

## Tesis de Posgrado

# Análisis de la promoción y progresión tumoral inducidas por peróxido de benzoílo en el modelo de carcinogénesis en múltiples estadios en piel de ratón

Durán, Hebe Alicia

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Durán, Hebe Alicia. (1994). Análisis de la promoción y progresión tumoral inducidas por peróxido de benzoílo en el modelo de carcinogénesis en múltiples estadios en piel de ratón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2658\\_Duran.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2658_Duran.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Durán, Hebe Alicia. "Análisis de la promoción y progresión tumoral inducidas por peróxido de benzoílo en el modelo de carcinogénesis en múltiples estadios en piel de ratón". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2658\\_Duran.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2658_Duran.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

***ANALISIS DE LA PROMOCION Y PROGRESION TUMORAL  
INDUCIDAS POR PEROXIDO DE BENZOILO EN EL  
MODELO DE CARCINOGENESIS EN MULTIPLES ESTADIOS  
EN PIEL DE RATON***

**Autor: Lic. Hebe A. Durán**

**Director: Dr. Beatriz Molinari de Rey**

**Lugar de Trabajo:  
Comisión Nacional de Energía Atómica  
Departamento de Radiobiología**

**Tesis presentada para optar al título de:  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**-1994-**

*Tesis  
2658  
(2 e/s)*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, por su amor, su permanente apoyo y por haberme estimulado desde siempre el interés por la ciencia.*

*A mi Directora de Tesis, la Dra. Beatriz Molinari, por sus enseñanzas, su colaboración y por haber trabajado a la par mía viajando a donde fuera necesario con los ratones a cuestas.*

*Al Dr. Alberto Boveris, por sus enseñanzas, sus consejos científicos y por haberme hecho sentir como una más de su grupo de trabajo.*

*A los Dres. R. Cabrini, H. Lanfranchi, A. Ubios y A. Schwint por su colaboración desinteresada durante todos estos años.*

*A los Dres. C. Conti y A. Klein-Szanto, por su permanente apoyo incondicional, tanto en el envío de material que facilitó nuestras investigaciones, como en las prolongadas discusiones científicas a pesar de la distancia.*

*A mis compañeros de laboratorio, los que se fueron y los que aún están, Fernando, Jorgito, Mónica, Marcelo, Verónica y Alfonsina, por todos los momentos y las Cocas compartidas.*

*A las Sras. Carmen y Eugenia, por el cuidado del material y el mantenimiento del laboratorio en orden.*

*A mis compañeros y amigos del Departamento de Radiobiología, Rubén, Ramón, Cristina C., Cristina F., Oscar, y en especial a Marcelo V. (quien a pesar de la distancia sigue estando presente), por el buen ambiente de trabajo, la solidaridad y a algunos de ellos por sus enseñanzas bioquímicas.*

*A mis hermanos, Julio, Ricardo y Willy, a quienes les debo la fama de mi apellido en Exactas, por su afecto y por ser los mejores hermanos.*

*A mis amigas y casi hermanas, Laura, Lorena y María Eugenia, por haberme hecho revivir en los momentos más difíciles.*

## INDICE

|   | Página |
|---|--------|
| <b>INTRODUCCION</b>   | 1      |
| 1. Carcinogénesis química   | 1      |
| 1.1. Carcinogénesis en múltiples estadios   | 2      |
| 1.1.1. Iniciación   | 3      |
| 1.1.2. Promoción  | 7      |
| 1.1.3. Progresión   | 8      |
| 2. Radicales libres y defensas antioxidantes  | 10     |
| 2.1. Generación de radicales libres   | 10     |
| 2.2. Mecanismos de defensa antioxidantes  | 12     |
| 3. Radicales libres y carcinogénesis  | 15     |
| 3.1. Radicales libres en la iniciación  | 16     |
| 3.2. Radicales libres en la promoción   | 18     |
| 3.2.1. Mecanismos posibles de acción de los radicales libres<br>en la promoción tumoral | 22     |
| 3.3. Radicales libres en la progresión  | 22     |
| <b>OBJETIVOS</b>  | 24     |
| <b>MATERIALES Y METODOS</b>   | 26     |
| 1. Animales   | 26     |
| 2. Obtención de células epidérmicas aisladas para estudios <i>in vitro</i>              | 26     |
| 3. Tratamientos <i>in vivo</i>  | 27     |
| 3.1. Tratamientos simples con promotores tumorales                                      | 28     |
| 3.2. Tratamientos múltiples con promotores tumorales                                    | 29     |
| 3.3. Inducción de tumores   | 29     |
| 4. Evaluación de las respuestas   | 31     |
| 4.1. Evaluación de estrés oxidativo   | 31     |
| 4.1.1. Determinación de quimioluminiscencia en células<br>epidérmicas aisladas          | 32     |
| 4.1.2. Determinación de quimioluminiscencia <i>in vivo</i>                              | 32     |
| 4.2. Evaluación de enzimas antioxidantes  | 35     |
| 4.2.1. Determinación de actividad de superóxido dismutasa<br>y catalasa                 | 35     |

|   |           |
|---|-----------|
| a) Determinación de actividad de superóxido dismutasa   | 35        |
| b) Determinación de actividad de catalasa   | 37        |
| c) Determinación de proteínas   | 38        |
| 4.2.2. Evaluación del contenido de ARNm de superóxido dismutasa                                   | 38        |
| a) Aislamiento de ARN total   | 38        |
| b) Electroforesis de ARN y transferencia a membranas de nylon<br>(northern blot)                  | 39        |
| c) Hibridización de ARN   | 41        |
| 4.3 Evaluación de alteraciones morfológicas   | 42        |
| 4.3.1. Técnicas de microscopía óptica   | 43        |
| a) Evaluación de espesor epitelial  | 43        |
| b) Evaluación de regiones organizadoras del nucleolo  | 44        |
| c) Evaluación de mastocitos   | 45        |
| 4.3.2. Técnica de microscopía electrónica   | 46        |
| 4.4. Evaluación de promoción y progresión tumoral   | 47        |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>49</b> |
| 1. Evaluaciones de estrés oxidativo   | 49        |
| 1.1. Determinación de QL inducida por la acción de oxidantes en<br>células epidérmicas aisladas   | 49        |
| 1.2. Determinación <i>in vivo</i> de QL inducida por promotores tumorales<br>en piel              | 54        |
| 1.2.1. Tratamientos con peróxido de benzoílo  | 54        |
| a) QL inducida por tratamientos únicos con BzPo y su<br>modulación por la acción de antioxidantes | 54        |
| b) QL inducida por tratamientos múltiples con BzPo  | 62        |
| 1.2.2. Tratamientos con TPA   | 66        |
| a) Determinación de QL en ratones con tratamientos<br>simples con TPA                             | 66        |
| b) QL inducida por tratamientos múltiples con TPA   | 66        |
| 2. Evaluaciones de enzimas antioxidantes  | 68        |
| 2.1. Determinación de actividad de SOD y catalasa   | 68        |
| 2.1.1. Modulación de actividad de SOD y catalasa por un único<br>tratamiento con TPA o BzPo       | 68        |
| 2.1.2. Modulación de actividad de SOD y CAT durante la<br>promoción tumoral                       | 71        |
| 2.2. Determinación de ARNm de SOD   | 75        |

|  |            |
|--|------------|
| 3. Evaluación de alteraciones morfológicas durante la promoción y progresión tumoral | 77         |
| 3.1. Evaluación del espesor epitelial  | 77         |
| 3.2. Evaluación de regiones organizadoras del nucleolo                               | 80         |
| 3.3. Evaluación de alteraciones celulares en la dermis.                              |            |
| Caracterización de las poblaciones de mastocitos                                     | 84         |
| 3.4. Análisis ultraestructural: epidermis y dermis                                   | 87         |
| 4. Evaluación de la promoción y progresión tumoral                                   | 91         |
| 4.1. Cuantificación de tumores a lo largo del proceso de promoción                   | 91         |
| 4.1.1. Promoción tumoral inducida por BzPo   | 91         |
| 4.1.2. Promoción tumoral inducida por TPA  | 94         |
| 4.2. Caracterización histológica de los tumores                                      | 97         |
| 4.2.1. Promoción y progresión tumoral con BzPo                                       | 100        |
| 4.2.2. Promoción y progresión tumoral con TPA  | 105        |
| <b>DISCUSION</b>   | <b>108</b> |
| 1. Evaluaciones de estrés oxidativo  | 109        |
| 2. Enzimas antioxidantes   | 115        |
| 3. Alteraciones morfológicas   | 121        |
| 4. Promoción y progresión  | 127        |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>132</b> |
| <b>REFERENCIAS</b>   | <b>134</b> |

## **INTRODUCCION**

### **1. CARCINOGENESIS QUIMICA**

El primer modelo experimental en animales para la inducción de carcinomas por sustancias químicas aplicadas a la epidermis fue desarrollado hace ochenta años por Yamagiwa y col. (1). Estas investigaciones fueron llevadas a cabo a fin de evaluar el desarrollo de cáncer de piel en trabajadores expuestos al petróleo y sus derivados. Desde entonces, se ha avanzado mucho en la identificación de sustancias químicas carcinogénicas y en el conocimiento de las dosis y tratamientos capaces de inducir lesiones benignas y malignas en piel de animales experimentales.

En el año 1964, Boutwell (2) distinguió la iniciación y promoción como pasos cualitativamente diferentes en la carcinogénesis en piel. El estudio de dichos pasos como componentes del proceso de carcinogénesis es importante en el análisis de riesgos carcinogénicos en modelos animales, que pueden tener relevancia en humanos. Existen un gran número de sustancias que a bajos niveles de exposición no generan neoplasmas en animales experimentales; sin embargo, la combinación específica de diferentes compuestos (iniciador y promotor) puede inducir la formación de tumores benignos y malignos. En general, la exposición del hombre a carcinógenos se da a un nivel tan bajo que es insuficiente para causar cáncer. Sin embargo, los hombres están expuestos a gran cantidad de agentes diferentes. Es importante analizar si entre las combinaciones de diferentes agentes, existe un sinergismo análogo al observado en los animales de laboratorio.

## 1.1. CARCINOGENESIS EN MULTIPLES ESTADIOS

La inducción de cáncer por sustancias químicas está caracterizada por diferentes estadios de evolución celular, desde células normales, pasando por células preneoplásicas y premalignas hasta la formación de neoplasias altamente malignas.

En modelos experimentales de carcinogénesis en piel de ratón se han descrito tres estadios: iniciación, promoción y progresión (2-5), los cuáles pueden ser definidos operativamente mediante el uso de diferentes agentes químicos.

La fase de iniciación es un fenómeno de alteración génica que resulta de la interacción de un carcinógeno con el ADN, siendo esta fase esencialmente irreversible. La etapa de iniciación, sin la subsiguiente etapa de promoción, no genera tumores.

La fase de promoción es un fenómeno de activación génica, en la cual se expresa el fenotipo latente de las células iniciadas a través de selección y expansión clonal. Las sustancias promotoras no son carcinogénicas y en ausencia de iniciación producen cambios reversibles en la proliferación y expresión fenotípica de las células. La aplicación secuencial de una dosis subumbral de un carcinógeno, que actúa como iniciador, seguida por tratamiento repetitivo con un promotor no carcinogénico induce la formación de tumores benignos.

La fase de progresión es el proceso por el cual una lesión benigna se transforma en un tumor con características malignas. Se postula que la progresión tumoral estaría dada por un segundo evento de alteración génica, cuyo resultado neto sería la transformación irreversible de una o más células del tumor benigno en células cancerosas de crecimiento autónomo.

Los tumores de piel pueden también ser inducidos por una única aplicación de una dosis alta de un compuesto carcinogénico como el DMBA o



por aplicaciones repetidas de una dosis subcarcinogénica de dicho compuesto (carcinogénesis completa) (6). Los tumores originados mediante estos protocolos de experimentación son teóricamente el resultado de ambas capacidades combinadas del carcinógeno como iniciador y promotor.

La Figura 1 muestra los distintos protocolos experimentales usualmente aplicados para la inducción de tumores, incluyendo la carcinogénesis completa y el modelo de iniciación-promoción (5).

El concepto de carcinogénesis en múltiples estadios ha sido extendido a otros tejidos. Se han descrito modelos similares en muchos tejidos epiteliales de diversas especies, incluyendo hígado, pulmón, riñón, glándulas mamarias, páncreas, esófago, estómago y colon, y en células en cultivo (7). Dichos hallazgos sugieren que la carcinogénesis en múltiples estadios es un concepto más general y que por lo tanto podría ser importante en la etiología del cáncer humano.

### **1.1.1. INICIACION**

La iniciación tumoral en piel de ratón es un estadio irreversible que involucra una mutación somática, que implicaría una alteración en la información genética relacionada con el control de la proliferación y la diferenciación celular. Existen datos experimentales que muestran una buena correlación entre la capacidad carcinogénica y la actividad mutagénica de diversos compuestos químicos (8).

Hay una gran cantidad de agentes químicos que son efectivos como carcinógenos completos o como iniciadores tumorales. Dichos compuestos carcinogénicos pueden actuar directamente o requerir metabolización para ejercer su acción.

Figura 1. Protocolos experimentales de carcinogénesis química

|   | Iniciación | Promoción           | Tumores |
|---|------------|---------------------|---------|
| a | ■ ■        |                     | +       |
| b | ■          |                     | -       |
| c | ■ ■        | ■                   | ++      |
| d | ■          |                     | -       |
| e |            | x x x x x x x x x x | -       |
| f | ■          | x x x x x x x x x x | +++     |
| g | ■          | x x x x x x         | +       |
| h | ■          | x x x x             | -       |

■ DMBA      x TPA

- a) Una dosis elevada única de un carcinógeno como el DMBA es capaz de inducir tumores benignos y carcinomas (carcinogénesis completa).
- b) Una dosis menor del carcinógeno no genera tumores.
- c) Con dosis menores se necesita repetir la administración del carcinógeno para inducir tumores.
- d) Cuando se disminuye aún más la dosis del carcinógeno, se llega a una dosis subumbral, con la cual no se generan tumores.
- e) La aplicación repetida del promotor (TPA), sin iniciación previa, no genera tumores.
- f) Si subsecuentemente a la aplicación de una dosis subumbral única del carcinógeno (iniciador), se aplican dosis repetidas del promotor aparecerán tumores benignos y posteriormente carcinomas.
- g) y h) Si la frecuencia de aplicación del promotor no es la óptima, la cantidad resultante de tumores disminuirá.

La mayoría de los agentes iniciadores son o se convierten metabólicamente en reactivos electrofílicos, los cuales pueden unirse covalentemente al ADN o a otras macromoléculas (9).

Una de las principales clases de carcinógenos químicos, que tienen actividad como carcinógenos completos o como iniciadores en piel de ratón, son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH).

Hasta la década del setenta no se conocían los "targets" críticos de la acción mutagénica de los carcinógenos químicos. El descubrimiento de los proto-oncogenes (10,11), y el hecho de que tengan un papel importante en el control de la proliferación y la diferenciación celular, sugirió que dichos genes podrían ser activados por la acción de compuestos químicos ambientales. Esta posibilidad fue apoyada por la demostración de múltiples mecanismos de activación de estos genes, incluyendo mutaciones puntuales, amplificación génica, deleciones o translocaciones (12). Todas estas alteraciones genéticas pueden ser inducidas por diversos mutágenos químicos.

La familia de proto-oncogenes *ras* es de especial interés dado que el oncogen Harvey-*ras* (Ha-*ras*) fue el primer oncogen descrito en cáncer humano (13) y además los oncogenes *ras* son los genes transformantes que más frecuentemente se han encontrado activados tanto en tumores humanos como en roedores (14,15). Experimentos evaluando el papel de los oncogenes en la carcinogénesis en piel de ratón, mostraron que un miembro de esta familia de genes, el gen Ha-*ras*, se encuentra activado tanto en papilomas como en carcinomas iniciados con PAH (16,17). Dichos resultados sugirieron que la activación del gen Ha-*ras* en la carcinogénesis en piel de ratón sería un evento temprano potencialmente asociado con la iniciación tumoral. La detección de mutaciones específicas inducidas por iniciadores y la demostración de que un gen *ras* activado puede iniciar tumores en piel de

ratón (18) apoyan la idea de que, al menos en algunos sistemas de carcinogénesis, la iniciación involucra una mutación directa de un gen *ras*.

Estudios realizados con una variedad de carcinógenos como iniciadores en combinación con diferentes promotores mostraron que la naturaleza del oncogen activado, como así también el tipo de mutación observada en los casos que está activado el oncogen *Ha-ras*, es dependiente del agente usado como iniciador e independiente del agente usado como promotor (12,19). Estos resultados apoyan la hipótesis de que las mutaciones en el oncogen *ras* son inducidas en un estadio temprano de la carcinogénesis, particularmente en el momento de la iniciación.

Los genes *ras* codifican para proteínas de 21 kD (p21) (20) que unen nucleótidos de guanina y se encuentran ancladas en la superficie interna de la membrana plasmática. Estas proteínas actúan como segundos mensajeros transmitiendo señales desde receptores activados de la superficie celular a elementos regulatorios del citoplasma (21). La p21 unida a GDP se encuentra en estado inactivo y es activada por una señal que causa la liberación de GDP y la unión de GTP. Esta proteína activada tiene actividad de GTPasa intrínseca, la cual es marcadamente incrementada por su unión a una proteína activadora de GTPasa (GAP) (22), aumentando por lo tanto la hidrólisis de GTP a GDP y volviendo rápidamente a su estado inactivo. Las p21 mutantes son deficientes en su actividad de GTPasa (23,24), por lo tanto, al no hidrolizar GTP se mantiene por tiempos prolongados el estado activado.

Aunque no está clarificado el mecanismo por el cual los genes *ras* regulan la proliferación celular, mediante la introducción de anticuerpos anti-p21 en cultivos de células se ha demostrado que la p21 es necesaria para la estimulación por suero de la síntesis de ADN y de la división celular (25).

Las mutaciones en el gen *ras* podrían alterar los mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación celular. Estudios *in vitro* han demostrado que los queratinocitos transformados muestran una respuesta

alterada a las señales que inducen diferenciación terminal (26). Las células epidérmicas de ratón transformadas con DMBA contienen una mutación en el gen *Ha-ras*, la cual está estrechamente ligada con el fenotipo neoplásico (27). Un fenotipo similar se presenta cuando el gen *Ha-ras* viral es introducido en queratinocitos normales, sugiriendo que un gen *ras* mutado sería suficiente para producir los cambios bioquímicos necesarios para producir la transformación epidérmica benigna (28).

La respuesta diferencial a los mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación entre las células con el gen *ras* mutado (iniciadas) y las células normales (no iniciadas) se expresaría *in vivo* por la acción posterior de los promotores tumorales.

### 1.1.2. PROMOCION

La promoción tumoral es un estadio de la carcinogénesis en el cual se induce el desarrollo de una neoplasia benigna a partir de tejido iniciado aún preneoplásico (5,8). Este estadio ha sido caracterizado por el uso de agentes químicos discretos, los cuales no son carcinogénicos por sí solos, pero son capaces de modular la expresión fenotípica tanto en las células iniciadas como en las no iniciadas. Por ejemplo, los promotores tumorales pueden modular la expresión génica induciendo un aumento de la proliferación respecto a la diferenciación de las células iniciadas. Por otro lado, la selección y expansión clonal de las células iniciadas puede ser facilitada como consecuencia de la acción de los promotores acelerando la diferenciación terminal de las células no iniciadas, o cuando son particularmente tóxicos para dichas células. La modulación de la expresión fenotípica por la acción de los promotores puede resultar de una combinación de eventos transcripcionales, traduccionales o post-traduccionales.

Existen una gran diversidad de agentes químicos que pueden actuar como promotores tumorales. A diferencia de los iniciadores que producen un cambio irreversible, las dosis individuales de promotores causan cambios transitorios y reversibles. La aplicación repetitiva de un promotor a un tejido previamente iniciado induce la formación de múltiples tumores luego de un cierto período de latencia (5).

El agente promotor más estudiado y el más potente que se conoce es el tetradecanoil forbol acetato (TPA). No obstante, existe una gran diversidad de compuestos químicos capaces de actuar como promotores tumorales: los diterpenos (ésteres del forbol, entre ellos el TPA), alcaloides indólicos, crisarobina, antralina, peróxidos orgánicos, como peróxido de benzoílo (BzPo).

En general, los promotores generan una serie de cambios epigenéticos, que podrían ser importantes en el proceso de inducción de tumores. Los ésteres del forbol y muchos otros promotores causan inflamación, hiperplasia epidérmica, inducción de la actividad de ornitina decarboxilasa (ODC) con el consecuente aumento de poliaminas (29-31).

Los ésteres del forbol inducen cambios que parecen estar mediados por su interacción con receptores de membrana específicos (32), mientras que otros promotores tales como el BzPo y la antralina no actuarían a través de este receptor y sus efectos podrían estar mediados por la acción de radicales libres (5).

### **1.1.3. PROGRESION**

La progresión tumoral es el estadio de la carcinogénesis mediante el cual una lesión benigna se transforma en una neoplasia maligna. Si bien existen numerosos trabajos experimentales sobre los mecanismos involucrados en las fases de iniciación y promoción, menor es la información

bibliográfica existente sobre el estadio de progresión en la carcinogénesis en piel (5).

Las sustancias activas en la conversión maligna son genotóxicas, tales como agentes iniciadores (33) y peróxidos orgánicos (34,35). Por lo tanto, se postula que la fase de progresión se daría como consecuencia de un segundo evento de alteración génica.

Analizando las características de los tumores benignos y malignos inducidos en piel de ratón se han descrito diversas alteraciones bioquímicas que aparecen durante la promoción y se continúan o aumentan durante la progresión, tales como el aumento en el contenido de poliaminas y de prostaglandinas (31). Existen otra serie de eventos que aparecen muy tarde en el proceso de carcinogénesis y que estarían relacionados con la conversión maligna, tales como la falta de productos proteicos de diferenciación, como queratinas de alto peso molecular, o la presencia de actividad de  $\gamma$ -glutamyl-transferasa (36). Se ha descrito que las alteraciones cromosómicas numéricas estarían íntimamente relacionadas con este estadio de progresión (37).

## 2. RADICALES LIBRES Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES

### 2.1. GENERACION DE RADICALES LIBRES

Durante las últimas décadas los efectos de la generación de radicales libres en los sistemas biológicos han sido objeto de numerosos estudios (38-42). Los radicales libres juegan un papel importante en muchas reacciones bioquímicas del metabolismo normal de las células (43). Principalmente, los radicales libres son formados como intermediarios en los sistemas de transporte de electrones mitocondrial y microsomal. En los organismos aeróbicos el oxígeno molecular juega un papel importante como aceptor de electrones, particularmente como aceptor final en el sistema de transporte de electrones mitocondrial. Se ha demostrado que el oxígeno actúa como mediador en una variedad de reacciones de radicales libres en las células.

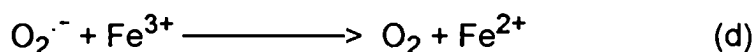
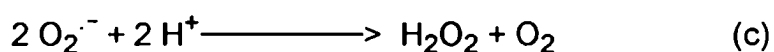
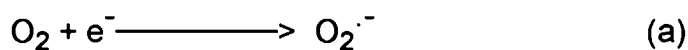
Numerosas evidencias experimentales indican que radicales libres derivados del  $O_2$  son mediadores de diversas formas de daño tisular, tales como daños asociados con respuestas inflamatorias o daños resultantes del metabolismo intracelular de drogas (38-43).

La reducción del  $O_2$  a  $H_2O$  requiere cuatro electrones. La mayor parte del consumo biológico de  $O_2$  (98 %) ocurre en las mitocondrias por la acción de la enzima citocromo c oxidasa que reduce el  $O_2$  a  $H_2O$  sin la formación de formas intermediarias de oxígeno reducido. Sin embargo, una pequeña porción del  $O_2$  consumido es reducido parcialmente en vías específicas generando intermediarios de reducción como el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). La formación secuencial de dichos radicales libres de  $O_2$  se muestra en la Figura 2. La reducción de la molécula de  $O_2$  por un sólo electrón produce el radical  $O_2^{\cdot-}$  (a), el cual existe en equilibrio con una forma protonada, el radical perhidroxilo

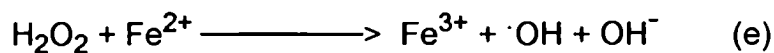


$\text{HO}_2\cdot$  (b). La dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  genera  $\text{H}_2\text{O}_2$  (c), que a su vez puede ser reducido por metales presentes en los tejidos formándose  $\cdot\text{OH}$  mediante la reacción de Fenton (e). El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden interactuar *in vivo* para formar  $\cdot\text{OH}$ , siendo esta reacción catalizada por trazas de iones metálicos de transición (reacción de Haber-Weiss) (f).

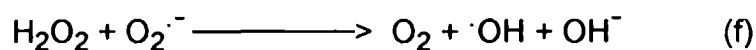
Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno



Reacción de Fenton:



La suma de las reacciones (d) y (e) se conoce como la reacción de Haber-Weiss:



Por otro lado, la interacción de xenobióticos con diversos sistemas enzimáticos resultan en la generación de radicales libres, algunos de los cuáles pueden también activar  $\text{O}_2$  mediante la reducción univalente a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

A diferencia tanto del  $\text{O}_2$  como del  $\text{H}_2\text{O}$ , que son especies relativamente estables y no reactivas, los tres intermediarios de reducción

( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$ ) son altamente reactivos. Otra forma de oxígeno reactivo que puede generarse en los sistemas biológicos es el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el cual se origina cuando uno de los dos  $e^-$  no apareados del oxígeno molecular absorbe suficiente energía para producirse inversión del spin. La generación de  $^1O_2$  puede ocurrir en diversas reacciones, tales como, durante la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$ , o como uno de los productos de la reacción de Haber-Weiss, o como producto de la reacción de hipoclorito con  $H_2O_2$  en células fagocíticas.

Los intermediarios de reducción del oxígeno, así como también el  $^1O_2$  pueden interactuar con moléculas de importancia biológica, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Los procesos iniciados por radicales libres son perjudiciales para las células, dado que las interacciones de radicales libres con las biomoléculas producen radicales libres secundarios y terciarios derivados de aminoácidos, ácido ascórbico, glutatión, lípidos y componentes de ácidos nucleicos.

## 2.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES

Las células aeróbicas han desarrollado mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos, los cuáles protegen contra las reacciones mediadas por radicales libres (39-41).

Las enzimas responsables de la detoxificación de las especies reducidas de oxígeno son:

a) Superóxido dismutasas (SOD) (44): es un grupo de enzimas que catalizan la conversión de anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Figura 3). En células eucariontes se han caracterizado dos tipos de SOD, una de ellas contiene cobre y zinc como grupos prostéticos y se

encuentra en el citosol; la otra contiene manganeso y su ubicación es mitocondrial.

b) Catalasa: es una hemoproteína que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Figura 3); dicha enzima se encuentra localizada principalmente en una organela especial, el peroxisoma.

c) Glutación peroxidasas: es un grupo de enzimas involucradas también en la remoción de peróxido de hidrógeno, catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno a agua utilizando el tripéptido glutatión (GSH) como agente reductor (Figura 3). Dichas enzimas están localizadas en mitocondrias y en citosol. La glutatión peroxidasa es específica para el agente reductor glutatión, pero no es específica para el hidroperóxido. Por lo tanto, no sólo reacciona con peróxido de hidrógeno, sino también puede reducir hidroperóxidos orgánicos, que pueden formarse en las células por diversos mecanismos. El contenido principal de glutatión peroxidasa en la mayoría de los tejidos es una enzima que contiene selenio. Se ha descrito también una glutatión peroxidasa independiente de selenio (una glutatión S-transferasa) que reduce hidroperóxidos orgánicos, pero no es activa en la reducción de peróxido de hidrógeno.

Además de dichas enzimas, las células poseen sistemas de protección no enzimáticos, tanto secuestradores de radicales libres liposolubles, que actúan a nivel de membranas, por ej.: vitamina E, como antioxidantes hidrosolubles citoplasmáticos, por ej.: glutatión.

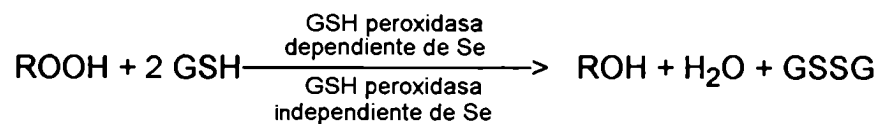
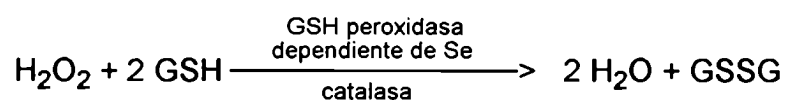
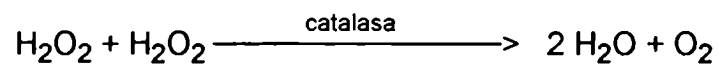
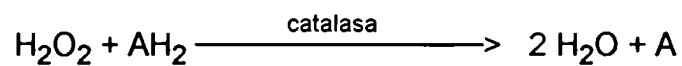
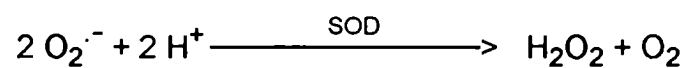
En particular, no se han descrito enzimas capaces de la remoción de  $\cdot\text{OH}$  o de  $\cdot\text{O}_2$ , por lo tanto estas especies altamente reactivas deben ser neutralizadas por sistemas no enzimáticos, como glutatión, vitaminas A, C y E.

En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la velocidad de generación de radicales libres y la de disipación mantiene la homeostasis, de manera que los niveles de concentraciones de intermediarios de reducción del  $\text{O}_2$  sean compatibles con la vida celular.

Si esta homeostasis es alterada por un aumento en la velocidad de generación de radicales libres o una disminución de las defensas celulares, el resultado será un estado de estrés oxidativo. Como consecuencia, los efectos acumulativos de la cascada de eventos iniciados por radicales libres pueden llevar a la muerte celular y por lo tanto a una posible necrosis tisular, o pueden manifestarse tardíamente produciendo daños crónicos, incluyendo el desarrollo de neoplasmas.

Figura 3.

Enzimas responsables de la detoxificación de especies reactivas de oxígeno



### 3. RADICALES LIBRES Y CARCINOGENESIS

Los estados prooxidantes celulares parecen tener un papel importante en las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis (45-47). Las células epidérmicas tratadas con carcinógenos químicos o con promotores tumorales podrían aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno o ser deficientes en su capacidad de neutralizarlos. Las células neoplásicas presentan niveles aumentados de oxidantes potencialmente perjudiciales, sin embargo no ha sido aún esclarecido si las reacciones de radicales libres son causa de las lesiones celulares relacionadas con el proceso de transformación celular o simplemente una consecuencia de ellas.

Existen importantes evidencias experimentales que avalarían la acción de radicales libres de  $O_2$ , como así también de radicales libres orgánicos, como mediadores en los diferentes estadios de la carcinogénesis química. Numerosas investigaciones relacionan la transformación neoplásica con los radicales libres, particularmente con los intermediarios de reducción del oxígeno. Por otro lado, los radicales libres orgánicos, tales como radicales peroxilo ( $ROO\cdot$ ) originados de hidroperóxidos orgánicos, al ser más estables que otros radicales libres de oxígeno, son capaces de difundir a lugares distantes en el interior de la célula a partir del sitio de origen. Por lo tanto, estos radicales podrían interactuar directa o indirectamente con ADN u otras macromoléculas, siendo importantes en la producción de lesiones celulares asociadas con la carcinogénesis. Los ácidos nucleicos y proteínas pueden también ser oxidados o convertidos a radicales libres, los cuales son altamente reactivos y pueden originar "cross-links".

Tales daños oxidativos podrían contribuir significativamente a la inducción, promoción o progresión de tumores en piel. Los procesos de iniciación, promoción y progresión podrían ser gatillados por diferentes niveles

y tipos de agentes oxidantes primarios y secundarios, causantes de posibles mutaciones, aberraciones cromosómicas y otros daños a ADN y proteínas.

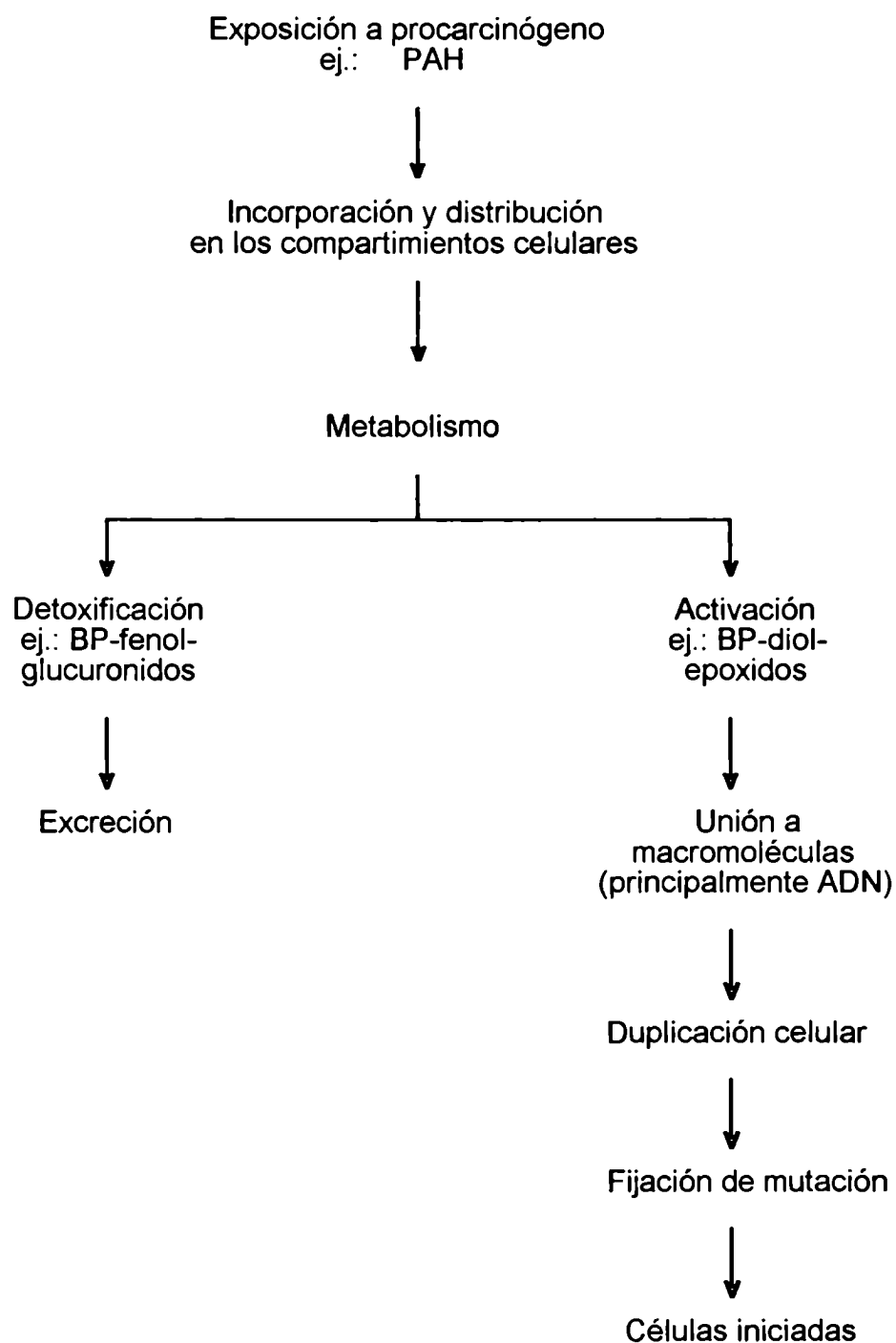
### 3.1. RADICALES LIBRES EN LA INICIACION

Aunque la generación de radicales libres puede inducir daño al ADN y es potencialmente carcinogénica, el papel de los mismos en la iniciación tumoral no ha sido aún esclarecido (45).

Algunos agentes generadores de radicales libres, como BzPo, peróxido de lauroilo y peróxido de hidrógeno son inactivos como iniciadores, pero esto podría explicarse porque las dosis de peróxidos capaces de inducir lesiones irreversibles al ADN serían demasiado tóxicas para permitir la supervivencia de una población de células iniciadas que puedan ser promovidas (48).

