

CARCINOGENESIS Y NITROSOAMIDAS* (I)

Doctores A. Martínez J. Merchán, M. L. Sala, G. Renedo, J. Fernández-Pascual y A. Bullón**

Introducción

La carcinogénesis experimental, sobre todo a base de los carcinógenos de reabsorción, tiene un gran interés, ya que de ella pueden derivarse estudios de gran importancia en oncología general: relaciones entre dosis y respuesta en oncogénesis, efectos químicos a nivel molecular en las diferentes estructuras celulares en las fases iniciales de la carcinogénesis, cambios morfológicos incipientes, oncología comparada experimental, tratamiento de las neoplasias, potencial efecto carcinogénico en el hombre, etcétera.

Entre los agentes químicos empleados en la producción de tumores experimentales, las nitrosoureas han adquirido una gran importancia desde los trabajos, en la pasada década, de Duckrey y colaboradores (1 a 5). Los compuestos N-nitrosos presentan una estructura molecular básica común, con un radical efector y un radical "guía"

del que parece depender su efecto organotropo (22); por ejemplo, los del grupo metilo (DMNA) dan lugar a la producción de tumores hepáticos; el grupo uretano (MNUT), a tumores pulmonares, y el grupo urea, a tumores del sistema nervioso (MNU y ENU). Sin embargo, dentro de cada uno de estos compuestos, la selectividad orgánica del efecto oncogénico depende a su vez de otros factores: dosis y pautas de administración, edad del animal y raza, etcétera. Su efecto oncogénico parece deberse a la acción metilante de estos compuestos sobre la guanina, lo que daría lugar a la aparición de cambios irreversibles en el DNA (4 y 11). Metilación del DNA, RNA y proteínas, así como inhibición de la síntesis de estos compuestos, se han descrito tras la inyección del carcinógeno, alcanzando un máximo a las tres-seis horas (17). Tras esto habría un período de latencia hasta el desarrollo y crecimiento del tumor (22).

Nuestras experiencias tienen por objeto la producción de distintos tipos tumorales con estos compuestos, especialmente del sistema nervioso, y su tipificación con los métodos histológicos ordinarios, histoquímicos y electromicroscópicos. En la presente comunicación expondremos los resulta-

* Comunicación presentada al VI Congreso Nacional de Anatomía Patológica. Trabajo realizado con la ayuda económica de la A. E. C. C.

** Cátedra de Anatomía Patológica, Hospital Clínico de la Facultad de Medicina Complutense y Departamento de Cancerología Experimental del C. S. I. C.

dos generales obtenidos hasta el momento con la metilnitroso-urea (MNU) y etilnitroso-urea (ENU).

Material y métodos

Se han utilizado 322 ratas Wistar, distribuidas en varios grupos, según la edad, sexo y carcinógeno empleado.

a) 152 animales fueron tratados mediante administración trasplacentaria de ENU (15 miligramos por kilogramo) por vía intraperitoneal, en dosis única, a las ratas gestantes los días catorce a dieciséis de la preñez.

b) 15 machos y 15 hembras, de unos 50 gramos de peso, fueron inyectados con MNU por vía intraperitoneal (10 miligramos por kilogramo semanal) hasta un total de 140 miligramos por kilogramo.

c) 67 machos y 73 hembras, de unos 150 gramos de peso, se inyectaron con MNU vía intraperitoneal (10 miligramos por kilogramo semanal) hasta una dosis total de 240 miligramos por kilogramo.

La MNU y ENU se sintetizaron en nuestro laboratorio, según técnica facilitada por el Departamento de Química Orgánica (profesor Lora Tamayo), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense:

Urea + nitrito sódico = a nitroso-urea.
Nitroso-urea + metil o etil-amina =
= MNU o ENU.

Los animales se sacrificaron cuando mostraban sintomatología nerviosa expresiva o cuando el tumor se hacía evidente a la palpación o a la inspección, en el caso de los tumores periféricos.

