

CONTRIBUCION AL ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL CANCER

III. ALTERACIONES DE LA CORTEZA SUPRARRENAL EN LA CARCINOGENESIS QUIMICA. *

POR OSCAR MIRO-QUESADA C.

Sección de Bioquímica, Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.

(Recibido para su publicación el 27 de Diciembre de 1948)

Según una hipótesis experimental sobre el mecanismo etiopatogénico del cáncer en el organismo animal planteada en 1943 (10), se hacía la sugerencia que la corteza de la glándula suprarrenal juega un rol preponderante en la etiopatogenia cancerosa.

Dicha hipótesis de trabajo sometida a un diseño experimental adecuado, recibió confirmación parcial para el ratón (pericote), al demostrarse, en forma preliminar, que diferentes grados de actividad cortical ejercen una influencia manifiesta sobre el periodo de latencia de la cancerización química en el ratón de raza C₃H (Strong) (11).

Prosiguiendo dichas investigaciones, el objeto de la presente comunicación es presentar los resultados obtenidos en el estudio histo-químico funcional de la corteza suprarrenal del ratón durante el proceso de la carcinogenesis química.

* Trabajo realizado bajo los auspicios del Instituto Nacional de Higiene y S. P. de Lima en los laboratorios y con la generosa ayuda del Departamento de Anatomía, Sección de Genética, y Departamento de Química Fisiológica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, Conn., U.S.A., 1945.

MATERIAL Y METODOS

Aprovechando parte de la población experimental que se hallaba sometida a un experimento final confirmatorio sobre la correlación existente entre el grado de funcionalismo córtico-suprarrenal y el período de latencia de la carcinogenesis química (ver estudio preliminar (11), se seleccionaron al azar 120 ratones de la raza homocigote cáncer-sensible C₃H (Strong) de 7 ± 1 semanas de edad, integrados por 60 machos y 60 hembras. Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}.$), humedad (40-50%) y dieta ("Nurishmix" y agua de caño ad libitum) durante el tiempo que duró el experimento, viviendo en cajas de madera con virutas en el fondo.

A fin de restringir aun más el error experimental por muestreo, se adoptó un diseño experimental del tipo de "Bloque Randomizado" (Randomized Block Experiment), sorteando alternativamente la población experimental con respecto a sexo y a tratamiento, obteniéndose en esta forma una serie de 60 ratones "tratados" y otra serie de 60 "controles", agrupados en 60 grupos de sexos alternos.

La totalidad de los animales de cada serie fué adrenalectomizada unilateralmente bajo anestesia al éter, extirpándose la glándula suprarrenal izquierda, por convenir dicho tratamiento a los fines del experimento confirmatorio de cuya población experimental se seleccionaron los 120 animales objeto del presente estudio.

En diferentes periodos del post-operatorio los 60 ratones de la serie "tratados", fueron inyectados por vía subcutánea en la región axilar derecha con 0.05 cc. de una solución de 20-Metilcolantreno q.p.* en aceite de Sésamo al 1 %, o sean 0.5 mg. de M-C como dosis cancerígena única por animal tratado. El período de observación total de la población experimental duró 177 días, durante los cuales la aparición de tumores malignos fué confirmada siguiendo la técnica descrita por Shimkin (17). A las dos semanas de diagnosticada la aparición de tumoración local en un individuo de la serie "tratados", se le sacrificó conjuntamente con un animal de la serie "controles" por dislocación cervical, previa pesada de los ratones en balanza sensible al 0.1 gm.

* EDCAN LABORATORIES, 12 Pine Street, South Norwalk, Conn., U.S.A.

Estudio de las Glándulas Suprarrenales — La glándula suprarrenal derecha de cada animal sacrificado fué extirpada, rápidamente liberada de tejido conjuntivo y adiposo sobre papel de filtro Whatman No 4 y pesada en una balanza de torsión sensible al 0.1 mg. Luego las glándulas fueron colocadas individualmente en pequeños tubos con solución de Formol al 10 %, rotuladas y conservadas para su estudio histo-químico.