El paso esencial en el proceso de iniciación, cuando se utilizan PAHs, es la activación metabólica de dicho carcinógeno mediante acción enzimática. Las células epidérmicas contienen una variedad de enzimas capaces de metabolizar PAHs y otros carcinógenos produciendo la activación o detoxificación (49) (Figura 4). El potencial carcinogénico de un determinado PAH depende del balance entre la velocidad de formación de los intermediarios activos y la velocidad de remoción por reacciones de detoxificación. Las enzimas más importantes en la activación metabólica de PAHs son oxidasas microsomales dependientes de citocromo P-450 y NADPH, que generan derivados electrofílicos altamente reactivos, los cuales pueden modificar covalentemente al ADN y otras macromoléculas celulares. Si bien este mecanismo parece ser el más importante en la producción de intermediarios activos en la unión al ADN a partir de PAHs, se han descrito otras vías de activación o degradación metabólica de PAHs (45-49). Una vía

Figura 4. Biotransformación y bioactivación de carcinógenos químicos



Abreviaturas:

PAH : Hidrocarburos aromáticos policíclicos

BP : Benzopireno

metabólica dependiente de  $O_2$ , en la cual intermediarios semiquinonas de PAHs participando en ciclos redox son oxidados a quinonas con la consecuente generación de  $O_2^{\cdot-}$  y posteriormente  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$ , podría indirectamente contribuir al daño al ADN que resulta en la iniciación de las células afectadas.

Dado que la radiación ionizante produce daño al ADN directamente, o indirectamente a través de generación de radicales libres, es interesante notar que una sólo dosis subtumorigénica de radiación ionizante mimetiza la actividad iniciadora del DMBA en el modelo de iniciación-promoción en piel de ratón (50).

### 3.2. RADICALES LIBRES EN LA PROMOCION

Las evidencias experimentales (45-47,51,52) que relacionan a los radicales libres con el proceso de promoción tumoral son:

a) Compuestos generadores de radicales libres, tales como peróxidos orgánicos, son capaces de actuar como promotores tumorales (53,54).

b) Algunos promotores tumorales activan la producción de especies reactivas de oxígeno a partir de fuentes celulares endógenas en una variedad de tipos celulares (55).

c) Sistemas generadores de especies reactivas de oxígeno pueden mimetizar las acciones bioquímicas de los promotores tumorales (56).

d) Algunos promotores tumorales son capaces de modular los sistemas de defensa antioxidante (57-60).

e) Compuestos antioxidantes, secuestradores de radicales libres, son capaces de inhibir las respuestas bioquímicas y biológicas inducidas por la acción de promotores tumorales (61).



### **a) PROMOCION TUMORAL POR COMPUESTOS GENERADORES DE RADICALES LIBRES**

Se ha estudiado la actividad promotora de diversos dialquilperóxidos e hidroperóxidos, usados comunmente en las industrias química y farmacéutica. Los peróxidos de benzoílo, lauroílo, decanoílo y cumilo son activos como promotores tumorales en piel de ratón (53), mientras que los hidroperóxidos de cumeno y de tert-butilo y el peróxido de hidrógeno son muy débiles como promotores (54,61). La actividad promotora de dichos peróxidos podría estar relacionada con su capacidad de generar radicales libres. Dicha formación de radicales libres requiere activación mediada por células. Los radicales libres generados a partir de diversos hidroperóxidos y peróxidos, mediado por células epidérmicas aisladas, han sido detectados por spin trapping y electron spin resonance (52,62-66). Una vez formados los radicales libres primarios, pueden ocurrir reacciones de fragmentación, de adición, o de sustracción de hidrógeno. Los productos resultantes serían radicales libres de moléculas biológicas, tales como glutatión o lípidos, los cuales pueden tener una vida media significativamente más larga que los radicales primarios.

### **b) ACTIVACION DE FUENTES CELULARES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO POR PROMOTORES TUMORALES**

Radicales libres pueden ser generados *in vivo* como productos secundarios del metabolismo normal durante el ciclo catalítico de numerosas enzimas. Se ha demostrado que algunos promotores celulares aumentan la elaboración de especies reactivas de oxígeno por estas fuentes endógenas, generando un estado celular pro-oxidante.

El ejemplo mejor caracterizado es la estimulación de "burst" oxidativo en células inflamatorias. En respuesta a TPA, los neutrófilos y macrófagos

aumentan su consumo de oxígeno, oxidan glucosa por la vía de la hexosa monofosfato y generan  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ . Este proceso parece estar mediado por la interacción del TPA con la proteína quinasa C (67) y la consecuente activación de un sistema oxidasa dependiente de NAD(P)H localizado en la membrana plasmática (68). Otras clases de promotores tumorales epidérmicos, tales como alcaloides indólicos, y poliacetatos también activan la proteína quinasa C y estimulan la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en células inflamatorias (55). Por otro lado, otros promotores como antralina, ácido iodoacético y BzPo no inducen un "burst" oxidativo en neutrófilos (51,52).

Otra fuente de oxígeno reactivo en piel tratada con TPA puede ser el aumento de actividad de xantina oxidasa, la cual genera  $O_2^{\cdot-}$ , (69).

### **c) SISTEMAS GENERADORES DE RADICALES LIBRES QUE MIMETIZAN LA ACCION DE PROMOTORES TUMORALES**

Se ha estudiado la acción de sistemas que generan radicales libres en modelos de promoción *in vitro*.

La exposición de células C3H/10T1/2 a agentes carcinogénicos seguida de tratamiento con ésteres del forbol induce una formación aumentada de focos de transformación. Zimmerman y Cerutti (56) han demostrado que especies reactivas de oxígeno pueden actuar directamente como promotoras de transformación en este tipo celular, dado que células, previamente iniciadas, tratadas con el sistema generador de  $O_2^{\cdot-}$  extracelular xantina/xantina oxidasa producen un efecto comparable al inducido por TPA.

Las células epidérmicas JB6 adoptan un fenotipo transformado capaz de crecer en agar blando cuando son tratadas con diferentes clases de promotores (52,70), dicho fenotipo transformado puede también ser inducido en estas células por el sistema generador de  $O_2^{\cdot-}$  xantina/xantina oxidasa (52).

#### **d) MODULACION DE MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE POR PROMOTORES TUMORALES**

Una respuesta temprana de la epidermis al TPA es una disminución de la actividad específica de SOD y catalasa (57,59). En cambio, el tratamiento con TPA induce un aumento inicial de la actividad de glutatión peroxidasa, seguido de una disminución posterior por debajo de los niveles control luego de una hora del tratamiento (71). Perchellet y col. (60) demostraron que la incubación de células epidérmicas aisladas con TPA produce un significativo aumento en los niveles de glutatión oxidado, lo que podría reflejar un estrés oxidativo resultante del balance alterado entre producción y detoxificación de radicales libres de oxígeno.

#### **e) INHIBICION DE LA ACCION DE PROMOTORES TUMORALES POR ANTIOXIDANTES**

Numerosos trabajos utilizando antioxidantes o sequestradores de radicales libres, tales como SOD, agentes biomiméticos de SOD, catalasa, glutatión, vitamina E, manitol o antioxidantes fenólicos, han demostrado inhibiciones de los efectos bioquímicos y biológicos de los promotores tumorales, particularmente el TPA, *in vitro* o *in vivo* (45,71-75). Los diversos tratamientos con antioxidantes que disminuyen el estado oxidativo causado por el TPA, también inhiben los eventos bioquímicos ligados a la actividad promotora de este compuesto, tales como inducción de actividad de ornitina decarboxilasa, síntesis de ADN y mitosis, intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y poliploidización, transformación neoplásica *in vitro*, como así también la promoción tumoral *in vivo* (45).

### **3.2.1. MECANISMOS POSIBLES DE ACCION DE LOS RADICALES LIBRES EN LA PROMOCION TUMORAL**

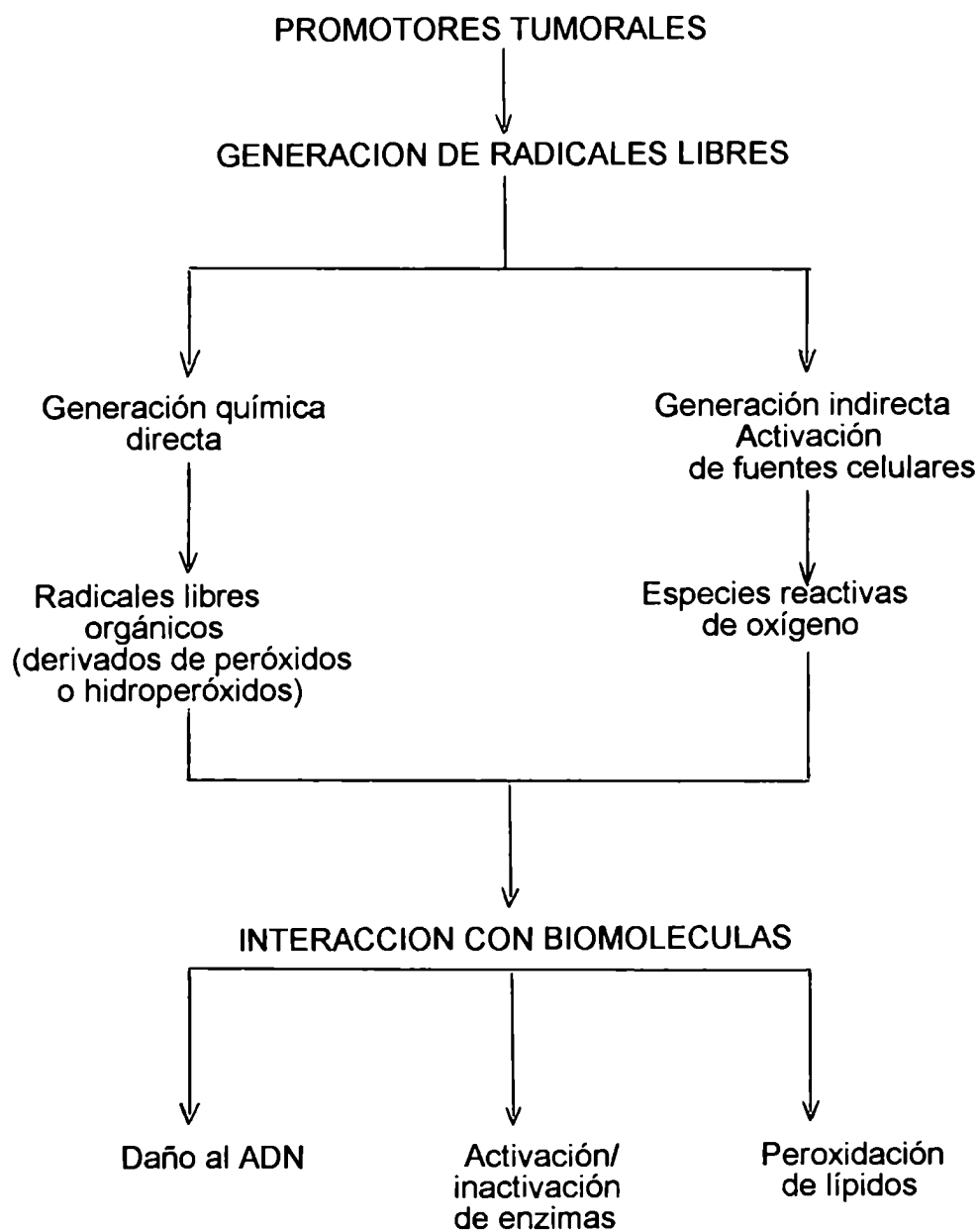
Las evidencias experimentales mencionadas apoyan fuertemente la hipótesis de que los radicales libres estarían implicados en el proceso de promoción tumoral. Sin embargo, los mecanismos moleculares relacionados con la participación de los radicales libres en la promoción tumoral son desconocidos. Existen algunas evidencias de que los radicales libres podrían modificar la expresión fenotípica y la diferenciación de las células alterando cascadas de transducción de señales (46,51,76). A nivel tisular el estado prooxidante en la población de células basales probablemente produciría una alteración en el equilibrio homeostático como consecuencia de un aumento en la citotoxicidad y un aumento en la diferenciación terminal, lo que en definitiva resultaría en la expansión clonal de las células iniciadas, que son resistentes a la diferenciación terminal (77).

La Figura 5 muestra la generación de radicales libres por promotores tumorales y las posibles interacciones con biomoléculas que contribuirían al desarrollo de un estado neoplásico.

### **3.3. RADICALES LIBRES EN LA PROGRESION**

Se ha descrito el aumento de conversión maligna de papilomas inducidos por tratamientos estándar de iniciación - promoción, utilizando TPA como promotor, por la exposición de los papilomas a una variedad de compuestos, incluyendo agentes iniciadores y peróxidos (33-35). Debido al tipo de compuestos químicos que son activos en la progresión, se ha postulado que el daño al ADN sería importante en este proceso de conversión maligna.

Figura 5. Generación de radicales libres por promotores tumorales



Por otro lado, se han descrito diversas formas de daño al material genético, tales como modificaciones de bases, rupturas de cadenas de ADN y alteraciones cromosómicas, en células expuestas a oxidantes. Además las especies reactivas de oxígeno son mutagénicas y aumentan la transformación de células *in vitro* (51,52).

Por lo tanto, los estados pro-oxidantes, ya sea inducidos por células inflamatorias activadas o por radicales libres derivados de los mismos agentes químicos que actúan en la progresión, podrían generar daños macromoleculares compatibles con este estadio de la carcinogénesis.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es analizar los procesos de promoción y progresión tumoral inducidos por un compuesto oxidante, el peróxido de benzoílo (BzPo), en el modelo de carcinogénesis en múltiples estadios en piel de ratón.

El análisis de los diferentes modos de acción de los diversos compuestos químicos capaces de actuar como promotores y la comparación de las respuestas celulares inducidas por dichos compuestos a lo largo del proceso de inducción de tumores permiten inferir conclusiones sobre los mecanismos generales relacionados con la transformación celular.

En este trabajo se comparan los efectos producidos por el BzPo con el compuesto promotor más ampliamente estudiado, el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

Por lo tanto, a fin de caracterizar la promoción y progresión tumoral inducidas por BzPo, los objetivos parciales de este trabajo son:

a) Evaluar el estrés oxidativo inducido por BzPo o por TPA en piel, tomando como parámetro la inducción de quimioluminiscencia de baja intensidad, y analizar la modulación de esta respuesta por la acción de compuestos antioxidantes.

b) Determinar la posible modulación de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa y catalasa, producida por acción del BzPo o del TPA en piel de ratón.

c) Evaluar, a nivel de microscopía óptica y electrónica, las posibles alteraciones morfológicas inducidas durante la promoción tumoral con BzPo, y analizar, mediante técnicas histoquímicas, alteraciones epidérmicas y dérmicas específicas, tales como:

- evaluación de las regiones organizadoras del nucleolo en las células epidérmicas teñidas selectivamente con una técnica de plata coloidal, como una medida de las posibles variaciones en la actividad celular.

- caracterización de la población de mastocitos dérmicos, diferenciando los diferentes fenotipos mediante técnicas de tinción diferencial.

d) Realizar el diagnóstico histopatológico de los diferentes tipos de tumores inducidos usando BzPo o TPA como promotor, evaluando la etapa de conversión maligna y su modulación por la acción de un compuesto antioxidante.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. ANIMALES**

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, y ratones hembras de la cepa SENCAR (sensible al cáncer). Esta cepa de ratones fue originalmente desarrollada por cruce de hembras de la cepa CD-1 con machos Rockland variedad STS (skin tumor susceptible). Esta variedad ha sido desarrollada por selección artificial durante ocho generaciones de ratones de la cepa Rockland con mayor susceptibilidad a la inducción de tumores, usando DMBA como iniciador y aceite de crotón como promotor (2). Todos los animales utilizados fueron mantenidos y expandidos en el bioterio de la CNEA.

Para los experimentos *in vitro* con células epidérmicas aisladas se utilizaron ratas de 6 a 8 días de edad.

Para los experimentos *in vivo* el dorso de ratas adultas de 200 gramos o ratones adultos de 6 a 8 semanas de edad fue afeitado 3 días antes del comienzo de cualquier tratamiento.

### **2. OBTENCION DE CELULAS EPIDERMICAS AISLADAS PARA ESTUDIOS *IN VITRO***

Las ratas de 6 a 8 días de edad fueron sacrificadas por dislocación cervical. Pequeños trozos de piel del dorso fueron extraídos e incubados en solución de tripsina 0.25 % y EDTA 0.02 % en buffer fosfato 10 mM pH 7.4 en solución salina con glucosa 6 mM (PBS) durante 16 horas a 4°C, luego de lo cual se separó la epidermis de la dermis. Se inactivó la tripsina colocando la epidermis aislada en PBS con 10 % de suero fetal bovino y por agitación fuerte



se obtuvo una suspensión de células epidérmicas. La suspensión celular fue centrifugada a 500 g en una centrífuga ecys-GF4 y las células resuspendidas en PBS. La viabilidad fue evaluada mediante el test de exclusión de azul trypan, para ello a 100  $\mu$ l de suspensión celular se le agregó 100  $\mu$ l de solución de azul trypan 0.08 % en PBS y la viabilidad fue determinada contando en una cámara de Neubauer el porcentaje de células que habían incorporado el colorante azul (células no viables) dentro de los 5 a 10 minutos de incubación con azul trypan. En todos los casos la viabilidad fue mayor del 85 %.

Las suspensiones de células epidérmicas fueron utilizadas para evaluar el estrés oxidativo inducido por diversos agentes oxidantes, capaces de actuar como promotores tumorales (52,53,61), peróxido de benzoílo (BzPo), hidropéroxido de t-butilo (tBOOH) e hidropéroxido de cumeno (CuOOH). Este modelo experimental permite analizar el estrés oxidativo inducido en las células epidérmicas aisladas, sin influencia de componentes dérmicos.

### **3. TRATAMIENTOS *IN VIVO***

En todos los experimentos *in vivo* las diferentes drogas utilizadas fueron aplicadas en forma percutánea sobre la zona afeitada disueltas en 0.2 ml de acetona.

Para la mayor parte de los experimentos se utilizaron ratones SENCAR, en los cuales se han realizado gran parte de los estudios de carcinogénesis química experimental en piel, dado que se trata de una cepa endocriada con alta susceptibilidad a los agentes inductores de tumores (2). El hecho de usar una cepa endocriada tiene la ventaja de una menor variabilidad genética entre ratones de una misma población, lo que origina una susceptibilidad similar en los diferentes ratones frente a tratamientos con

carcinógenos, iniciadores o promotores, lográndose una menor heterogeneidad en la respuesta. Por otro lado, la alta susceptibilidad permite el rápido desarrollo de gran cantidad de tumores a bajas dosis, lo que facilita el análisis de los pasos que componen el proceso de inducción de tumores; períodos largos de inducción aumentarían la aparición de factores biológicos no controlables que podrían interferir en el desarrollo tumoral (2).

### 3.1. TRATAMIENTOS SIMPLES CON PROMOTORES TUMORALES

En ratas Wistar se utilizó el agente promotor BzPo en dosis entre 0 y 8  $\mu$ moles/rata y se evaluó el estrés oxidativo inducido *in vivo*.

En ratones SENCAR las sustancias promotoras utilizadas fueron BzPo y TPA. Según la bibliografía las dosis más frecuentemente utilizadas durante el proceso de promoción son de 83  $\mu$ moles de BzPo (53) o de 3.25 nmoles de TPA (78). Por lo tanto, las dosis evaluadas en este trabajo fueron entre 0 y 83  $\mu$ moles para el BzPo y entre 0 y 100 nmoles para el TPA.

Se probaron diversos compuestos antioxidantes: 3,5-diisopropilsalicilato de cobre (CuDIPS), 3,5-diisopropil-salicilato de zinc (ZnDIPS), ácido 3,5-diisopropilsalicílico (DIPS), butil-hidroxianisol (BHA) o butil-hidroxitolueno (BHT). Los animales tratados con BzPo o TPA en dosis de promoción fueron pretratados 10 minutos antes de la aplicación del promotor con diferentes dosis de dichos compuestos.

El CuDIPS es un compuesto de coordinación de cobre con capacidad de catalizar la dismutación de anión superóxido (79). Su bajo peso molecular (PM=500) y su solubilidad en lípidos le permiten atravesar las membranas biológicas sin dificultad, pudiendo por lo tanto pasar a través de la membrana citoplasmática, como así también a través de la membrana mitocondrial. Por lo tanto, dicho compuesto podría actuar como biomimético de SOD en los diferentes compartimientos celulares. El ZnDIPS y el DIPS son análogos

estructurales del CuDIPS pero no poseen actividad de SOD (79). El CuDIPS y el ZnDIPS fueron utilizados en dosis de hasta 2  $\mu$ moles/ratón y el DIPS hasta 4  $\mu$ moles/ratón.

El BHA y el BHT son compuestos fenólicos capaces de actuar como antioxidantes. El BHA y el BHT se utilizaron en dosis de hasta 50 y 90  $\mu$ moles/ratón respectivamente.

### **3.2. TRATAMIENTOS MÚLTIPLES CON PROMOTORES TUMORALES**

Se realizaron tratamientos múltiples con BzPo o con TPA con diferentes intervalos de tiempo entre aplicaciones: 24, 48, 72 horas o dos veces por semana, de acuerdo a los siguientes protocolos:

- Tratamientos múltiples con 83  $\mu$ moles de BzPo (dosis de promoción).
- Tratamientos múltiples con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de 83  $\mu$ moles de BzPo.
- Tratamientos múltiples con 3.25 nmoles de TPA (dosis de promoción).
- Tratamientos múltiples con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de 3.25 nmoles de TPA.

### **3.3. INDUCCION DE TUMORES**

Los animales fueron iniciados con una única aplicación percutánea de una dosis subumbral (20 nmoles/ratón) del carcinógeno DMBA. La promoción tumoral fue comenzada 10 días después de la iniciación de acuerdo a los siguientes protocolos:

Grupos control:

Controles sin iniciar:

- Tratamientos con 83  $\mu$ moles de BzPo dos veces por semana.

- Tratamientos con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de 83  $\mu$ moles de BzPo dos veces por semana.
- Tratamientos con 3.25 nmoles de TPA dos veces por semana.
- Tratamientos con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de 3.25 nmoles de TPA dos veces por semana.

Controles iniciados:

- Iniciación con DMBA y tratamiento con 0.2 ml de acetona dos veces por semana.
- Iniciación con DMBA y tratamiento con 2  $\mu$ moles de CuDIPS dos veces por semana.

Grupos experimentales:

- Iniciación con DMBA y promoción-progresión con 83  $\mu$ moles de BzPo aplicado dos veces por semana (BzPo).
- Iniciación con DMBA, promoción-progresión con 83  $\mu$ moles de BzPo y pretratamiento con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de cada aplicación de BzPo (CuDIPS + BzPo).
- Iniciación con DMBA y promoción-progresión con 3.25 nmoles de TPA aplicado dos veces por semana (TPA).
- Iniciación con DMBA, promoción-progresión con 3.25 nmoles de TPA y pretratamiento con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de cada aplicación de TPA (CuDIPS + TPA).

## 4. EVALUACION DE LAS RESPUESTAS

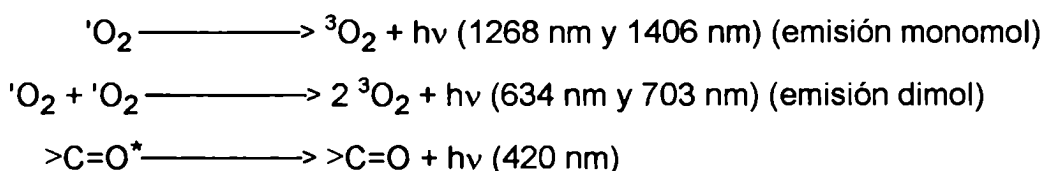
### 4.1. EVALUACION DE ESTRES OXIDATIVO

La alteración en el balance que existe normalmente en condiciones fisiológicas entre la velocidad de generación y de disipación de radicales libres en las células conduce a un estrés oxidativo, que puede ser evaluado por medio de diversas metodologías. La determinación de quimioluminiscencia de baja intensidad (QL) es un método no invasivo, útil para estudiar el estrés oxidativo en sistemas biológicos de diferente complejidad, incluyendo animales vivos (80-83). La emisión de QL se produce como consecuencia del decaimiento de especies excitadas, tales como oxígeno singulete y carbonilos excitados, los cuales son considerados como productos secundarios de procesos de radicales libres. Por lo tanto, dicha emisión es una expresión del metabolismo oxidativo de las células.

La emisión producida por el decaimiento del oxígeno singulete es de 634 y 703 nm (emisión dimol), mientras que los carbonilos excitados emiten entre 360 y 480 nm (80-83) (Figura 6).

La ventaja de dicho método es que permite una estimación directa del estrés oxidativo, sin alterar el metabolismo celular, pudiendo por lo tanto evaluarse el estrés oxidativo *in vivo* en un mismo animal durante períodos prolongados de tiempo.

Figura 6. Emisión de quimioluminiscencia por oxígeno singulete y carbonilos excitados



#### **4.1.1. DETERMINACION DE QUIMIOLUMINISCENCIA EN CELULAS EPIDERMICAS AISLADAS**

Para la medición de QL en células epidérmicas aisladas se utilizó un contador de centelleo líquido marca Packard, modelo Tri-Carb 1500, con el circuito de coincidencia desconectado, es decir en el modo de conteo de fotón simple, de manera de detectar la QL emitida por las células. Distintas cantidades de células epidérmicas en suspensión fueron incubadas en un volumen final de 5 ml de PBS en viales de contador de centelleo, en oscuridad a 37°C y se determinó la QL inducida en forma espontánea o inmediatamente después del agregado del agente oxidante. Soluciones concentradas de los diferentes compuestos oxidantes, BzPo, CuOOH y tBOOH, fueron agregadas a la suspensión celular, previamente incubada a 37°C, en volúmenes del orden de 100 µl, a fin de obtener concentraciones finales entre 0 y 5 mM.

#### **4.1.2. DETERMINACION DE QUIMIOLUMINISCENCIA *IN VIVO***

En animales vivos la QL fue determinada utilizando un contador de fotones descrito por Cadenas y Sies (83). El contador de fotones (Figura 7) consta de:

- a) Una fuente de poder de alto voltaje.
- b) Un tubo fotomultiplicador EMI 9658, que se caracteriza por su sensibilidad extendida en el rojo (sensible en el intervalo de 300 a 900 nm), con un sistema de enfriamiento termoeléctrico, que lo mantiene a -25°C, a fin de reducir la corriente oscura (la corriente oscura corresponde al ruido electrónico del fototubo más el ruido electrónico del sistema de amplificación).
- c) Amplificador-discriminador: El fotomultiplicador está conectado a un amplificador-discriminador, que tiene la función de amplificar la señal que sale

del tubo bajo la forma de pulsos y discriminar que pulsos son contados, de manera de lograr que la contribución de los pulsos originados por ruido sea mínima.

d) Registrador y contador de pulsos: La señal que sale del amplificador-discriminador es conectada a un contador de pulsos y a un registrador.

e) Compartimiento de muestra: El animal se ubica en un compartimiento oscuro y termostatzado. Una barra de polimetilacrilato, con sus caras ópticas pulidas y forrada lateralmente con papel de aluminio y cinta negra, separa al animal del fototubo. Esta barra provee un buen aislamiento térmico con acoplamiento óptico entre la muestra y el tubo fotomultiplicador. Un obturador permite la operación continua del fotomultiplicador, manteniendo al fototubo en oscuridad al abrir el compartimiento de muestra.

La emisión de QL de la piel fue medida inmediatamente despues de cada tratamiento colocando al animal vivo, previamente anestesiado con pentobarbital sódico, dentro del compartimiento de muestra exponiendo un área fija del dorso y con el resto del cuerpo blindado. El área expuesta se ubica próxima al obturador y centrada con el sistema óptico. Los datos son expresados como cuentas por segundo referidas al área expuesta ( $\text{cps}/\text{cm}^2$ ) y fueron calculados como  $(\text{cps del animal expuesto} - \text{cps con el obturador cerrado})/\text{área expuesta en cm}^2$ .

En todos los experimentos el contador de fotones fue calibrado usando un estándar de nitrato de uranilo de 300 cps.

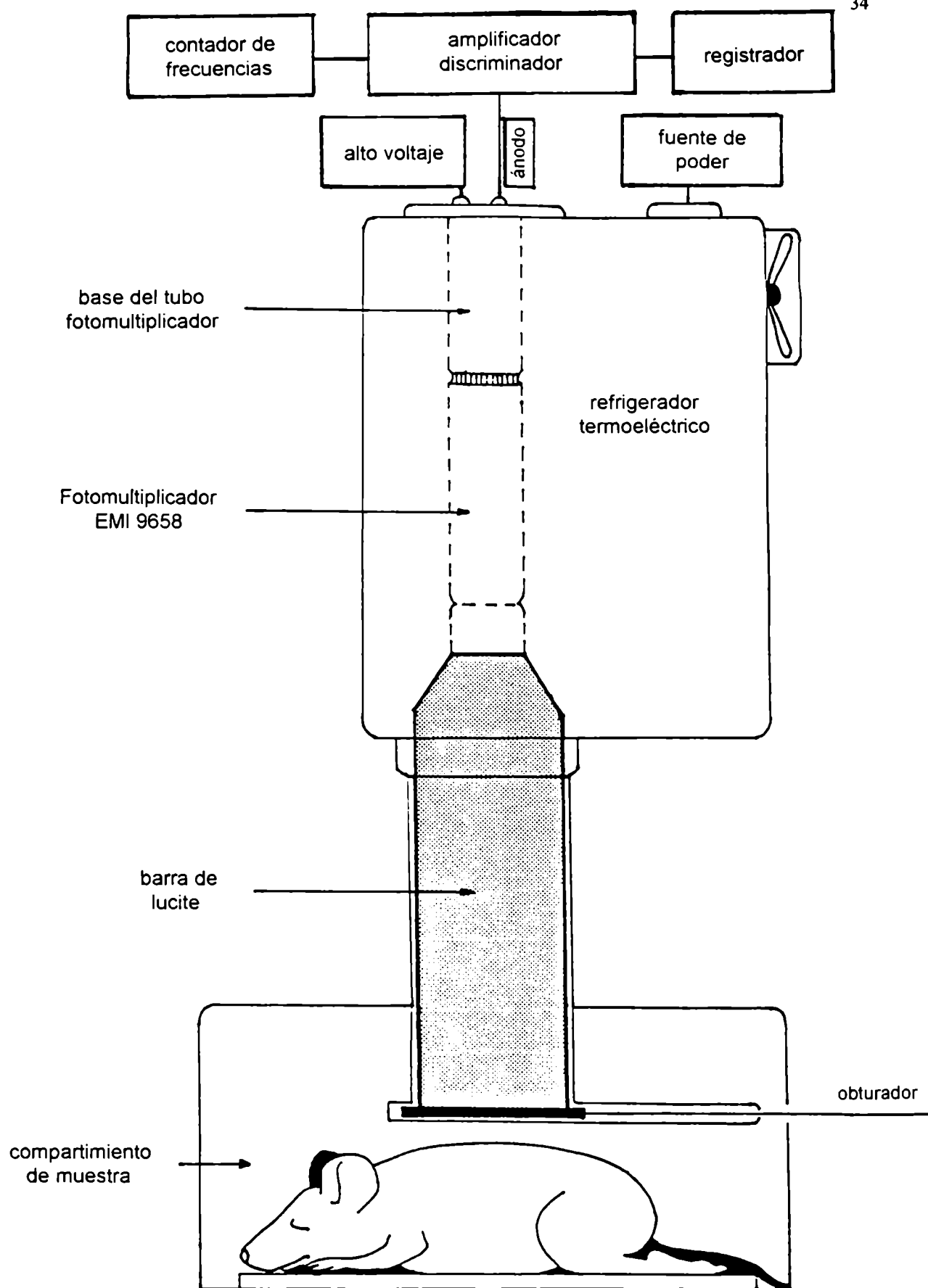


Figura 7

Contador de fotones (según Cadenas, E. y Sies, H., ref. 83)



## **4.2. EVALUACION DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

### **4.2.1. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA Y CATALASA**

A fin de evaluar la modulación en la actividad de las enzimas antioxidantes, animales tratados de acuerdo con los protocolos de experimentación antes mencionados fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron muestras de piel del dorso de la zona tratada. La epidermis fue aislada por el método de raspado en frío descrito por Argyris (84). La piel extraída fue colocada con la epidermis hacia abajo sobre una caja de Petri enfriada con hielo y los músculos y grasa subdérmica removidos raspando con el borde de un portaobjetos, la piel fue luego transferida a otra caja de Petri enfriada con hielo, con la epidermis hacia arriba, la cual fue extraída raspando con una hoja de afeitar. El extracto obtenido fue homogeneizado en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.8 con EDTA 0.1 mM. Del extracto epidérmico obtenido de cada ratón una parte fue utilizada para la determinación de actividad de SOD y otra parte para la actividad de catalasa.

#### **a) DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA**

El homogeneizado de epidermis previamente obtenido fue sonificado con 6 pulsos de 5 segundos cada uno en un sonicador marca Sonics. Luego fue centrifugado a 100000 g durante 40 minutos a 4°C en una ultracentrífuga marca Kontron, y el sobrenadante fue utilizado para la medición de actividad de SOD total.

Debido a que el sustrato de la reacción catalizada por la SOD, el  $O_2^{\cdot-}$ , es un radical libre inestable, las mediciones de actividad de dicha enzima son complicadas. Los ensayos más utilizados para la determinación de actividad

de SOD son del tipo negativo, es decir, se basan en la inhibición en presencia de la enzima de una determinada reacción medible espectrofotométricamente. Se combina una reacción que genera  $O_2^{\cdot-}$  con un método de detección de este radical. En presencia de SOD, ésta actúa dismutando el  $O_2^{\cdot-}$  y por lo tanto, inhibiendo la reacción de detección.

La técnica utilizada para las mediciones de SOD fue descrita por Beauchamp y Fridovich (85). El  $O_2^{\cdot-}$  fue generado por el sistema enzimático xantina/xantina oxidasa y la detección del  $O_2^{\cdot-}$  se realizó midiendo la reducción de nitro blue tetrazolium (NBT) a formazan espectrofotométricamente a 560 nm.

La mezcla de reacción utilizada contenía buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM, nitro blue tetrazolium (NBT) 70  $\mu$ M, xantina 0.125 mM, catalasa 1.25 U/ml y la fuente enzimática de SOD, en este caso el extracto epidérmico. La reacción se inicia con el agregado de xantina oxidasa diluída en el mismo buffer fosfato a una concentración capaz de producir un cambio de absorbancia a 560 nm de 0.025/min en los blancos, sin fuente de SOD. Una vez iniciada la reacción se midieron los cambios de absorbancia a 560 nm durante 12 minutos, observándose una variación de absorbancia lineal entre 4 y 10 minutos, cuya pendiente fue calculada por regresión lineal. El porcentaje de inhibición para cada muestra se calculó de acuerdo a la fórmula:  $I = (1 - V_x/V_o) \times 100$ , donde  $V_x$  es la velocidad de reducción de NBT en presencia de xantina oxidasa y fuente de SOD, y  $V_o$  es la velocidad de reducción de NBT en presencia de xantina oxidasa y sin fuente de SOD (blanco). Se define como una unidad enzimática a la cantidad de enzima capaz de inhibir en un 50 % la reducción de NBT llevada a cabo por el  $O_2^{\cdot-}$

Con el objeto de diferenciar la actividad de ambos tipos de SOD, la Cu,Zn-SOD y la Mn-SOD, se agregó a la mezcla de reacción KCN 2 mM, el cual es capaz de inhibir la actividad de la Cu,Zn-SOD, y la determinación de

actividad fue realizada en la misma forma descrita para las determinaciones de SOD total.

Los resultados de actividad de SOD obtenidos con los diferentes tratamientos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de la varianza.

## **b) DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE CATALASA**

El homogeneizado de epidermis fue centrifugado a 20000 g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante fue utilizado para la medición de catalasa de acuerdo con Reiners y col. (86), según el método descrito originalmente por Nelson y Kiesow (87).

La mezcla de reacción utilizada contenía buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM (lo que da una absorbancia a 240 nm del orden de 0.5) y la reacción fue iniciada con el agregado de la fuente enzimática, en este caso la muestra de extracto epidérmico. La actividad de catalasa se determinó midiendo la velocidad de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu.

La actividad fue calculada midiendo la pendiente inicial de la curva de absorbancia en función del tiempo y considerando un coeficiente de extinción molar de 39.4 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (88). Una unidad de catalasa se define como la desaparición de 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min a 22-23 °C.

Los resultados son expresados en Unidades/mg proteína (actividad específica). Se determinó la actividad de catalasa con distintas concentraciones de la muestra epidérmica y la actividad específica fue calculada por regresión lineal de la actividad en función de los μg de proteína.

Los resultados de actividad de catalasa obtenidos con los diferentes tratamientos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de la varianza.

### **c) DETERMINACION DE PROTEINAS**

En todos los casos la concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Lowry y col. (89) utilizando albúmina bovina como estándar.