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral o éter etílico. El material para microscopía convencional se fijó en formol neutro tamponado de Lillie y, tras su inclusión en parafina, fue cortado y teñido rutinariamente (19). Algunos fragmentos se impregnaron con platas tras ser seccionados en congelación (14). El material seleccionado para estudio electromicroscópico

fue fijado por inmersión en glutaraldehído, osmificado y procesado de forma rutinaria (13). Un alto porcentaje fue fijado para microscopía electrónica mediante perfusión intravascular con aldehídos (15). Las preparaciones se estudiaron con un microscopio electrónico Zeiss EM-9S, con un potencial de aceleración de 60 kilovatios.

Resultados y discusión

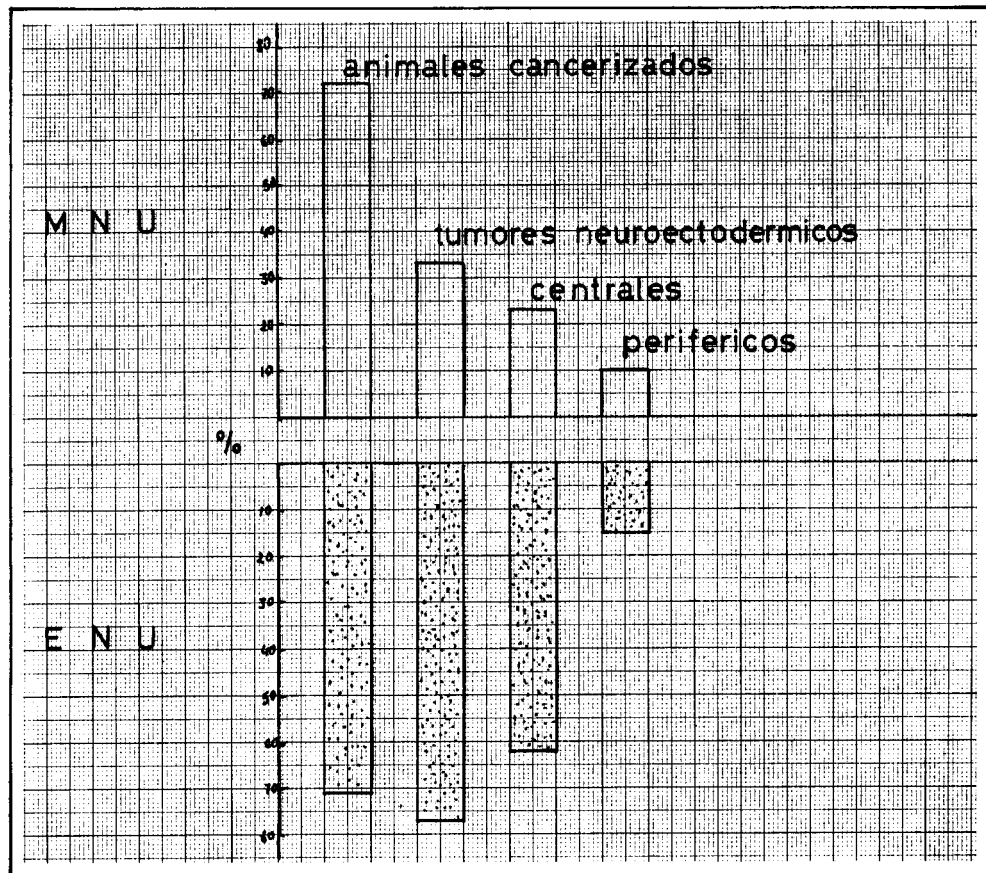
Los resultados obtenidos hasta el momento quedan resumidos en las gráficas. Tanto con la MNU como con la ENU obtenemos algo más del 70 por 100 de animales cancerizados con la dosis y vía de administración señaladas. Sin embargo, existe una marcada diferencia en la incidencia de tumores nerviosos, tanto centrales como periféricos, pues mientras con la MNU solamente alcanzan un 35 por 100, con la ENU comprenden el grupo más importante (más de un tumor por animal). La baja incidencia de tumores nerviosos en nuestra serie con MNU concuerda con los experimentos de Koestner y colaboradores (10), en ratas Sprague-Dawley, en los que se ve claramente una variación en la incidencia de estos tumores, según la vía de administración empleada: en la vía intravenosa obtienen el 97 por 100; en la digestiva, el 52 por 100; intraperitoneal, el 36 por 100, y subcutánea, el 12 por 100. Asimismo, Stroobandt y Brucher (16) obtienen un 70 por 100 de tumores nerviosos por vía digestiva en ratas Wistar. La vía utilizada por Druckrey y colaboradores (6) fue fundamentalmente la intravenosa, con un 90 por 100 de incidencia de tumores nerviosos. Cifras similares, e incluso más altas, se observan en las grandes estadísticas de Zulch y Mennel (21).

