



FUNDACION BUNGE Y BORN

Consejo de Administración

Presidente: Salvador L. Carbó

Consejeros: Juan C. Born, Octavio Caraballo,
Jorge Cóppola, Alejandro de La Tour d'Auvergne

Directora Ejecutiva: María Luisa Herrera Vegas

La Fundación Bunge y Born fue creada en agosto de 1963, cuando el grupo económico Bunge y Born cumplía 80 años de permanencia en el país. Realiza una labor filantrópica que beneficia a miles de argentinos, en todas las provincias del país, apoyando la investigación científica, la educación, la salud pública, el desarrollo comunitario y la cultura.

El Premio Fundación Bunge y Born a la investigación científica ha adquirido una indudable jerarquía, que lo coloca a la vanguardia de los que se otorgan en ese campo en Argentina. Basta mencionar que uno de sus jurados fue el Dr. Bernardo Houssay (1963) y uno de sus adjudicatarios el Dr. Luis Federico Leloir (1965), ambos galardonados con el Premio Nobel.

La Fundación también apoya el funcionamiento de escuelas rurales, programas de alfabetización, huertas escolares, enseñanza de oficios para adolescentes y planes para erradicación de enfermedades endémicas. Efectúa donaciones a hospitales públicos y subsidia trabajos de investigación, colaborando en el sostenimiento de organizaciones sin fines de lucro que bregan por la preservación y mejoramiento de la calidad de vida en Argentina, otorgando innumerables becas de estudio para distintos niveles de las ciencias, el arte y la cultura.

La Fundación Bunge y Born ha instaurado una beca anual destinada a estudiantes destacados de nuestra Facultad de Ciencias Veterinarias, con prestación de servicios en la Cátedra de Fisiología, que en el año 2003 fue adjudicada al alumno Norberto Orlando Correa y en 2004 a Sergio Ernesto López Belsunce.

El Premio Bunge y Born a personalidades destacadas de las Ciencias Veterinarias recayó sucesivamente en las figuras del Dr. José J. Monteverde (1973), Dr. Bernardo Carrillo (1979) y Dr. Alfredo Manzullo (1985). Los más recientes le correspondieron al Dr. Oscar J. Lombardero (1992), profesor de nuestra Casa de Estudios, y al Dr. Adolfo P. Casaro (2003), miembro del Cuerpo de Consultores de esta revista. El Dr. Luis Ignacio Alvarez (UNCPBA) recibió en 2003 el Premio "Estímulo a Jóvenes Científicos".

En un gesto que exalta su vocación de servicio, la Fundación Bunge y Born apoya económicamente el sostenimiento de "Revista Veterinaria", publicación oficial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste.

FUNDACIÓN BUNGE Y BORN

25 de Mayo 501 – Buenos Aires (1002) – Argentina

Estudio histoquímico y ultraestructural de focos de criptas displásicas del intestino grueso inducidos con 1,2-dimetilhidrazina en ratas

Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Lértora, W.J.; Borda, J.T.

Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax: 03783-425753, E-mail: patgral@vet.unne.edu.ar

Resumen

Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Lértora, W.J.; Borda, J.T.: Estudio histoquímico y ultraestructural de focos de criptas displásicas del intestino grueso inducidos con 1,2-dimetilhidrazina en ratas. El objetivo de este estudio fue verificar cambios histoquímicos y ultraestructurales en los focos de criptas displásicas (FCD) inducidos por el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en intestino grueso de ratas. Fueron utilizadas 30 ratas Wistar machos, de 3 meses de edad, mantenidas con dieta balanceada (20 experimentales y 10 controles). La DMH fue administrada a los animales experimentales por vía subcutánea durante 16 semanas, a dosis de 20 mg/kg de peso corporal. Luego de la última inoculación se sacrificaron todos los animales de ambos grupos. En el intestino grueso se localizaron los FCD, en los cuales se estudiaron los cambios histológicos e histoquímicos del epitelio intestinal a partir de muestras seccionadas en 5µm, coloreadas con hematoxilina y eosina, PAS y azul alcian a pH 2,5; también fueron examinados mediante microscopía electrónica de barrido. Histoquímicamente los FCD se caracterizaron por disminución o ausencia de la coloración de mucosustancias neutras y ácidas, reaccionando negativamente al PAS y al azul alcian. Desde el punto de vista ultraestructural se registraron aumentos del tamaño de las criptas (hiperplasia y crecimiento desorganizado de las células glandulares) y cambios en la superficie, caracterizados por una leve distorsión de las bocas de aberturas de las criptas, aumento del grosor de sus paredes y disminución del número y tamaño de las microvellosidades (menor grado de maduración). Las lesiones halladas indican que la superficie mucosa del intestino grueso de ratas tratadas con DMH desarrolla cambios morfológicos durante la carcinogénesis, evidenciables antes de la aparición del tumor visible macroscópicamente.