### **4.2.2. EVALUACION DEL CONTENIDO DE ARNm DE SUPEROXIDO DISMUTASA**

A fin de evaluar si las modificaciones en la actividad de SOD, inducidas por los agentes promotores, se deben a una regulación a nivel transcripcional, se determinó el contenido de ARNm de SOD. Para ello, se extrajeron muestras de piel del dorso de ratones tratados con una o dos aplicaciones del agente promotor (BzPo o TPA). Por cada condición se utilizaron muestras de piel de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> cada una, provenientes de 3 ratones. Las pieles se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se guardaron a -70 ° C hasta la extracción del ARN.

### **a) AISLAMIENTO DE ARN TOTAL**

El ARN total se extrajo según el método de Chomczynsky y Sacchi (90). Las pieles fueron homogeneizadas en solución D (guanidina tiocianato 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, lauril sarcosina 0.5 % y β-mercaptoetanol 0.1 M). Una vez homogeneizado el tejido se adicionó: 1/15 vol. de acetato de sodio 3 M, pH 4, 1 vol. de fenol saturado con H<sub>2</sub>O, 1/2 vol. de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1. Se mezcló con vortex por 10 seg. y se dejó 15 min. en hielo. La mezcla (aprox. 25 ml) se centrifugó a 10000 g durante 20 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante con el ARN, teniendo cuidado de no aspirar la

interfase que contiene ADN y parte de las proteínas, y se lo transfirió a otro tubo. Se agregó 1 vol. de isopropanol frío y se dejó 2 hs a -20 °C para precipitar el ARN. Se centrifugó a 10000 g por 15 min. a 4 °C y el pellet de ARN obtenido se resuspendió en 3.3 ml de solución D. Se precipitó nuevamente el ARN con el agregado de 1 vol. de isopropanol frío dejando la muestra a -20 °C por un tiempo mayor a una hora. Se centrifugó a 10000 g por 15 min. a 4 °C y el pellet obtenido se lavó con 10 ml de etanol 75 % frío. Se centrifugó nuevamente como en el paso anterior y el pellet se resuspendió en 500 µl de buffer proteinasa K (PK) (SDS 0.5 %, acetato de sodio 0.3 M pH 6, EDTA 1 mM pH 8). Se transfirió la muestra a un tubo eppendorf y se agregó 10 µl de proteinasa K predigerida. El ARN se incubó con la PK durante 1 h. a 37 °C. Se agregó un volumen de fenol (saturado con buffer PK sin SDS)/cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se mezcló con vortex durante 1 min. y se centrifugó a 12000 g por 5 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó 1 vol. de cloroformo:alcohol isoamílico. Se mezcló con vortex por 1 min. y se centrifugó como en el paso anterior. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf, se agregó 1/10 vol. de acetato de sodio 3 M, pH 6 y 2.5 vol. de etanol absoluto frío. Se dejó precipitando a -20 °C toda la noche. Se centrifugó a 12000 g por 5 min., el pellet fue lavado con etanol 70 % y luego se resuspendió en H<sub>2</sub>O libre de ARNasas en un volumen entre 100 y 400 µl. La concentración de ARN fue determinada a 260 nm y luego las muestras fueron guardadas a -70 °C.

#### **b) ELECTROFORESIS DE ARN Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE NYLON (NORTHERN BLOT)**

Los experimentos aquí descriptos se realizaron de acuerdo a las técnicas descriptas por Sambrook y col. (91).

La electroforesis de ARN se realizó por medio de geles conteniendo formaldehído. El gel se preparó disolviendo la agarosa (1.2 %) en agua a ebullición, enfriando a 60 °C, se agregó buffer de corrida 5 X (0.1 M ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) pH 7, 40 mM acetato de sodio, 5 mM EDTA pH 8) hasta alcanzar una concentración 1 X y formaldehído (solución 37 % = 12.3 M) hasta una concentración 2.2 M. La muestra se preparó en un tubo eppendorf conteniendo: 30 µg de ARN, 2 µl de buffer de corrida 5 X, 3.5 µl de formaldehído 37 %, 10 µl de formamida deionizada y H<sub>2</sub>O libre de ARNasas hasta completar 20 µl. La mezcla se incubó 15 min. a 65 °C, se enfrió en hielo y se agregaron 2 µl de buffer de muestra 10 X (glicerol 50 %, EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol 0.4 %). Se sembró el gel y se corrió durante 16 hs. bajo campana.

Para determinar el tamaño de los ARN detectados por hibridización luego de la transferencia, se corrió en una de las calles ARN total. Esta calle fue cortada luego de finalizarse la corrida, fue teñida en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml en acetato de amonio 0.1 M y se fotografió bajo iluminación ultravioleta junto a una regla. En base a la distancia de migración de los ARNs ribosomales 28S y 18S se determinó el tamaño de los ARNs detectados por la hibridización.

La transferencia de ARN se realizó de acuerdo con Sambrook y col. (91) usando membranas de nylon Gene Screen Plus NEN (New England Nuclear) y el buffer de transferencia fue SSC 20 X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M). Previo a la transferencia, la membrana de nylon se embebió en agua y luego en SSC 20 X. En una bandeja de plástico conteniendo SSC 20 X, se colocó sobre un soporte un papel Whatmann 3MM embebido en SSC 20 X, sobre el que se depositó el gel. Se colocó una tira de parafilm rodeando el gel. La membrana de nylon se ubicó sobre el gel, cuidando de eliminar las burbujas de aire. Por encima de la membrana se colocaron dos trozos de papel Whatmann 3MM, previamente embebidos en SSC 2 X, del mismo tamaño del

gel. El dispositivo se completó con el agregado de una pila de papeles absorbentes de aproximadamente 8 cm de altura y por encima un vidrio y un peso de aproximadamente 500 g. La duración de la transferencia fue de 12 hs, luego de las cuales la membrana de nylon se sumergió en SSC 6 X por 5 min a temperatura ambiente, se dejó secar y se horneó 90 minutos a 80 °C.

### **c) HIBRIDIZACION DE ARN**

Las sondas utilizadas fueron: cADN de CuZn-SOD de rata de 0.65 kb obtenida del plásmido pUC13-RCS, cADN de Mn-SOD de rata de 1.4 kb obtenida del plásmido pSP65-RCS. Estos plásmidos fueron obsequiados por el Dr. Ye-Shih Ho del Institute of Chemical Toxicology, Wayne State University, Detroit, USA.

Como control de la carga de ARN se utilizó una sonda de ARNr 7S, obtenida del plásmido pA6, obsequiado por el Dr. F. Larcher del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Madrid, España.

La amplificación de los plásmidos y el aislamiento de los fragmentos utilizados como sondas se efectuaron de acuerdo con Sambrook y col. (91).

Las sondas fueron marcadas por el método de Random primer, para lo cual se utilizó el kit Prime-a-Gene de Promega basado en el método desarrollado por Feinberg y Vogelstein (92,93).

La membrana de nylon con el ARN transferido se prehibridizó con la solución de hibridización (SSC 6 X, solución de Denhardt 5 X, SDS 0.5 %, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado 100 µg/ml, formamida desionizada 50 %) sin la sonda marcada por 1-2 horas a 42°C en una bolsa de polietileno sellada. Luego se abrió la bolsa, se descartó la solución y se agregó nuevamente solución de hibridización conteniendo 1-2 ng/ml de sonda marcada de Cu,Zn-SOD o Mn-SOD con actividad específica

aproximada de  $10^9$  cpm/ $\mu$ g, previamente desnaturalizada. Se selló la bolsa y se dejó hibridizar por 16 horas a 42°C. Luego de la hibridización, la membrana de nylon fue sometida a sucesivos lavados con SSC y SDS en distintas concentraciones según Sambrook y col. (91). Las membranas fueron rehibridizadas para determinar la carga de ARN con la sonda de ARNr 7S.

La membrana fue expuesta a una película de rayos X, a -70 ° C y durante distintos tiempos según la sonda utilizada, para obtener la imagen autorradiográfica. Los tiempos de exposición fueron de 72 horas, 7 días, y 18 horas cuando se hibridizó con las sondas de Cu,Zn-SOD, Mn-SOD y ARNr 7S respectivamente. Las autorradiografías fueron densitometreadas, los valores relativizados con respecto a los valores obtenidos para el ARNr 7S y los datos expresados como porcentaje de inhibición con respecto al control.

### **4.3 EVALUACION DE ALTERACIONES MORFOLOGICAS**

Las alteraciones morfológicas observadas en células y tejidos pueden ser consideradas evidencias de cambios metabólicos importantes. La detección de estas modificaciones relacionadas con la estructura constitutiva de las células y tejidos y su evaluación cuantitativa contribuyen al análisis del proceso en estudio. Con el objeto de evaluar las posibles alteraciones morfológicas inducidas por la acción de promotores tumorales, tanto por tratamientos únicos, como por tratamientos crónicos durante el proceso de promoción, se extrajeron muestras de piel del dorso de ratones, tratados de acuerdo con los protocolos de experimentación previamente detallados en la sección 3, y procesadas para su estudio por microscopía óptica y electrónica.



#### **4.3.1. TECNICAS DE MICROSCOPIA OPTICA**

Las muestras de piel destinadas a estudios de microscopía óptica fueron fijadas en formol neutro, y luego de una adecuada orientación que permitió predefinir el plano de corte, se las deshidrató en concentraciones crecientes de etanol y se las incluyó en parafina según las técnicas convencionales. Para cada animal se preparó un taco conteniendo un trozo de piel de aproximadamente 1 cm de longitud. De cada taco se obtuvieron cortes que fueron teñidos con diferentes técnicas según las alteraciones a evaluar, lo que permitió analizar diversos cambios morfológicos en el material extraído del mismo animal. A nivel de la epidermis, se analizaron el espesor epitelial, y las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) en las células de los estratos basales y suprabasales. A nivel de la dermis se analizaron los cambios inducidos en la celularidad del tejido dando especial énfasis a las variaciones cuantitativas y cualitativas en la población de mastocitos.

##### **a) EVALUACION DE ESPESOR EPITELIAL**

Se evaluaron las variaciones en el espesor epitelial en cortes de piel obtenidos de animales tratados con una única aplicación de promotor (BzPo o TPA) o con múltiples aplicaciones según los protocolos de promoción detallados en la sección 3. Para ello, se obtuvieron cortes histológicos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de espesor, asegurando una correcta orientación a fin de evitar cortes oblicuos que dificultarían la correcta interpretación de los preparados. Los cortes fueron teñidos con la técnica clásica de hematoxilina y eosina.

## b) EVALUACION DE REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO

Se evaluaron posibles modificaciones en la actividad celular durante el proceso de promoción tumoral con BzPo determinando las variaciones en las regiones organizadoras del nucleolo teñidas selectivamente con una técnica de plata coloidal (AgNOR) de acuerdo con el método previamente descrito por Howat y col. (94).

Los AgNORs fueron evaluados en muestras de piel extraídas a distintos tiempos durante el proceso de promoción-progresión tumoral con BzPo, las cuales fueron procesadas según las técnicas convencionales de microscopía óptica. Se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, que fueron desparafinadas en xileno, hidratados con grados decrecientes de etanol y luego lavados con agua desionizada durante 8-10 minutos.

Para obtener la solución de plata coloidal se prepararon las siguientes soluciones:

- Se disolvió gelatina en polvo a una concentración del 2 % p/v en agua desionizada en un baño a 60-70°C y luego se agregó ácido fórmico a una concentración final de 1 %.
- Solución acuosa de nitrato de plata al 50 %, preparada nueva cada vez, filtrada utilizando un filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y mantenida en la oscuridad.

La solución final se obtuvo mezclando ambas soluciones en una proporción 1:2.

Los cortes de piel fueron incubados con dicha solución de plata, en oscuridad durante 45 minutos, luego fueron lavados en agua desionizada durante 1-15 minutos, deshidratados en concentraciones crecientes de etanol, aclarados en xileno y montados en bálsamo.

Se realizó el análisis morfométrico de diversos parámetros relacionados con los AgNORs (95), sabiendo que la medida de áreas ocupadas por estructuras celulares determinadas en cortes de tejidos es

cuantitativamente representativa del volumen ocupado por dichas estructuras en el tejido (96)

Los epitelios de animales control y promovidos con BzPo, incluyendo los casos con tumores, teñidos con plata fueron fotografiados en un microscopio óptico marca Zeiss utilizando un objetivo de inmersión 100 X. Se tomaron 10 fotografías de cada corte a fin de realizar el análisis morfométrico de los AgNORs y se utilizaron microfotografías con una magnificación final de 2000 X para evaluar diferentes parámetros relacionados con los AgNORs usando un analizador de imágenes electrónico semiautomático marca Kontron Messgerate MOP/AM 03-Carl Zeiss. Las medidas fueron realizadas en los estratos basal y suprabasal, debido a su importancia en la inducción de alteraciones celulares tempranas. Los parámetros evaluados fueron:

- Area ocupada por el núcleo, la cual da información del volumen del núcleo (V.NUC).
- Número de AgNOR por núcleo (N.NOR)
- Area total de AgNOR por núcleo, que da información sobre el volumen total de AgNOR por núcleo (VT.NOR)
- Proporción del núcleo ocupado por AgNOR (VT.NOR/V.NUC)

Los resultados fueron analizados estadísticamente para cada uno de los parámetros medidos mediante análisis de la varianza anidado.

### **c) EVALUACION DE MASTOCITOS**

Para la caracterización de las poblaciones de mastocitos se utilizaron muestras de piel extraídas a distintos tiempos durante el proceso de promoción-progresión tumoral con BzPo, las cuales fueron procesadas según las técnicas de microscopía óptica ya descriptas. Los cortes de piel obtenidos fueron teñidos con dos técnicas específicas para mastocitos, que permitieron

cuantificarlos, como así también caracterizar los distintos fenotipos de la población de mastocitos. Dichas técnicas son:

- Coloración con Fitc-Avidina: Los cortes de piel fijados se contrastaron con avidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Se ha descrito en piel de ratón que este compuesto se une específicamente a los gránulos de todos los mastocitos (97). Los cortes de piel se incubaron en 1/200 Fitc-Avidina durante 60 minutos a temperatura ambiente, luego se montaron en glicerol y se examinaron con un microscopio de fluorescencia Axioplan Carl Zeiss.
- Coloración con Alcian blue/Safranina: Los cortes de piel fijados se tiñeron con Alcian blue (AB) y a continuación con Safranina O (S). Esta coloración secuencial tiñe en forma diferencial la población de mastocitos de los tejidos de ratones. Así es posible determinar dos fenotipos distintos: mastocitos mucosos (MMC) que se tiñen de azul y mastocitos de tipo conectivo (CTMC) que se tiñen de azul y rojo o sólo de rojo (98). Brevemente la técnica histoquímica es la siguiente: los cortes se incuban con una solución de Alcian blue 1 % en HCl 0.7 M durante tres días, luego se lavan en HCl 0.7 M y se los incuban en una solución de Safranina 0.5 % en HCl 0.125 M.

La evaluación cuantitativa de los mastocitos se realizó utilizando un ocular con cuadrícula de medición, la cual se orientó a lo largo de la unión dermis-epidermis y para cada preparado se contó el número de mastocitos en 30 campos elegidos al azar. Los resultados fueron expresados como número de mastocitos por unidad de área de tejido conectivo.

#### **4.3.2. TECNICA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA**

Con el objeto de analizar las posibles alteraciones ultraestructurales inducidas durante el proceso de promoción tumoral, muestras de piel de ratones tratados según los protocolos de inducción de tumores detallados en la

sección 3.3 fueron extraídas a distintos tiempos durante el proceso de promoción y procesadas para microscopía óptica (descrito en sección 4.3.1) y electrónica simultáneamente. Pequeños trozos de piel de aproximadamente 3x1x1 mm se fijaron en glutaraldehído 2.5 % en buffer cacodilato 0.1 M, pH 7.4, durante 24 horas a temperatura ambiente; fueron postfijados en tetróxido de osmio 2 % en buffer cacodilato por 4 horas y contrastados en bloc con acetato de uranilo en solución acuosa. Luego de la gradual deshidratación en concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a etanol absoluto y óxido de propileno, se incluyeron en Epon 812 en cápsulas Beem. Se tuvo especial cuidado en la orientación de los trozos de tejido, de modo de obtener dermis y epidermis en un plano paralelo al plano de corte. Los cortes se realizaron con navaja de diamante en un ultramicrotomo Reichert UM2, se montaron en grillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones y fotografías se realizaron en un microscopio electrónico Philips 300.

#### **4.4. EVALUACION DE PROMOCION Y PROGRESION TUMORAL**

En los animales tratados según los protocolos de inducción de tumores detallados en la sección 3.3 se determinó la incidencia tumoral semanalmente. Los resultados se presentan como porcentaje de ratones con tumores (incidencia) y número promedio de tumores por ratón (multiplicidad). El análisis estadístico de los datos de promoción tumoral fue realizado por análisis de la varianza.

A partir de las 30 semanas de tratamiento de promoción-progresión, grupos de animales fueron sacrificados por dislocación cervical a fin de extraer los tumores para el análisis histológico de los tipos de tumores desarrollados con los distintos tratamientos. Los tumores fueron fijados en formol neutro y

procesados según las técnicas convencionales de microscopía óptica. Los cortes histológicos obtenidos fueron teñidos con la técnica clásica de hematoxilina y eosina.

Caracterización histológica de los tumores:

Con el objeto de evaluar los tipos de tumores desarrollados con ambos tipos de promotores tumorales y analizar la etapa de conversión maligna (progresión) se realizó el diagnóstico histopatológico de los tumores de acuerdo con los criterios previamente descritos por Chiba y col. (99):

- Papilomas (Pa): tumores exofíticos formados por series de papilas de tejido conectivo cubiertas por epitelio escamoso estratificado, generalmente sin atipía celular.
- Queratoacantomas (KA): tumores con forma de cráter con sus bordes epidérmicos hiperplásicos y con grandes acúmulos de queratina en su parte central, presentando además en la región central numerosas proliferaciones epiteliales irregulares que penetran en la dermis.
- Carcinomas epidermoides (Ca): compuestos de crecimientos epiteliales endofíticos muy irregulares con numerosas atipías celulares, generalmente muy diferenciados con formación de capas queratinizadas y globos córneos.

Las frecuencias de los tipos de tumores desarrollados con los diferentes tratamientos de inducción de tumores fueron analizadas por comparación estadística de las proporciones.

## **RESULTADOS**

### **1. EVALUACIONES DE ESTRES OXIDATIVO**

Se hicieron experimentos de determinación de QL utilizando como modelo experimental ratas hembras Wistar y células epidérmicas aisladas de piel de dorso de animales de dicha cepa con el objeto de poner a punto las condiciones técnicas de medida de QL en piel. El resto de los experimentos fueron realizados en ratones hembras de la cepa SENCAR, debido a la susceptibilidad a la inducción de tumores y a que la mayor parte de la bibliografía sobre la caracterización de este modelo experimental de carcinogénesis se refiere a esta cepa de ratones.

#### **1.1. DETERMINACION DE QL INDUCIDA POR LA ACCION DE OXIDANTES EN CELULAS EPIDERMICAS AISLADAS**

Se determinó la QL generada espontáneamente por células epidérmicas aisladas de ratas Wistar con diferentes cantidades de células totales y se observó un aumento de la QL espontánea en función del número de células (Figura 8).

La inducción de QL por los diferentes agentes oxidantes fue evaluada en viales conteniendo  $3 \times 10^6$  células totales en 5 ml de PBS. En todos los tratamientos con distintas concentraciones de los oxidantes, BzPo, CuOOH o tBOOH, se observó un aumento inmediato de la emisión, que decae en función del tiempo (Figura 9).

A fin de comparar los diversos tratamientos, se expresaron los resultados de QL como el valor promedio de emisión de los 2 primeros minutos posteriores al agregado del oxidante.

La Tabla 1 muestra comparativamente los valores de emisión inducidos por los diferentes agentes oxidantes, BzPo, CuOOH y tBOOH en dosis de 0.5 y 5 mM, notándose un incremento de la QL significativamente mayor frente al tratamiento con BzPo.

La inducción de QL fue dependiente de la dosis de BzPo, para las concentraciones más bajas de BzPo estudiadas, llegando a un máximo de emisión para concentraciones por encima de 2 mM (Figura 10).

TABLA 1

QL inducida por diferentes agentes oxidantes en células epidérmicas de rata

| oxidante | QL (cps) |          |
|----------|----------|----------|
|          | dosis    |          |
|          | 0.5 mM   | 5 mM     |
| BzPo     | 317 ± 31 | 491 ± 43 |
| CuOOH    | 122 ± 1  | 249 ± 12 |
| tBOOH    | 106 ± 4  | 205 ± 21 |

La QL de células epidérmicas tratadas sólo con acetona (controles) fue de 48 ± 14 cps.



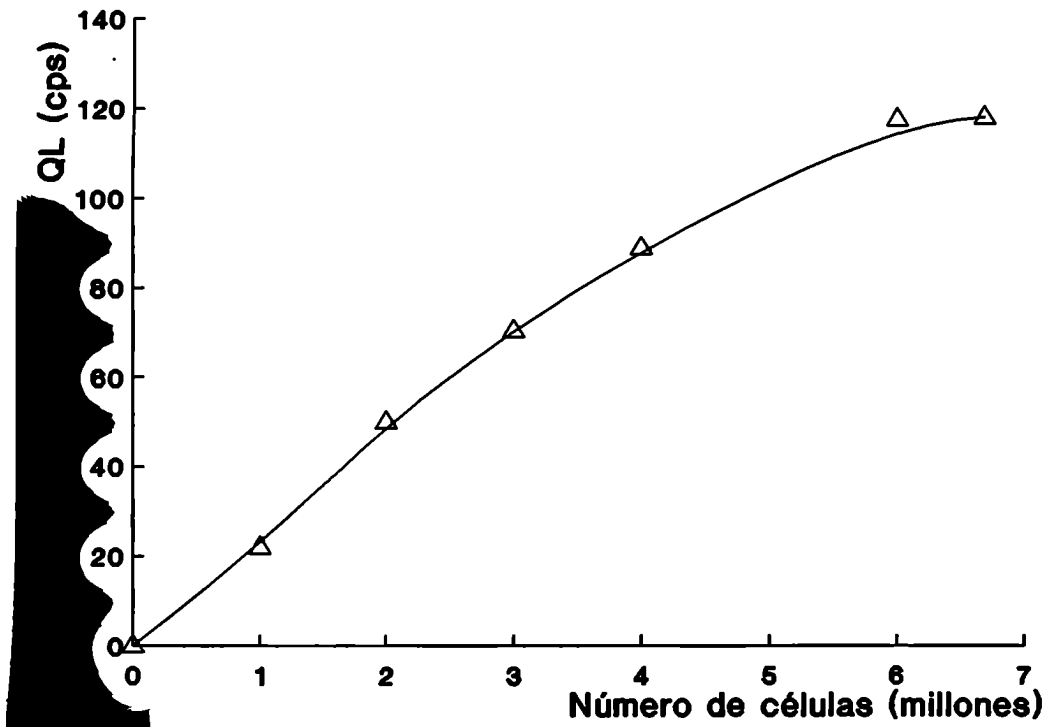


Figura 8

QL espontánea determinada en células epidérmicas *in vitro* en función del número de células.

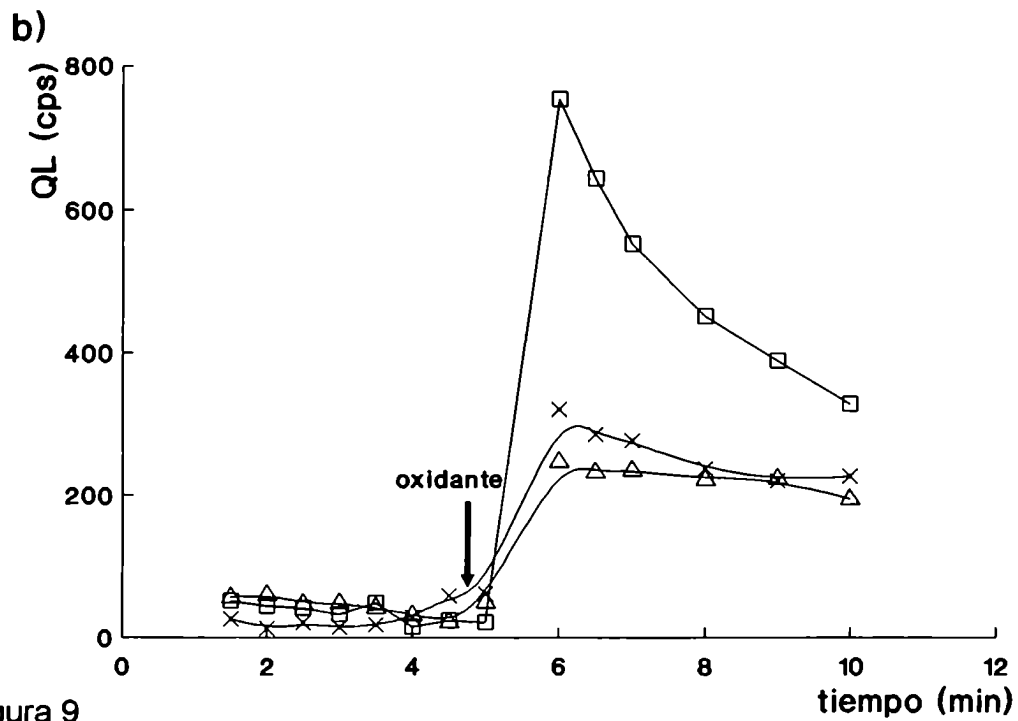
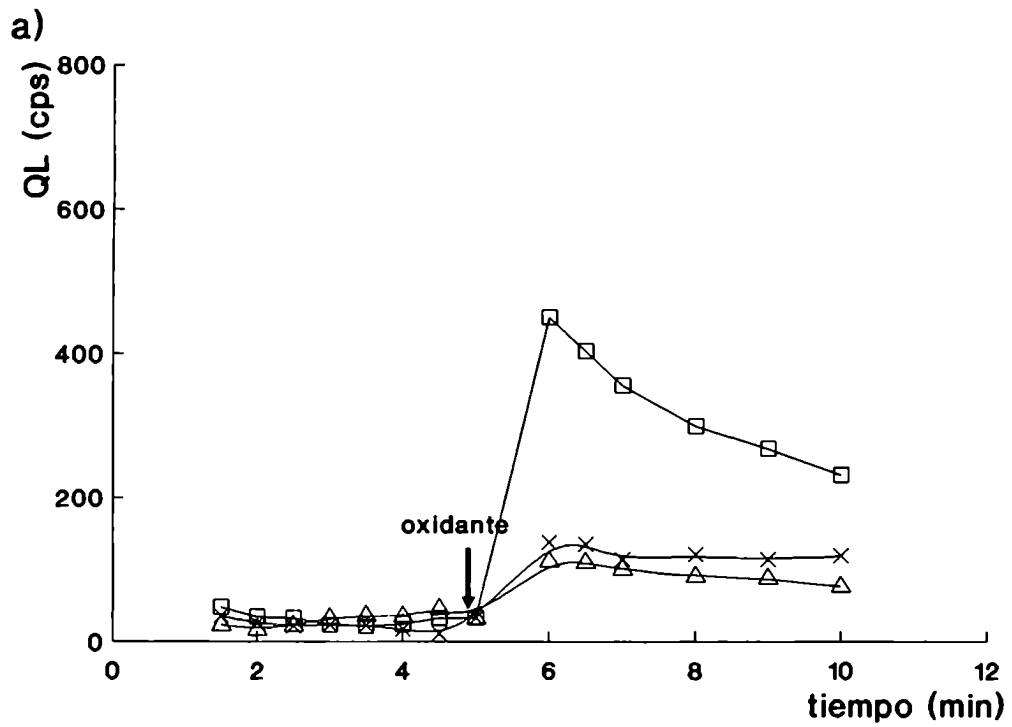


Figura 9

Cinética de la QL inducida por los agentes oxidantes: BzPo (□), CuOOH (x) y tBOOH (Δ), en células epidérmicas aisladas. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de dichos compuestos: a) 0.5 mM y b) 5 mM.

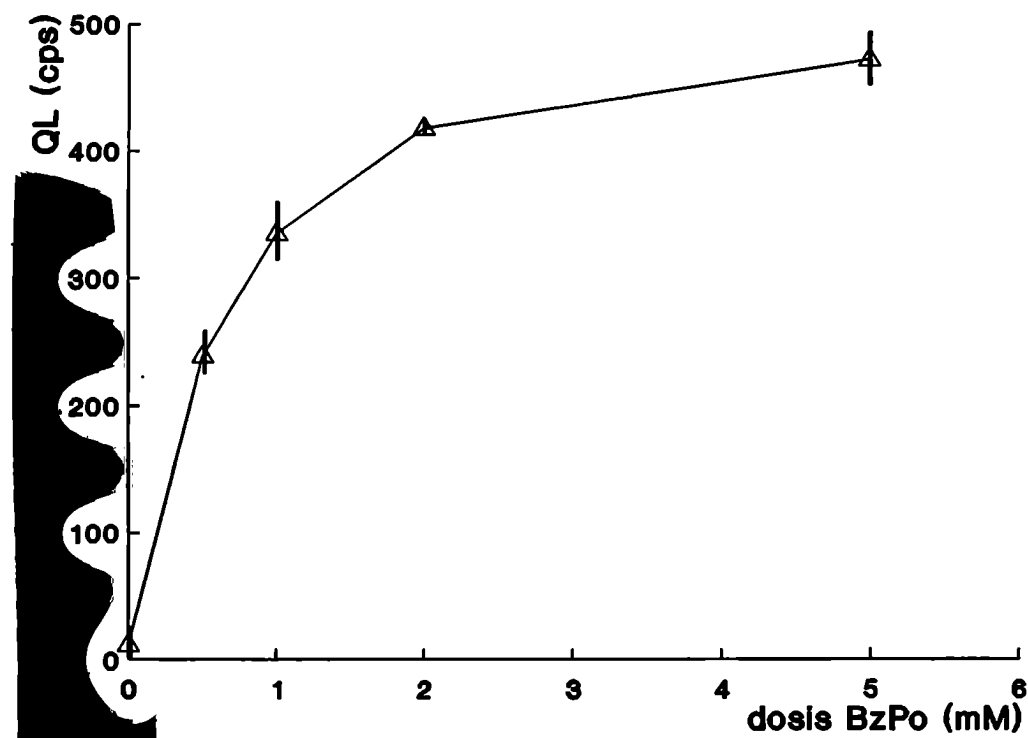


Figura 10

QL inducida por BzPo en células epidérmicas aisladas en función de la concentración de BzPo. Las barras verticales representan la desviación estándar.

## **1.2. DETERMINACION *IN VIVO* DE QL INDUCIDA POR PROMOTORES TUMORALES EN PIEL**

La emisión de piel de ratón no tratado fue en todos los experimentos del orden de 10-15 cps/cm<sup>2</sup>. La aplicación percutánea de 0.2 ml de acetona, vehículo en el cual se aplicaron todas las drogas, no mostró diferencias significativas con los valores de QL en animales sin tratamiento.

### **1.2.1. TRATAMIENTOS CON PEROXIDO DE BENZOILO**

#### **a) QL INDUCIDA POR TRATAMIENTOS UNICOS CON BzPo Y SU MODULACION POR LA ACCION DE ANTIOXIDANTES**

En todos los experimentos donde se observó aumento de la QL, la cinética de emisión mostró un máximo inmediatamente luego del tratamiento y un lento decaimiento de la emisión a lo largo del tiempo. La Figura 11 muestra un ejemplo representativo de la cinética de emisión de la piel de un ratón tratado con BzPo en dosis característica de promoción tumoral (83  $\mu$ moles/ratón).

Ratas Wistar y ratones SENCAR fueron tratados con diferentes dosis de BzPo y la emisión de QL fue determinada inmediatamente después de la aplicación. En todos los experimentos los resultados fueron expresados como cps/cm<sup>2</sup>, valor calculado según lo explicado en materiales y métodos, sección 4.1, considerando las cps del animal expuesto como el valor de emisión detectado en el contador de fotones luego de 1 minuto de tratamiento.

La Figura 12 y 13 muestran la QL inducida por diferentes dosis de BzPo en piel de ratas y ratones respectivamente. En ambos casos se observó un aumento de la QL dependiente de la dosis, llegando a un máximo de

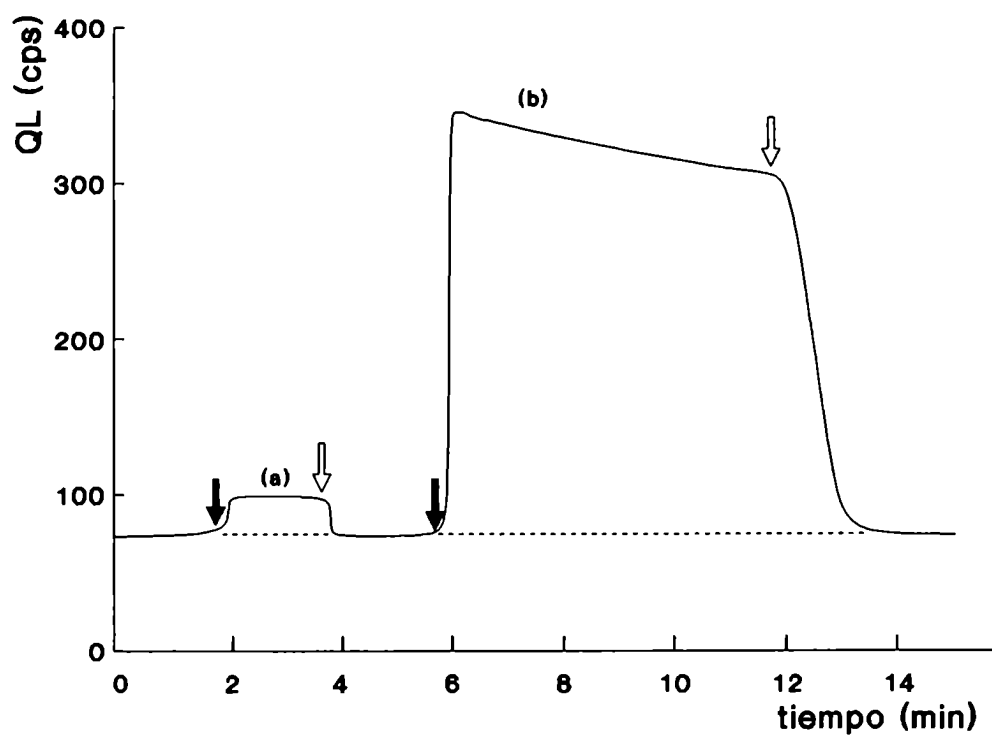


Figura 11

Cinética de la QL en piel de ratón:

a) tratado con 0.2 ml de acetona (control)

b) tratado con 83  $\mu$ moles de BzPo / 0.2 ml de acetona

↓ : apertura del obturador

⇩ : cierre del obturador

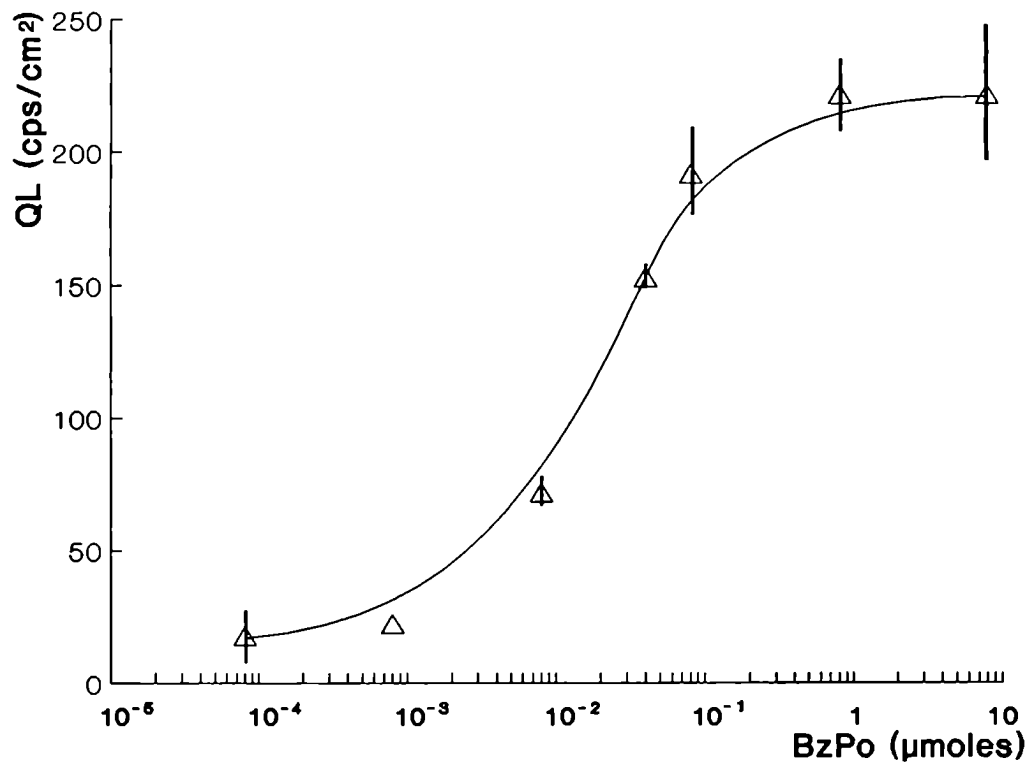


Figura 12

QL inducida por BzPo en piel de ratas Wistar en función de la dosis de BzPo. Las barras verticales representan la desviación estándar.