Los tumores periféricos (un alto porcentaje con la MNU) se desarrollan con gran frecuencia en la cavidad peritoneal (serosa, útero, retroperitoneo), lo que indica un efecto carcinogénico tóxico que se explica por la gran inestabilidad de la MNU en solución. Asimismo, Stroobandt y Brucher (16), empleando la vía digestiva, encuentran en todos los animales hiperplasias papilomatosas y tres carcinomas en la porción inicial del estómago. La mayoría de los

tumores no nerviosos obtenidos por nosotros tienen un reparto muy desigual, y si bien algunos de ellos eran interesantes (varios nefroblastomas, un timoma, un carcinoma tiroideo, un ameloblastoma), su escasa incidencia y la falta, en general, de un organotropismo determinado confirman los trabajos iniciales de Druckrey y colaboradores sobre la especificidad de estos compuestos para producir tumores nerviosos, aunque su incidencia sea baja, según los factores expuestos anteriormente.

Como se ha visto en la figura 1, los mejores resultados se obtienen con la ENU, por vía transplacentaria, por inyección única intraperitoneal del mismo a la madre gestante. En el caso de este compuesto no parece tener importancia que la

inyección sea intravenosa o intraperitoneal, aunque generalmente se emplea la primera (3, 7 y 20). Lo importante con la ENU, es la dosificación y el momento de la preñez en que se inyecta el carcinógeno (6). Los óptimos resultados (100 por 100) se obtienen con 50 miligramos por kilogramo en el día 20 de la gestación, mientras que con cinco miligramos la incidencia de tumores nerviosos baja al 60 por 100 (8). Asimismo, se obtiene un marcado descenso en la incidencia de tumores nerviosos cuanto más precoz es la inyección, siendo imposible obtenerlos antes del día 12 (9). Esto mismo lo hemos podido comprobar nosotros en series anteriores de prueba. Como hemos visto en las gráficas, en las series actuales obtenemos más de un 70 por 100 de tumores nerviosos con una



Rendimiento de los cancerígenos

dosis de 15 miligramos por kilogramo en los días 14 y 16, lo que está en concordancia con los datos anteriormente expuestos.

Es interesante señalar que, en el día 12 de la gestación, el encéfalo de la rata está compuesto de células neuroepiteliales primitivas (22), con una mínima diferenciación glioblástica o neuroblástica. Por tanto, conforme avanza la diferenciación del sistema nervioso, la incidencia tumoral aumenta, si bien esto es solamente cierto en cuanto a las series gliales y endimarias se refiere, ya que prácticamente no se originan tumores de la serie neuronal, probablemente por la alta diferenciación en estos estadios de las células ganglionares, aunque sí sufren efectos tóxicos tras la inyección del carcinógeno (22).

La alta incidencia de tumores oligodendrogiales que se encuentran en todas las series (16 y 24) puede ser debida exclusivamente a que la oligodendroglia es el tipo celular predominante en el sistema nervioso y, por tanto, con más posibilidades de sufrir cambios neoplásicos. Para Taper y colaboradores (18), sin embargo, sería debida a la escasa cantidad de nucleasas que poseen, lo que podría significar una deficiente defensa enzimática contra la aparición de ácidos nucleicos extraños o alterados.

La alta incidencia que se refleja en toda la serie de glioblastomas y gliopiteliomas ha sido atribuida por Wechsler (21 y 22) a las alteraciones tóxicas ocurridas, sobre todo en las células subependimarias a nivel del telencéfalo de los embriones, tras la inyección de ENU. a las madres gestantes: el tóxico origina severas y extensas rupturas de la pared ventricular primitiva al primer día de la inyección, seguidas de un proceso reparativo que determina la formación de rosetas endimarias heterotópicas, es decir, desplazadas en pleno parénquima nervioso. Estas lesiones, que pueden ser conceptuadas como un proceso hamartomatoso originado químicamente, podrían considerarse, junto a los cambios bioquímicos descritos anteriormente (alkilación, etcétera), como el período de iniciación del

tumor, el cual, tras una fase de latencia, daría lugar al desarrollo de neoplasias (22).