Palabras clave: displasia de colon, dimetilhidrazina, histoquímica, ultraestructura, rata.

INTRODUCCIÓN

La histogénesis del carcinoma inducido químicamente en animales de laboratorio es un tema ampliamente debatido. Algunos investigadores describen que los focos carcinomatosos microscópicos se originan en la mucosa superficial, independientemente de una lesión adenomatosa previa (*teoría de novo*)^{15, 20, 25}. Otros consignan focos microscópicos originados en pólipos (*teoría de la secuencia adenoma-carcinoma*)^{5, 14, 17}. Esta misma discusión existe sobre la génesis del cáncer de colon en los seres humanos^{2, 4, 9, 12, 13, 19, 26}.

Resultan interesantes los resultados obtenidos referentes a las lesiones preneoplásicas observadas en el epitelio colónico de roedores tratados con la droga cancerígena 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Observaciones tempranas muestran que antes del desarrollo de una franca lesión neoplásica existen cambios caracterizados por disminución de la secreción de mucina y distorsión de las criptas, incluyendo áreas de dilatación

quística¹¹. Otras experiencias demuestran un aumento de la longitud de las criptas, de su circunferencia, del número de mitosis y de la zona proliferativa constituyendo fenómenos hiperplásicos^{7, 22}.

Estos cambios son seguidos por la formación de criptas displásicas conocidos como *focos de criptas displásicas* (FCD), caracterizados por un incremento en el diámetro, luz dilatada en su parte media inferior acompañada de algunas irregularidades y tortuosidades, con ocasionales evaginaciones de la capa epitelial de la mitad superior de la cripta. Las células de estos FCD manifiestan basofilia citoplasmática, baja relación núcleo-citoplasmática, nucléolos prominentes y pérdida de la polaridad⁷. Mediante estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos se han identificado las variaciones de los componentes mucopolisacáridos de la superficie epitelial del cáncer colónico en seres humanos y en animales de laboratorio^{8, 11, 18}.

El objetivo del presente trabajo fue determinar mediante histoquímica y microscopía electrónica de barri-

do (MEB), los cambios químicos y ultraestructurales que ocurren en los FCD y en la superficie mucosa del intestino grueso, en ratas tratadas con el carcinógeno DMH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron utilizadas 30 ratas Wistar, machos, de 3 meses de edad, con un peso promedio de 180 g, alojadas en jaulas individuales en ambientes con temperatura controlada de 21°C y mantenidas con dieta balanceada y agua *ad-libitum*. Diez animales operaron como testigos, en tanto que los 20 restantes constituyeron el grupo experimental. Estos últimos fueron sometidos a inyecciones subcutáneas semanales de DMH durante 16 semanas, a dosis de 20 mg/kg de peso corporal, para inducir FCD en el intestino grueso.

La droga cancerígena fue preparada como una solución conteniendo 400 mg de DMH disuelta en 100 ml de agua destilada estéril conteniendo 37 mg de EDTA como agente estabilizador y mantenida a pH 6,5 con hidróxido de sodio. A fin de evitar contaminaciones químicas del medio ambiente y de los animales no tratados con la droga cancerígena, sendos grupos fueron alojados en salas separadas.

