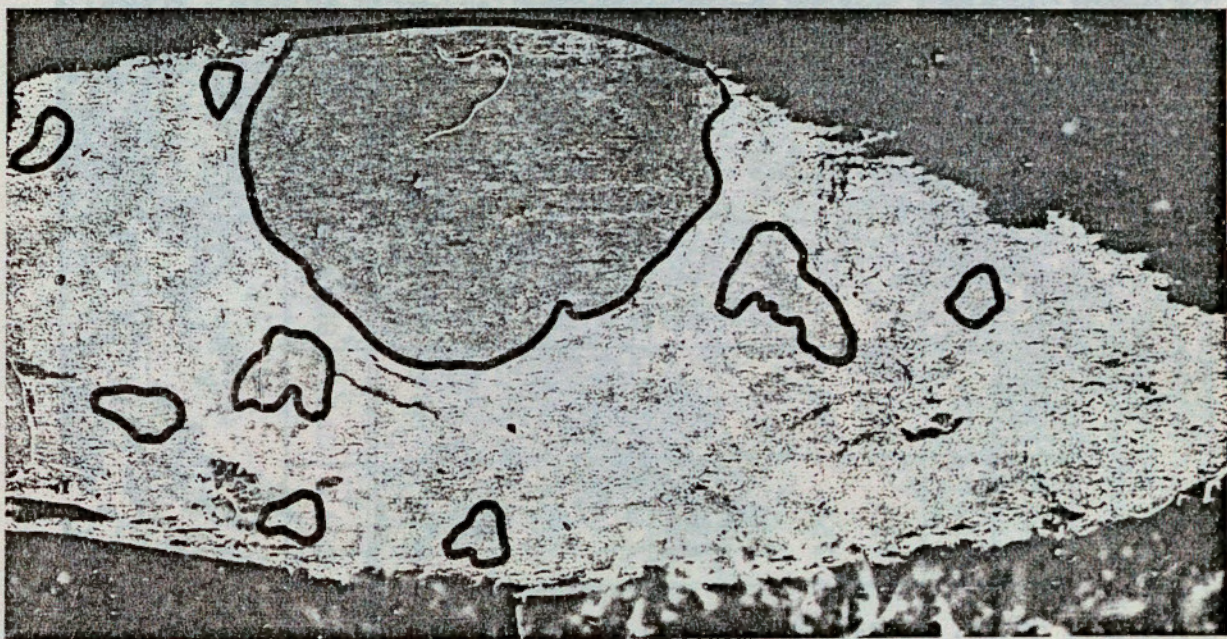


Figura 4 : Fetge, pauta C, secció de 6 micres assajada per a l'ATPasa. Negatiu fotogràfic de la preparació, baixa amplificació.

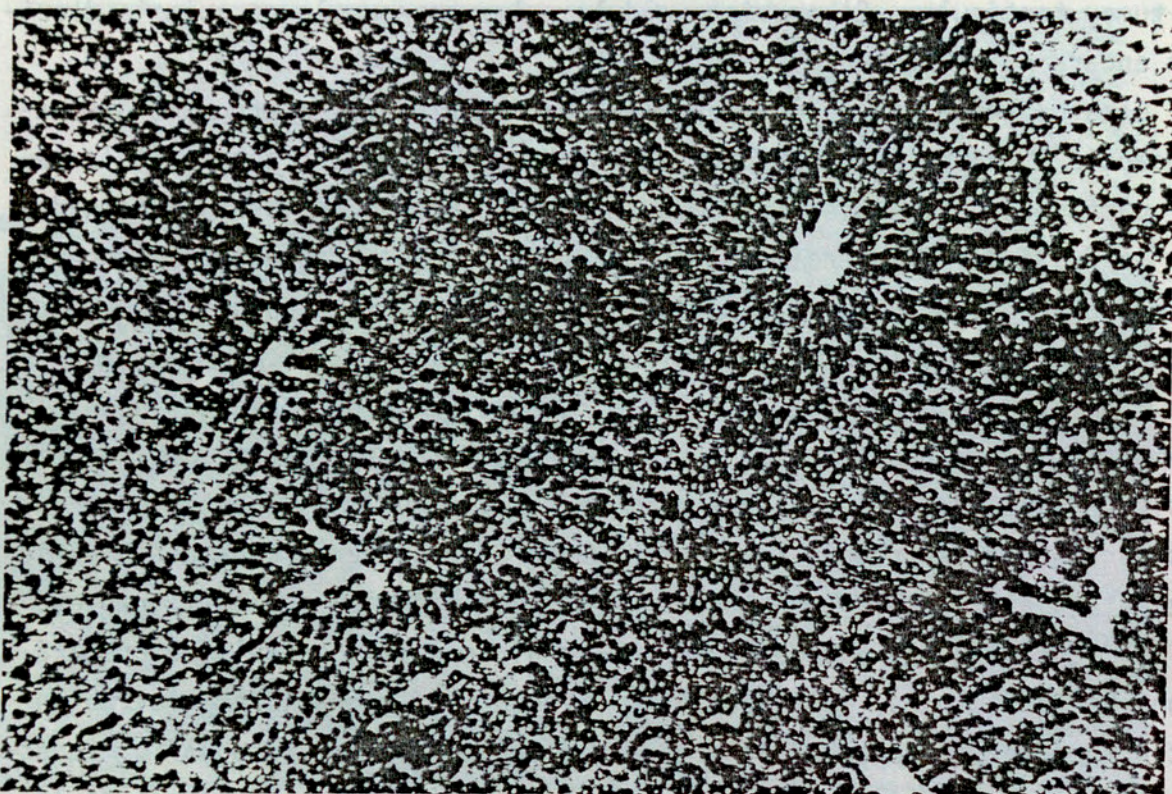


Figura 5 : Fetge. Animal control. Secció de 6 micres. Assaig per a la glucosa-6-fosfatasa. Ampliació microscòpica x 75.