El examen histo-químico de las glándulas suprarrenales así obtenidas se llevó a cabo empleando la técnica de coloración de Romeis modificada, usando el Sudan IV (Scharlach Rot) y Hematoxilina de contraste en secciones por congelación, previa inclusión en gelatina según Mallory (8). La razón de seleccionarse este método de coloración histo-química se debe al reciente descubrimiento hecho por Long, White y col. (7), (15), (16) del valor de dicha técnica en la demostración histo-química del colesterol total de la corteza suprarrenal; trabajo que confirma el concepto sostenido por Gatenby y Cowdry (5) con respecto a la selectividad del Sudan IV en la tinción histo-química de los esteres de colesterol y ácidos grasos.

RESULTADOS

Los pesos en miligramos de la glándula suprarrenal derecha fresca de cada ratón en ambas series, referidos al peso corpóreo de cada animal (en la serie "tratados" el peso corpóreo incluye el peso del tejido tumoral) y expresados en términos de peso fresco de glándula por 100 gm. de peso corpóreo ($\text{peso fresco glándula} / 100 \text{ gm. peso corpóreo}$) fueron sometidos a un análisis matemático-estadístico, empleando la función logarítmica de los datos experimentales en el Análisis de Variante según Bliss (2).

Debe mencionarse que durante el curso del experimento murieron 6 animales de la serie "tratados" y 4 de la serie "controles", motivo por el cual fué necesario eliminar por sorteo 2 individuos más de la serie "controles" a fin de balancear adecuadamente el diseño experimental en "Bloque Randomizado". Por lo tanto, el total efectivo de la población al finalizar el experimento quedó reducido a 108 individuos divididos en dos series de 54 animales cada una ("tratados" y "controles") y agrupados en 54 grupos de sexos alternos.

CUADRO I

Análisis de Varianza para Diseño Experimental en "bloque randomizado" del peso de las Glándulas Suprarrenales de 2 Series de Peritos (C.H. (Stroud), con un total de 34 machos y 34 hembras entre ambas Series. Serie Tratados: Animales con Tumores Meduloadrenélicos. Serie Controles: Animales Normales.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Variante	Cociente de la variante	P
Entre Sexos	53	0.916137	0.017285	1.45	> 0.20
Entre Tratamientos . . .	1	0.522084	0.522084	43.93	< 0.001
ERROR (Interacción entre Sexos y Tratamientos) . .	53	0.619893	0.011875 (S ²)		
TOTAL	107	2.058104			
Corrección para la Media	1	101.380839			
			$S = \pm \sqrt{0.011885} = \pm 0.108018$		

Los resultados del Análisis de Variante en "Bloque Randomizado", con respecto a Sexo y a Tratamiento, pueden apreciarse debidamente en el Cuadro I:

Adquiere especial interés el hecho, que el Punto de Probabilidad "P" entre Sexos para ambas series es mayor que 0.20 mientras que la misma medida de Probabilidad Estadística es menor que 0.001 en la comparación matemática entre Tratamientos para las dos series. Es decir, que la diferencia de sexos en la población experimental no ha influenciado en absoluto las alteraciones del peso observadas en la glándula suprarrenal de las dos series; pudiendo afirmarse categóricamente, que la diferencia observada entre el peso de las glándulas de la serie "tratadas" y la serie "controles" se debe sólo y exclusivamente al proceso de carcinogenesis química en la primera, ya que dicha diferencia acusa un alto grado de significado estadístico ($P < 0.001$).

El valor ponderal encontrado del promedio de distribución de pesos de la glándula suprarrenal fresca de cada serie, expresado en mg. glándula fresca / 100 gm. peso corpóreo, más el correspondiente Error Standard, es como sigue:

CUADRO II

Serie "Tratados"	Serie "Controles"	Δ
8.196 ± 1.338 mg	11.299 ± 1.397 mg.	3.103 ± 0.059 mg.

La distribución de pesos de las glándulas suprarrenales se ilustra en los Histogramas comparativos de la Fig. 1, los que expresan en forma gráfica la normalidad de la distribución en ambas series experimentales.

Por otro lado el estudio histo-químico de las glándulas suprarrenales de los animales de ambas series, mostró una disminución muy marcada (en la mayoría de los casos completa) del material sudanofílico de la corteza suprarrenal en los individuos de la serie "tratados", contrastando en forma notable con el contenido normal en material sudanofílico del tejido cortical de los ratones de la serie "controles": lo que puede apreciarse en las microfotografías de la Fig. 2.