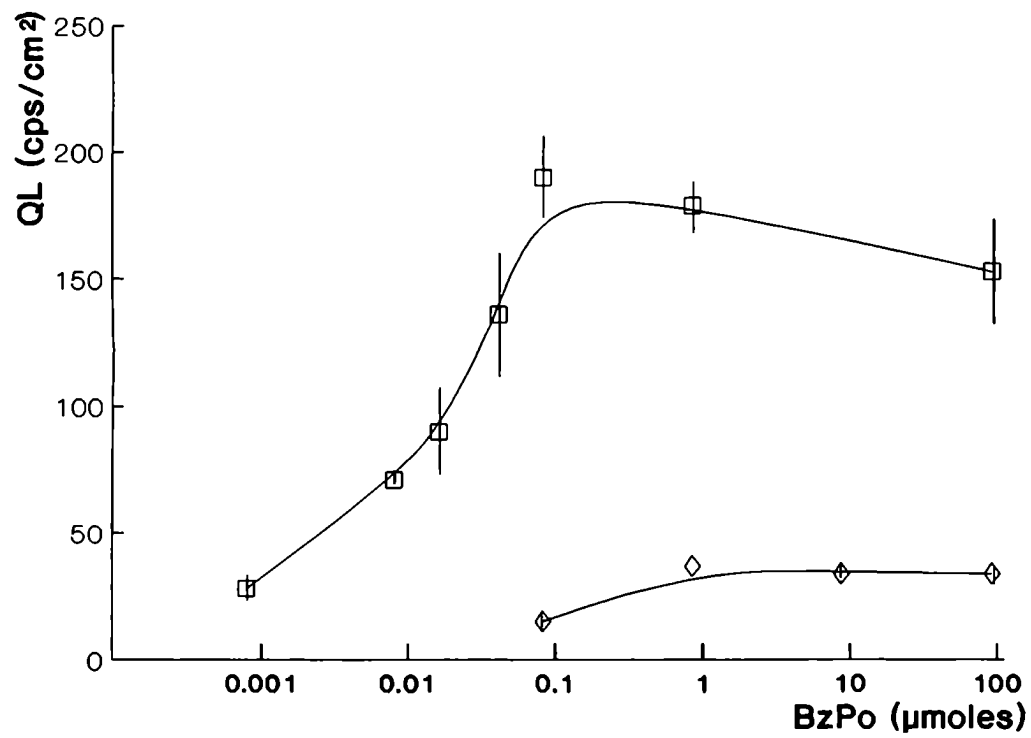


Figura 13

QL inducida por BzPo (□) en piel de ratones SENCAR en función de la dosis de BzPo. Inhibición de la QL por pretratamiento con 2 μmoles de CuDIPS (◇). Las barras verticales representan la desviación estándar.

emisión para dosis de aproximadamente 300 y 80 nmoles/animal para ratas Wistar y ratones SENCAR respectivamente.

Modulación de la QL inducida por BzPo por la acción de antioxidantes:

A fin de caracterizar la QL inducida por BzPo se evaluó la capacidad inhibitoria de diversos compuestos antioxidantes.

La aplicación percutánea de 2  $\mu$ moles de CuDIPS, dosis previamente utilizada para inhibir la promoción tumoral (73,74), 10 minutos antes del tratamiento con diferentes dosis de BzPo resultó en una disminución significativa de la inducción de QL para todas las dosis de BzPo evaluadas (Figura 13).

Se evaluó la capacidad inhibitoria del CuDIPS en función de la dosis aplicada. Para ello, ratones tratados con BzPo en dosis de promoción (83  $\mu$ moles/ratón) fueron pretratados con diferentes dosis de CuDIPS entre 0 y 2  $\mu$ moles. Los resultados mostraron que la inhibición de la QL inducida por BzPo es función de la dosis de CuDIPS aplicada (Figura 14).

Con el objeto de analizar la inhibición de QL inducida por CuDIPS, se estudió el efecto de ZnDIPS y DIPS, análogos estructurales de CuDIPS, pero sin actividad biomimética de SOD. La aplicación percutánea de 2  $\mu$ moles de ZnDIPS o de 4  $\mu$ moles de DIPS 10 minutos antes de la aplicación de 83  $\mu$ moles de BzPo no produjo variaciones significativas en la emisión con respecto a la obtenida en animales tratados sólo con BzPo (Tabla 2).

Se evaluó la QL en ratones pretratados con diferentes dosis de antioxidantes fenólicos, BHA o BHT, aplicados en forma percutánea 10 minutos antes del tratamiento con 83  $\mu$ moles de BzPo. Las dosis de BHA y BHT utilizadas fueron del orden de las descritas para inhibir la promoción tumoral (61), 0-50 y 0-90  $\mu$ moles/ratón para el BHA y el BHT respectivamente. Los resultados obtenidos por pretratamientos con estos antioxidantes se muestran en la Tabla 3. El BHA resultó ser más efectivo como inhibidor de la



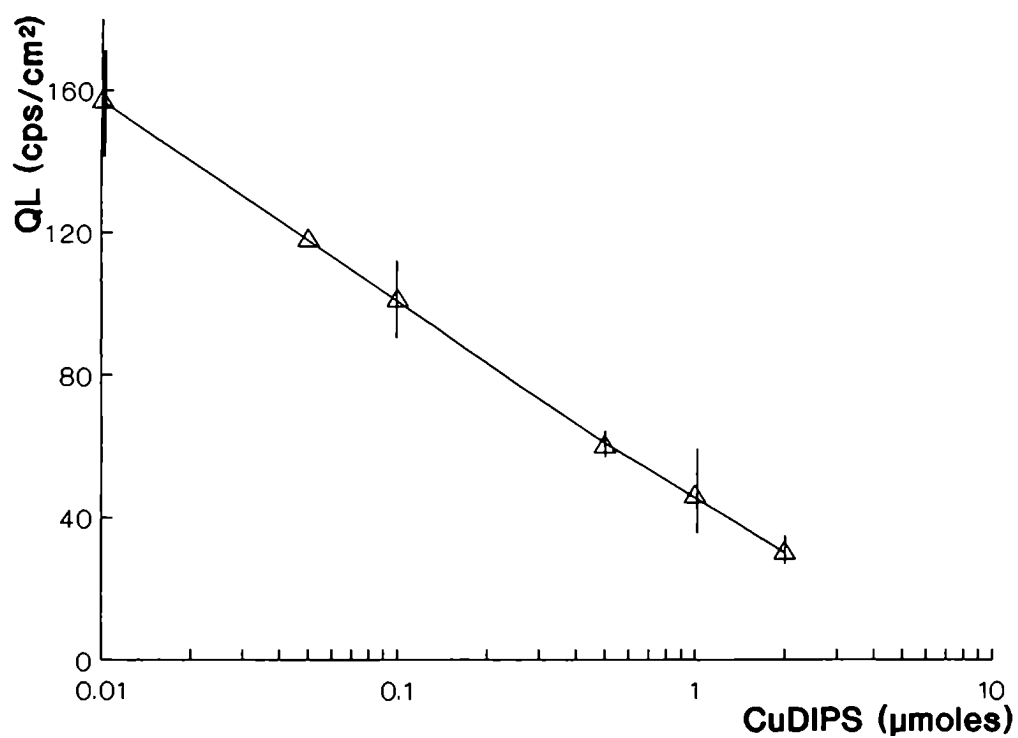


Figura 14

Inhibición de la QL inducida por 83 μmoles de BzPo en función de la dosis de CuDIPS en piel de ratones SENCAR. Las barras verticales representan la desviación estándar.

QL inducida por BzPo que el BHT. No obstante, la inhibición de QL obtenida por pretratamiento con BHA sólo fue parcial, llegando a un máximo de 43 % de inhibición. El pretratamiento con BHT sólo resultó en una leve inhibición de la QL inducida por BzPo.

TABLA 2

QL inducida por tratamiento con BzPo, y pretratamiento con CuDIPS, ZnDIPS o DIPS

| Tratamiento <sup>x</sup> | QL (cps/cm <sup>2</sup> ) | % de BzPo |
|--------------------------|---------------------------|-----------|
| acetona + BzPo           | 120 ± 15 <sup>*</sup>     | 100       |
| CuDIPS 2 µmoles + BzPo   | 36 ± 4                    | 30        |
| ZnDIPS 2 µmoles + BzPo   | 117 ± 20                  | 97        |
| DIPS 4 µmoles + BzPo     | 108 ± 18                  | 90        |

<sup>x</sup> Los valores de QL en animales tratados sólo con acetona (0.2 ml) fue de 10-15 cps/cm<sup>2</sup> en todos los ensayos.

<sup>\*</sup> Los valores representan la media ± la desviación estándar.

TABLA 3

QL inducida por tratamiento con BzPo, y pretratamiento con BHA o BHT

| Tratamiento <sup>x</sup> | BHA o BHT<br>dosis ( $\mu\text{mol/ratón}$ ) | QL<br>(cps/cm <sup>2</sup> ) | % de BzPo |
|--------------------------|--|------------------------------|-----------|
| acetona +<br>BzPo        |  | 116 $\pm$ 20*                | 100       |
| BHA +<br>BzPo            | 5  | 114 $\pm$ 12                 | 98        |
|                          | 25   | 66 $\pm$ 15                  | 57        |
|                          | 50   | 69 $\pm$ 13                  | 59        |
| BHT +<br>BzPo            | 5  | 117 $\pm$ 11                 | 100       |
|                          | 25   | 109 $\pm$ 25                 | 94        |
|                          | 50   | 90 $\pm$ 8                   | 78        |
|                          | 90   | 95 $\pm$ 23                  | 82        |

<sup>x</sup> Los valores de QL en animales tratados sólo con acetona (0.2 ml) fue de 10-15 cps/cm<sup>2</sup> en todos los ensayos.

\* Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar.

## b) QL INDUCIDA POR TRATAMIENTOS MÚLTIPLES CON BzPo

Se estudió la respuesta de la piel frente a tratamientos múltiples con 83  $\mu$ moles de BzPo, determinándose la QL generada inmediatamente después de cada tratamiento. El efecto de los tratamientos múltiples fue analizado variando el intervalo de tiempo entre tratamientos.

Los resultados de dichos tratamientos se muestran en la Figura 15. Tratamientos secuenciales diarios con 83  $\mu$ moles de BzPo produjeron una disminución en la inducción de QL a partir de la segunda aplicación. Tratamientos secuenciales con BzPo con intervalos de tiempo entre sí de 2 ó 3 días también resultaron en una disminución en la QL inducida por la segunda aplicación, con respecto a la primera, aunque la diferencia de QL entre ambas aplicaciones fue menor que la observada por tratamientos diarios. Es decir, al aumentar la separación en el tiempo entre tratamientos, aumentaba la emisión inducida por la segunda topicación hasta no encontrarse diferencias significativas entre los valores de QL de la segunda y primera aplicación de BzPo, cuando el intervalo entre tratamientos fue de 4 días (Figura 16).

Los animales pretratados con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de cada aplicación de 83  $\mu$ moles de BzPo mostraron una significativa inhibición de la QL inducida por BzPo en cada tratamiento (Figura 15).

Se determinó la QL inducida por BzPo en animales previamente iniciados con DMBA, aplicados de acuerdo a los protocolos de iniciación-promoción. Los resultados no muestran diferencias con los obtenidos por tratamientos con BzPo en animales sin iniciación previa (Figura 17). Se continuaron las determinaciones de QL a distintos tiempos durante el proceso de promoción-progresión con BzPo hasta las 40 semanas de tratamiento y no se observaron diferencias con respecto a los valores de emisión obtenidos en animales sin iniciar y tratados con BzPo en forma crónica durante 40 semanas. En los animales pretratados con CuDIPS durante la promoción-progresión la QL se

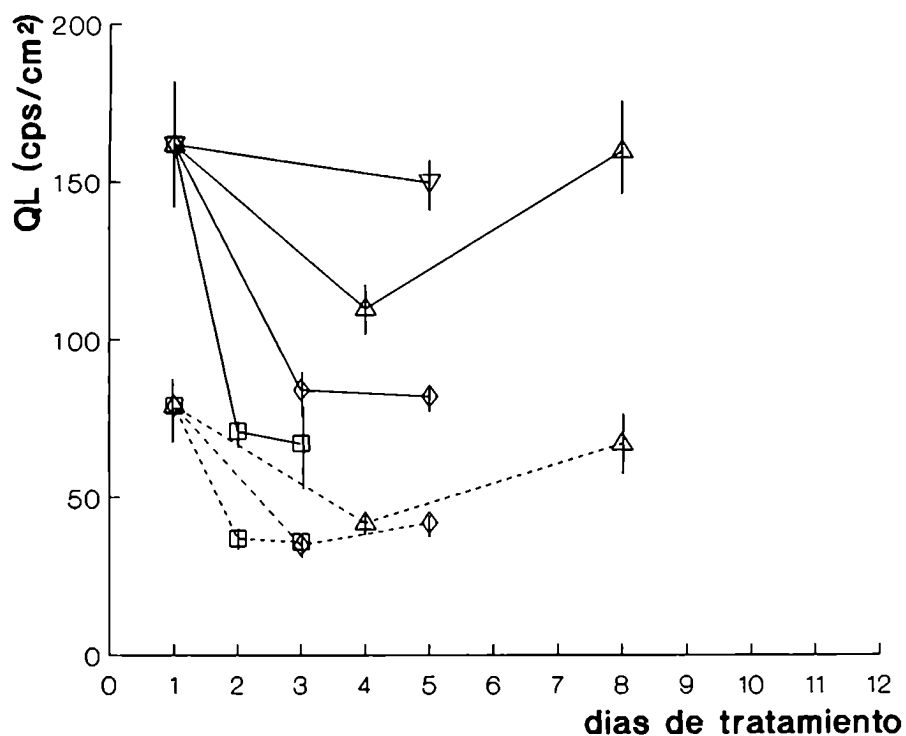


Figura 15

QL inducida por tratamientos múltiples con 83  $\mu$ moles de BzPo en piel de ratones, con diferente intervalo de tiempo entre tratamientos:

(□) tratamientos diarios

(◇) tratamientos cada 2 días

(Δ) tratamientos dos veces por semana

(▽) tratamientos cada 4 días

(—) ratones tratados con BzPo

(- - -) ratones tratados con CuDIPS + BzPo

Las barras verticales representan la desviación estándar.

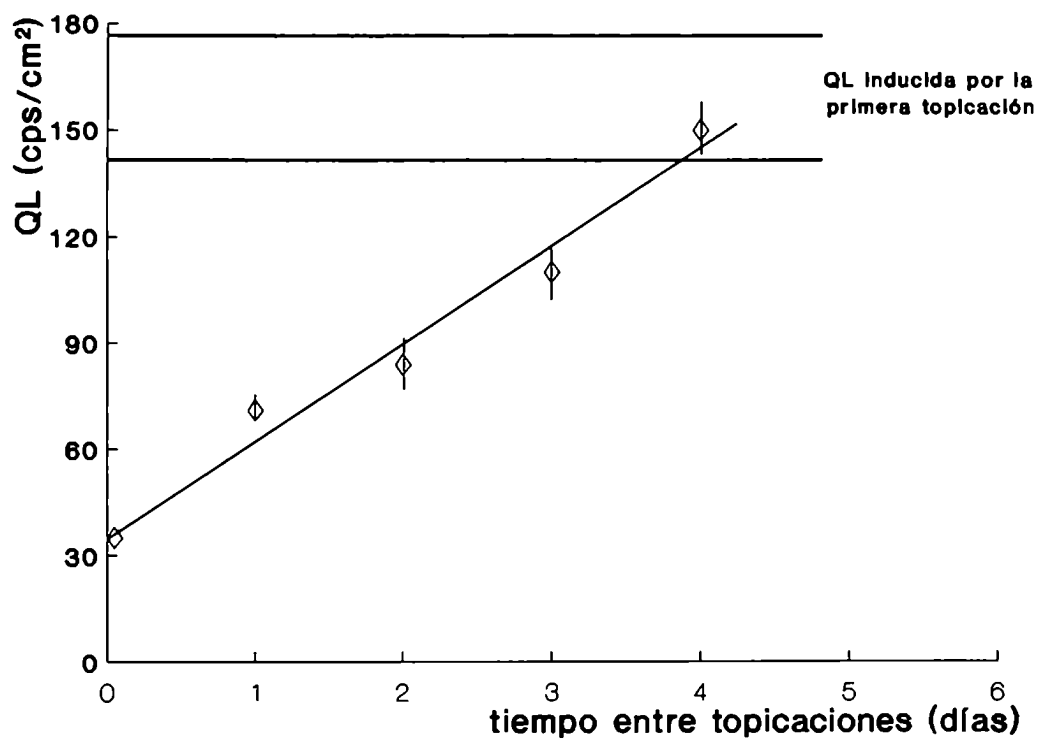


Figura 16

QL inducida por el segundo tratamiento con 83  $\mu$ moles de BzPo en función del tiempo entre tratamientos. Las barras verticales representan la desviación estándar.

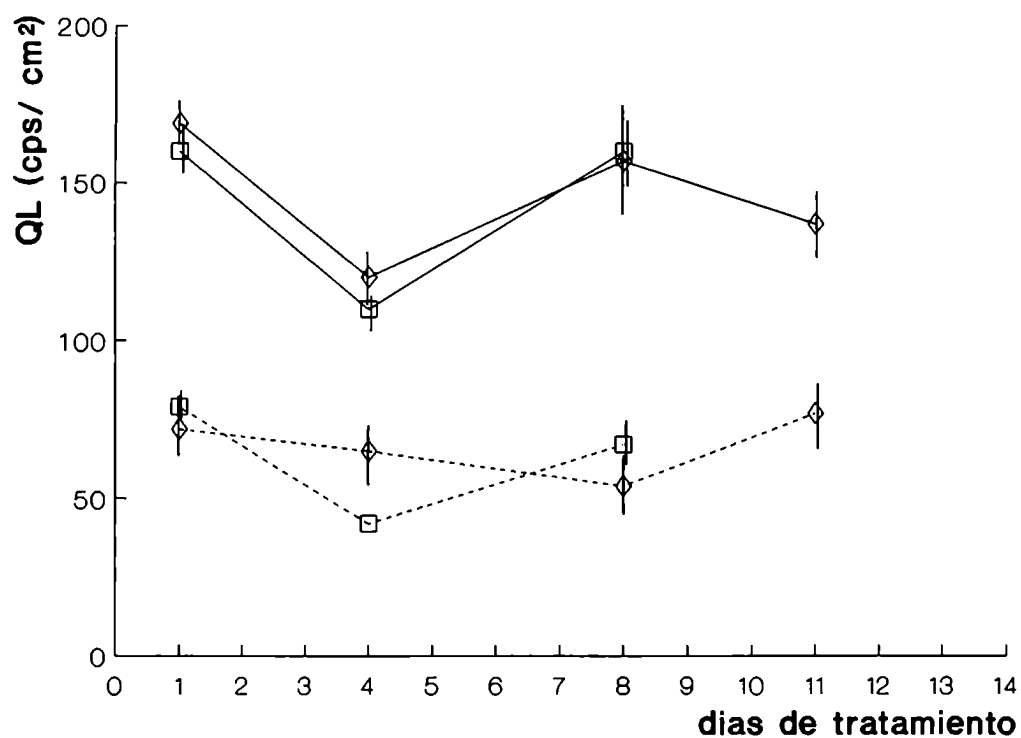


Figura 17

QL inducida por tratamientos múltiples con BzPo en piel de ratones previamente iniciados con DMBA (◇) y de ratones no iniciados (□).

(—) ratones tratados con BzPo

(- - -) ratones tratados con CuDIPS + BzPo

Las barras verticales representan la desviación estándar.

mantuvo disminuída en valores similares a los obtenidos luego de las primeras topicaciones (Figura 17).

### **1.2.2. TRATAMIENTOS CON TPA**

#### **a) DETERMINACION DE QL EN RATONES CON TRATAMIENTOS SIMPLES CON TPA**

Con el objeto de comparar los mecanismos de acción del BzPo con un conocido agente promotor, el TPA, se determinó la QL en ratones tratados en forma percutánea con diferentes dosis de TPA.

La aplicación percutánea de TPA en la dosis normalmente usada en los experimentos de promoción tumoral (78) (3.25 nmoles/ratón) no indujo un aumento en la QL con respecto a los animales control. El valor de emisión en los animales tratados con 3.25 nmoles de TPA fue de  $13 \pm 3$  cps/cm<sup>2</sup>.

Se determinó la QL en animales tratados con dosis crecientes de TPA hasta 105 nmoles/ratón y en ningún caso se observaron variaciones significativas con respecto a los animales control. En animales tratados con 32 y 105 nmoles de TPA los valores de QL obtenidos fueron de  $18 \pm 5$  y  $18 \pm 4$  cps/cm<sup>2</sup> respectivamente.

#### **b) QL INDUCIDA POR TRATAMIENTOS MULTIPLES CON TPA**

La QL inducida por tratamientos repetidos con 3.25 nmoles de TPA fue evaluada inmediatamente después de cada tratamiento con diferentes intervalos de tiempo entre tratamientos.

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos por tratamientos con TPA en comparación con los resultados ya descriptos en el punto anterior de tratamientos repetidos con BzPo. En todos los animales tratados con TPA se



observó un significativo aumento de la QL luego de la segunda aplicación, independientemente del tiempo entre aplicaciones, siendo los valores de QL del doble con respecto a la primera aplicación.

El pretratamiento con 2  $\mu$ moles de CuDIPS 10 minutos antes de cada aplicación de 3.25 nmoles de TPA resultó en una inhibición de la QL inducida por la segunda aplicación de TPA.

TABLA 4

QL inducida por tratamientos secuenciales con TPA o BzPo, aplicados en dosis de promoción, e inhibición por pretratamiento con CuDIPS

| Tratamiento <sup>x</sup> | QL (cps/cm <sup>2</sup> ) |                 |             |              |
|--------------------------|---------------------------|-----------------|-------------|--------------|
|                          | 1er tratamiento           | 2do tratamiento |             |              |
|                          |                           | 24 horas*       | 48 horas*   | 72 horas*    |
| acetona + TPA            | 13 $\pm$ 3 <sup>#</sup>   | 26 $\pm$ 1      | 24 $\pm$ 5  | 29 $\pm$ 6   |
| CuDIPS + TPA             |                           | 14 $\pm$ 2      |             | 10 $\pm$ 2   |
| acetona + BzPo           | 162 $\pm$ 20              | 71 $\pm$ 8      | 84 $\pm$ 15 | 110 $\pm$ 16 |
| CuDIPS + BzPo            | 79 $\pm$ 22               | 37 $\pm$ 6      | 35 $\pm$ 4  | 42 $\pm$ 4   |

<sup>x</sup> Los valores de QL en animales tratados sólo con acetona (0.2 ml) fue de 10-15 cps/cm<sup>2</sup> en todos los ensayos.

\* Tiempo entre tratamientos

<sup>#</sup> Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar.

## **2. EVALUACIONES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

### **2.1. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE SOD Y CATALASA**

#### **2.1.1. MODULACION DE ACTIVIDAD DE SOD Y CATALASA POR UN UNICO TRATAMIENTO CON TPA O BzPo**

Se determinó la actividad de SOD y catalasa en ratones SENCAR tratados con una sólo aplicación percutánea de TPA o BzPo en las dosis utilizadas para los experimentos de promoción, o acetona (controles) y sacrificados a distintos tiempos post-tratamiento.

Las actividades de SOD y catalasa en epidermis de ratones tratados sólo con acetona no mostraron diferencias con respecto a las de animales sin tratamiento. El valor promedio de actividad de SOD total y catalasa en animales control fue de  $68.63 \pm 8.40$  y  $37.48 \pm 3.71$  Unidades/mg proteína respectivamente.

La Figura 18 muestra las variaciones en la actividad de SOD total en epidermis de animales tratados con TPA o BzPo. Los datos están expresados como porcentaje del control. Cuando se determinó la actividad de SOD en presencia de KCN con el objeto de diferenciar los dos tipos de SOD, en ningún caso, independientemente del tratamiento, se inhibió la velocidad de reducción de NBT en presencia del extracto epidérmico, es decir, no se detectó actividad de Mn-SOD.

El tratamiento con TPA indujo una disminución altamente significativa en la actividad de SOD a partir de las 2 horas post-topicación, llegando a una disminución máxima del 45 % a las 4 horas; esta disminución se mantuvo hasta las 18 horas, notándose una parcial recuperación a las 24 horas post-tratamiento.

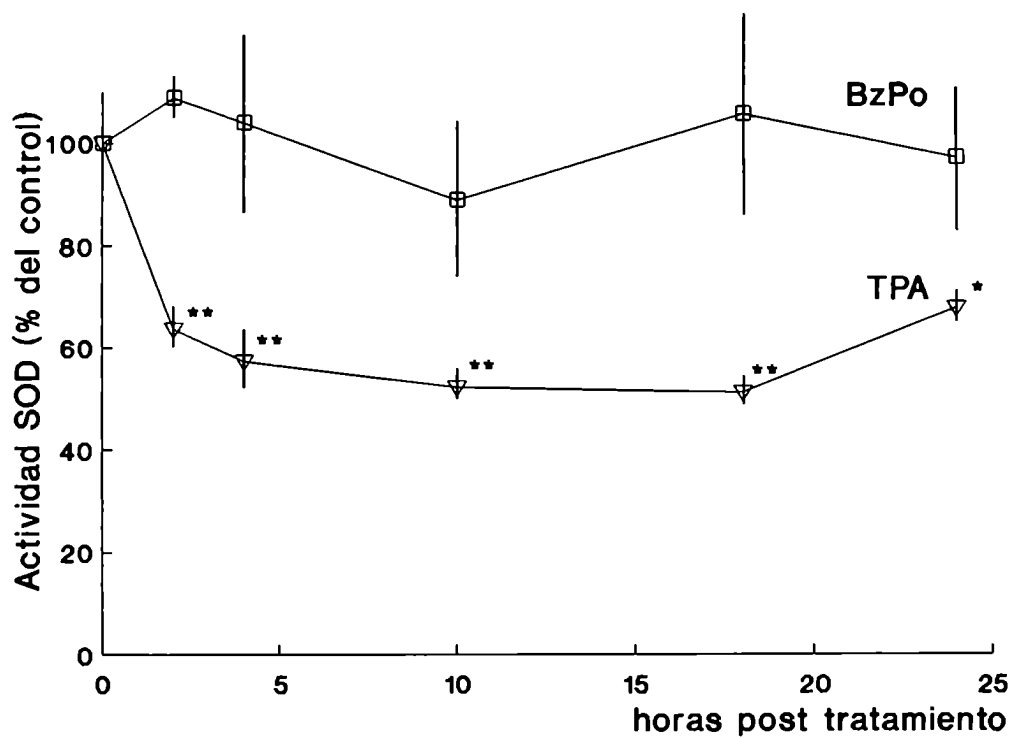


Figura 18

Actividad de SOD total (expresada como porcentaje del control) en función del tiempo post-tratamiento, en epidermis de ratones tratados con una dosis única de BzPo ( $\square$ ) o de TPA ( $\nabla$ ).

Las barras verticales representan la desviación estándar.

Diferencias significativas con respecto al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

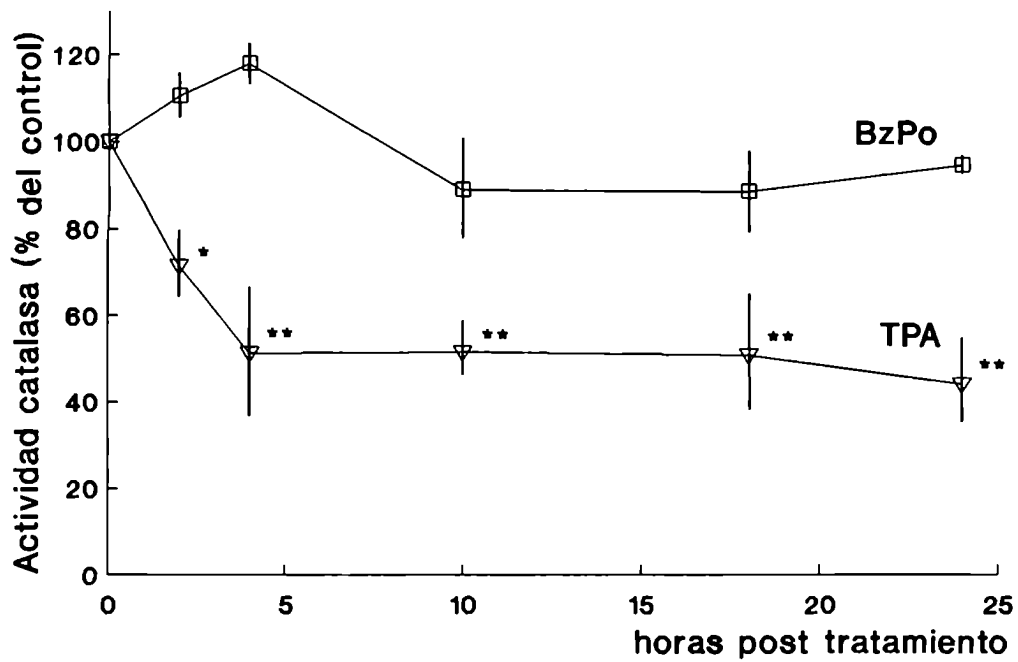


Figura 19

Actividad de catalasa (expresada como porcentaje del control) en función del tiempo post-tratamiento en epidermis de ratones tratados con una dosis única de BzPo ( $\square$ ) o de TPA ( $\nabla$ ).

Las barras verticales representan la desviación estándar.

Diferencias significativas con respecto al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Por el contrario, la actividad de SOD en epidermis de animales tratados con BzPo no mostró diferencias significativas con respecto al control.

La figura 19 muestra la actividad de catalasa en epidermis de animales tratados con TPA o BzPo. Los datos están expresados como porcentaje del control.

En los animales tratados con TPA se observaron diferencias significativas con respecto al control en la actividad de catalasa a partir de las 2 horas post-topicación, llegando a una disminución máxima del 50 % a las 4 horas, que se mantuvo aún a las 24 horas.

Por otro lado, en animales tratados con BzPo no se observaron diferencias significativas en la actividad de catalasa con respecto al control.

Por lo tanto, las Figuras 18 y 19 muestran que la respuesta de la epidermis frente a la acción de los promotores tumorales es similar para ambas enzimas, resultando en una disminución importante de las actividades de SOD y catalasa por tratamientos únicos con TPA, a diferencia del BzPo que no tendría ningún efecto directo sobre la actividad de dichas enzimas.

### **2.1.2. MODULACION DE ACTIVIDAD DE SOD Y CAT DURANTE LA PROMOCION TUMORAL**

Ratones SENCAR iniciados con DMBA y tratados con acetona (controles), TPA o BzPo dos veces por semana de acuerdo a los protocolos previamente detallados (materiales y métodos, sección 3.3) fueron sacrificados a distintos tiempos durante el proceso de promoción a fin de determinar las posibles variaciones inducidas en las actividades de SOD y catalasa por la acción crónica de los agentes promotores.

Se evaluaron las actividades de ambas enzimas en epidermis extraída de animales con diferente cantidad de tratamientos de promoción sacrificados a las 18 horas del último tratamiento.

Los datos de actividad de SOD y catalasa en los animales utilizados como control (iniciados con DMBA y tratados durante la promoción con acetona) no mostraron diferencias significativas con respecto a las actividades en animales sin ningún tratamiento. Los valores promedio de actividad de SOD y catalasa en los controles resultó ser de  $63.32 \pm 8.39$  y  $42 \pm 4.98$  Unidades/mg proteína respectivamente.

Los datos de actividad de ambas enzimas obtenidos durante el proceso de promoción fueron expresados como porcentaje del control.

En la Figura 20 se observa que el TPA indujo una disminución en la actividad de SOD a partir del primer tratamiento, que resultó ser altamente significativa con respecto a los controles, coincidiendo con lo observado luego de un sólo tratamiento con TPA. La actividad se mantuvo disminuída a lo largo de todo el proceso más del 50 % con respecto al control. En los animales tratados con BzPo, si bien no hubo cambios significativos en la actividad de SOD luego del primer tratamiento de promoción, se observó una disminución altamente significativa de la actividad a las 2 semanas de promoción con BzPo, siendo esta disminución del orden del 40 %. Contrariamente a lo observado en la promoción con TPA, luego de 5 semanas de promoción con BzPo se observó una tendencia a la recuperación de los niveles de actividad de SOD, haciéndose dicha recuperación evidente a las 9 semanas de promoción con una disminución de actividad con respecto al control del 20 %.

Con respecto a la catalasa, la Figura 21 muestra el efecto de ambos promotores sobre la actividad de dicha enzima. En coincidencia con lo observado para la SOD, la promoción con TPA indujo una disminución altamente significativa en la actividad de catalasa a partir del primer tratamiento, manteniéndose dicha actividad disminuída en más del 60 % durante el proceso de promoción. Por otro lado, la acción del BzPo, al igual que para la SOD, no resultó en cambios significativos en la actividad de catalasa luego del primer tratamiento, pero a las dos semanas de promoción

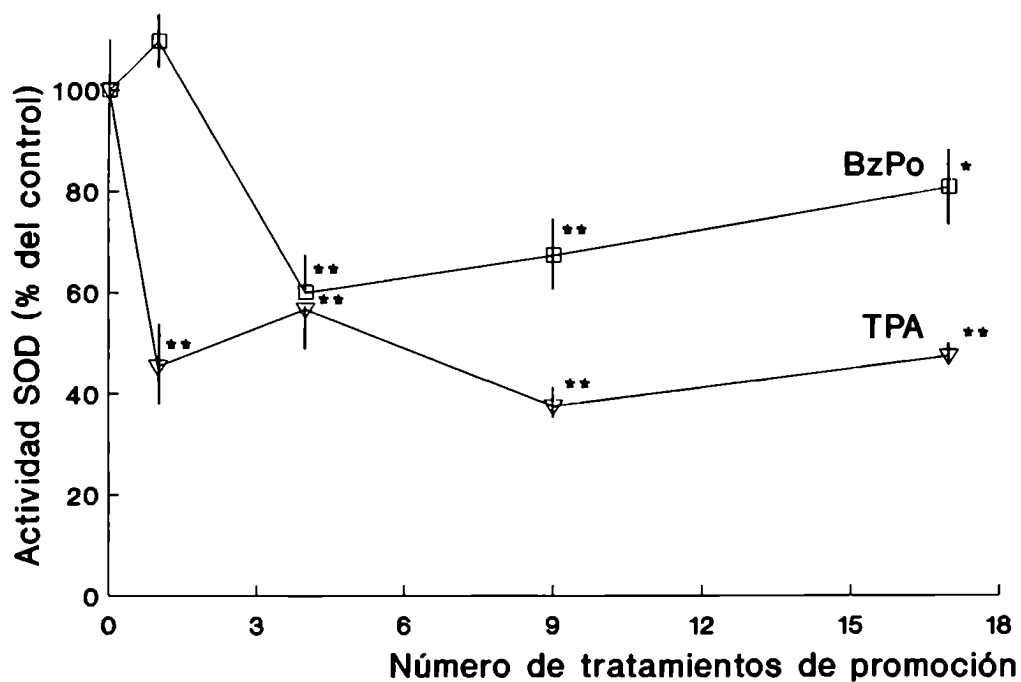


Figura 20

Actividad de SOD total (expresada como porcentaje del control) en función del número de tratamientos de promoción con BzPo (□) o TPA (▽) en epidermis de ratones previamente iniciados con DMBA.

Las barras verticales representan la desviación estándar.