Todos los animales fueron sacrificados inmediatamente luego de la última dosis de DMH. El intestino grueso fue extraído en su totalidad, abierto longitudinalmente y colocado sobre una plancha de cartón, tras lo cual fue fijado con formol bufferado al 10% durante 24 horas y procesado por la técnica histológica clásica para bloques parafinados. Posteriormente el material procesado fue cortado en micrótomos tipo Minot, en 5µm de espesor y coloreado con hematoxilina-eosina y técnicas histoquímicas del PAS y azul alcian a pH 2,5.

Para el estudio con MEB, se procedió a lavar el intestino con glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato de sodio 0,1M; luego se extrajo la porción de intestino a estudiar (no mayor a 1x1cm), la cual se adhirió a una plancha de cartón mediante alfileres, para ser fijado durante 2 h en glutaraldehído al 3%. Posteriormente, dicho material fue deshidratado con alcoholes de graduación creciente e inmerso en acetona, para luego ser secado a punto crítico, montado sobre un cabo de aluminio y cubierto con oro-paladio. El estudio fue realizado mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL 5800LV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los animales tratados con DMH fueron observados FCD, ubicados en ciego, colon proximal, colon distal y recto, preferentemente en criptas alejadas de los nódulos linfoides asociados al intestino. Las ratas controles no desarrollaron lesiones.

Los FCD se caracterizaron por comprometer grupos de 2 a 3 criptas (Figura 1), hasta grupos con numerosas criptas (Figura 2), ubicándose en la superficie de la mucosa, en la parte media o comprometiendo casi

todo el espesor de la misma. Se caracterizaron por marcada basofilia citoplasmática, disminución y/o ausencia de células caliciformes, núcleos prominentes con cromocentros gruesos y evidente nucléolo, frecuentes mitosis, en ocasiones estratificación celular y pérdida de la polaridad, así como dilatación y formación de pseudopapilas y/o brotes glandulares.

Histoquímicamente los FCD se caracterizaron por disminución o ausencia de la coloración de mucosustancias neutras y ácidas, reaccionando negativamente al PAS y al azul alcian a pH 2,5 (Figuras 3 y 4). En los FCD que presentaron células caliciformes, las mismas aparecieron como vacuolas claras, en ocasiones débilmente coloreadas en sus bordes. En otros se observó una débil coloración de la superficie apical de las células correspondientes a la chapa estriada y de algunas pequeñas vacuolas localizadas en muy pocas células. En todos los casos, las criptas vecinas a los FCD mostraron una mucosa que reaccionaba muy débilmente a las coloraciones PAS y azul alcian.

Si bien los FCD presentaron una débil reacción histoquímica tanto con la técnica del PAS como con la de azul alcian, no se encontraron diferencias en la intensidad de coloración como para inferir que se trató de FCD con distintos grados de diferenciación. La disminución y/o ausencia de mucosustancias en FCD, adenomas y adenocarcinomas se debería probablemente al menor grado de diferenciación celular, así como a la ausencia o menor número de células caliciformes^{18, 27, 29}, pero debido a que este comportamiento es similar entre un FCD y un adenocarcinoma, resulta de poca utilidad como posible marcador oncogénico a fin de diferenciar en etapas previas si un FCD podría evolucionar hacia un tumor benigno o maligno.

En ratas tratadas con DMH se produjo disminución en el número de células caliciformes del tejido displá-

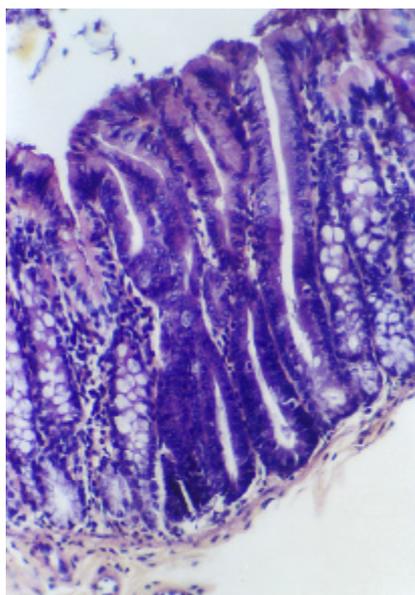


Figura 1: FCD compuesto por algunas criptas, con compromiso de todo el espesor de la mucosa (H y E, 100x).