Como se observa claramente en dichas láminas, el material sudanofílico y por ende el colesterol total en la glándula normal (Microfotografía 1) se halla preferentemente acumulado en los espongiosos de la zona fascicular de la corteza. En la glándula correspondiente al animal cancerizado químicamente (Microfotografía 2), los espongiosos fascicula-

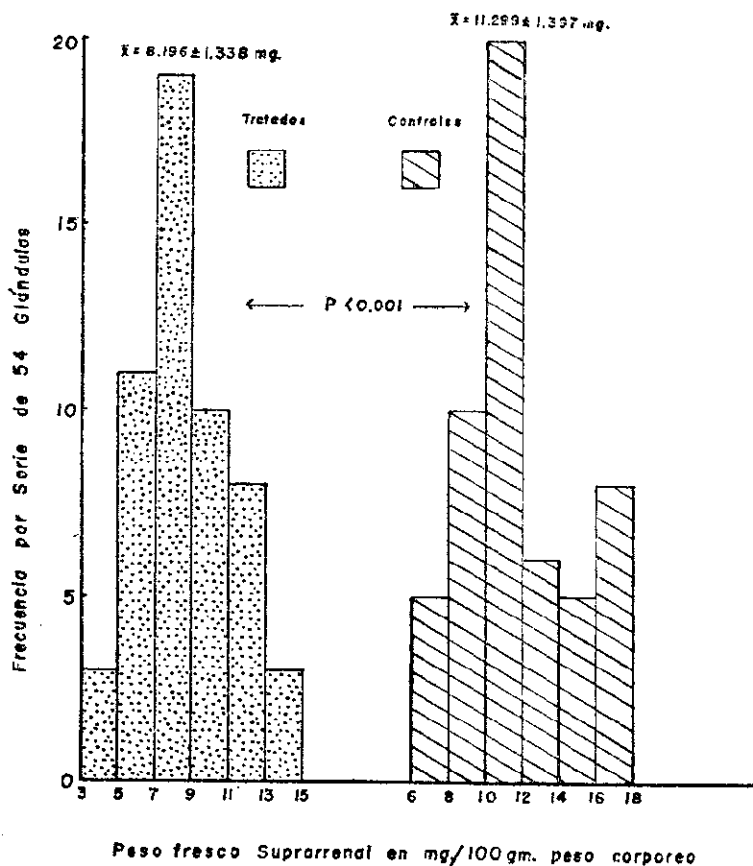
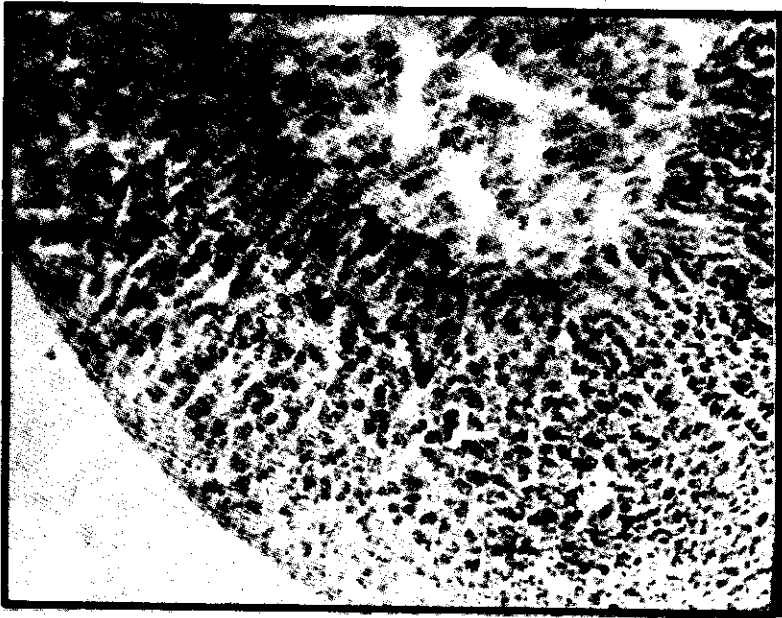