Diferencias significativas con respecto al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

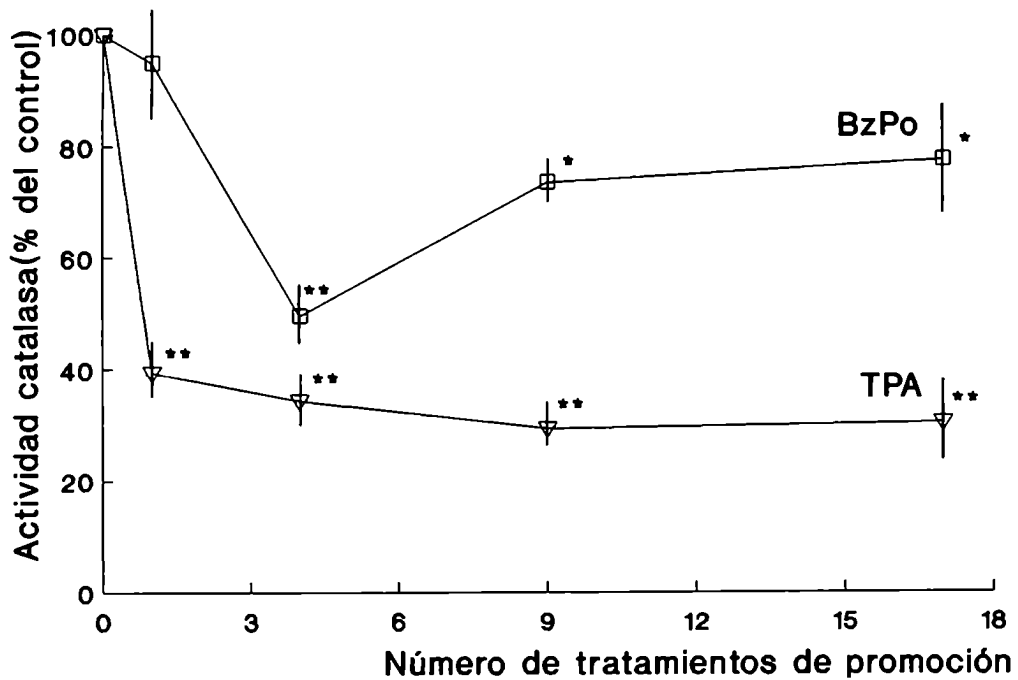


Figura 21

Actividad de catalasa (expresada como porcentaje del control) en función del número de tratamientos de promoción con BzPo ( $\square$ ) o TPA ( $\nabla$ ) en epidermis de ratones previamente iniciados con DMBA.

Las barras verticales representan la desviación estándar.

Diferencias significativas con respecto al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



se produjo una disminución altamente significativa de la actividad del orden del 50 %. Se observó una recuperación de la actividad de catalasa luego de períodos más largos de promoción, siendo la disminución de actividad del orden del 25 % a partir de las 5 semanas de promoción.

Por lo tanto, se concluye de las Figuras 20 y 21 que las actividades de ambas enzimas antioxidantes permanecieron disminuídas en forma marcada durante la promoción con TPA, mientras que en la promoción con BzPo hubo una importante disminución de actividades luego de pocos tratamientos y una tendencia a la recuperación de dichas actividades enzimáticas a medida que se avanza en la promoción.

## **2.2. DETERMINACION DE ARNm DE SOD**

Se evaluó mediante northern blot el contenido de ARNm de SOD en piel de animales tratados con un único tratamiento con BzPo o con TPA, o con dos tratamientos con BzPo, espaciados entre sí por 72 horas, ambos promotores fueron aplicados en las dosis utilizadas en los experimentos de promoción tumoral y los animales sacrificados a distintos tiempos post-tratamiento (6 y 24 horas). Las sondas utilizadas para las hibridizaciones fueron: cADN de Cu,Zn-SOD o cADN de Mn-SOD de rata.

La Figura 22 muestra un northern blot hibridizado con la sonda de CU,Zn-SOD y rehibridizado con la sonda de ARNr 7S a fin de evaluar la carga de ARN.

Estos resultados muestran una marcada disminución del contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD en piel de animales tratados con TPA. Los resultados de las densitometrías revelaron una disminución del 54 % en el contenido de dicho ARNm a las 6 horas de tratamiento con TPA y una leve recuperación a las 24 horas de tratamiento, siendo la disminución a las 24 horas del 40 %.

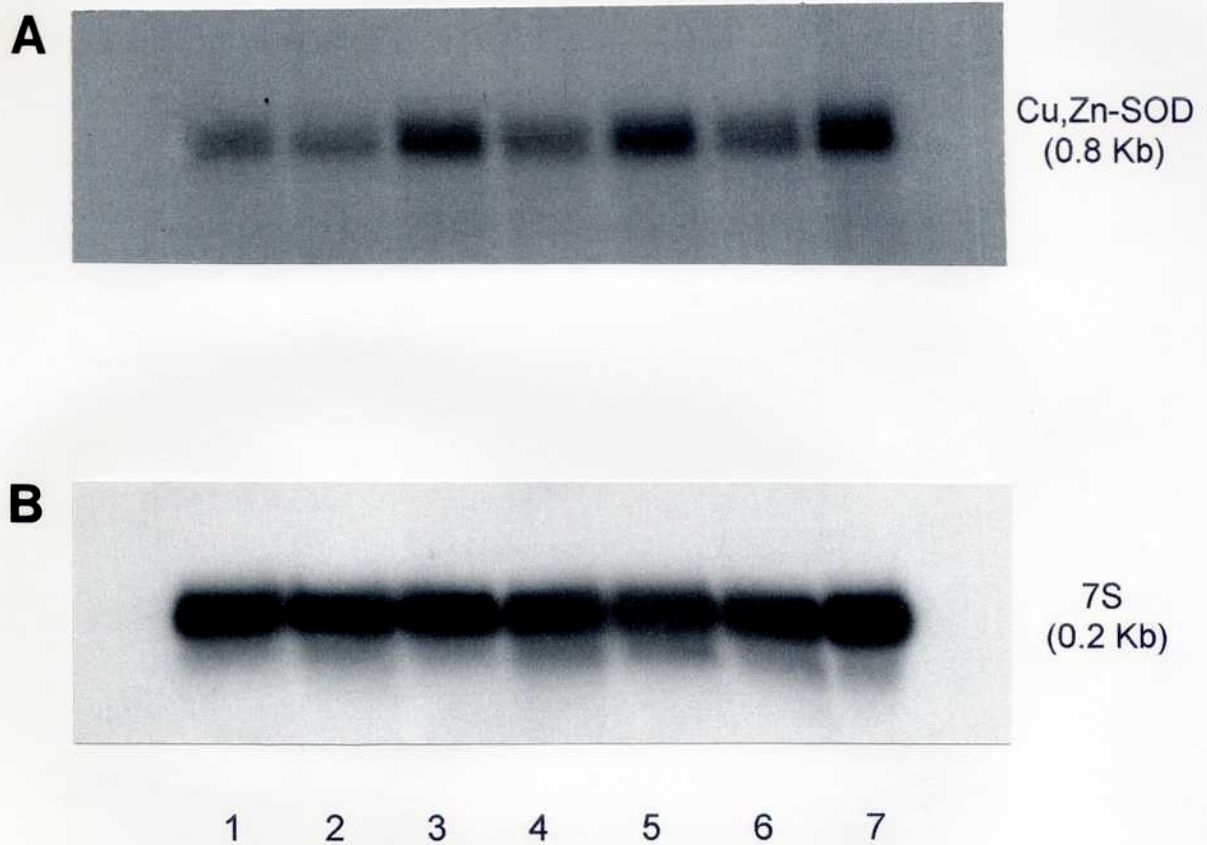


Figura 22

Análisis mediante northern blot de ARNm de Cu,Zn SOD (A) y de ARNr 7S (B) de piel de ratones tratados con una (1x) o dos (2x) aplicaciones de TPA o BzPo y sacrificados a las 6 o 24 horas luego del último tratamiento:

1) TPA 1x, 24 hs., 2) TPA 1x, 6 hs., 3) BzPo 2x, 24 hs., 4) BzPo 2x, 6 hs., 5) BzPo 1x, 24 hs., 6) BzPo 1x, 6 hs., 7) control (piel normal tratada con acetona).

En los ratones tratados con un única aplicación con BzPo, se produjo una parcial disminución, 20 % con respecto a los animales control, del contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD a las 6 horas de tratamiento, y una total recuperación a las 24 horas post-tratamiento. Luego de dos aplicaciones con BzPo, la disminución del contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD a las 6 horas del último tratamiento, fue del 43 % con respecto al control, notándose también una total recuperación a las 24 horas post-tratamiento.

Cuando se realizaron hibridaciones con la sonda de Mn-SOD, en todos los casos se obtuvieron señales apenas detectables, no pudiéndose analizar diferencias entre los diferentes tratamientos.

### **3. EVALUACION DE ALTERACIONES MORFOLOGICAS DURANTE LA PROMOCION Y PROGRESION TUMORAL**

#### **3.1. EVALUACION DEL ESPESOR EPITELIAL**

Se evaluó el espesor epitelial por microscopía óptica en cortes histológicos de piel de ratones tratados con una única dosis con el agente promotor (BzPo o TPA) o con múltiples tratamientos según los protocolos de inducción de tumores detallados en materiales y métodos, sección 3.

Las muestras de pieles control tratadas sólo con acetona en ningún caso mostraron diferencias en el espesor epitelial con respecto a lo observado en pieles de ratones sin ningún tratamiento.

Las evaluaciones de espesor epitelial en muestras de pieles procesadas a las 72 horas de un único tratamiento con BzPo o TPA aplicados en dosis de promoción no reflejaron diferencias en el espesor entre pieles de animales tratados con BzPo y de controles (Figura 23). En cambio, el tratamiento con TPA resultó en una moderada hiperplasia epitelial (Figura 23).

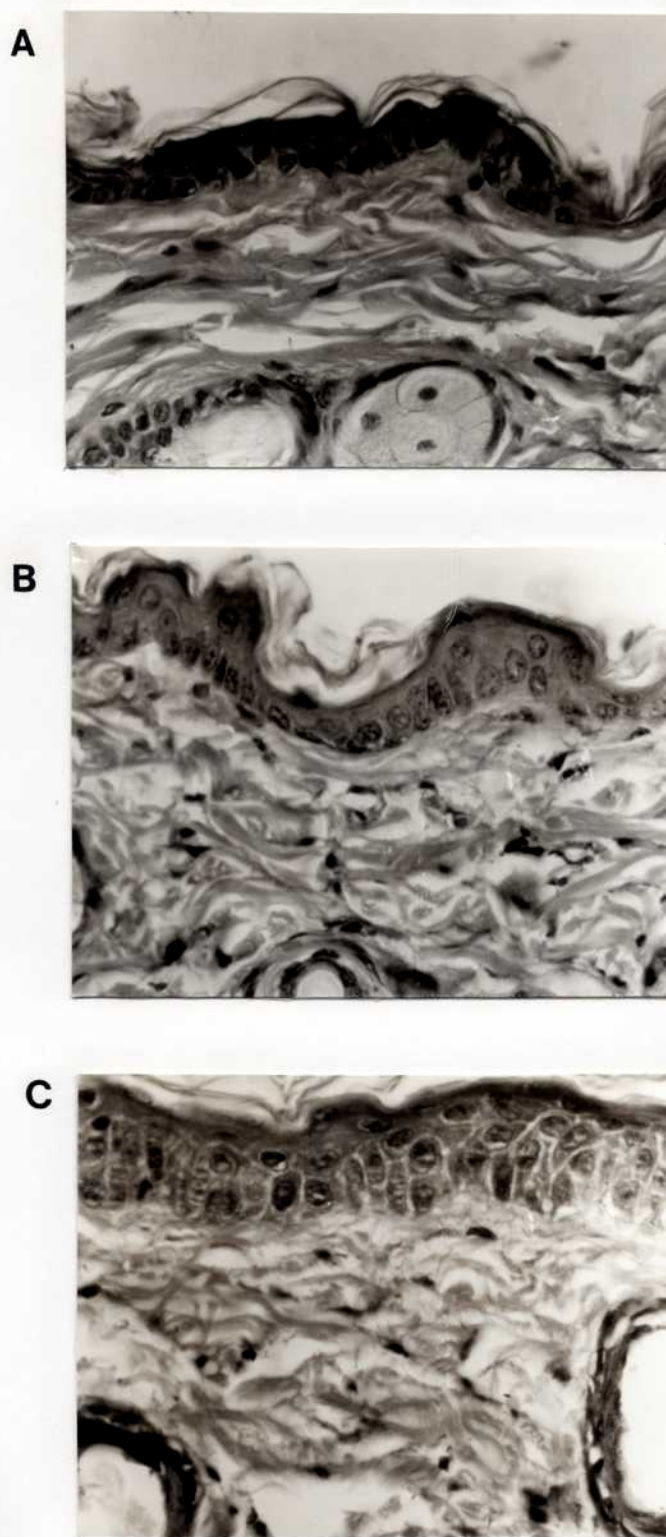


Figura 23

Microfotografías de piel de ratones tratados con una única aplicación de:  
A) acetona (control), B) BzPo y C) TPA. Aumento: 400 x

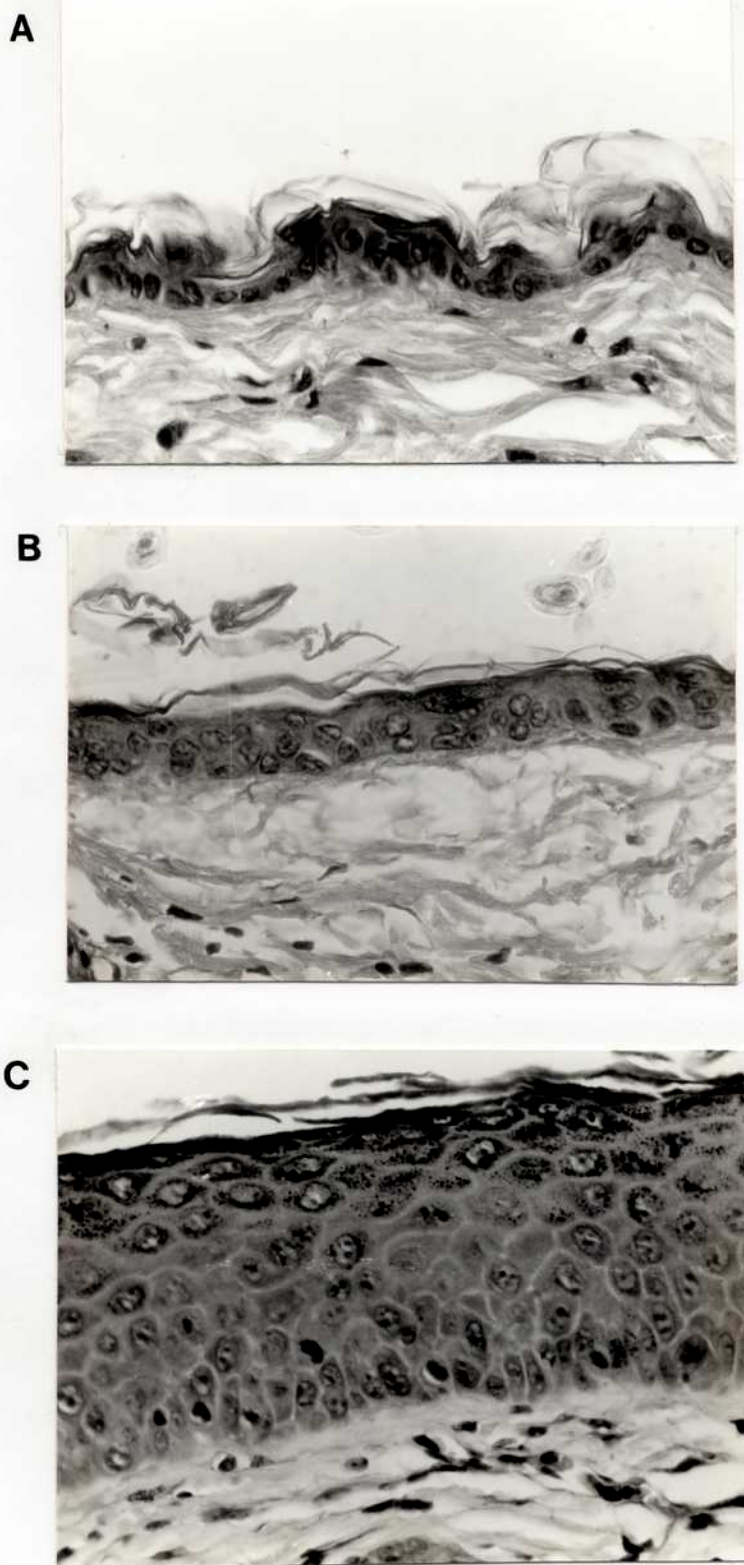


Figura 24

Microfotografías de piel de ratones a las 9 semanas de promoción.  
A) acetona (control), B) BzPo y C) TPA. Aumento: 400 x

La Figura 24 muestra el aspecto de la piel en la semana 9 de promoción con BzPo o TPA. Se observa que en la piel promovida con BzPo no se detectaron cambios en el número de estratos epidérmicos ni otro tipo de cambios morfológicos detectables por técnicas convencionales de microscopía óptica. En cambio, es muy significativo el grado de hiperplasia epidérmica desarrollado por la acción del TPA durante la promoción.

### **3.2. EVALUACION DE REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO**

El análisis de las muestras de piel teñidas con la técnica de plata coloidal demostró variaciones en los AgNORs durante el proceso de carcinogénesis. La Figura 25 muestra microfotografías representativas de epitelios de ratón control y de ratón promovido con BzPo durante 10 semanas, y de papiloma como un ejemplo de tejido tumoral.

La evaluación del número de AgNOR por núcleo (N.NOR) reveló un significativo aumento ( $p < 0.01$ ) en los tres tipos de tumores. En cambio, no se detectaron diferencias significativas en la piel sin tumores durante el período de promoción hasta la semana 24, cuando los tumores ya se habían desarrollado. Los valores promedio de N.NOR obtenidos fueron: en los controles  $2.33 \pm 0.40$ , durante la promoción  $2.36 \pm 0.46$  y en los tumores (considerados en conjunto los tres tipos de tumores, dado que no había diferencias significativas entre los mismos)  $7.46 \pm 0.44$ .

El análisis de la distribución de frecuencias del volumen total de AgNOR por núcleo (VT.NOR) demostró una tendencia al aumento de VT.NOR durante el período de promoción, que fue estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) a partir de la semana 2 de promoción (Figura 26). En el 90 % de los núcleos control se obtuvieron valores de VT.NOR entre 0 y  $5.3 \mu\text{m}^2$ , mientras que sólo en el 40-50 % de los núcleos de muestras de piel en promoción se



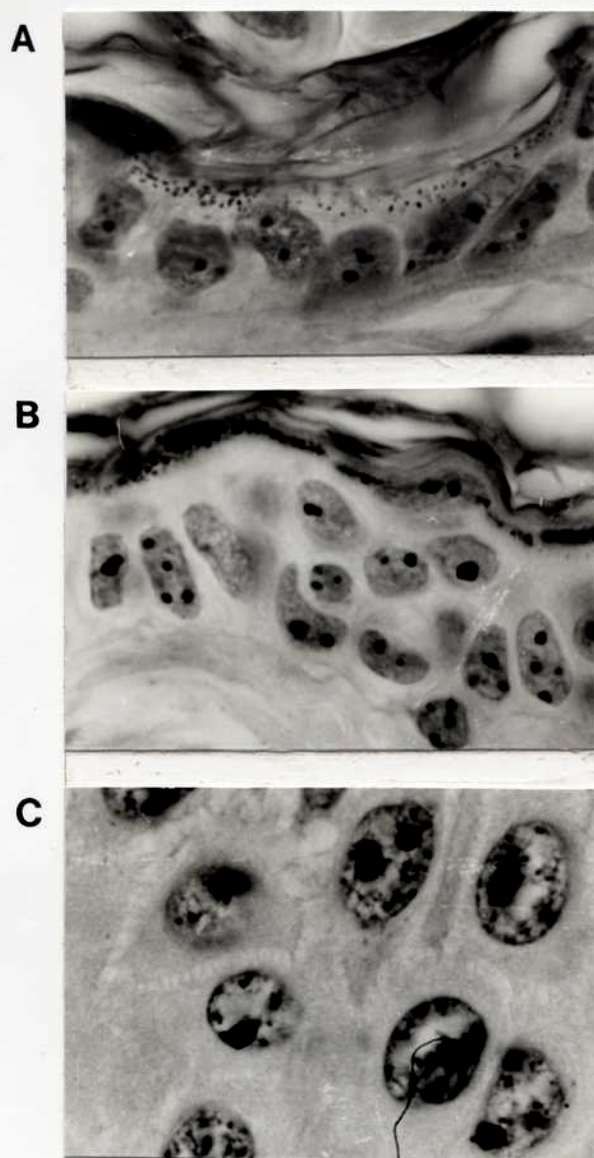


Figura 25

Microfotografías de piel de ratones teñidas con la técnica de plata coloidal, que permite visualizar las regiones organizadoras del nucleolo (AgNORs).

Aumento: 2000 x.

A) control, B) 10 semanas de promoción con BzPo y C) papiloma.

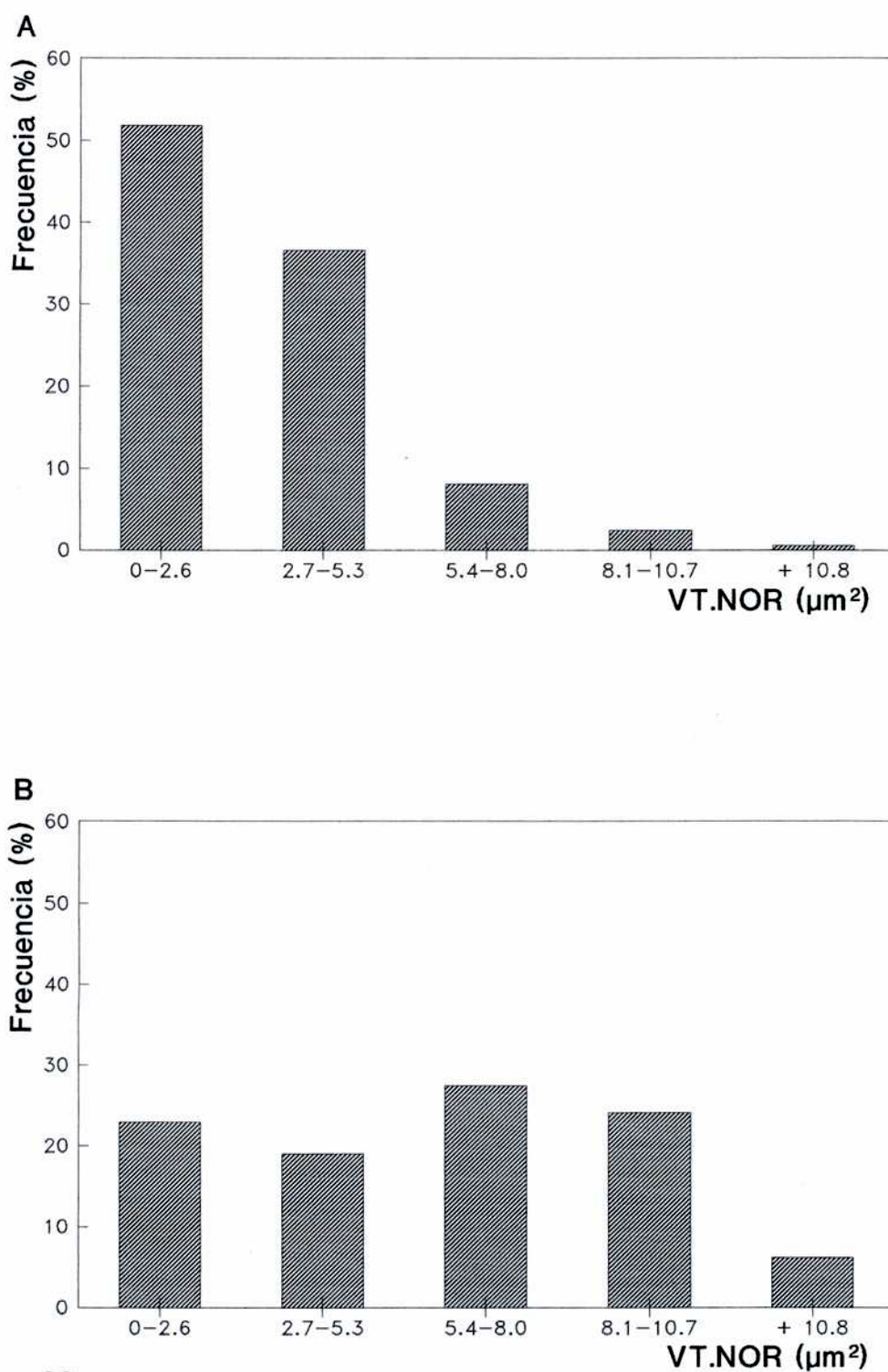


Figura 26

Distribución de frecuencias del volumen total de AgNORs por núcleo (VT.NOR)

A) epitelio control

B) epitelio a las 2 semanas de promoción con BzPo



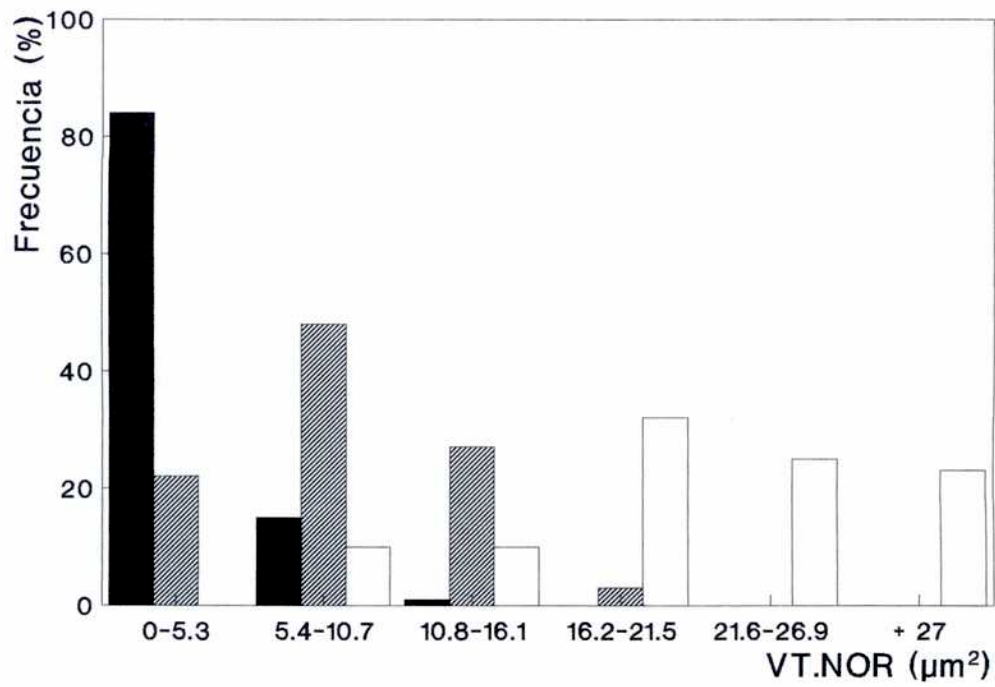


Figura 27

Distribución de frecuencias del volumen total de AgNORs por núcleo (VT.NOR) en epitelio control (■), epitelio en promoción (▨) y papiloma (□).

encontraron VT.NOR entre 0 y  $5.3 \mu\text{m}^2$ , siendo mayor el porcentaje de núcleos con valores de VT.NOR mayores de  $5.4 \mu\text{m}^2$ .

Los valores de VT.NOR en tumores difirió significativamente ( $p < 0.01$ ) de los valores de VT.NOR, tanto de epitelios control como de epitelios en promoción (Figura 27). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de VT.NOR entre los diferentes tipos de tumores. La Figura 27 muestra comparativamente la distribución de frecuencias de VT.NOR en epitelio de animales control, de animales en promoción y en papilomas tomados como ejemplo de tejido tumoral .

La proporción de núcleo ocupado por AgNORs (VT.NOR/V.NUC) en los epitelios en promoción aumentó concomitantemente con VT.NOR dado que no se encontraron diferencias significativas en V.NUC de epitelios control y epitelios en promoción.

Los valores de V.NUC aumentaron significativamente ( $p < 0.01$ ) en los tres tipos de tumores. No obstante, el aumento de VT.NOR en los tumores fue notablemente superior proporcionalmente al aumento de V.NUC, por lo tanto, la porción de núcleo ocupada por AgNORs, VT.NOR/V.NUC, es superior en los tumores que en los epitelios control o en promoción . Los valores promedio de VT.NOR/V.NUC obtenidos fueron en epitelios control de  $0.0711 \pm 0.004$  y en tumores de  $0.1953 \pm 0.008$ .

### **3.3. EVALUACION DE ALTERACIONES CELULARES EN LA DERMIS. CARACTERIZACION DE LAS POBLACIONES DE MASTOCITOS**

El análisis ultraestructural de la piel demostró importantes cambios estructurales en la dermis durante el proceso de promoción tumoral. El aspecto y densidad celular de la dermis de ratones tratados con BzPo como promotor, de acuerdo con el protocolo de inducción de tumores detallado en la sección 3.3 de materiales y métodos, fue sustancialmente diferente de la dermis de

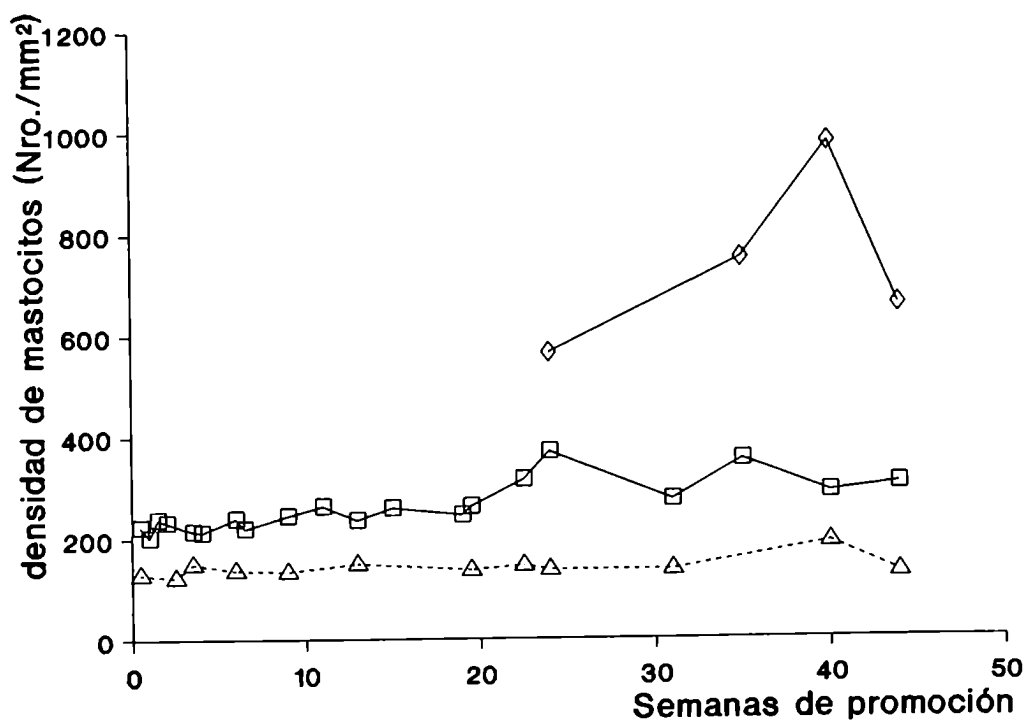


Figura 28

Densidad de mastocitos determinada en cortes de piel coloreados con Fitc-Avidina, en función del tiempo de promoción con BzPo.

Ratones tratados con acetona durante la promoción (controles) (---).

Ratones iniciados con DMBA y promovidos con BzPo (—): (□) área no tumoral, (◇) área tumoral.

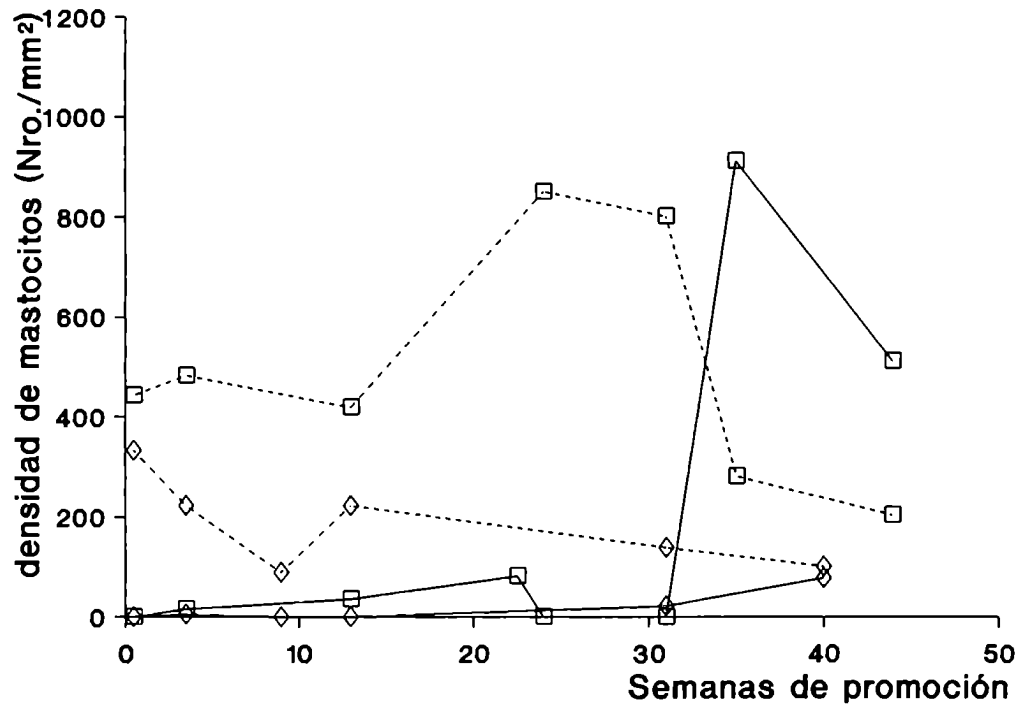


Figura 29

Evaluación de los distintos fenotipos de mastocitos en cortes de piel coloreados con la tinción diferencial alcian blue/safranina.

(◇) piel de ratones control

(□) piel de animales iniciados con DMBA y promovidos con BzPo

(- - - -) mastocitos AB<sup>+</sup>/S<sup>+</sup> (tipo conectivo)

(—) mastocitos AB<sup>+</sup>/S<sup>-</sup> (tipo mucoso)

animales control. Esta observación nos llevó a centrar el estudio en algunas de las poblaciones celulares que proliferan en estas condiciones, siendo los mastocitos los que mostraron profundas modificaciones morfológicas e histoquímicas tal como se revela en las Figuras 28 y 29. La Figura 28 muestra la densidad de mastocitos determinada en cortes de piel coloreados con Fitc-Avidina, obtenidos de ratones sacrificados a lo largo de la promoción con BzPo. La Figura 29 muestra las variaciones en los fenotipos de la población de mastocitos, evaluada en cortes de piel coloreados con la tinción diferencial alcian blue/safranina, durante el proceso de promoción tumoral con BzPo.

### **3.4. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL: EPIDERMIS Y DERMIS**

El análisis ultraestructural de la piel de los animales durante el proceso de promoción tumoral con BzPo revela pocos cambios a nivel de las células epiteliales, aunque se observan algunos linfocitos y células dendríticas infiltradas entre las células basales y espinosas. La membrana basal aparece intacta, sólo interrumpida en zonas infratumorales.