Figura 6 : Fetge. Animal de la pauta A. Secció de 6 micres. Assaig per a la glucosa-6-fosfatasa. Ampliació microscòpica x 30. S'obseven àrees enzim-deficients de diferent extensió.

TAULA I : PARÀMETRES DE BIOQUÍMICA SÈRICA

Nº	GLUC.	GOT	GPT	BUN	A.P.	γ-GT	LDH	BILIRR.	COLEST.	PROT.	ALB.	CLOR.	CREAT.	Ca	K
A-2	102	166	98	17,7	245	54	1306	0,105	219	8,5	3,3	119	0,7	19,9	8,85
A-3	102	91	79	17,3	198	55	403	0,210	207	8,6	3,5	114	0,8	14,9	8,06
A-4	138	166	94	18	355	71	76	0,210	238	9,2	3,9	147	0,9	19,7	9,5
A-5	189	135	122	18,3	337	49	167	0,105	195	11,2	5,3	169	1,1	27,2	9,66
B-1	134	180	112	17,6	417	422	12	0,210	254	10,4	4,7	167	1,1	18,7	9,67
B-2	142	210	92	19,2	421	303	349	0,525	260	11,5	5	154	1,2	-	9,9
B-4	106	120	86	17,4	251	55	69	0,105	192	8,3	3,8	125	0,8	21	8,31
B-7	175	112	97	18,3	321	106	37	0,157	178	11,2	4,7	143	1,1	22,8	9,77
C-7	215	119	83	17,8	238	38	63	0,210	202	11,3	-	168	0,6	19	10,74
Control	129,2	149,8	33,6	16,8	102,1	8,1	1356,2		78	10,3	3,65	138,4	1,27	10,05	

Entre parèntesi s'indiquen els mètodes emprats en cada cas : GLUC. (glucosa hexoquinasa, Bondar & Mead). GOT (glutàmic-oxalacètic-transaminasa, Henry, Amador & Wacker). GPT (glutàmic-pirúvic-transaminasa, Henry). BUN (nitrogen ureic, Talke & Schunbert). A.P. (fosfatasa alcalina, Bowers & McComb). gamma-GT (gamma-glutamiltanspeptidasa, Szasz modificat). LDH (làctideshidrogenasa, Wacker). COLEST. (colesterol, Allain). PROT. (proteïnes, Weichselbaum). ALB. (albúmina, Guyre & Vidmantas). CLOR. (clorurs, Amino & Giese). CREAT. (creatinina, Jaffe). Ca (calci, Gindler & King). K (potasi, fotòmetre de flama).

L'estudi serològic de paràmetres bioquímics (Taula I) indica una alteració de la major part dels que són indicatius del funcionalisme hepàtic. Així, la GPT (glutàmic-pirúvic-transaminasa), AP (fosfatasa alcalina) i gamma-GT (gamma-glutamil-transpeptidasa) augmenten mentre que la LDH (làctic-deshidrogenasa) disminueix de forma notable. La GOT (glutàmic-oxalacètic-transaminasa) no mostra gairabé variacions. Cal destacar l'increment experimentat pel calci que resulta inesperat.

Els resultats presentats són encara preliminars i representen una primera caracterització d'un nou model d'hepatocarcinogènesi. Pel que fa a la mortalitat dels animals tractats, cal destacar la importància del temps transcorregut entre dos cicles consecutius. Les diferències de mortalitat observades segons que l'interval sigui de 1,5 o de 8 mesos pot explicar-se pel diferent grau de regeneració i recuperació funcional del fetge. També s'ha fet palès l'efecte tòxic acumulatiu en el cas de comparar els efectes tòxics d'una segona dosi amb els d'una tercera dosi quan l'interval entre els cicles és el mateix en els dos casos (1,5 mesos), les diferències de mortalitat observades es poden explicar per la diferent proporció de parènquima hepàtic funcional existent en els dos casos.

En relació al desenvolupament de les lesions neoplàsiques, és interessant l'observació de que en els animals estudiats als 12 i 13 mesos de promoció no hi ha hagut lesions macroscòpiques mentre que als animals sacrificats als 16 mesos de promoció s'han vist tumors bastant grans (fins a 3 cm de diàmetre). Sembla, per tant, que el creixement dels tumors ha estat molt més important en els últims tres mesos de promoció.

Pel que fa al nombre de tumors, la relació amb el nombre de cicles és clara en comparar els animals que han rebut una dosi de carcinogen amb els que n'han rebut dues. No havent observat, en canvi, diferències entre els animals de dos i de tres cicles. A les dosis de carcinogen emprades, resulta clar que amb dos cicles la quantitat de parènquima hepàtic afectat és tant gran que impedeix l'observació d'efectes addicionals a l'augmentar el nombre de cicles.

Un resultat especialment interessant és l'observació del desenvolupament de neoplàsies de diversos orígens apart dels diferents tipus d'hepatomes.

La problemàtica que es planteja per a la quantificació de les focus enzim-deficients és l'existència de confluències i de gradació de la intensitat de la reacció que fa difícil una mesura fiable dels focus. Per to això, els criteris d'evaluació morfològica no poden ser els mateixos