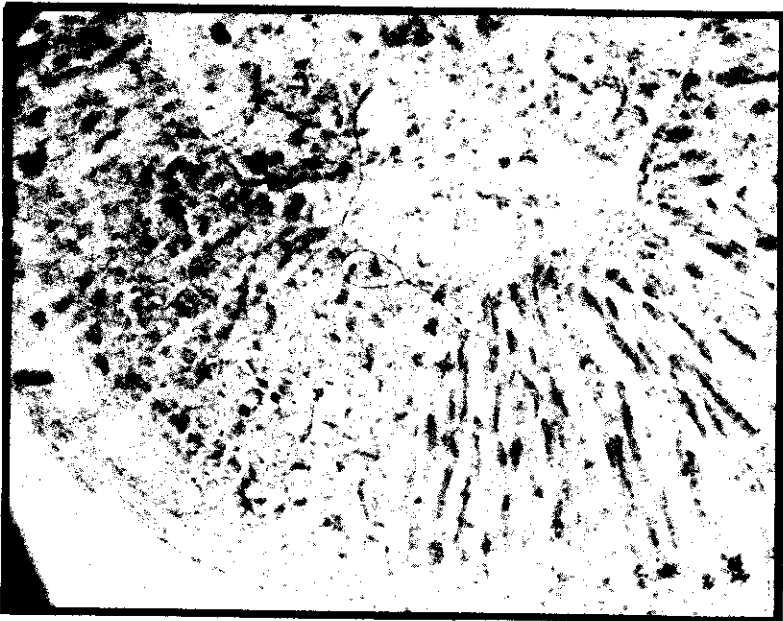
Fig. 1 — Histogramas comparativos de la frecuencia de distribución de los pesos de las glándulas suprarrenales en la serie de ratones "tratados" con 20-Metilcolentina y la serie "controles". La diferencia de pesos entre las dos series debida al tratamiento, acusa un alto grado de significado estadístico, como lo indica el punto de Probabilidad "P". Los promedios del valor ponderal de cada serie expresados en mg. glándula fresca / 100 gm. peso corpóreo más su correspondiente Error Standard, se hallan consignados en la parte superior de cada histograma.

LAMINA I



MICROFOTOGRAFIA

No. 1



MICROFOTOGRAFIA

No. 2

res se encuentran tan sólo coloreados por la Hematoxilina de contraste, no observándose ningún rastro tintorial correspondiente a la acumulación del colesterol total en la glándula.

DISCUSION

Es de interés hacer notar el hecho, que durante el proceso de carcinogénesis química en el ratón se ha podido observar una atrofia relativa de la glándula suprarrenal, expresada en reducción ponderal de la masa glandular, contrastando con un estado funcional de hiperactividad cortical, como lo atestigua el estudio histo-químico de la glándula.

Según lo han demostrado Long, White y col. (7), (15), (16) la acumulación de material sudanofílico en la corteza suprarrenal paralela exactamente a la acumulación de colesterol total en la glándula: fenómeno histo-químico funcional, que se halla en función directa del estado hipoactivo o de reposo fisiológico de la corteza. En cambio, la disminución de material sudanofílico y por lo tanto de colesterol total, es indicación inequívoca de hiperactividad funcional de la glándula. De donde se puede inferir que durante la carcinogénesis química en el ratón se produce un desequilibrio funcional de la corteza suprarrenal, traducido por un estado de "atrofia-hiperactiva" de la glándula. Es evidente que el vocablo constituye una contradicción de términos, pero por los resultados obtenidos en el presente trabajo es imposible catalogar el cuadro cortical observado dentro de los cinco tipos de reacción funcional de la glándula suprarrenal descritos por Long y col. (7); ya que los cuatro primeros tipos reaccionales incluyen "hiperactividad" funcional (disminución de colesterol) con "hipertrofia glandular" (aumento ponderal de masa glandular), y el quinto, "hipoactividad" (acumulación de colesterol) con "atrofia" de la corteza (reducción ponderal de masa glandular). Las alteraciones observadas en la glándula suprarrenal durante la cancerización química materia de esta comunicación, constituyen pues un nuevo tipo de reacción funcional de dicha glándula.

En un hecho ya clásico en cancerología que la inducción de neoplasmas por medio de sustancias cancerígenas (Hidrocarburos policíclicos de anillos bencenoides condensados) constituye el fenómeno biológico experimental que más se aproxima al cuadro de la oncogénesis espontánea, puesto que las técnicas de trasplante o injerto tumoral no reprodu-

cen el hecho fisiopatológico de la tumorigénesis, sino meramente constituyen la prolongación del desarrollo tumoral en un nuevo huésped.