En cuanto a las diferentes líneas celulares de tipo glial que se encuentran en algunos tumores (gliomas mixtos), sobre todo en fases tardías, cuando han alcanzado un gran desarrollo, han sido objeto de varias explicaciones. Para Zimmermann (23) sería debido a una cancerización local de varios tipos celulares (cancerización de campo) que, por tener períodos de latencia diferentes, en estadios iniciales sólo predominaría un tipo celular. Sin embargo, Zulch (24) cree que es debido a fenómenos anaplásicos que ocurren durante el crecimiento tumoral. Otra explicación podría ser simplemente la confluencia de dos tumores próximos de diferente estirpe, hecho sugerido por algunas imágenes histológicas observadas en nuestros casos.

Por fin, los tumores nerviosos periféricos pueden derivar de células de Schwann, aunque no está claro si otros tipos celulares (intersticiales o perineurales) participan en la neoplasia, sobre todo en los tipos indiferenciados (12), en los que se pierden las características estructurales y citológicas que permiten su diagnóstico micro y electromicroscópico. Su tiempo de inducción suele ser de unos dos meses (22), mientras los tumores gliales aparecen más tarde.

Resumen

Con el fin de estudiar la carcinogénesis organotrópica por metil y etil-nitroso-urea, se han utilizado 322 ratas Wistar no homocigóticas, de sexo y peso variable, a las que se han administrado estos compuestos según distintas pautas de inoculación. Los mejores resultados, referidos a la sencillez y garantía del procedimiento, se obtuvieron mediante inyección intraperitoneal de 15 miligramos por kilogramo de etil-nitroso-urea en el 15 día de la gestación lo que produjo tumores en un 71 por 100 de la descendencia. De estos tumores, el 75 por 100 era de estirpe neuroectodérmica. La metil-nitroso-urea, o la etil en otra forma

de administración, pueden producir un número semejante de tumores, pero la acción organotrópica no es tan definida.

Summary

In order to evaluate the organotropic carcinogenicity of Methyl- and Ethyl-nitroso-urea, 322 not inbred Wistar rats, of variable sex and weight, have been treated with these compounds according to several inoculation schemes. The best results as to reliability and easiness of the technique were obtained by intraperitoneal injection of 15 mg/kg. of Ethyl-nitroso-urea in the 15th day of pregnancy. This procedure rendered tumours in 71 % of the offspring, 75 % of which were of neural origin; Methyl-nitroso-urea, or Ethyl-nitroso-urea in adult rats have a carcinogenetic effect of similar intensity, but the organo-specific action is not so well defined.