Sin embargo, la dermis muestra cambios ultraestructurales muy marcados. A diferencia de la dermis de piel no tratada, en la cual sólo se observan pequeños fibrocitos embebidos en una densa matriz colágena, es llamativa la gran afluencia de mastocitos (Figura 30) y sus cambios fenotípicos ya descritos en la sección 3.3, y la densidad de células de distinta estirpe que fluyen hacia la dermis formando infiltrados celulares que en la mayoría de los casos muestran asociaciones entre diferentes tipos de granulocitos, grandes linfocitos, fibroblastos, macrófagos y mastocitos (Figuras 31, 32 y 33). Estos grupos celulares infiltran la dermis, particularmente en la zona subepitelial. Sin embargo, estas células no infiltran la masa tumoral. La Figura 31 muestra asociaciones celulares entre eosinófilo, fibroblasto y macrófago. El contacto

Figura 30

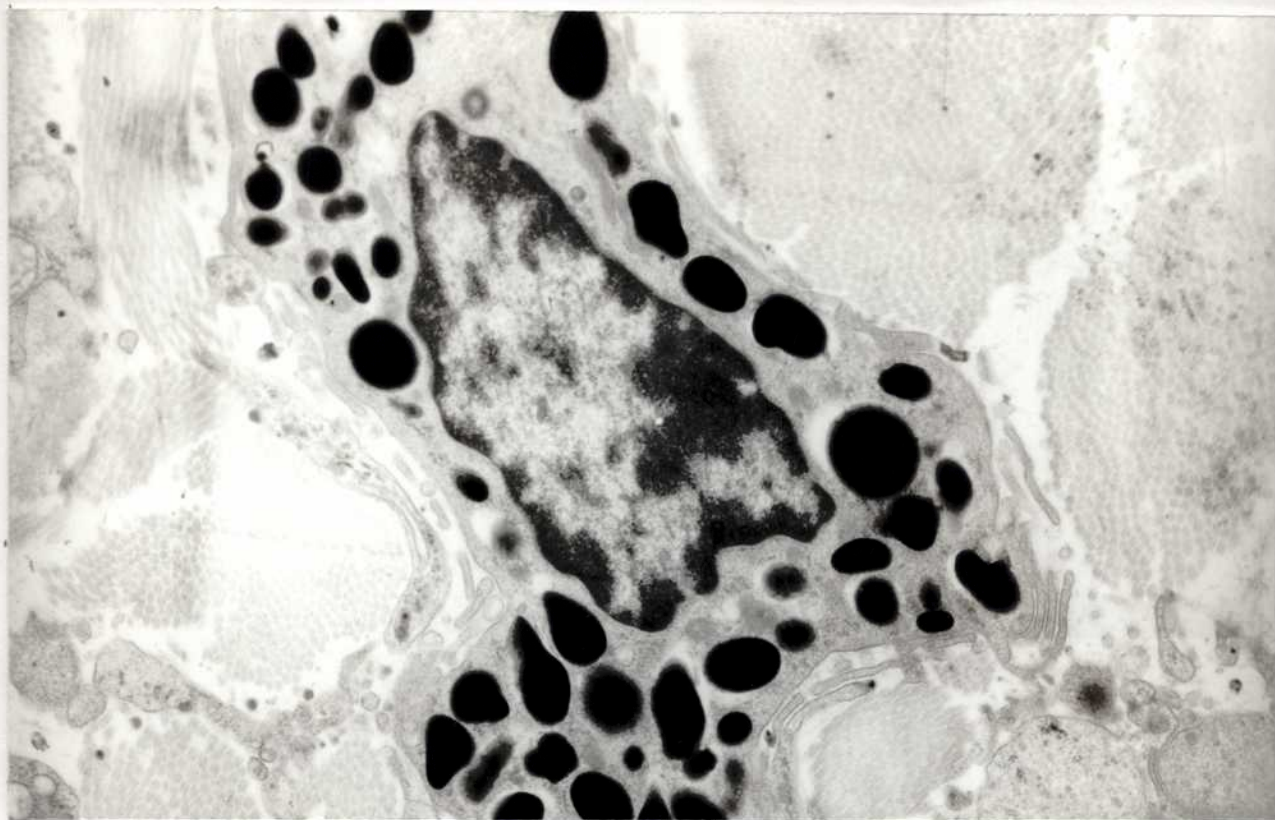


Figura 31

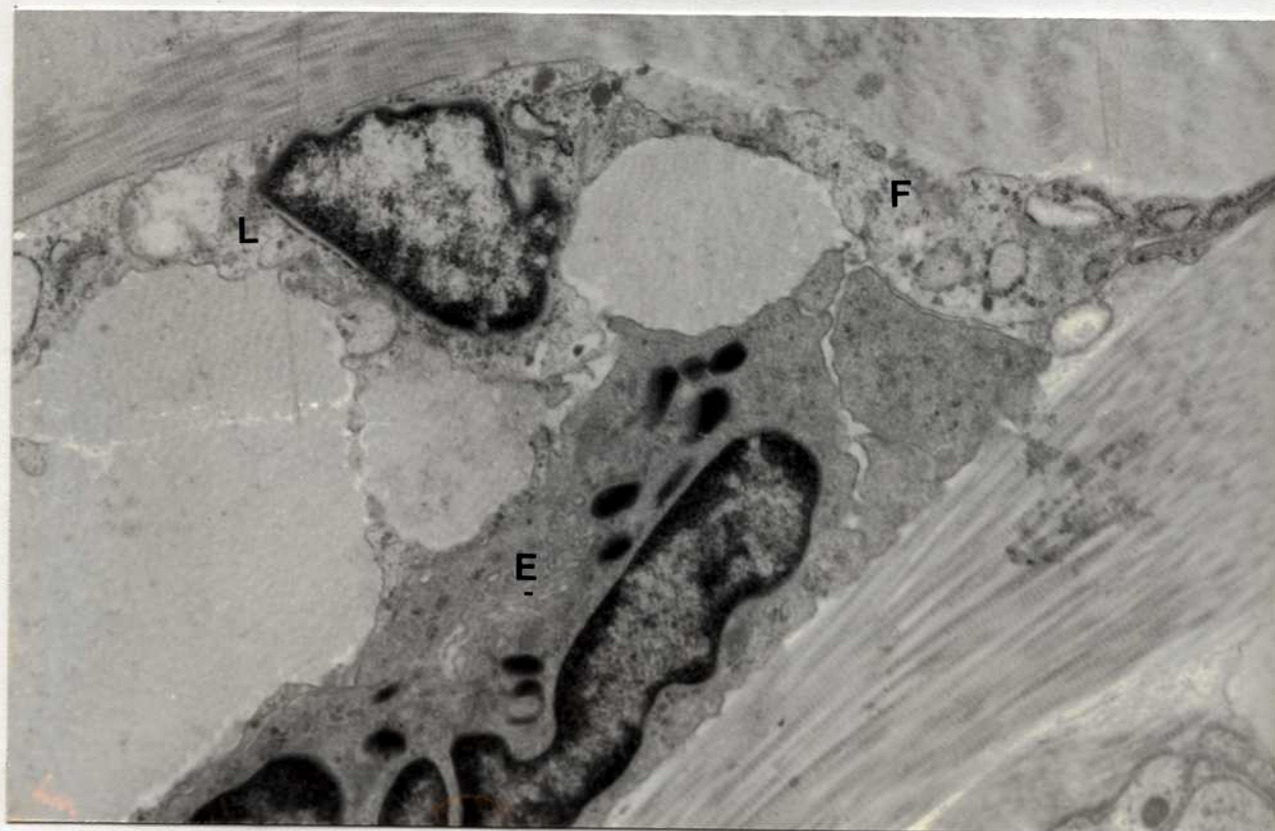




Figura 32



Figura 33



### Figura 30

Microfotografía electrónica mostrando el aspecto de un mastocito conectivo y su relación con las prolongaciones celulares de células vecinas. Aumento: 16000 x

### Figura 31

Microfotografía electrónica de infiltrados celulares mostrando asociaciones entre un eosinófilo (E), un fibroblasto (F) y un macrófago (M) durante el proceso de promoción con BzPo. Obsérvese las extensas prolongaciones del fibroblasto por debajo del granulocito eosinófilo constituyendo una extensa zona de contacto intercelular (\*). Aumento: 5000 x

### Figura 32

Microfotografía electrónica mostrando en detalle área de contacto entre fibroblasto y prolongaciones de un macrófago (∇). Aumento: 60000 x

### Figura 33

Microfotografía electrónica mostrando asociaciones celulares entre un eosinófilo (E), un fibroblasto (F) y un linfocito (L). Aumento: 8500 x



entre membranas celulares puede estar limitado a unas pocas décimas de micrón (Figura 32) o prolongarse a lo largo de las membranas de ambas células como puede observarse en la Figura 31 donde la asociación entre un eosinófilo y un fibroblasto se prolonga a lo largo de 22  $\mu$ .

#### **4. EVALUACION DE LA PROMOCION Y PROGRESION TUMORAL**

##### **4.1. CUANTIFICACION DE TUMORES A LO LARGO DEL PROCESO DE PROMOCION**

Los ratones de los grupos control (detallados en **Materiales y Métodos**, sección 3.3), tanto los no iniciados y tratados con promotores (BzPo o TPA) dos veces por semana durante 40 semanas como los iniciados con DMBA y tratados con acetona o CuDIPS dos veces por semana durante el mismo tiempo de promoción, no desarrollaron tumores.

###### **4.1.1. PROMOCION TUMORAL INDUCIDA POR BzPo**

En ambos grupos experimentales promovidos con BzPo (detallados en **Materiales y Métodos**, sección 3.3: BzPo y CuDIPS + BzPo) comenzaron a desarrollarse formaciones tumorales incipientes entre las 12 y 15 semanas de promoción. A partir de la semana 19 de promoción se contaron semanalmente la cantidad de ratones con tumores en cada grupo experimental y la cantidad de tumores en cada ratón. La Figura 34 muestra la incidencia tumoral representada como el porcentaje de ratones con tumores y la Figura 35 el número promedio de tumores por ratón para cada tratamiento en función del tiempo de promoción.

Los análisis estadísticos demostraron una inhibición significativa de la promoción tumoral en ratones pretratados con CuDIPS cuando el parámetro

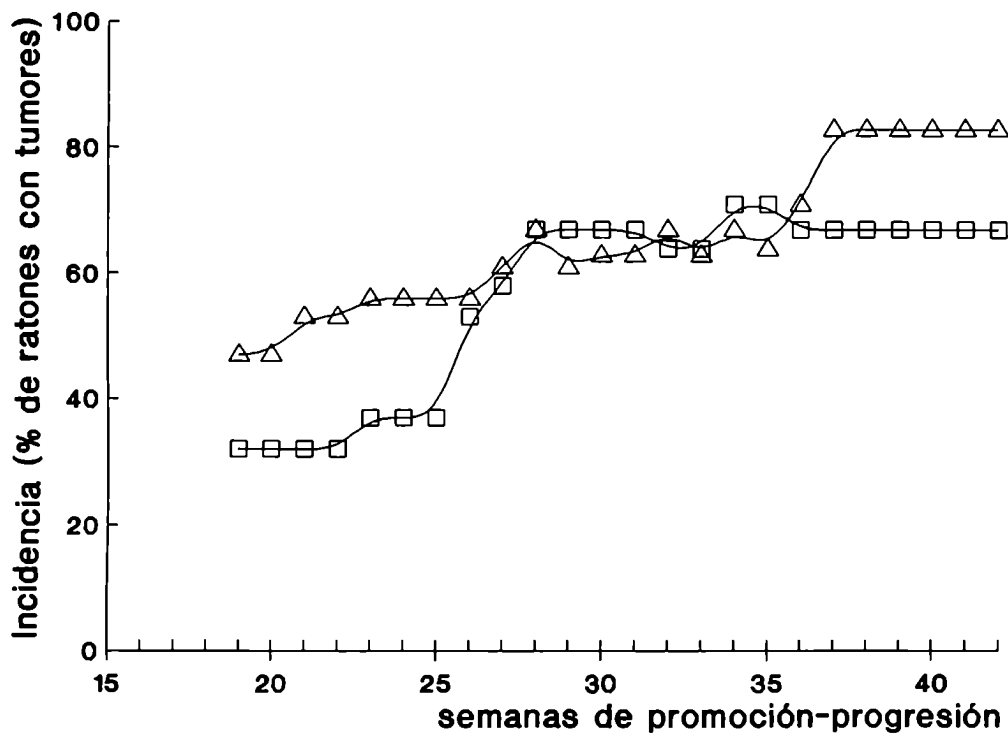


Figura 34

Incidenca tumoral evaluada como porcentaje de ratones con tumores en función del tiempo de promoción-progresión con BzPo ( $\Delta$ ) o con CuDIPS + BzPo ( $\square$ ).

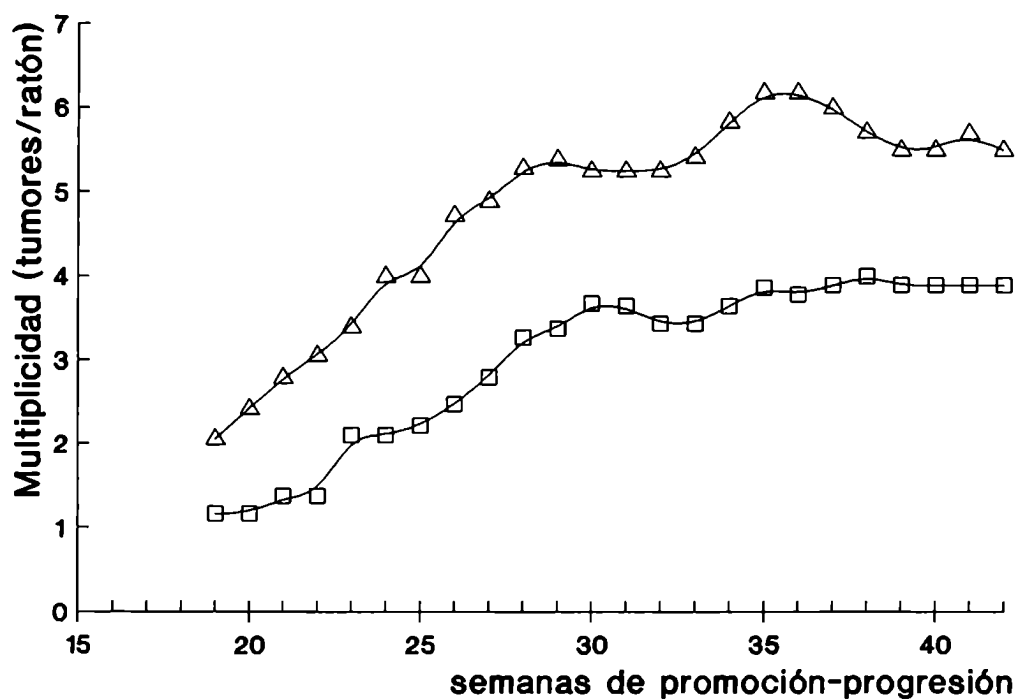


Figura 35

Número promedio de tumores por ratón en función del tiempo de promoción-progresión con BzPo ( $\Delta$ ) o con CuDIPS + BzPo ( $\square$ ).

analizado fue el número de tumores por ratón ( $p < 0.05$ ) (Figura 35). En cambio, cuando el parámetro analizado fue el porcentaje de ratones con tumores no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Sin embargo, se observó un retraso en la aparición de tumores en los animales pretratados con CuDIPS, estadísticamente significativo hasta la semana 25 ( $p < 0.05$ ) (Figura 34).

#### 4.1.2. PROMOCION TUMORAL INDUCIDA POR TPA

A partir de la semana 7 de promoción se contaron semanalmente la cantidad de ratones con tumores y la cantidad de tumores en cada ratón en ambos grupos experimentales promovidos con TPA (detallados en Materiales y Métodos, sección 3.3: TPA y CuDIPS + TPA). La Figura 36 muestra la incidencia tumoral representada como el porcentaje de ratones con tumores y la Figura 37 el número promedio de tumores por ratón para cada tratamiento en función del tiempo de promoción.

Estos resultados muestran que no hubo diferencias en el porcentaje de ratones con tumores en los animales pretratados con CuDIPS con respecto a los tratados sólo con TPA durante la promoción. En ambos casos se desarrollaron tumores en el 100 % de los ratones alrededor de las 13 semanas de tratamiento de promoción (Figura 36).

Cuando el parámetro analizado es la cantidad de tumores por ratón (Figura 37) se observó un retraso en la aparición de tumores en los animales pretratados con CuDIPS, llegándose a las 20 semanas de promoción a valores similares a los obtenidos en animales promovidos sólo con TPA. Sin embargo, en los animales promovidos sólo con TPA se observó a partir de la semana 17 una progresiva regresión de los tumores, que fue inhibida por el pretratamiento con CuDIPS. Como consecuencia de esto, desde la semana 23 la cantidad de

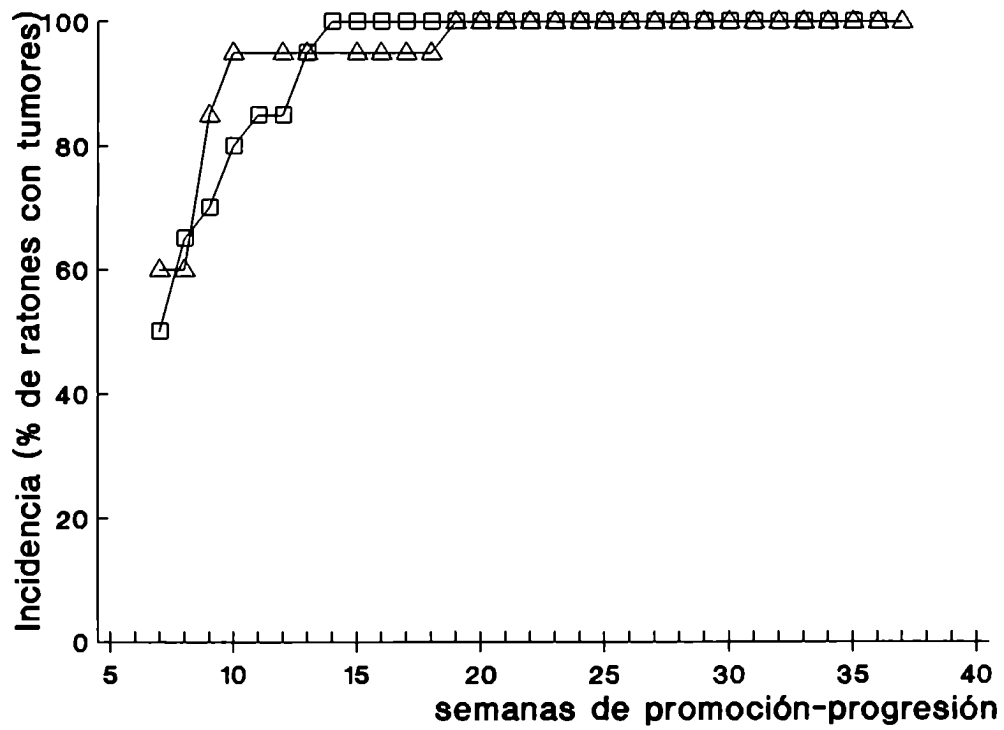


Figura 36

Incendencia tumoral evaluada como porcentaje de ratones con tumores en función del tiempo de promoción-progresión con TPA ( $\Delta$ ) o con CuDIPS + TPA ( $\square$ ).

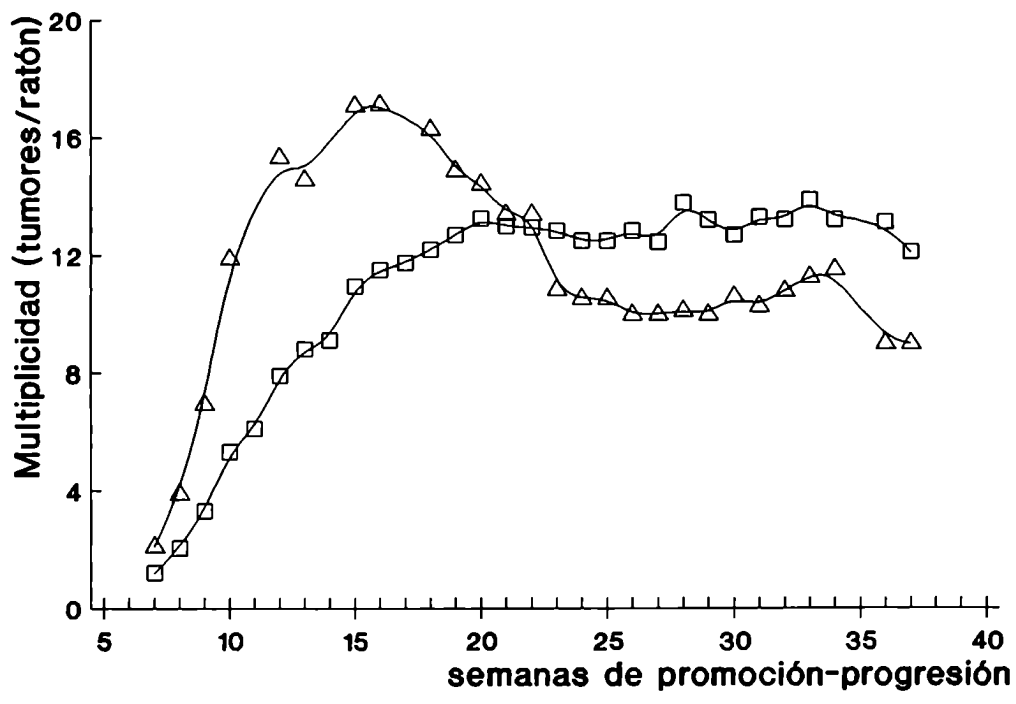


Figura 37

Número promedio de tumores por ratón en función del tiempo de promoción-progresión con TPA (Δ) o con CuDIPS + TPA (□).

tumores por ratón fue menor en los ratones que fueron tratados sólo con TPA durante la promoción.

## 4.2. CARACTERIZACION HISTOLOGICA DE LOS TUMORES

Con el objeto de caracterizar el proceso de progresión se analizaron histológicamente los tumores desarrollados en grupos de animales sacrificados a las 33 y 42 semanas de tratamiento de promoción-progresión con BzPo o con CuDIPS + BzPo y a las 37 semanas de tratamiento con TPA o con CuDIPS + TPA.

El diagnóstico de los tumores desarrollados con ambos tipos de promotores reveló dos tipos de tumores benignos (Figura 38), papilomas y queratoacantomas, y un tipo de tumor maligno (Figura 39), carcinoma epidermoide, con las siguientes características morfológicas coincidentes con los tumores descritos por Chiba y col. (99):

- Papilomas (Pa): tumores exofíticos formados por series de papilas de tejido conectivo cubiertas por epitelio escamoso estratificado, sin atipía celular.
- Queratoacantomas (KA): neoplasmas con forma de cráter con bordes de epidermis hiperplásica y zona central llena de queratina, presentando en la región central numerosas proliferaciones epiteliales irregulares que se extienden dentro de la dermis.
- Carcinomas epidermoides (Ca) compuestos de crecimientos epiteliales endofíticos muy irregulares con numerosas atipías celulares, generalmente muy diferenciados con formación de capas queratinizadas y globos córneos.

Algunos casos de tumores benignos, Pa y KA, presentaban áreas de transformación en Ca, y algunos Pa presentaban áreas de conversión en KA.



Figura 38

Microfotografía de los dos tipos de tumores benignos desarrollados:  
A) papiloma y B) queratoacantoma. Aumento: 35 x.



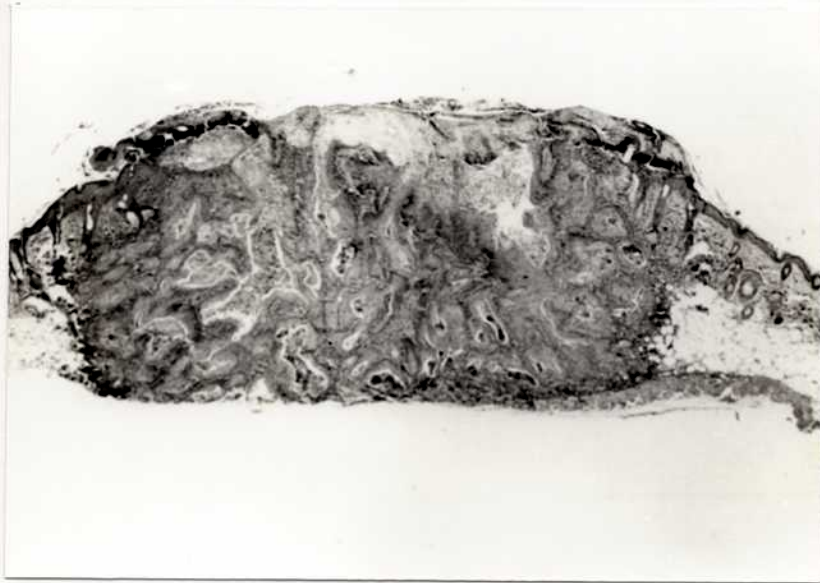
**A****B**

Figura 39

A) Microfotografía de carcinoma epidermoide. Aumento: 35 x.

B) Detalle del carcinoma mostrando la desorganización del tejido y la atipía celular. Aumento: 100 x.

#### 4.2.1. PROMOCION Y PROGRESION TUMORAL CON BzPo

Se determinaron las frecuencias de los distintos tipos de tumores desarrollados a las 33 y 42 semanas de promoción-progresión con BzPo o con CuDIPS + BzPo (Figuras 40 y 41).

Considerando el número total de tumores obtenidos a dichos tiempos de tratamiento se observó una significativa inhibición de la conversión maligna en los animales pretratados con CuDIPS ( $p < 0.05$ ), siendo del 10 % la cantidad de tumores malignos en animales tratados sólo con BzPo durante la promoción-progresión, mientras que en animales pretratados con CuDIPS, la cantidad de tumores malignos fue sólo del 1.8 %.

La Figura 42 muestra la cantidad de tumores/ratón obtenidos en los animales sacrificados a las 33 y a las 42 semanas de tratamiento considerados en conjunto, discriminando los diferentes tipos de tumores, notándose la marcada disminución de tumores malignos en los animales pretratados con CuDIPS.

Con respecto a los dos tipos de tumores benignos, comparando los resultados obtenidos a las 33 y a las 42 semanas, representados en las Figuras 40 y 41 respectivamente, se observó un aumento en la proporción de KA a expensas de una disminución en la proporción de Pa al aumentar el tiempo de tratamiento de promoción-progresión con BzPo. Las comparaciones estadísticas de las proporciones de KA y de Pa a las 33 y 42 semanas de tratamiento con BzPo demostraron un aumento significativo en la proporción de KA y una disminución significativa en la proporción de Pa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5).

Estas modificaciones en las proporciones de ambos tipos de tumores benignos durante el proceso de promoción-progresión fue inhibida por pretratamiento con CuDIPS, dado que no se observaron diferencias significativas en las proporciones de Pa y de KA al comparar los resultados

obtenidos a las 33 semanas con los obtenidos a las 42 semanas (Tabla 5, Figuras 40 y 41).

**TABLA 5**

Porcentaje de tumores benignos inducidos por tratamiento de promoción con BzPo y con CuDIPS + BzPo.

| Promoción        | Tipo de tumor   | 33 semanas | 42 semanas |
|------------------|-----------------|------------|------------|
| a) BzPo          | Papiloma        | 72 %       | 45 %       |
|                  | Queratoacantoma | 28 %       | 55 %       |
|                  | K/P             | 0.39       | 1.23       |
| b) CuDIPS + BzPo | Papiloma        | 78 %       | 63 %       |
|                  | Queratoacantoma | 21 %       | 37 %       |
|                  | K/P             | 0.27       | 0.6        |

La incidencia relativa de papilomas y queratoacantomas varió significativamente ( $p < 0.05$ ) entre las 33 y 42 semanas de tratamiento de promoción con BzPo (a). En los ratones pretratados con CuDIPS no hubo diferencias significativas en la incidencia relativa de ambos tipos de tumores entre las 33 y 42 semanas de tratamiento (b).

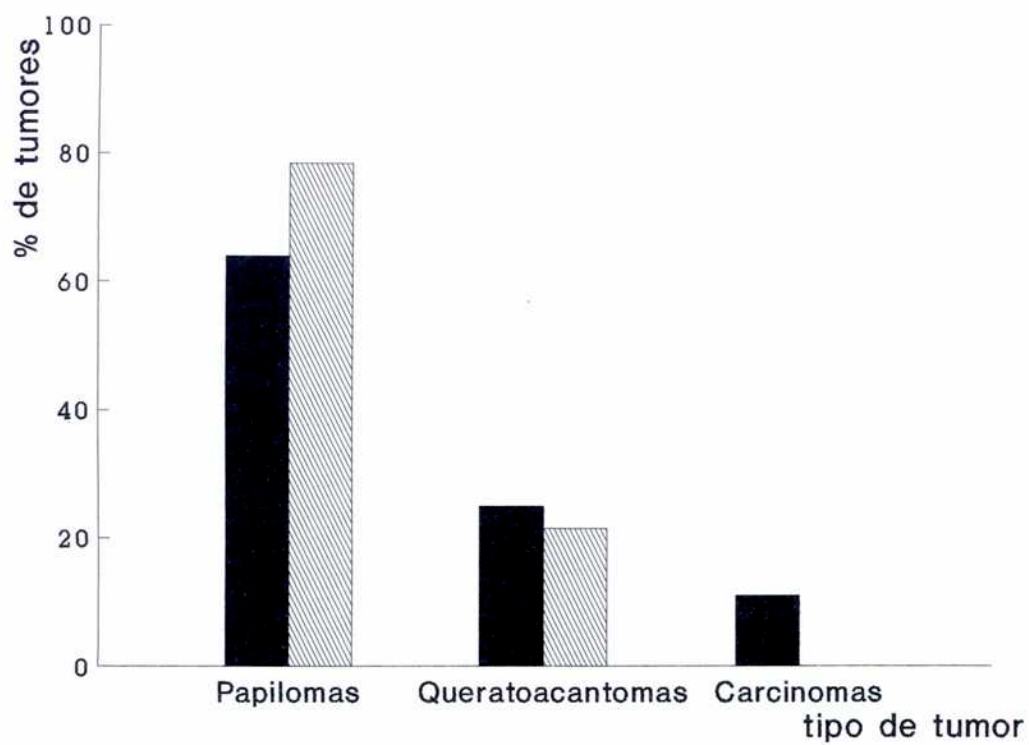


Figura 40

Porcentaje de los diferentes tipos de tumores desarrollados a las 33 semanas de promoción-progresión con BzPo (■) o con CuDIPS + BzPo (▨).

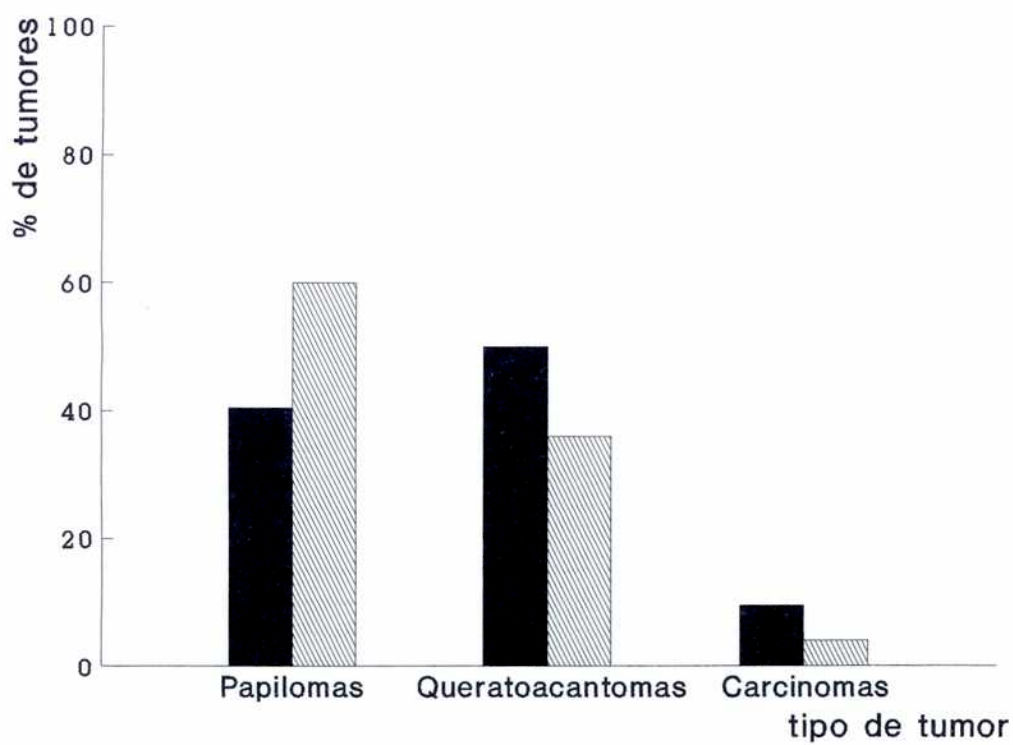


Figura 41

Porcentaje de los diferentes tipos de tumores desarrollados a las 42 semanas de promoción-progresión con BzPo (■) o con CuDIPS + BzPo (▨).

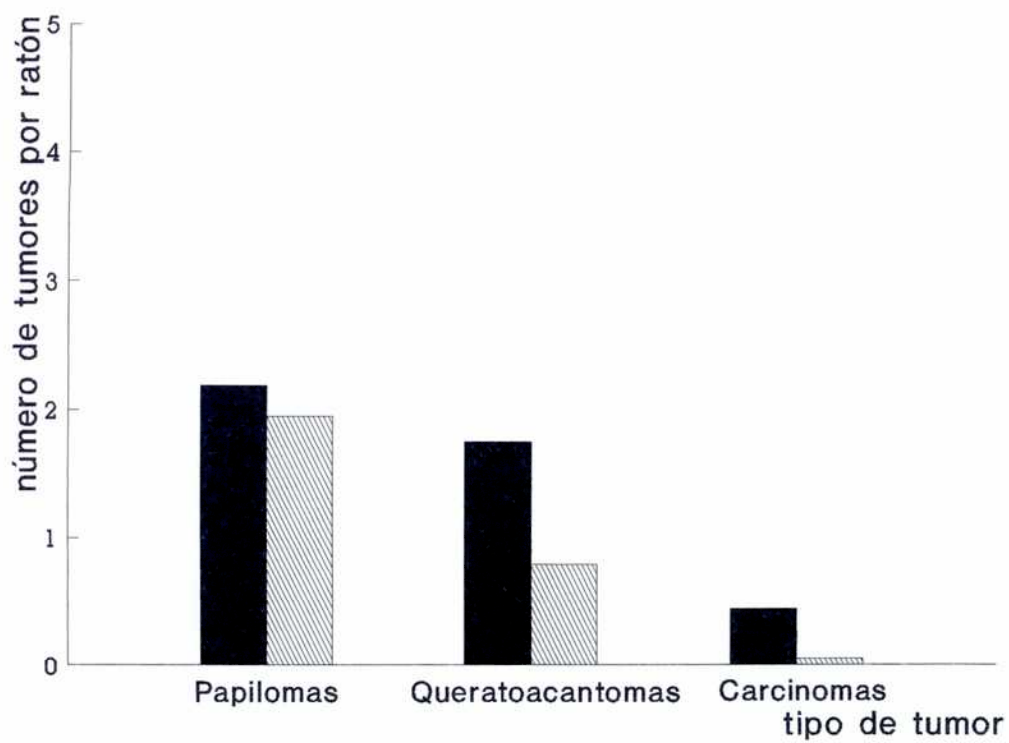


Figura 42

Número promedio de tumores por ratón, discriminando los diferentes tipos de tumores, en ratones tratados durante la promoción-progresión con BzPo (■) o con CuDIPS + BzPo (▨).

#### 4.2.2. PROMOCION Y PROGRESION TUMORAL CON TPA

Se determinaron las frecuencias de los distintos tipos de tumores desarrollados a las 37 semanas de promoción-progresión con TPA o con CuDIPS + TPA (Figura 43). Estos resultados muestran una marcada disminución en el porcentaje de carcinomas desarrollados en los animales pretratados con CuDIPS durante la promoción. Dado que hay una importante regresión de tumores benignos en los ratones promovidos sólo con TPA, el análisis de frecuencia de los distintos tipos de tumores estaría sobreestimando la capacidad de conversión maligna del TPA. Por lo tanto, los resultados fueron evaluados considerando la cantidad de tumores de cada tipo desarrollados por ratón. La Figura 44 muestra la cantidad de tumores/ratón a las 37 semanas de promoción discriminando los diferentes tipos de tumores. El análisis de estos datos muestra que el CuDIPS inhibe parcialmente la conversión maligna de los tumores inducidos por TPA. Sin embargo, estos datos reflejan que el CuDIPS produjo una significativa inhibición de la regresión de tumores benignos que se observó en la promoción con TPA.

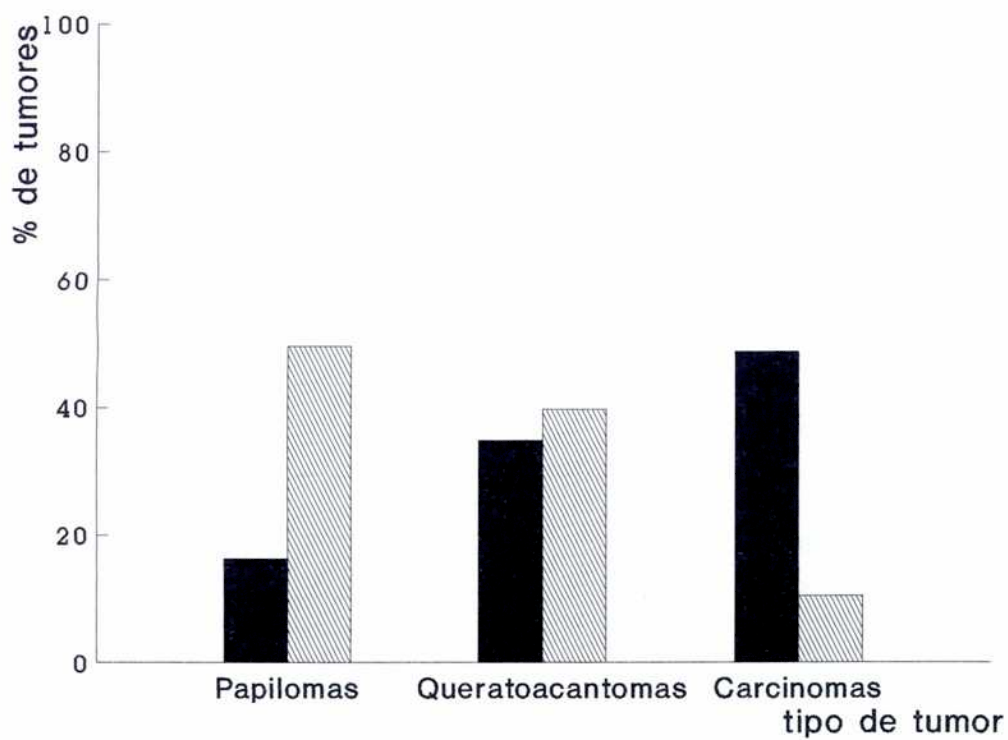


Figura 43

Porcentaje de los diferentes tipos de tumores desarrollados a las 37 semanas de promoción-progresión con TPA (■) o con CuDIPS + TPA (▨).