Adquieren pues gran valor comparativo con los resultados obtenidos en el presente trabajo los estudios realizados por Vicari (21). Este investigador empleando la técnica de coloración histo-química de Romeis con Sudan III y la reacción positiva de Schultz para colesterol tisular, estudió el contenido de material sudanofílico y colesterol de las glándulas suprarrenales de ratones homocigotes con alta y baja incidencia de adeno-carcinomas espontáneos de la glándula mamaria. El resultado de dichas investigaciones revela que existe un paralelismo manifiesto entre la alta incidencia de cánceres mamarios espontáneos y la disminución del material sudanofílico y colesterol en la corteza suprarrenal, mientras que los ratones con baja incidencia de este tipo de neoplasmas espontáneos presentan concentración normal o hiperconcentración de dichos lípidos en la corteza de la glándula. En otras palabras, en el cáncer espontáneo del ratón también se observa hiperactividad funcional en contraste con los animales normales o cáncer-resistentes.

Al haber omitido Vicari en su trabajo el estudio ponderal de la masa glandular, es imposible saber si la hiperactividad funcional córtico-suprarrenal en el cáncer espontáneo del ratón se halla también asociada a una atrofia parcial de la glándula, ya que la literatura no registra estudio semejante hasta la fecha.

Dalton y Peters (3) en una investigación histo-química de los lípidos totales osmófilos de la corteza suprarrenal en ratones con cánceres injertados, llegan a la conclusión que la disminución de lípidos totales de la corteza se debe al estado caquéctico inducido por el cáncer de grado avanzado en dichos animales. Estos resultados carecen de valor comparativo con los obtenidos en el presente trabajo, ya que no se trata de neoplasmas espontáneos ni de coloración selectiva de esteroides corticales.

Sin embargo, los trabajos de Sokoloff (18), Sure y col. (20), Oike (13), Ball y Samuels (1), McEuen y Selye (9) y Murphy y Sturm (12), coinciden en describir hipertrofia de la glándula suprarrenal en cánceres animales. Dichas observaciones carecen también de valor comparativo por tratarse de tumores injertados y no espontáneos en la mayoría de los casos y por haberse realizado, por lo general, en poblaciones expe-

rimentales restringidas. A pesar de ello es importante recalcar los resultados a que llega Sokoloff en un trabajo más reciente, del cual se desprende que el proceso canceroso se halla asociado a un desequilibrio córtico-suprarrenal (19).

En conexión con los trabajos arriba mencionados adquiere especial interés el reciente estudio hecho por Savard (14) de las alteraciones bioquímico-funcionales de la glándula suprarrenal en ratones injertados con Sarcoma 180. Dicho autor encuentra, en un estudio bien balanceado desde el punto de vista estadístico, empleando 46 ratones injertados y 46 controles, que la hipertrofia glandular e hiperactividad funcional de la corteza suprarrenal (expresada en nivel de Acido Ascórbico glandular (16) paralelan estrictamente al desarrollo del injerto neoplásico. Es decir, según la clasificación de reacción funcional de la corteza suprarrenal de Long y col., correspondería al tipo III de dicha clasificación (7).

Para terminar debe mencionarse el trabajo de Larionow (6) como el primero en emplear un hidrocarburo cancerígeno químicamente puro en el estudio de las alteraciones de las glándulas endocrinas resultantes del proceso de cancerización gradual en el ratón. Desgraciadamente, los resultados especulativos a que llega este investigador de la escuela de Leningrado no se apoyan en técnicas experimentales de buen diseño estadístico, ya que el escaso número de animales tratados y deficiente cantidad de controles (12 ratones) no proporcionan bases experimentales que justifiquen conclusiones con significado estadístico.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

1 — Se hace un estudio crítico histo-químico funcional de la corteza suprarrenal en ratones homocigotes $C_{57}H$ (Strong) sometidos a la cancerización química con 20-Metilcolantreno.

2 — Se describe un nuevo tipo de reacción funcional de dicha glándula bajo las condiciones experimentales empleadas, sugiriéndose la denominación de "atrofia-hiperactiva", en contraste con las alteraciones histo-químico funcionales de la corteza suprarrenal descritas por varios autores en animales portadores de injertos neoplásicos, las que corresponden al tipo de reacción funcional de la glándula caracterizado por "hipertrofia-hiperactiva".