sico y tumoral ²⁸. Al comparar resultados de estudios experimentales en ratas y ratones con cáncer de colon inducido con diferentes carcinógenos, se descubrió la existencia de una secuencia de cambios comunes, semejantes entre el cáncer experimental en roedores y el cáncer espontáneo del hombre y los animales domésticos ²¹. Estos cambios consisten en la forma-

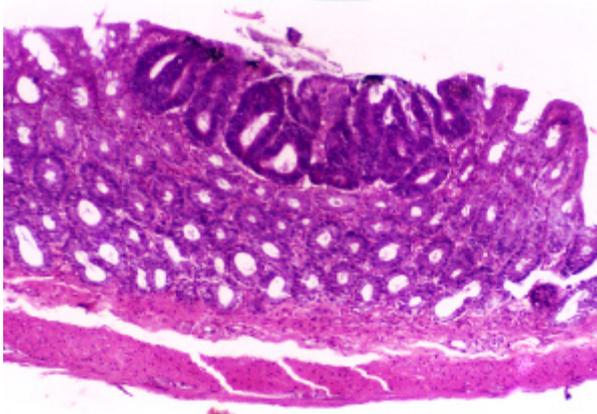


Figura 2: FCD que abarca numerosas criptas en la superficie de la mucosa (H y E, 40x).

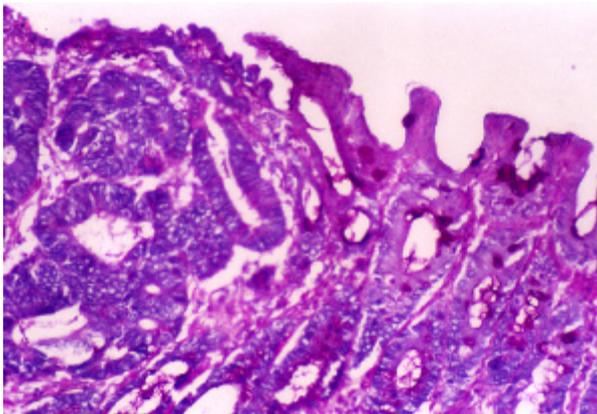


Figura 3: Margen de un FCD, a la derecha superficie epitelial débilmente coloreada con relación a la chapa estriada y criptas con células caliciformes escasamente positivas. A la izquierda el FCD es negativo al PAS (PAS-Hematoxilina, 200x).

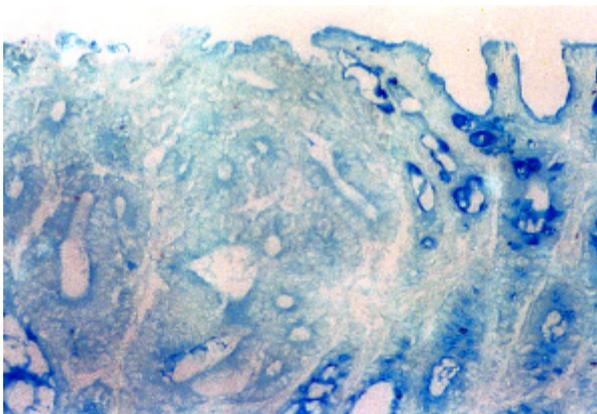


Figura 4: El mismo FCD de la figura 3. A la derecha se observa la mucosa débilmente coloreada con azul alcian (200x).

ción de focos de criptas hiperplásicas, con apariencia histológica normal, pero caracterizados por el aumento

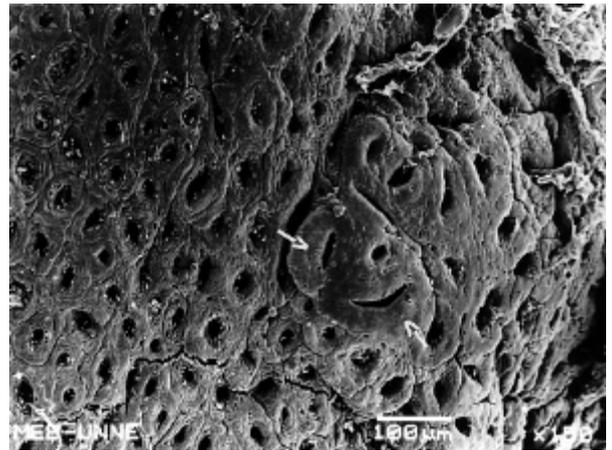


Figura 5: FCD. Las flechas indican distorsión de la luz y engrosamiento de la pared de las criptas (MEB, 100x).