BIBLIOGRAFIA

1. Druckrey, H.; Ivankovic, S., y Preussmann, R.: "Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrososoharnstoff". *Naturwiss*, 51, 144 (1964).
2. Druckrey, H.; Ivankovic, S., y Preussmann, R.: "Selektive Erzeugung maligner Tumoren in Gehirn und Rückenmark von Ratten durch n-Methyl-n-Nitrososoharnstoff". *Z. Krebsforsch*, 66, 389-408 (1965).
3. Druckrey, H.; Ivankovic, S., y Preussmann, R.: "Teratogenic and Carcinogenic effects in the offspring after single injection of Ethyl-Nitrosourea to pregnant rats". *Nature*, 210, 1378-1379. Londres, 1966.
4. Druckrey, H.; Preussmann, R.; Ivankovic, S., y Schmahl, D.: "Organotrope karzinogene wirkungen bei 65 verschiedenen n-Nitroso-Verbindungen an bd-Ratten". *Z. Krebsforsch*, 69, 103-201 (1967).
5. Druckrey, H.; Landschutz, C., e Ivankovic, S.: "Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. II) Athyl-Nitrososoharnstoff und 10 genetisch definierten Rattenstämmne". *Z. Krebsforsch*, 73, 371-386 (1970).
6. Druckrey, H.; Ivankovic, S.; Preussmann, R.; Zulch, K. J., y Mennel, H. D.: "Selective induction of malignant tumors of the nervous system by resorptive carcinogens." En "The Experimental Biology of brain tumors", editado por W. M. Kirsch y colaboradores. C. Charles Thomas. Springfield, Illinois, 85, 147 (1972).
7. Ivankovic, S.; Druckrey, H., y Preussmann, R.: "Erzeugung neurogener Tumoren bei den Nachkommen nach einmaliger Injektion von Athylnitrososoharnstoff an schwangeren Ratten". *Naturwiss*, 53, 410 (1966).
8. Ivankovic, S., y Druckrey, H.: "Transplazentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I) Athylnitrososoharnstoff (ANM) an BD-IX-Ratten". *Z. Krebsforsch*, 71, 320-360 (1968).
9. Koestner, A.; Swenberg, Y. A., y Wechsler, W.: "Transplacental production with Athylnitrosourea of neoplasma of the nervous system in Sprague-Dawley rats". *Am. J. Path.*, 13, 37-50 (1971).
10. Koestner, A.; Swenberg, Y. A., y Wechsler, W.: "Experimental tumours of the nervous system induced by resorptive N-Nitrosourea compound". En "Progress in experimental tumor research", V. 17, editado por Bingham, W. G., Jr., y S. Karger, 9-30. Basel, 1972.
11. Magee, P. N., y Barnes, J. M.: "Carcinogenic N-Nitroso compounds". *Adv. Cancer Res.*, 10, 162-246 (1967).
12. Merchan, J.; Martínez, A.; Sala, M. L., y Renedo, G.: "Fine structure of nerve trunks experimental tumours". *Actas del Symposium on Electron Microscopy*. Estambul, 1972.
13. Pease, D. C.: "Histological techniques for Electron Microscopy". *Academic Press*. Nueva York, 1964.
14. Ramón y Cajal, S., y Castro, F.: "Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso". Edición actualizada por A. Bullón y J. Merchán. Salvat. Madrid, 1972.
15. Sotelo, C., y Palay, S. L.: "The fine structure of the lateral vestibular nucleus in the rat. I) Neurons and neuroglial cells". *J. Cell Biol.*, 36, 151-179 (1968).
16. Stroobandt, G., y Brucher, J. M.: "Etude de tumeurs nerveuses obtenues par l'administration de MNU au rat". *Neurochir.*, 14, 515-535. Paris, 1968.
17. Swann, P. F., y Magee, P. N.: "Nitrosamine-Induced carcinogenesis". *Biochem. J.*, 110, 39-47 (1968).
18. Taper, H. S.; Brucher, J. M., y Fort, L.: "Histoenzymologie des nucleases dans le Système Nerveus central humain à l'état normal et neoplastique". *Proc. VI Int. Cong. Neuropath.*, 540-541. Masson. Paris, 1970.

19. **Tedeschi, C. G.**: "Neuropathology. Methods and Diagnosis". *Little, Brown and Co.* Boston, 1970.
20. **Wechsler, W.**; **Ivankovic, S.**; **Kleihues, P.**; **Matsumoto, S.**; **Preussmann, R.**; **Cruckrey, H.**, y **Zulch, K. J.**: "Pathology of Experimental neurogenic tumors Chemically induced during pre and postnatal life". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 159, 360-408 (1969).
21. **Wechsler, W.**: "Oncogenic, Teratogenic and Mutagenic effects of Methyl and Ethyl-Nitrosourea". *Proc. VI Int. Cong. Neuropath.*, 128-129. Masson. Paris, 1970.
22. **Wechsler, W.**: "Old and new concepts of oncogenesis in the nervous System of man and animals". En "Progress in Experimental Tumor Research", V. 17, editado por W. G. Bingham, Jr., y S. Karger, 219-278. Basel, 1972.
23. **Zimmermann, H. M.**: "Brain tumors, their incidence and classification in man and their experimental production". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 159, 337-359 (1969).
24. **Zulch, K. J.**, y **Mennel, H. D.**: "Recent results of Chemically induced tumors of the Nervous System". *Proc. VI Int. Cong. Neuropath.*, 60-83. Masson. Paris, 1970.