3 — Los resultados obtenidos sugieren la intervención del sistema endocrino, via la corteza suprarrenal, durante el proceso de carcinogenesis química en el ratón homocigote de raza C_3H (Strong).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1 — A critical study is made of the functional-histochemical alterations in the adrenal cortex of strain C_3H (Strong) mice under chemical carcinogenesis with 20-Methylcholanthrene.

2 — A new type of functional response of the gland is described under such experimental conditions, suggesting a state of "hyperactive-atrophy" in the cortex, contrasting with the functional-histochemical changes described in the literature for transplanted-tumor-bearing mice; alterations that fit rather closely the type response of Long et al. characterized by a state of "hyperactive-hypertrophy" of the gland.

3 — The experimental results suggest the participation of the endocrine system via the adrenal cortex in the mechanism of chemical carcinogenesis in the mouse of the C_3H (Strong) strain.

Desearnos expresar nuestro sincero agradecimiento a los doctores G. N. H. Long y A. White, Profesor principal y Profesor asociado del Departamento de Química Fisiológica, y a los doctores W. U. Gardner y L. C. Strong, Profesor principal y Profesor asistente del Departamento de Anatomía de la Escuela de Medicina de Yale por sus valiosos consejos y generoso apoyo en la consecución del presente trabajo.

Así mismo, agradecemos la eficiente ayuda de los señores Carlos Battistini V., Carlos Roe G. y Raúl Rebagliatti G., Asistentes de la Sección Bioquímica del Instituto Nacional de Higiene y S. P. de Lima, en el análisis matemático de los datos experimentales y mecanografía del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. BALL, H. A. & SAMUELS, A. T.: *Proc. Soc. Exper. Biol & Med.*, 88: 441, 1938.
2. BLISS, C. I.: *Curso de Bioestadística y Ensayos Biológicos, Departamento de Farmacología, Yale School of Medicine, Yale University*, 1945.
3. DALTON, A. J. & PETERS, V. B.: *J. Nat. Cancer Inst.*, 5: 99, 1944-45.
4. DOUGHERTY, T. F. & WHITE, A.: *Endocrinology*, 35: 1, 1944.
5. GATENBY, J. B. & COWDRY, E. V.: *Bolles Lee's "Microtomist's Vade-Mecum"*. P. Blakiston's Son & Co., Philadelphia, 1928.
6. LARIONOW, L. TH.: *Am. J. Cancer*, 38: 492, 1940.
7. LONG, C. N. H., SAYERS, G., SAYERS, M. A., FRY E. G. & WHITE, A.: *Yale J. Biol & Med.*, 16: 361, 1944.
8. MALLORY, F. B.: *"Pathological Technique"*. W. B. Saunders Co., Philadelphia & London, 1938.
9. McEuen, D.S. & SELYE, H.: *Am. J. Med. Sc.*, 189: 433, 1935.
10. MIRÓ-QUESADA C., OSCAR: *Rev. Med. Exper. (Lima)*, 2: 131, 1943.
11. MIRÓ-QUESADA C., OSCAR: *Rev. Med. Exper. (Lima)*, 4: 18, 1945.
12. MURPHY, J. B. & STURM, E.: *Cancer Research*, 7: 417, 1948.
13. OIKE, M.: *Trans. Jap. Path. Soc.*, 20: 655, 1930.
14. SAVARD, K.: *Science*, 108: 381, 1948.
15. SAYERS, G., SAYERS, M. A., WHITE, A. & LONG, C. N. H.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 52: 200, 1943.
16. SAYERS, G. SAYERS, M. A., TSANG-YING, LIANG & LONG, C. N. H.: *Endocrinology*, 38: 1, 1946.
17. SHIMKIN, M. B.: *J. Nat. Cancer Inst.*, 1: 211, 1940.
18. SOKOLOFF, B.: *Arch. f. exper. Zellforsch*, 11: 112, 1931.
19. SOKOLOFF, B., & ARONS, I.: *Am. J. Surgery*, 49: 417, 1940.
20. SURE, B., THEIS, R., HARRELSON, R. & FARBER, L.: *Am. J. Cancer*, 36: 252, 1939.
21. VICARI, E. M. *Anat. Record*, 86: 523, 1943.