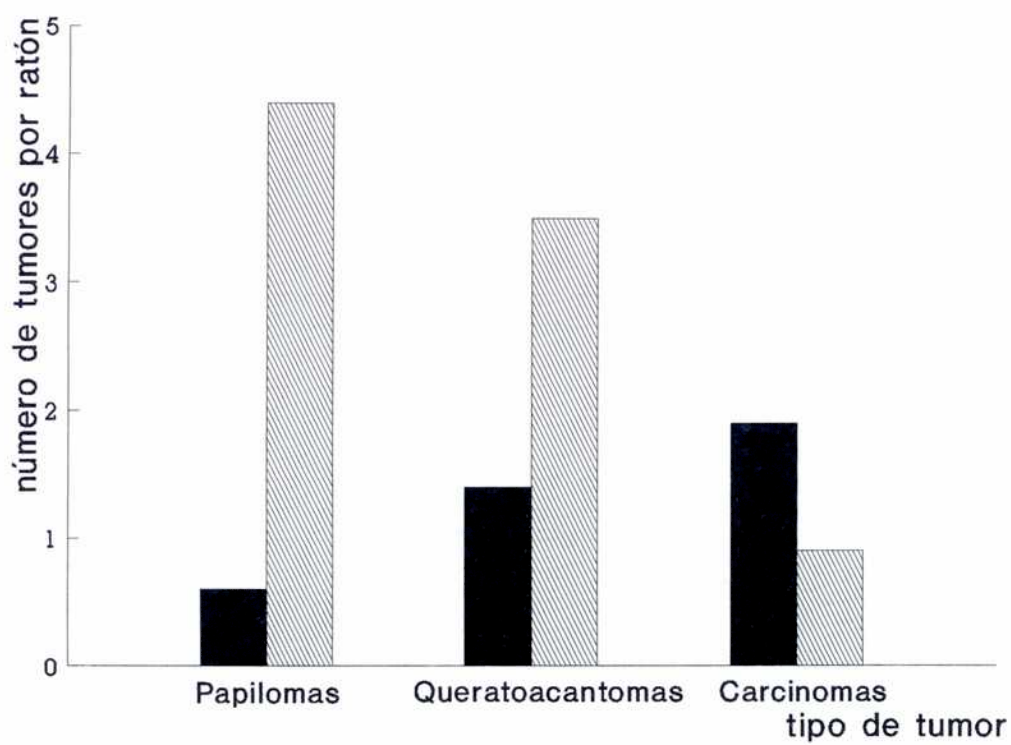


Figura 44

Número promedio de tumores por ratón, discriminando los diferentes tipos de tumores, en ratones tratados durante la promoción-progresión con TPA (■) o con CuDIPS + TPA (▨).

## DISCUSION

Los tumores espontáneos de piel son los neoplasmas más frecuentes en la especie humana y en diversas especies de mamíferos (100). El primer cáncer ocupacional descrito fue en piel, lo que llevó al desarrollo de modelos experimentales de inducción de tumores en piel de animales de laboratorio y por consiguiente al descubrimiento de los carcinógenos químicos (1). Desde entonces, los numerosos trabajos científicos realizados en piel han jugado un papel fundamental en la comprensión de los mecanismos involucrados en la carcinogénesis química y en los procesos de transformación celular.

La carcinogénesis en piel de ratón es un proceso que puede dividirse en diferentes estadios, iniciación, promoción y progresión. Este proceso de carcinogénesis química ha sido demostrado también en otros tejidos de ratas y ratones, tales como hígado, esófago, colon, glándulas mamarias (7). Estas evidencias experimentales indican que los mecanismos básicos de la carcinogénesis en múltiples estadios serían generales en la etiología del cáncer. Sin embargo, si bien existen respuestas celulares comunes a los diversos agentes físicos y químicos capaces de actuar en las etapas de la carcinogénesis, los mecanismos de acción inmediatos varían entre los diferentes agentes utilizados.

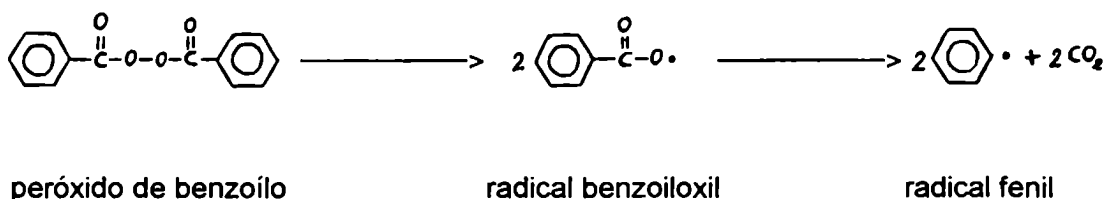
En particular, existe una amplia variedad de compuestos químicos capaces de actuar en la etapa de promoción tumoral. El agente promotor más estudiado es el TPA y su modo de acción estaría dado por su interacción con receptores celulares específicos (32). El BzPo ha sido descrito como agente promotor en este modelo de carcinogénesis en piel de ratón (53). Sin embargo, los mecanismos de acción de dicho compuesto en la promoción tumoral no han sido aún esclarecidos. Diversos trabajos experimentales sugieren que las vías de acción del BzPo serían diferentes a las del TPA (45,51,78). Las respuestas

celulares al BzPo podrían ser inducidas en forma indirecta a través de la generación de radicales libres. Esto explicaría las diferentes dosis de promotor necesarias para la inducción de tumores en ambos casos.

En este trabajo se caracterizaron la promoción y progresión tumoral inducidas por BzPo en piel de ratones SENCAR, evaluando diferentes aspectos bioquímicos y morfológicos durante dichos procesos. Con el objeto de analizar comparativamente la acción del BzPo, se utilizó el TPA y se evaluaron los resultados en forma paralela.

## 1. EVALUACIONES DE ESTRES OXIDATIVO

La actividad promotora de los peróxidos orgánicos podría estar directamente relacionada con su capacidad de generar radicales libres. Los radicales libres derivados de hidroperóxidos orgánicos incubados con células epidérmicas aisladas de ratón han sido caracterizados por medio de electron spin resonance, siendo los radicales metilo las especies primarias detectadas (62,63,65). La generación de radicales libres a partir de diacilperóxidos ha sido demostrada en presencia de células epidérmicas aisladas (66), pero los radicales libres primarios no han sido caracterizados. Kensler y col. (52) han propuesto el siguiente esquema de la activación del BzPo mediada por células epidérmicas:



Los trabajos mencionados concluyen que los hidroperóxidos y peróxidos orgánicos requieren una activación intracelular para generar radicales libres. Dicha activación podría estar mediada por una variedad de hemoproteínas o por reacciones no enzimáticas mediadas por metales.

El aumento en la generación de radicales libres inducido por BzPo podría alterar el balance que normalmente existe entre la velocidad celular de generación de radicales libres y la velocidad de disipación de los mismos. Esta alteración en la homeostasis celular produciría un estado de estrés oxidativo, que podría inducir los eventos celulares necesarios para el desarrollo tumoral.

En este trabajo se evaluó el estrés oxidativo inducido por el promotor tumoral BzPo en diferentes condiciones experimentales, utilizando como parámetro la emisión de QL. El aspecto más importante de este método no invasivo es que da una señal de los resultados del metabolismo oxidativo de las células. Cadenas y col. (83) han contribuido a la interpretación de los datos experimentales obtenidos *in vivo* mediante estudios sobre los mecanismos de reacciones quimioluminiscentes en sistemas simples químicamente definidos. Las reacciones de QL podrían involucrar, directa o indirectamente, la participación del oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), ya sea por la emisión dimol del  $^1O_2$ , o por reacción del mismo con dobles ligaduras que generen grupos carbonilos excitados que al decaer emiten luz.

Los resultados de QL obtenidos *in vitro* o *in vivo* no son comparables en cuanto a las especies emisoras responsables de la respuesta de QL, debido a la diferente respuesta espectral de los fotomultiplicadores de los equipos utilizados en ambos casos.

En los experimentos *in vitro* la QL fue determinada utilizando un contador de centelleo. La naturaleza específica de las especies fotoemisoras detectadas con el contador de centelleo no ha sido del todo clarificada (83), dado que estos equipos están provistos de fotomultiplicadores sensibles sólo

hasta aproximadamente 600 nm, de manera que la emisión dimol del oxígeno singulete, que se da a 634 y 703 nm, no podría ser detectada. Por lo tanto, es probable que la principal especie responsable de la QL detectada con el contador de centelleo sean los carbonilos excitados, que al decaer emiten luz de 420–450 nm.

En los experimentos *in vivo* se utilizó un contador de fotones provisto de un fotomultiplicador EMI 9658, que se caracteriza por su sensibilidad extendida en el rojo (300-900 nm). Por lo tanto, se puede detectar la emisión dimol del oxígeno singulete y la emisión de los carbonilos excitados.

Los experimentos realizados con células epidérmicas aisladas de piel de rata mostraron que en presencia de diferentes agentes oxidantes (hidroperóxidos y peróxidos orgánicos) se produce un inmediato aumento de la QL. Este aumento sería una medida del estrés oxidativo que podría estar generado por la activación metabólica de dichos compuestos. La comparación entre los diferentes compuestos analizados reflejó un estrés oxidativo significativamente mayor frente al tratamiento con BzPo. Estos resultados se relacionarían en forma directa con la capacidad promotora de dichos compuestos, dado que el BzPo es un activo agente promotor (53), mientras que el CuOOH y el tBOOH son promotores débiles (52,61).

Los resultados de los experimentos realizados *in vivo* mostraron que una única aplicación percutánea de BzPo en dosis similares a las usadas en los protocolos clásicos de promoción produce un estrés oxidativo, medido como un significativo aumento de la emisión de QL. Luego de dos tratamientos secuenciales con BzPo se observó una caída en la QL inducida por la segunda aplicación, la cual es dependiente del período de tiempo entre tratamientos. Esto podría ser el resultado de una respuesta homeostática de los sistemas de defensa de las células epidérmicas frente al estrés oxidativo inducido por la primera aplicación. Sin embargo, los resultados obtenidos en las

determinaciones enzimáticas de SOD y CAT luego de un único tratamiento con BzPo no mostraron variaciones en las actividades de ambas enzimas con respecto a los controles. Estos resultados no descartan la posibilidad de que haya otros sistemas de defensa antioxidante involucrados en esta respuesta. Otra hipótesis que explicaría la menor inducción de QL luego de la segunda aplicación sería una disminución de los sistemas celulares involucrados en la activación del BzPo como consecuencia del primer tratamiento.

Aunque se produjo una disminución en la inducción de QL frente a tratamientos secuenciales, en los casos en que los tratamientos fueron espaciados a dos por semana, dicha disminución luego de la segunda aplicación, en este caso separada en el tiempo por un lapso de más de dos días, no se produjo. Esto sugiere que durante el tratamiento de promoción se generaría un aumento crónico en la generación de radicales libres, el cual podría estar de alguna manera relacionado con las posteriores respuestas bioquímicas y biológicas asociadas con la promoción tumoral.

El hecho de que no se observaron diferencias en el estrés oxidativo inducido por tratamientos crónicos con BzPo entre ratones iniciados y no iniciados estaría indicando que dicho estrés se produciría como consecuencia de la respuesta de las células al BzPo independientemente de que se encuentren alteradas por la iniciación.

Si bien la evaluación de QL es una estimación directa del estrés oxidativo de las células, esta técnica no permite identificar los radicales libres fotoemisores, dado que lo que se determina es la emisión total de luz. Por lo tanto, el estudio de diferentes tipos de antioxidantes como moduladores de la emisión de QL permite analizar las posibles especies reactivas involucradas en dicha emisión.

Se ha demostrado que algunos compuestos antioxidantes son capaces de actuar como inhibidores en la promoción tumoral y en diversas respuestas

bioquímicas de las células a los agentes promotores (45,51,52,61). En particular, se ha demostrado que la SOD y el CuDIPS son efectivos inhibidores de la QL mediada por luminol inducida por TPA en células epidérmicas aisladas de ratón (101). La SOD es una metaloproteína de alto peso molecular, que no puede atravesar la membrana celular. El uso de complejos de cobre lipofílicos, de bajo peso molecular, con capacidad de catalizar la dismutación de anión superóxido, como el CuDIPS (79), permite analizar las posibles modificaciones de las respuestas celulares a los agentes promotores debidas a la acción de un compuesto biomimético de SOD. Los resultados de QL obtenidos muestran en todos los protocolos analizados que el CuDIPS fue un efectivo inhibidor de la QL. Dado que los análogos estructurales del CuDIPS: el ZnDIPS y el DIPS, que no poseen capacidad de catalizar la dismutación de anión superóxido, no produjeron ningún efecto en la emisión de QL inducida por BzPo, la capacidad inhibitoria del CuDIPS podría deberse a su actividad biomimética de SOD. Estos resultados sugieren que un posible aumento en la generación de anión superóxido durante la activación intracelular del BzPo estaría involucrado en la inducción de QL. El anión superóxido podría iniciar una serie de reacciones en cadena de radicales libres que lleven a la formación de especies emisoras tales como oxígeno singulete o carbonilos excitados.

Los antioxidantes fenólicos fueron capaces de inhibir sólo parcialmente la QL inducida por BzPo, llegándose a un máximo de inhibición del 40 % con BHA y a una leve inhibición del 20 % con BHT. De estos resultados se deduce que la QL se debería principalmente a la emisión del oxígeno singulete, que no puede ser "quenched" por los antioxidantes fenólicos, y en menor medida a los grupos carbonilos excitados y posiblemente al radical benzoiloxil generado en la activación del BzPo.

Con el objeto de comparar la acción del BzPo con otros promotores se utilizó el agente promotor más estudiado, el TPA. Una única aplicación de TPA no indujo aumento de la QL con respecto a los animales control. Sin embargo, luego de dos tratamientos consecutivos con TPA, se observó un aumento en la QL. Este estrés oxidativo podría estar mediado por las células inflamatorias que se encuentran en la piel como respuesta al primer tratamiento con TPA (102). Se ha postulado que el mecanismo de acción del TPA podría estar relacionado con la generación de radicales libres mediada por una respuesta inflamatoria (55,103,104). Se ha demostrado que el TPA induce una respuesta inflamatoria en piel de ratón (102) y por otro lado, es capaz de estimular la producción de radicales libres en leucocitos polimorfonucleares (55,67,103).

Aunque no se observó aumento de QL espontánea en células epidérmicas tratadas con TPA, tanto *in vitro* (101) como *in vivo*, Fischer y col. detectaron en células epidérmicas aisladas tratadas con TPA la producción de especies oxidativas medidas por su capacidad de oxidar luminol (101,105,106). Por lo tanto, según estos autores el TPA es capaz de inducir estrés oxidativo directamente en células epidérmicas. En base a estos datos, el aumento de QL espontánea obtenido *in vivo* luego de dos tratamientos con TPA podría ser el resultado de un mayor estrés oxidativo inducido directamente por la acción del TPA en las células epidérmicas luego de la segunda aplicación, aumentado por una disminución en los sistemas de defensa antioxidante debida al primer tratamiento con TPA. Esta posibilidad es avalada por los resultados de inhibición de SOD y catalasa obtenidos luego de un único tratamiento con TPA, que coinciden con lo demostrado por otros autores (57-59).

Comparando los resultados de QL obtenidos con BzPo y con TPA se puede observar que el estrés oxidativo inducido por tratamientos repetidos con TPA es mucho menor que el inducido directamente por BzPo. Estos resultados sugieren que la generación de radicales libres no sería importante en la



promoción con TPA. Esta hipótesis está de acuerdo con Fischer y col. (106), quienes no encontraron una correlación entre la producción de oxidantes y la actividad promotora del TPA y sugirieron que la promoción tumoral con TPA no depende de la generación de especies oxidativas.

Los resultados de estrés oxidativo inducido en células epidérmicas *in vitro* por diferentes agentes oxidantes capaces de actuar como promotores (BzPo, CuOOH y tBOOH) mostraron una correlación con la actividad promotora de dichos compuestos. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo sería importante como mediador de las respuestas pleiotrópicas asociadas con la promoción tumoral cuando el agente usado como promotor es un peróxido o hidroperóxido orgánico.

En cambio, la respuesta diferencial de la piel en cuanto al estrés oxidativo inducido por BzPo o TPA y los resultados obtenidos por Fischer y col. (106) en células epidérmicas *in vitro* apoyan la hipótesis de que la generación de radicales libres no sería importante en la promoción con TPA. En este sentido, es bien sabido que el TPA activa directamente la proteína quinasa C y se supone que la activación de esta enzima jugaría un papel importante en la promoción inducida por TPA (107). Por el contrario, el BzPo no parece ser capaz de inducir en forma directa la proteína quinasa C (108).

## **2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

La producción de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo ocurre normalmente en las células aeróbicas como consecuencia de la reducción parcial del oxígeno. Dichas especies son tóxicas, ya que pueden interactuar con moléculas de importancia biológica, tales como proteínas y ácidos nucleicos, generando radicales libres secundarios y terciarios. Las células aeróbicas han desarrollado mecanismos de defensa contra las

especies reducidas de oxígeno. Entre los mecanismos de defensa enzimáticos se encuentra la SOD, que cataliza la dismutación de anión superóxido, que lleva a la formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno. El peróxido de hidrógeno puede ser transformado en oxígeno y agua por la acción de la catalasa (38-43).

Si bien los diferentes tipos de SOD han sido bien caracterizados en diversos tejidos de mamíferos, tales como hígado, corazón, pulmón, existe poca información sobre la SOD en piel.

En este trabajo se determinó la actividad de SOD en epidermis de ratones SENCAR y se utilizó KCN a fin de discriminar los dos tipos de SOD, la Cu,Zn-SOD, inhibible por KCN y la Mn-SOD. Las determinaciones de actividad de SOD en presencia de KCN no permitieron detectar la presencia de Mn-SOD en ninguno de los extractos epidérmicos ensayados. Estos resultados de actividad coinciden con la baja señal obtenida cuando se determinó el contenido de ARNm de Mn-SOD en extractos de piel mediante Northern blot. Carraro y col. (109) han caracterizado las SOD en piel de diferentes especies de mamíferos, demostrando la presencia de Cu,Zn-SOD y de Mn-SOD en epidermis humana y de cobayo. En cambio, en piel de ratón sólo detectaron la presencia de Cu,Zn-SOD, lo cual coincide con los resultados previamente mencionados. Estos autores demostraron que el contenido de SOD total en epidermis de mamíferos es 5 a 10 veces menor que en otros tejidos como hígado o corazón. Sin embargo, los bajos valores de actividad de SOD/mg de proteína epidérmica puede deberse al alto contenido de proteínas no enzimáticas presentes en el estrato córneo, lo cual estaría enmascarando los valores reales de actividad de esta enzima en las células activas de la epidermis. La distribución de ambos tipos de SOD ha sido descrita en piel humana mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales (110), notándose que ambas están localizadas fundamentalmente en las células basales de la epidermis. Por lo tanto, es probable que la falta de

detección de Mn-SOD se deba a la existencia de muy baja proporción de esta enzima en epidermis de ratón localizada principalmente en las células basales y a un alto contenido de proteínas no enzimáticas presentes en los extractos de epidermis provenientes de los estratos suprabasales. Para detectarla podrían utilizarse otras técnicas, como inmunohistoquímica, o la determinación de actividad en extractos de mitocondrias aisladas de epidermis.

Existen evidencias experimentales que sugieren que la SOD estaría relacionada con el crecimiento tumoral. La disminución en la actividad de SOD es una característica común de diferentes células tumorales (79,111,112) y en particular ha sido demostrada en papilomas de piel de ratones SENCAR (57). No obstante, los resultados obtenidos en extractos de tumores de origen epidérmico no pueden ser fácilmente analizados comparativamente con los datos obtenidos de extractos epidérmicos, dado que el componente proteico aportado por el estroma tumoral estaría induciendo a una subestimación de las actividades enzimáticas de las células tumorales. Debido a esto, en este trabajo no se han determinado las actividades de SOD y catalasa en los tumores desarrollados. La adecuada evaluación de estas enzimas en los tumores requiere técnicas de inmunohistoquímica, que permiten determinar las variaciones en el contenido de la enzima en estudio teniendo en cuenta los diferentes componentes celulares del tejido.

En este trabajo se estudió el efecto que produce el promotor BzPo en las enzimas antioxidantes SOD y catalasa en epidermis y los resultados se compararon con los efectos producidos por el TPA.

Como había sido descrito previamente (57-59) el TPA produce una inhibición en la actividad de ambas enzimas antioxidantes en epidermis de ratones, que ya es significativa a las dos horas de un único tratamiento. Estas actividades se mantienen disminuídas durante el proceso de promoción con

TPA. Se sabe que el tratamiento de la piel con TPA induce un aumento general en la velocidad de síntesis proteica, como ha sido demostrado por experimentos de incorporación de [<sup>3</sup>H]-leucina en epidermis de ratones tratados con TPA (57). Por lo tanto, la disminución en las actividades de SOD y catalasa indicaría cierta especificidad en la acción del TPA, que afectaría diferencialmente a dichas enzimas. Por otro lado, las evaluaciones del contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD en pieles de ratones tratados con TPA demostraron disminuciones similares a las observadas en los valores de actividad. Estos resultados significarían que la modulación de la SOD por acción del TPA sería a nivel transcripcional.

Contrariamente a lo ocurrido con TPA, el BzPo no produjo variaciones en las actividades de SOD y catalasa en epidermis de ratones con un único tratamiento. Sin embargo, las evaluaciones del contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD luego de una única aplicación de BzPo, revelaron una leve disminución a las 6 horas del tratamiento y una recuperación de los valores control a las 24 horas. No obstante, estas variaciones en el contenido de ARNm no se reflejaron en los valores de actividad.

Luego de múltiples tratamientos con BzPo durante el proceso de promoción se observó una disminución significativa en la actividad de ambas enzimas, notándose valores de actividad similares a los obtenidos con TPA luego de 4 tratamientos de promoción. La disminución de la actividad de SOD inducida por múltiples tratamientos con BzPo podría explicarse por una modulación a nivel transcripcional, dado que luego de dos tratamientos con BzPo ya se observó una disminución del 43 % en el contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD y este porcentaje de disminución es comparable con la inhibición de actividad de SOD observada en las etapas tempranas de la promoción con BzPo.

Otra diferencia con respecto a lo ocurrido en la promoción con TPA, es que se observó una tendencia a recuperar los niveles de actividad de ambas enzimas durante el proceso de promoción con BzPo.

La comparación de la acción de ambos tipos de promotores muestra una respuesta inmediata diferente en cuanto a la modulación de las enzimas antioxidantes. Esta diferencia sería una evidencia de los distintos mecanismos de acción de ambos compuestos. Se sabe que el TPA activa directamente la proteína quinasa C, debido a su similitud estructural con el diacilglicerol, activador fisiológico de la PKC, y que la PKC fosforila sustratos muy variados, entre ellos factores de transcripción (113,114). Por lo tanto, los resultados de inhibición de la SOD y la catalasa por acción del TPA podrían estar relacionados con una posible regulación de la expresión de dichas enzimas mediada por la PKC. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en las determinaciones del contenido de ARNm de Cu,Zn-SOD que reflejan que la modulación de dicha enzima estaría dada a nivel de transcripción.

Por otro lado, el BzPo es incapaz de activar directamente la PKC (108). Sin embargo, el BzPo activaría la PKC en forma indirecta (108) y dicha activación podría estar mediada por procesos de estrés oxidativo (76). Como consecuencia de esto, el tratamiento crónico con BzPo podría inducir en forma indirecta la modulación de las enzimas antioxidantes mimetizando la acción del TPA. Esto explicaría que la disminución de las actividades de SOD y catalasa inducida por BzPo se detecte luego de varios tratamientos. Para evaluar estas hipótesis, serán necesarios futuros trabajos tendientes a correlacionar la acción del BzPo sobre las enzimas antioxidantes con las posibles modulaciones en la actividad de la PKC.

Es importante destacar que el comportamiento de ambas enzimas fue similar frente a un mismo promotor, esto sugiere que ambas enzimas estarían

moduladas por los mismos mecanismos. Amstad y col. (115), en base a experimentos de células epidérmicas transfectadas con cDNA de Cu,Zn-SOD o de catalasa sometidas a condiciones de estrés oxidativo, han propuesto que el balance entre los niveles de Cu,Zn-SOD y catalasa sería más importante para la sensibilidad de las células a las especies activas de oxígeno que las variaciones en la cantidad absoluta de cada una de dichas enzimas antioxidantes. Por lo tanto, la regulación conjunta de ambas enzimas sería importante en la defensa de las células frente a un estrés oxidativo.

El análisis de las evaluaciones de estrés oxidativo comparativamente con las determinaciones de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa por acción de los promotores tumorales BzPo y TPA demostró que no existe correlación entre la inducción de QL y la inhibición de estas enzimas antioxidantes. Esto se concluye dado que no hay variaciones en la inducción de QL a lo largo del proceso de promoción que se relacionen con las variaciones en las actividades de SOD y catalasa. Además, la inhibición altamente significativa de estas enzimas antioxidantes por acción del TPA no se correlaciona con un importante aumento de la inducción de QL. De estos resultados se deduce que el estrés oxidativo, medido como inducción de QL no estaría relacionado con las modificaciones en las concentraciones de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, esta conclusión se contradice con la posible explicación de la inhibición de la inducción de QL por acción del complejo de cobre con actividad de superóxido dismutasa, el CuDIPS. En base a esto, no se descarta la posibilidad de otras vías de acción de este compuesto en la inhibición de QL, teniendo en cuenta otras posibles actividades descritas para el CuDIPS (116). En el caso de la inducción de QL por BzPo, una posibilidad sería que el CuDIPS estuviera interfiriendo en la activación del BzPo mediada por las células epidérmicas, de manera similar a la acción del CuDIPS en la activación de carcinógenos (74,117).

### 3. ALTERACIONES MORFOLOGICAS

La evaluación de modificaciones morfológicas durante el proceso de carcinogénesis permite la comprensión de la patología y en particular, la histogénesis de los tumores en desarrollo.

La piel normal está compuesta por tres componentes principales: la epidermis, la dermis y los apéndices o anexos cutáneos. La epidermis es un epitelio estratificado que cubre la superficie del cuerpo y se caracteriza por un continuo reemplazo de las capas más superficiales mediante proliferación y migración de las capas más profundas. La división celular de las células basales y la posterior migración y diferenciación origina la capa de células espinosas, granulosa y finalmente la capa córnea. Por otra parte, la dermis está formada por un tejido conectivo muy vascularizado, que además de fibroblastos y otras células, contiene los anexos cutáneos y se encuentra separada de la epidermis por la lamina basal. Los anexos cutáneos son una serie de estructuras epiteliales que se proyectan hacia la dermis, tales como los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.

Los compuestos carcinogénicos y promotores pueden producir daños inmediatos o agudos, los cuales son usualmente no específicos. Los daños agudos en el tejido epidérmico, que pueden conducir a necrosis con erosión y ulceraciones, ocurren normalmente cuando se utilizan dosis muy altas de diversos compuestos químicos, incluyendo promotores tumorales (118). En cambio, cuando se aplican las dosis de promotores usualmente utilizadas en los experimentos de inducción de tumores se obtienen daños epidérmicos moderados y efectos probablemente específicos de estos compuestos.

En este trabajo se evaluaron diversas alteraciones morfológicas inducidas durante la promoción tumoral con BzPo con el objeto de caracterizar

el daño biológico producido por el tratamiento crónico con un agente oxidante capaz de actuar como promotor.

Uno de los parámetros descritos como importante en la promoción tumoral es la hiperplasia epidérmica, que se detecta como un aumento en el grosor de la epidermis y en el número de capas celulares. Esta alteración morfológica ha sido descrita como uno de los eventos tempranos en la promoción con ésteres del forbol (118). Los experimentos de promoción con TPA realizados en este trabajo coinciden con lo descrito en la bibliografía dado que ya se observó una moderada hiperplasia luego de un único tratamiento con TPA. Durante la promoción hubo un mayor incremento en el espesor epitelial que se mantuvo a lo largo de todo el proceso. Si bien la acción hiperplasiogénica no es específica de los agentes promotores, la diferencia entre los compuestos promotores y no promotores, capaces de inducir hiperplasia, sería que los promotores son capaces de mantener el efecto luego de múltiples tratamientos (118) mientras que otros compuestos como la mezereína y el ácido acético no producen hiperplasia epidérmica prolongada (119,120). Sin embargo, si bien estos autores consideran la hiperplasia epidérmica como uno de los eventos importantes en la promoción tumoral, los resultados aquí descritos muestran que el promotor tumoral BzPo no es capaz de inducir hiperplasia durante el proceso de inducción de tumores. Por lo tanto, esta alteración no sería un evento indispensable para el proceso de promoción, al menos cuando el promotor es un peróxido generador de radicales libres. Este resultado reflejaría las diferencias en los mecanismos de acción de ambos tipos de promotores. En este sentido, se sabe que el TPA actúa activando la PKC y se piensa que de esta forma produce varios de los efectos observados durante la promoción. Una característica importante del TPA es que ejerce su acción por un largo período debido a la lenta metabolización del mismo, produciendo como consecuencia "down regulation" de la PKC (121,122). La inducción de hiperplasia epidérmica mantenida



durante la promoción con TPA sería una de las respuestas a largo plazo asociadas con la "down regulation" de la PKC (123). Como ya se mencionó previamente, el BzPo no es capaz de activar en forma directa la PKC (108) y probablemente la modulación indirecta de esta enzima no sería suficiente para producir una "down regulation" de la misma, por lo cual no se darían ciertos efectos a largo plazo, como la hiperplasia.

Se evaluaron posibles alteraciones en la actividad transcripcional de las células epidérmicas durante el proceso de promoción con BzPo mediante el análisis morfométrico de las regiones organizadoras del nucleolo detectadas mediante la tinción selectiva con una técnica de plata coloidal (AgNORs). Se puede considerar que los NORs en interfase representan una unidad morfofuncional, en la cual todas las sustancias necesarias para la transcripción de los genes ribosomales están presentes (124). Las proteínas que se tiñen con esta técnica de plata representan un conjunto de proteínas ácidas que están localizadas selectivamente en las regiones organizadoras del nucleolo (125,126).

La evaluación del número de AgNORs por núcleo (N.NOR) mostró un muy significativo aumento de este parámetro en las células de todos los tipos de tumores desarrollados, en coincidencia con lo obtenido por otros autores en diversos tipos de tumores (95,127). En cambio, durante el proceso de promoción con BzPo no se observaron diferencias significativas en el parámetro N.NOR con respecto al epitelio control. Dado que el número de AgNORs puede aumentar por activación de NORs previamente inactivos o disminuir como resultado de una asociación de NORs activos (128) la determinación del volumen de AgNORs por núcleo (VT.NOR) sería un parámetro más adecuado para evaluar la actividad celular. Los resultados aquí descritos revelaron un aumento significativo en VT.NOR ya a partir de la segunda semana de promoción, cuando el tejido aún no presenta alteraciones

morfológicas detectables microscópicamente. Estos resultados indican que el volumen de los NORs sería un marcador temprano de variaciones en la actividad celular.

El significado biológico de estas variaciones puede ser analizado teniendo en cuenta el tipo de proteínas que se tiñen mediante esta técnica. Si bien la identidad de dichas proteínas no ha sido totalmente clarificada, varias proteínas se han propuesto como responsables de la tinción con plata, tales como la subunidad mayor de la ARN polimerasa I (129), B23 o numatrina (130) y C23 o nucleolina (125). La acumulación de B23 se correlaciona con la entrada en la fase S del ciclo celular, por lo tanto el aumento en B23 estaría asociado con la inducción de mitogénesis (131). La C23 controlaría la velocidad de transcripción de los genes ribosomales (132), por lo tanto el aumento en C23, como así también en ARN polimerasa I, se correlacionaría con la activación transcripcional de los genes de ARN ribosomal. Ochs y col. (125) sugieren que la proteína C23 sería la principal responsable de la tinción con plata. Si fuera así, el aumento en el volumen de NORs durante el proceso de promoción tumoral indicaría activación transcripcional de NORs previamente inactivos, que llevaría a un aumento de la síntesis de ARN ribosomal y por lo tanto, de síntesis proteica. Estos eventos se correlacionarían con el fenómeno de activación génica que ocurre durante la promoción y que conduce finalmente a la expresión del fenotipo latente.

La aplicación percutánea de compuestos químicos no sólo afecta la epidermis sino también induce fundamentalmente cambios muy marcados a nivel del tejido dérmico.

A lo largo del proceso de promoción los infiltrados de células de distinta estirpe y función son muy importantes y probablemente, por medio del intercambio de diversos tipos de citoquinas, produzcan cambios en el

micromedio que rodea a las células y condicionen las respuestas relacionadas con la inhibición o avance del crecimiento tumoral durante todo el proceso.

Un aumento en el número de mastocitos se observó en la piel durante la promoción con BzPo, coincidiendo con lo previamente descrito para el TPA (102). Este aumento se detecta a partir de las primeras aplicaciones con el promotor y se mantiene durante el proceso de promoción notándose un aumento aún mayor cuando comienzan a aparecer los tumores. Variaciones en el número de mastocitos han sido descritas en numerosas condiciones patológicas, y en particular, en varios tipos de tumores malignos (133-135). Sin embargo, no se conoce claramente el papel que cumplen los mastocitos en condiciones fisiológicas o patológicas.

Los mastocitos que se encuentran en diferentes localizaciones anatómicas muestran distintas características fenotípicas, que pueden ser detectadas por técnicas histoquímicas específicas, tales como la tinción secuencial con Alcian blue y Safranina O que permite diferenciar entre mastocitos de tipo mucoso (MMC) y mastocitos de tipo conectivo (CTMC). Las poblaciones de mastocitos pueden sufrir variaciones en las características fenotípicas y dicha heterogeneidad depende de una compleja regulación mediada por factores del microambiente en que se desarrollan (136).

El análisis de la población de mastocitos subepidérmicos durante la promoción con BzPo mediante esta técnica que permite detectar la naturaleza heterogénea de los mismos mostró que durante las etapas tempranas de la promoción los mastocitos que se encontraron aumentados son del tipo que en condiciones normales residen en la piel, es decir, de tipo conectivo. Sin embargo, en las etapas tardías de la promoción, cuando ya se produjo el desarrollo de tumores, se observó un notable predominio de un fenotipo diferente de mastocitos, que mostraron una afinidad preferencial por Alcian blue, lo que sugiere que serían mastocitos de tipo mucoso.

Un evento importante en la regulación del microambiente de los mastocitos, que puede llevar a la expresión de los diferentes fenotipos, podría ser la producción de una variedad de citoquinas por parte de las células epidérmicas (137,138). Los mastocitos también son capaces de producir y liberar diversas citoquinas multifuncionales (139). En particular, la liberación de mediadores del tipo interleuquina 3 podría inducir la proliferación de las células progenitoras de mastocitos y los cambios fenotípicos *in vivo*.

De los resultados aquí descritos se concluye que el número aumentado de mastocitos durante todo el proceso de promoción así como los cambios fenotípicos observados sería una de las alteraciones dérmicas más notables producidas durante el proceso de inducción de tumores. No obstante, la comprensión de la posible relación entre las modificaciones en la población de mastocitos subepidérmicos y el desarrollo tumoral requiere de posteriores estudios, que analicen las variaciones bioquímicas en el microambiente, así como también las posibles citoquinas involucradas.

El análisis ultraestructural del tejido durante el proceso de promoción reveló el importante infiltrado celular que fluye hacia la dermis formando complejas asociaciones celulares.

Los infiltrados celulares y sus diferentes tipos de asociaciones intercelulares han despertado un interés creciente en relación a su influencia en el desarrollo de neoplasias humanas y experimentales.

Trabajos recientes de Colombo y col. (140) han demostrado en ratón que la aplicación local de citoquinas exógenas en zonas peritumorales produce una reacción antitumoral masiva que está acompañada por respuestas histopatológicas aparentemente independientes del tipo de citoquina empleada (141). La zona afectada presenta infiltraciones masivas de linfocitos grandes, macrófagos y neutrófilos (142).