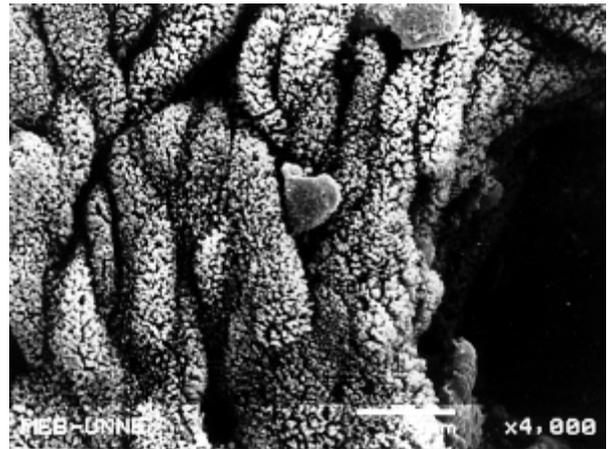


Figura 6: Superficie de células ubicadas alrededor de una boca de apertura de una cripta en el colon distal de una rata control, mostrando abundantes microvellosidades (MEB, 4.000x).

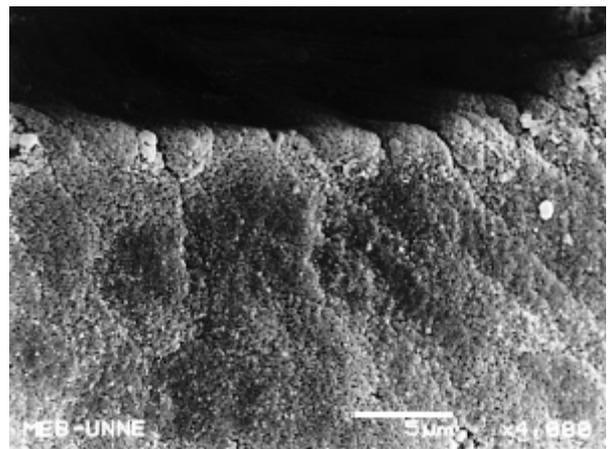


Figura 7: Células con la misma localización que las de Figura 6, en una cripta correspondiente a un FCD en el colon distal de una rata tratada con DMH, mostrando acortamiento y disminución de las microvellosidades (MEB, 4.000x).

del número de células y de las mitosis. Posteriormente, dentro de estos focos de criptas hiperplásicas aparecen atipias celulares que darían origen a focos de displasia. A menudo todos estos cambios ocurren luego de la exposición al carcinógeno DMH, causando modificaciones celulares irreversibles que permitirían el desarrollo secuencial de hiperplasia, displasia y neoplasia, citado recientemente por otros investigadores¹⁰. Los cambios hiperplásicos y displásicos del presente trabajo, así como la disminución de las mucosustancias, son semejantes a los anteriormente descritos.

Ultraestructuralmente los FCD fueron evidentes a pequeño aumento, manifestándose como grupos de criptas que sobresalen de la superficie mucosa. Se caracterizaron por cambios en la superficie, leve distorsión de las bocas de aberturas de las criptas (Figura 5), aumento del grosor de la pared, disminución de las microvellosidades (Figuras 6 y 7) y aumento del tamaño de las criptas (Figuras 8 y 9).

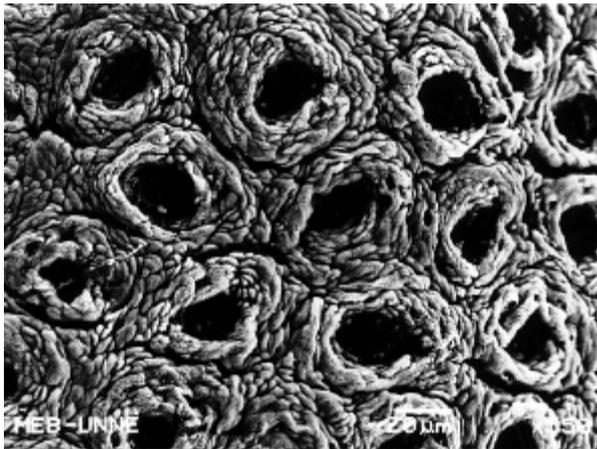


Figura 8: Superficie mucosa normal del colon distal en una rata control. Se pueden contar más de 12 criptas glandulares, cada una con un diámetro promedio de 45µm (MEB, 550x).

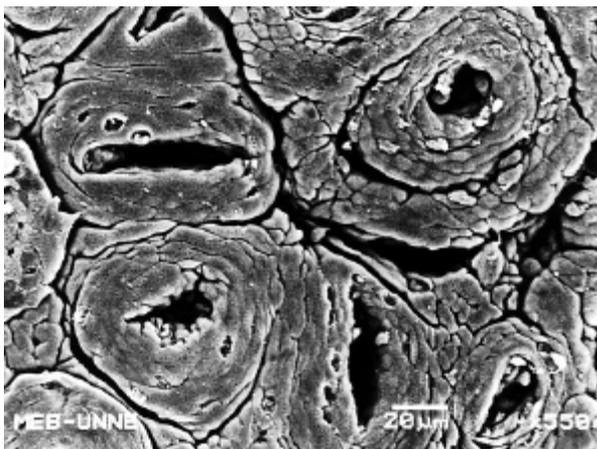


Figura 9: Superficie mucosa de un FCD localizado en el colon distal en una rata tratada con DMH. Se observan menos criptas por campo, aumento del grosor de la pared de las criptas y distorsión de la luz (MEB, 550x).

La mayoría de los hallazgos aquí efectuados coincide con los de otros trabajos experimentales en ratas¹⁶ y ratones^{3,6} tratados con DMH. No obstante, nuestras observaciones demuestran además un aumento significativo, más del doble, del tamaño de las criptas de los FCD, al compararlos con la superficie mucosa vecina al mismo y con la superficie mucosa normal del intestino de ratas controles. Este aumento probablemente pueda deberse a la hiperplasia y al crecimiento desorganizado de las células glandulares.

La disminución de microvellosidades constatada en las células de los FCD evidenciaría un menor grado de maduración. Estos hallazgos son similares a los observados en otras investigaciones sobre células neoplásicas de tumores, en los que la distribución, tamaño y número de las microvellosidades estaban disminuidas^{1,23,24}. No obstante, las lesiones descritas en el presente trabajo corresponden a una fase más temprana, antes de la transformación tumoral.

En conclusión, los hallazgos indican que durante el proceso de carcinogénesis por DMH, la superficie mucosa del intestino grueso de la rata desarrolla cambios histoquímicos y ultraestructurales, evidenciables antes de la aparición del tumor visible macroscópicamente.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por los aportes realizados para el presente trabajo.

Abstract

Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Lértora, W.J.; Borda, J.T.: Histochemical and ultrastructural study of large intestinal dysplastic crypt foci induced by 1,2-dimethylhydrazine, in rats. The main objective of this study was to determine the histochemical and ultrastructural changes of the large intestinal dysplastic crypt foci induced by 1,2-dimethylhydrazine, in rats. Wistar male rats, 3 months-old, were fed *ad-libitum* with a nutritionally adequate diet and demineralized drinking water. Large intestinal dysplastic crypt foci (DCF) were induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH), given subcutaneously as 16 weekly doses at 20 mg/kg body weight. After the last carcinogen injection, all animals were sacrificed and examined for intestinal DCF. Histological and histochemical changes of intestinal epithelium and mucins were observed at the end of the experience in specimens sectioned at 5 µm, stained with hematoxylin and eosin, PAS and alcian blue pH 2.5. Scanning electron microscopy of dysplastic crypt foci were examined. The findings indicate that the surface of the intestinal mucosa of DCF-treated rats develops abnormalities during carcinogenesis, before the appearance of a macroscopically visible tumour.