Se podría interpretar que la presencia del infiltrado celular y las asociaciones celulares que se observaron durante el proceso de promoción tumoral con BzPo podrían ser análogos a los descritos luego de tratamientos locales con citoquinas y provendrían en este caso, de la liberación natural de éstas como resultado de intensos "cross-talk" celulares. Estas interacciones producirían mensajes regulatorios, mediados por secreción polarizada y localizada de citoquinas y otros factores regulatorios (143). Varios autores sugieren que este "cross-talk" es importante en la eficacia de la respuesta inmunológica inespecífica y también en la reactividad mediada por linfocitos T.

La presencia local de citoquinas (144) y su influencia en la relación tumor/ huesped, podría inferirse en nuestro modelo a partir de las alteraciones ultraestructurales del infiltrado celular que responde morfológicamente al patrón descrito en la literatura para respuestas tisulares a la acción de citoquinas exógenas que estarían involucradas también en las modificaciones descritas en la población de mastocitos.

Este análisis de las observaciones morfológicas aquí descritas podrá ser profundizado mediante estudios bioquímicos específicos que permitan inferir conclusiones sobre la influencia de las citoquinas en el desarrollo tumoral.

#### **4. PROMOCION Y PROGRESION**

La capacidad promotora del BzPo fue evaluada determinando la incidencia (porcentaje de ratones con tumores) y multiplicidad (número promedio de tumores/ratón) tumoral semanalmente durante el proceso de promoción. Dado que la actividad del BzPo como promotor podría estar relacionada con su capacidad de generar radicales libres en las células epidérmicas y que el CuDIPS demostró ser un efectivo inhibidor del estrés

oxidativo inducido por BzPo, se evaluó la capacidad de este compuesto antioxidante de modular la acción del BzPo como promotor. Los resultados demostraron que el CuDIPS es un buen inhibidor de la actividad promotora del BzPo. Si la causa de esta inhibición fuera la capacidad del CuDIPS de actuar como biomimético de SOD, se podría concluir que la generación de anión superóxido estaría involucrada en la acción del BzPo como promotor. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otras vías de acción del CuDIPS sean las responsables de la inhibición de la promoción, como así también de la inhibición del estrés oxidativo.

Comparando la capacidad promotora del BzPo con la del TPA, los resultados reflejaron que el TPA es más efectivo como promotor que el BzPo. Por un lado, analizando la incidencia tumoral se observó que el BzPo requiere tiempos más prolongados de promoción para la inducción de tumores. La aparición de tumores comienza entre las 12 y 15 semanas de promoción con BzPo y nunca se llega a tener el 100 % de los ratones con tumores, mientras que con TPA a las 15 semanas el 100 % de los ratones ya presentan tumores. Por otro lado, analizando la multiplicidad tumoral se observó que la cantidad promedio de tumores desarrollados por ratón, cuando el promotor utilizado es el TPA, fue más del doble que en la promoción con BzPo. Sin embargo, luego de períodos prolongados de promoción con TPA se produjo una marcada regresión tumoral, lo cual no ocurre con el promotor BzPo. La regresión tumoral inducida por TPA coincide con lo descrito por otros autores (100).

Otro hecho que demuestra la mayor eficiencia del TPA como agente promotor en comparación con el BzPo es la alta dosis de BzPo requerida en cada tratamiento de promoción para la inducción de tumores, a diferencia del TPA que con dosis del orden de nmoles/ratón en cada tratamiento de promoción es muy efectivo en la inducción de tumores. Esta diferencia podría explicarse por la capacidad del TPA de actuar en forma directa y a través de

receptores específicos, mientras que el BzPo actuaría en forma indirecta e inespecífica.

El pretratamiento con CuDIPS durante el proceso de promoción con TPA no produjo inhibición de la promoción, dado que en ambos casos se obtuvo el 100 % de los ratones con tumores, el CuDIPS sólo produjo un leve retraso en la aparición de tumores que se detectó cuando el parámetro evaluado fue el número de tumores por ratón. Sin embargo, como efecto contrario del CuDIPS se observó que la regresión tumoral ocurrida en los animales promovidos sólo con TPA no ocurrió en los pretratados con CuDIPS. Este efecto condujo a la obtención de un mayor número de tumores por ratón como consecuencia del pretratamiento con CuDIPS luego de tiempos prolongados de promoción. La explicación biológica de este efecto requiere de nuevos experimentos que conduzcan al análisis de los mecanismos involucrados en la regresión tumoral.

Estos resultados muestran que la acción del CuDIPS como modulador de la promoción tumoral depende del agente usado como promotor y avalarían la hipótesis de que la acción del TPA como promotor, a diferencia del BzPo, no estaría mediada por radicales libres.

La falta de inhibición mediada por CuDIPS en la promoción con TPA coinciden con lo descrito por Solanki y col. (145) en ratones SENCAR. Sin embargo, Kensler y col. (73,74) encontraron que el CuDIPS, aplicado en las mismas dosis aquí descritas, fue un efectivo inhibidor de la promoción con TPA en ratones CD-1. Esta diferencia podría estar relacionada con respuestas diferenciales entre las distintas cepas de ratones utilizadas.

La evaluación de la conversión maligna se realizó luego de períodos prolongados de promoción-progresión, entre 33 y 42 semanas, mediante el diagnóstico histológico de los tumores desarrollados. Las características morfológicas de los tres tipos de tumores desarrollados: papilomas,

queratoacantomas y carcinomas epidermoides, coinciden con lo descrito por otros autores en ratones tratados según protocolos de carcinogénesis completa con DMBA o carcinogénesis en múltiples estadios usando DMBA como iniciador, TPA como promotor y BzPo como progresor (35,99).

Los papilomas desarrollados en piel de ratón son tumores benignos exofíticos cuyo destino es un tema de controversias entre diferentes autores. La discusión se centra en si estas lesiones en su mayoría regresionan o progresan a malignidad y si existen diferencias entre los diferentes papilomas en cuanto a su capacidad de convertirse en tumores malignos. En cuanto a la regresión de papilomas, este proceso ha sido previamente descrito (100), y confirmado por los resultados ya mencionados, cuando el agente promotor utilizado es el TPA. Sin embargo, los papilomas producidos por carcinogénesis completa con DMBA (100) o en los experimentos aquí detallados usando BzPo como agente promotor no regresionan y podrían ser considerados como precursores de carcinomas, como ha sido sugerido por Aldaz y col. (37).

O'Connell (35) y col. describieron la inducción de queratoacantomas en animales con papilomas durante la progresión con BzPo. Dado que durante este estadio no encontraron formación de nuevos tumores, estos autores sugieren que los queratoacantomas serían el resultado de la acción del BzPo sobre los papilomas ya existentes. Esta hipótesis coincide con la aparición de algunos tumores con áreas de papiloma y áreas de queratoacantoma, lo cual demostraría la conversión de un tipo de tumor en otro. En este sentido, también se encontraron ambos tipos de tumores benignos con áreas de conversión en carcinoma.

De estos hechos se puede concluir que los queratoacantomas podrían ser un estadio intermedio en la transformación de papiloma en carcinoma, dado que el queratoacantoma, el cual presenta crecimiento epidérmico endofítico, parece ser un tipo de tumor más agresivo que el papiloma. Esta hipótesis podría explicar el aumento en la proporción de queratoacantomas



con respecto a papilomas observada al aumentar el período de promoción-progresión con BzPo.

No obstante, de acuerdo a Chiba y col. (99) algunos carcinomas parecen originarse directamente a partir de zonas de piel no papilomatosas.

La acción del CuDIPS en la progresión tumoral inducida por BzPo resultó en una significativa inhibición de la conversión maligna. Además, el CuDIPS produjo una significativa inhibición del aumento de la proporción queratoacantoma/papiloma inducido durante la promoción-progresión con BzPo, lo que implicaría que el CuDIPS sería un efectivo inhibidor de la conversión de papiloma en queratoacantoma.

El análisis de la acción del CuDIPS en la progresión tumoral cuando los ratones fueron tratados con TPA durante el proceso de promoción-progresión reveló los dos efectos opuestos producidos por el CuDIPS. Por un lado, se observó un número significativamente mayor de tumores benignos por ratón, tanto papilomas como queratoacantomas, en los animales pretratados con CuDIPS. Dado que esto fue evaluado luego de un período prolongado (37 semanas) de promoción-progresión con TPA, este resultado se debería al proceso de regresión tumoral observado en los animales promovidos sólo con TPA y demostraría nuevamente la capacidad del CuDIPS de inhibir la regresión. Por otro lado, el CuDIPS indujo una parcial inhibición de la conversión maligna, dado que el número de carcinomas por ratón fue de aproximadamente el doble en los animales promovidos sólo con TPA con respecto a los pretratados con CuDIPS.

El hecho de que el CuDIPS demostró ser inhibidor de la conversión maligna, independientemente de si los animales fueron tratados durante la promoción-progresión con BzPo o con TPA, sería una evidencia de que los mecanismos involucrados en la progresión serían comunes a ambos tipos de compuestos, a diferencia de lo que ocurre en la promoción tumoral. Además

esta inhibición de la progresión mediada por un compuesto antioxidante podría estar relacionada con la posible acción de las especies activas de oxígeno en esta etapa de la carcinogénesis química. Se ha postulado que el daño al ADN es importante en la etapa de conversión maligna (33-35) y por otro lado, se han descrito diversas formas de daño al material genético, tales como modificaciones de las bases nitrogenadas, rupturas de cadenas del ADN y alteraciones cromosómicas por acción de agentes oxidantes (51,52). Por lo tanto, los estados de estrés oxidativo podrían inducir daños al ADN que produzcan la transformación maligna de células del tumor benigno. Estos estados pro-oxidantes podrían generarse por células inflamatorias activadas, o como en el caso del BzPo, por radicales libres orgánicos derivados de los mismos agentes químicos que actúan en la progresión tumoral.

## **CONCLUSIONES**

En este trabajo se estudiaron diferentes parámetros bioquímicos y morfológicos asociados con los procesos de promoción y progresión tumoral inducidos por un compuesto oxidante, el BzPo. El análisis comparativo entre dos tipos diferentes de agentes promotores, el BzPo y el TPA, dió nuevos aportes a la hipótesis de que ambos ejercen su acción por distintos mecanismos básicos.

El TPA mostró ser un promotor más activo, probablemente debido a su capacidad de actuar a través de receptores específicos, como la PKC y alterar de esta manera el control de la proliferación y diferenciación celular. No obstante, si bien existen algunas evidencias de que la generación de radicales libres no sería importante en el proceso de promoción con TPA, no se descarta

la posibilidad de que la modulación de las enzimas antioxidantes inducida por TPA tuviera alguna influencia en las respuestas celulares a dicho compuesto.

El BzPo resultó ser un promotor con una actividad moderada y los resultados aquí descritos, tales como las evaluaciones de estrés oxidativo, la respuesta diferencial de ambos promotores frente a un mismo compuesto antioxidante y las diferencias en las dosis y tiempos en que se manifiestan las alteraciones, sugieren que la acción del BzPo, a diferencia del TPA, sería indirecta e inespecífica y probablemente mediada por el aumento en la generación de radicales libres.

Las alteraciones morfológicas descritas: el aumento en la actividad transcripcional de las células epidérmicas y las importantes modificaciones celulares observadas en la dermis, serían una evidencia de las alteraciones bioquímicas tempranas inducidas por el BzPo, que conducen finalmente a las mismas respuestas pleiotrópicas que el TPA. El análisis histopatológico de los tipos de tumores desarrollados demostró también que el resultado final del proceso de carcinogénesis es similar entre ambos promotores.

Nuevos trabajos tendientes a correlacionar los procesos de estrés oxidativo con las posibles modificaciones en las vías de transducción de señales relacionadas con el control de la proliferación y diferenciación celular permitirán dilucidar los mecanismos por los cuales el BzPo induce a largo plazo las mismas respuestas biológicas que el TPA, probablemente a través del aumento en la generación de radicales libres.

Los resultados aquí descritos relacionando los eventos tempranos con los efectos a largo plazo inducidos por la acción de compuestos activos en la promoción y progresión tumoral, y el análisis multidisciplinario del proceso de carcinogénesis son un aporte a la comprensión de los mecanismos involucrados en la transformación celular.

## REFERENCIAS

- 1.- Yamagiwa, K. e Ishikawa, K. (1914) Uber die atypische Epithelwucherung. *Verh. Jpn. Pathol. Ges.* 4: 136-148.
- 2.- Boutwell, R. (1964) Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 4: 207-250.
- 3.- Boutwell, R. (1974) The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 2: 419-443.
- 4.- Berenblum, I., Shubik, P. (1947) The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin. *Br. J. Cancer* 1: 379-382.
- 5.- Slaga, T. (1989) Cellular and molecular mechanisms involved in multistage carcinogenesis. En: *Carcinogenesis: A Comprehensive Survey*. Conti, C., Slaga, T. y Klein-Szanto, A. (eds.) Raven Press, New York, Vol. 11, pp.1-18.
- 6.- Terracini, B., Shubik, P., Della Porta, G. (1960) A study of skin carcinogenesis in the mouse with single applications of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene at different dosages. *Cancer Res.* 20: 1538-1542.
- 7.- Slaga, T. (ed.) (1984) *Mechanisms of tumor promotion*, CRC Press, Boca Raton, Vol. 1-4.
- 8.- Slaga, T., Fischer, S., Weeks, C., Klein-Szanto, A. y Reiners, J. (1982) Studies on the mechanisms involved in multistage carcinogenesis in mouse skin. *J. Cell. Biochem.* 18: 99-119.
- 9.- Miller, J. y Miller, E. (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. En: *Origin of Human Cancer*, Book B. Hiatt, H., Watson, J. y Winsten, J. (eds.) Cold Spring Harbour Laboratory, New York, pp. 605-627.
- 10.- Stehelin, D., Varmus, H., Bishop, J. y Vogt, P. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173.
- 11.- Spector, D., Varmus, H. y Bishop, J. (1978) Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4102-4106.
- 12.- Bowden, G., Jaffe, D. y Krieg, P. (1989) Gene activation during multistage carcinogenesis in mouse skin. En: *Genes and Signal Transduction in Multistage Carcinogenesis*. Colburn, N. (ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 191-205.

- 13.- Parada, L., Tabin, C., Shih, C. y Weinberg, R. (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297: 474-478.
- 14.- Barbacid, M. (1987) *Ras* genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 779-827.
- 15.- Bos, J. (1989) *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- 16.- Balmain, A. y Pragnell, I. (1983) Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-*ras* oncogene. *Nature* 303: 72-74.
- 17.- Balmain, A., Ramsden, M., Bowden, G. y Smith, J. (1984) Activation of the mouse cellular Harvey-*ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307: 658-660.
- 18.- Brown, K., Quintanilla, M., Ramsden, M., Kerr, I., Young, S. y Balmain, A. (1986) V-*ras* genes from Harvey and Balb murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* 46: 447-456.
- 19.- Bailleul, B., Brown, K., Ramsden, M., Fee, F. y Balmain, A. (1989) Initiation of skin carcinogenesis can occur by induction of carcinogen-specific point mutations in the Harvey-*ras* gene. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Slaga, T., Klein-Szanto, A., Boutwell, R., Stevenson, D., Spitzer, H. y D'Motto, B. (eds.), Alan R. Liss, New York, Vol. 298, pp. 137-145.
- 20.- Shih, T., Weeks, M., Young, H. y Scolnick, E. (1979) Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology* 96: 64-79.
- 21.- Scolnick, E., Papageorge, A. y Shih, T. (1979) Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5355-5359.
- 22.- Gibbs, J., Schaber, M., Alard, W., Sigal, I. y Scolnick, E. (1988) Purification of *ras* GTPase activating protein from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5026-5030.
- 23.- Gibbs, J., Sigal, I., Poe, M. y Scolnick, E. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5704-5708.
- 24.- Sweet, R., Yokoyama, S., Kamata, T., Feramisco, J., Rosenberg, M. y Gross, M. (1984) The product of *ras* is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311: 273-275.

- 25.- Mulcahy, L., Smith, M. y Stacey, D. (1985) Requirement for *ras* proto-oncogen function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 313: 241-243.
- 26.- Roop, D., Mehrel, T., Krieg, T., Nakazawa, H., Cheng, C. y Yuspa, S. (1989) Keratin expression in mouse epidermal tumors. En: *Carcinogenesis: A Comprehensive Survey*. Conti, C., Slaga, T. y Klein-Szanto, A. (eds.) Raven Press, New York, Vol. 11, pp. 257-271.
- 27.- Balmain, A. y Brown, K. (1988) Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 51: 147-182.
- 28.- Roop, D., Lowy, D., Tambourin, P., Strickland, J., Harper, J., Balaschak, M., Spangler, E. y Yuspa, S. (1986) An activated Harvey *ras* oncogene produces benign tumours on mouse epidermal tissue. *Nature* 323: 822-824.
- 29.- Fischer, S., Cameron, G., Baldwin, J., Jasheway, D., Patrick, K. y Belury, M. (1989) The arachidonic acid cascade and multistage carcinogenesis in mouse skin. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Slaga, T., Klein-Szanto, A., Boutwell, R., Stevenson, D., Spitzer, H. y D'Motto, B. (eds.), Alan R. Liss, New York, Vol. 298, pp. 249-264.
- 30.- Marks, F., Berry, D., Bertsch, S., Furstenberger, G. y Richter, H. (1982) On the relationship between epidermal hyperproliferation and skin tumor promotion. En: *Cocarcinogenesis and Biological Effects of Tumor Promoters*. Hecker, E., Marks, F., Fusenig, N. y Slaga, T. (eds.), Raven Press, New York, pp. 331-346.
- 31.- O'Brien, T., Simsiman, R. y Boutwell, R. (1975) Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor promoting agents. *Cancer Res.* 35: 1662-1670.
- 32.- Blumberg, P., Jaken, S., Konig, N., Sharkey, K., Leach, A., Jeng, A. y Yeh, E. (1984) Mechanism of action of the phorbol ester tumor promoters: specific receptors for lipophilic ligands. *Biochem. Pharmacol.* 33: 933-940.
- 33.- Hennings, H., Shores, R., Wenk, M., Spangler, E., Tarone, R. y Yuspa, S. (1983) Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* 304: 67-69.
- 34.- Athar, M., Lloyd, J., Bickers, D. y Mukhtar, H. (1989) Malignant conversion of UV radiation and chemically induced mouse skin benign tumors by free-radical-generating compounds. *Carcinogenesis* 10: 1841-1845.
- 35.- O'Connell, J., Klein-Szanto, A., DiGiovanni, D., Fries, J. y Slaga, T. (1986) Enhanced malignant progression of mouse skin tumors by the free-radical generator benzoyl peroxide. *Cancer Res.* 46: 2863-2865.

- 36.- Nelson, K., Stephenson, K. y Slaga, T. (1982) Protein modifications induced in mouse epidermis by potent and weak tumor-promoting hyperplasiogenic agents. *Cancer Res.* 42: 4164-4175.
- 37.- Aldaz, C., Conti, C., Klein-Szanto, A. y Slaga, T. (1987) Progressive dysplasia and aneuploidy are hallmarks of mouse skin papillomas: relevance to malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2029-2032.
- 38.- Gerschman, R. (1964) Biological effects of oxygen. En: *Oxygen in the Animal Organism*. Dickens, F. y Neil, E. (eds). Pergamon Press, London, pp. 475-494.
- 39.- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- 40.- Halliwell, B. y Gutteridge, J. (1985) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- 41.- Ernster, L. (1986) Oxygen as an environmental poison. *Chemica Scripta* 26: 525-534.
- 42.- Cerutti, P., Fridovich, I. y McCord, J. (eds.) (1988) *Oxy-radicals in Molecular Biology and Pathology*. Alan R. Liss, New York.
- 43.- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- 44.- McCord, J. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- 45.- Perchellet, J. y Perchellet, E. (1989) Antioxidants and multistage carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 7: 377-408.
- 46.- Cerutti, P. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381.
- 47.- Trush, M. y Kensler, T. (1991) An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 10: 201-209.
- 48.- Klein-Szanto, A. y Slaga, T. (1982) Effect of peroxides on rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. *J. Invest. Dermatol.* 79: 30-34.
- 49.- DiGiovanni, J. (1989) Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons and phorbol ester by mouse skin: relevance to mechanism of action and trans-species/strain carcinogenesis. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Slaga, T., Klein-Szanto, A., Boutwell, R., Stevenson, D., Spitzer, H. y D'Motto, B. (eds.), Alan R. Liss, New York, Vol. 298, pp. 167-199.

- 50.- Jaffe, D. y Bowden, G. (1987) Ionizing radiation as an initiator: effects of proliferation and promotion time on tumor incidence in mice. *Cancer Res.* 47: 6692-6696.
- 51.- Kensler, T. y Taffe, B. (1986) Free Radicals in tumor promotion. *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2: 347-387.
- 52.- Kensler, T., Egner, P., Taffe, B. y Trush, M. (1989) Role of free radicals in tumor promotion and progression. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Slaga, T., Klein-Szanto, A., Boutwell, R., Stevenson, D., Spitzer, H. y D'Motto, B. (eds.), Alan R. Liss, New York, Vol. 298, pp. 233-248.
- 53.- Slaga, T., Klein-Szanto, A., Triplett, L., Yotti, L. y Trosko, J. (1981) Skin tumor promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science* 213: 1023-1025.
- 54.- Kurokawa, Y., Takamura, N., Matsushima, Y., Takayoshi, Y. y Hayashi, Y. (1985) Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* 24: 299-304.
- 55.- Goldstein, B., Witz, G. Amoruso, M., Stone, D. y Troll, W. (1981) Stimulation of human polymorphonuclear leukocyte superoxide anion radical production by tumor promoters. *Cancer Lett.* 11: 257-262.
- 56.- Zimmerman, R. y Cerutti, P. (1984) Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo CTH/10T1/2/C18 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2085-2087.
- 57.- Solanki, V., Rana, R. y Slaga, T. (1981) Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters. *Carcinogenesis* 2: 1141-1146.
- 58.- Cameron, G. y Pence, B. (1992) Effects of multiple applications of tumor promoters and ultraviolet radiation on epidermal proliferation and antioxidant status. *J. Invest. Dermatol.* 99: 189-192.
- 59.- Reiners, J., Thai, G., Rupp, T. y Cantu, A. (1991) Assessment of the antioxidant / prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Part I: Quantitation of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase. *Carcinogenesis* 12: 2337-2343.
- 60.- Perchellet, J., Perchellet, E., Orten, D. y Schneider, B. (1986) Decreased ratio of reduced/oxidized glutathione in mouse epidermal cells treated with tumor promoters. *Carcinogenesis* 7: 503-506.
- 61.- Slaga, T., Solanki, V. y Logani, M. (1983) Studies on the mechanism of action of antitumor promoting agents: suggestive evidence for the involvement



of free radicals in promotion. En: Radioprotectors and Anticarcinogens. Nygaard, O y Simic, M. (eds.). Academic Press, New York, pp. 471-485.

62.- Taffe, B., Takahashi, N., Kensler, T. y Mason, R. (1987) Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 12143-12149.

63.- Athar, M., Mukhtar, H., Bickers, D., Khan, U. y Kalyanaraman, B. (1989) Evidence for the metabolism of tumor promoter organic hydroperoxides into free radicals by human carcinoma skin keratinocytes: an ESR-spin trapping study. *Carcinogenesis* 10: 1499-1503.

64.- Timmins, G. y Davies, M. (1993) Free radical formation in isolated murine keratinocytes treated with organic peroxides and its modulation by antioxidants. *Carcinogenesis* 14: 1615-1620.

65.- Iannone, A., Marconi, A., Zambruno, G., Giannetti, A., Vannini, V. y Tomasi, A. (1993) Free radical production during metabolism of organic hydroperoxides by normal human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 101: 59-63.

66.- Kensler, T., Egner, P., Swauger, J., Taffe, B. y Zweier, J. (1988) Formation of free radicals from benzoyl peroxide in murine keratinocytes. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 29: 150.

67.- DeChatelet, L., Shirley, P. y Johnson, R. (1976) Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 47: 545-554.

68.- Cox, J., Jeng, A., Sharkey, N., Blumberg, P. y Tauber, A. (1985) Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J. Clin. Invest.* 76: 1932-1938.

69.- Reiners, J., Pence, B., Barcus, M. y Cantu, A. (1987) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate - dependent induction of xanthine dehydrogenase and conversion to xanthine oxidase in murine epidermis. *Cancer Res.* 47: 1775-1779.

70.- Gindhart, T., Srinivas, L. y Colburn, N. (1985) Benzoyl peroxide promotion of transformation of JB6 mouse epidermal cells: Inhibition by ganglioside GT but not retinoic acid. *Carcinogenesis* 6: 309-311.

71.- Perchellet, J., Perchellet, E., Orten, D. y Schneider, B. (1985) Inhibition of the effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse epidermal glutathione peroxidase and ornithine decarboxylase activities by glutathione level-raising agents and selenium-containing compounds. *Cancer Lett.* 26: 283-293.

- 72.- Kozumbo, W., Seed, J. y Kensler, T. (1983) Inhibition by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole and other antioxidants of epidermal ornithine decarboxylase activity induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 43: 2555-2559.
- 73.- Kensler, T., Bush, D. y Kozumbo, W. (1983) Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase. *Science* 221: 75-77.
- 74.- Egner, P. y Kensler, T. (1985) Effects of a biomimetic superoxide dismutase on complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Carcinogenesis* 6: 1167-1172.
- 75.- Perchellet, J., Abney, N., Thomas, R., Guislain, Y. y Perchellet, E. (1987) Effects of combined treatments with selenium, glutathione and vitamin E on glutathione peroxidase activity, ornithine decarboxylase induction, and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Cancer Res.* 47: 6302-6309.
- 76.- Taffe, B. y Kensler, T. (1989) Free radicals and signal transduction in tumor promotion. En: *Genes and Signal Transduction in Multistage Carcinogenesis*. Colburn, N. (ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 391-413.
- 77.- Yuspa, S. y Morgan, D. (1981) Mouse skin cells resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. *Nature* 293: 72-74.
- 78.- Reiners, J., Nesnow, S. y Slaga, T. (1984) Murine susceptibility to two-stage skin carcinogenesis is influenced by the agent used for promotion. *Carcinogenesis* 5: 301-307.
- 79.- Leuthauser, S., Oberley, L., Oberley, T., Sorenson, J. y Ramakrishna, K. (1981) Antitumor effect of a copper coordination compound with superoxide dismutase-like activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 1077-1081.
- 80.- Boveris, A., Cadenas, E., Reiter, R., Filipkowski, M., Nakase, Y. y Chance, B. (1980) Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 347-351.
- 81.- Boveris, A., Cadenas, E., y Chance, B. (1981) Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed Proc.* 40: 195-198.
- 82.- Cadenas, E., Boveris, A. y Chance, B. (1981) Low-level chemiluminescence of biological systems. En: *Free Radicals in Biology*. Pryor (ed.). Academic Press, New York. Vol. 6, pp. 211-242.
- 83.- Cadenas, E. y Sies, H. (1984) Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. En: *Methods in Enzymology*. Packer, L. (ed.). Academic Press, New York. Vol. 105, pp. 221-231.

- 84.-Argyris, T. (1978) Epidermal growth and ribosomal RNA accumulation in regenerating mouse epidermis following abrasion. *J. Invest. Dermatol.* 70: 267-271.
- 85.- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- 86.- Reiners, J., Hale, M. y Cantu, A. (1988) Distribution of catalase and its modulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in murine dermis and subpopulations of keratinocytes differing in their stages of differentiation. *Carcinogenesis* 9:1259-1263.
- 87.- Nelson, D. y Kiesow, L. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. *Anal. Biochem.* 49:474-478.
- 88.- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. En: *Methods in Enzymology*. Packer, L. (ed.). Academic Press, New York. Vol. 105, pp. 121-126.
- 89.- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 90.- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- 91.- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Ford, N., Nolan, C. y Ferguson, M. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 92.- Feinberg, A. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- 93.- Feinberg, A. y Vogelstein, B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- 94.- Howat, A., Giri, D., Cotton, D. y Slater, D. (1989) Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer* 63: 474-478.
- 95.- Cabrini, R., Schwint, A., Méndez, A., Femopase, F., Lanfranchi, H. y Itoiz, M. (1992) Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 21: 275-279.
- 96.- Weibel, E. y Bolender, R. (1973) Stereological techniques for electron microscopic morphometry. En: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Hayat, M. (ed.), pp. 237-296.

- 97.- Bergstresser, P., Tigelaar, R. y Tharp, M. (1984) Conjugated avidin identifies cutaneous rodent and human mast cells. *J. Invest. Dermatol.* 83: 214-218.
- 98.- Enerbäck, L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. II: Dye binding and metachromatic properties. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66: 303-312.
- 99.- Chiba, M., Maley, M. y Klein-Szanto, A. (1986) Sequential study of  $\gamma$ -glutamyltransferase during complete and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 46: 259-263.
- 100.- Klein-Szanto, A. (1989) Pathology of human and experimental skin tumors. En: *Carcinogenesis: A Comprehensive Survey*. Conti, C., Slaga, T. y Klein-Szanto, A. (eds.) Raven Press, New York, Vol. 11, pp. 19-53.
- 101.- Fischer, S. y Adams, L. (1985) Suppression of tumor promoter-induced chemiluminescence in mouse epidermal cells by several inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Cancer Res.* 45: 3130-3136.
- 102.- Aldaz, C., Conti, C., Giménez, I., Slaga, T. y Klein-Szanto, A. (1985) Cutaneous changes during prolonged application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin and residual effects after cessation of treatment. *Cancer Res.* 45: 2753-2759.
- 103.- Witz, G., Goldstein, B., Amoruso, M., Stone, D. y Troll, W. (1980) Retinoid inhibition of superoxide anion radical production by human polymorphonuclear leukocytes stimulated with tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88: 854-860.
- 104.- Weitzman, S., Weitberg, A., Clark, E. y Stossel, T. (1985) Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227: 1231-1233.
- 105.- Fischer, S., Baldwin, J. y Adams, L. (1986) Effects of anti-promoters and strain of mouse on tumor promoter-induced oxidants in murine epidermal cells. *Carcinogenesis* 7: 915-918.
- 106.- Fischer, S., Baldwin, J., Jasheway, D. y Patrick, K. (1987) Possible dissociation of the phorbol ester-induced oxidant response and tumor promotion in the F<sub>1</sub> offspring of SSIN x C57BL/6J. *Carcinogenesis* 8: 1521-1524.
- 107.- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.

- 108.- Donnelly, T., Pelling, J., Anderson, C. y Dalbey, D. (1987) Benzoyl peroxide activation of protein kinase C activity in epidermal cell membranes. *Carcinogenesis* 8: 1871-1874.
- 109.- Carraro, C. y Pathak, M. (1988) Characterization of superoxide dismutase from mammalian skin epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 90: 31-36.
- 110.- Kobayashi, T., Matsumoto, M., Ilzuka, H., Suzuki, K. y Taniguchi, M. (1991) Superoxide dismutase in psoriasis, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study. *British J. Dermatol.* 124: 555-559.
- 111.- Oberley, L., Oberley, T. y Buettner, G. (1981) Cell division in normal and transformed cells: The possible role of superoxide and hydrogen peroxide. *Med. Hypotheses* 7: 21-42.
- 112.- Marklund, S., Westman, N., Lundgren, E. y Roos, G. (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42: 1955-1961.
- 113.- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308: 693-698.
- 114.- Sharkey, N., Leach, K. y Blumberg, P. (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 607-610.
- 115.- Amstad, P., Peskin, A., Shah, G., Mirault, M., Moret, R., Zbinden, I. y Cerutti, P. (1991) The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30: 9305-9313.
- 116.- Sorenson, J. (ed.) (1987) *Biology of Copper Complexes*. Humana Press, Clifton, NJ.
- 117.- Reiners, J., Brott, E. y Sorenson, J. (1986) Inhibition of benzo[a]-pyrene-dependent mutagenesis and cytochrome P-450 reductase activity by copper complexes. *Carcinogenesis* 7: 1729-1732.
- 118.- Klein-Szanto, A. (1989) Morphological evaluation of the effects of carcinogens and promoters. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Slaga, T., Klein-Szanto, A., Boutwell, R., Stevenson, D., Spitzer, H. y D'Motto, B. (eds.), Alan R. Liss, New York, Vol. 298, pp. 45-62.
- 119.- Argyris, T. (1983) Analysis of the epidermal hyperplasia produced by acetic acid, a poor promoter, in the skin of female mice initiated with DMBA. *J. Invest. Dermatol.* 80: 430-435.

- 120.- Argyris, T. (1983) Nature of epidermal hyperplasia produced by mezerein, a weak tumor promoter, in initiated skin of mice. *Cancer Res.* 43: 1768-1773.
- 121.- Young, S., Parker, P., Ullrich, A. y Stabel, S. (1987) Down regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244: 775-779.
- 122.- Fournier, A. y Murray, A. (1987) Application of phorbol ester to mouse skin causes a rapid and sustained loss of protein kinase C. *Nature* 330: 767-769.
- 123.- Hansen, L., Monteiro-Riviere, N. y Smart, R. (1990) Differential down-regulation of epidermal protein kinase C by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and diacylglycerol: association with epidermal hyperplasia and tumor promotion. *Cancer Res.* 50: 5740-5745.
- 124.- Derenzini, M., Nardi, F., Farabegoli, F., Ottinetti, A., Roncaroli, F. y Bissolati, G. (1989) Distribution of silver stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from non neoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol.* 33: 491-498.
- 125.- Ochs, R. y Busch, H. (1984) Further evidence that phosphoprotein C23 (110 kD/pl 5.1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp. Cell Res.* 152: 260-265.
- 126.- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. y Adnet, J. (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem. J.* 18: 5-14.
- 127.- Leong, A. y Gilham, P. (1989) Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum. Pathol.* 20: 257-262.
- 128.- Wachtler, F., Hopman, H., Wiegant, J. y Schwarzacher, H. (1986) On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei: studies with a new, non-autoradiographic in situ hibridization method. *Exp. Cell Res.* 167: 227-240.
- 129.- Williams, M., Kleinschmidt, J., Khrono, G. y Franke, W. (1982) Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 137: 341-352.
- 130.- Feuerstein, N., Chan, P. y Mond, J. (1988) Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. *J. Biol. Chem.* 263: 10608-10612.
- 131.- Feuerstein, N., Mond, J., Kinchington, P., Hickey, R., Lindsberg, M., Hay, I. y Ruyenchau, W. (1990) Evidence for DNA binding activity of numatrin (B23),

a cell cycle regulated nuclear matrix protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1087: 127-136.

132.- Lapeyre, B., Bourbon, H. y Almarick (1987) Nucleolin, the major nuclear protein of growing eukariotic cells: an unusual protein structure revealed by nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1472-1476.

133.- Baroni, C. (1964) On the relationship of mast cells to various soft tissue tumors. *British J. Cancer* 18: 686-691.

134.- Kessler, D., Langer, R., Pless, N. y Folkman, J. (1972) Mast cells and tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 18: 703-709.

135.- de Cidre, L. y Lustig, E. (1990) Mast cells kinetics during tumor growth. *Tumor Biol.* 11: 196-201.

136.- Galli, S. (1990) New insights into "The riddle of mast cells": Microenvironmental regulation of mast cells development and phenotypic heterogeneity. *Lab. Invest.* 62: 5-33.

137.- Luger, T., Wirth, U. y Kock, A. (1985) Epidermal cells synthesize a cytokine with interleukin 3-like properties. *J. Immunol.* 134: 915-919.

138.- Luger, T. y Shwartz, T. (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* 95(Suppl.): 100s-104s.

139.- Gordon, J., Burd, P. y Galli, S. (1990) Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today* 11: 458-463.

140.- Colombo, M., Modesti, A., Parmiani, G. y Forni, G. (1992) Local cytokine availability elicits tumor rejection and systemic immunity through granulocyte-T-lymphocyte cross-talk. *Cancer Res.* 52: 4853-4857.

141.- Musiani, P., de Campora, P., Valitutti, S., Castellino, F., Calero, C., Jemma, C., De Stefani, A. y Forni, G. (1989) Effects of low doses of interleukin-2 injected perilymphatically and peritumorally in patients with advanced primary head and neck squamous cell carcinoma. *J. Biol. Resp. Med.* 8: 571-578.

142.- Tepper, R., Pattengale, P. y Leder, P. (1989) Murine interleukin-4 displays potent antitumor activity *in vivo*. *Cell* 57: 503-512.

143.- Janeway, C., Bottomly, K., Horowitz, J., Kaye, J., Jones, B. y Tite, J. (1985) Modes of cell:cell communication in the immune system. *J. Immunol.* 135: 179-184.

144.- Nathan, C. y Sporn, M. (1991) Cytokines in the context. *J. Cell Biol.* 113: 981-986.

145.- Solanki, V., Yotti, L., Logani, M. y Slaga, T. (1984) The reduction of tumor initiating activity and cell mediated mutagenicity of dimethylbenz[a]anthracene by a copper coordination compound. *Carcinogenesis* 5: 129-131.

FCE y N BIBLIOTECA