Key words: colonic dysplasia, dimethylhydrazine, histochemistry, ultrastructure, rat.

REFERENCIAS

1. **Barkla DH, Tutton PJ.** 1977. Surface changes in the descending colon of rats treated with dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 37: 262–271.
2. **Bedenne L, Faivre J, Boutron MC, Piard F, Cauvin JM, Hillon P.** 1992. Adenoma–carcinoma sequence or “de novo” carcinogenesis?. *Cancer* 69: 883–888.
3. **Bird RP.** 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37: 147–151.
4. **Boland CR.** 1993. The biology of colorectal cancer. *Cancer* 71: 4180–4186.
5. **Bralow SP, Weisburger JH.** 1976. Experimental carcinogenesis in the digestive organs. *Clin. Gastroenterol.* 5: 527–542.
6. **Carter JW, Lancaster HA, Harman WE, Cameron IL.** 1994. Distribution of intestine–associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1,2–dimethylhydrazine–treated mice. *Cancer Res.* 54: 4304–4307.
7. **Chang WWL.** 1984. Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 19: 28–43.
8. **Dahiya R, Itzkowitz SH, Byrd JC, Kim YS.** 1992. Mucin oligosaccharide biosynthesis in human colonic cancerous tissues and cell lines. *Cancer* 70: 1467–1476.
9. **Day DW.** 1984. The adenoma–carcinoma sequence. *Scand. J. Gastroenterology Suppl.* 19: 99–107.
10. **Fenoglio–Preiser CM, Noffsinger A.** 1999. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol.* 27: 632–642.
11. **Haase P, Corven DM, Knowles JC.** 1973. Evaluation of dimethylhydrazine induced tumors in mice as a model system for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 28: 530–543.
12. **Kuramoto S, Oohara T.** 1989. Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 64: 950–955.
13. **Kusunoki M, Sakanoue Y, Hatada T, Yanagi H, Yamamura T, Utsunomiya J.** 1992. Protein kinase C activity in human colonic adenoma and colorectal carcinoma. *Cancer* 69: 24–30.
14. **Madara JL, Harte P, Deasy J, Ross D, Lahey S, Steele G.** 1983. Evidence for an adenoma–carcinoma sequence in dimethylhydrazine–induced neoplasms of rat intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 110: 230–235.
15. **Maskens AP, Dujardin–Loits RM.** 1981. Experimental adenomas and carcinomas of the large intestine behave as distinct entities: most carcinomas arise *de novo* in flat mucosa. *Cancer* 47: 81–89.
16. **Paulsen JE, Steffensen IL, Namork E, Alexander J.** 1994. Scanning electron microscopy of aberrant crypt foci in rat colon. *Carcinogenesis* 10: 2371–2373.
17. **Rubio CA, Shetye J.** 1994. Flat adenoma–carcinoma sequence in the colon of rats. *Dis. Colon Rectum* 37: 1300–1306.
18. **Sánchez Negrette M, Borda JT, Montenegro MA, Lertora JW.** 1998. Estudio histológico e histoquímico de lesiones hiperplásicas y displásicas del intestino grueso en *Cebus apella* (Primate) tratado con 1,2–dimetilhidrazina. *Acta Physiol. Pharm.* 48: 211–223.
19. **Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E.** 1989. Early colorectal carcinoma with special reference to its development *de novo*. *Cancer* 64: 1138–1146.
20. **Sunter JP, Appleton DR, Wright NA, Watson AJ.** 1978. Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1,2–dimethylhydrazine. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 29: 211–223.
21. **Sunter JP.** 1984. Cell proliferation in gastrointestinal carcinogenesis. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 19: 45–55.
22. **Thurnherr N, Deschner EE, Stonelli EH, Lipkin M.** 1973. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injection of 1,2–dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 33: 940–945.
23. **Toth B, Malick L, Shimizu H.** 1976. Production of intestinal and other tumors by 1,2–dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. *Am. J. Pathol.* 84: 69–86.
24. **Traynor OJ, Costa NL, Wood CB.** 1983. A scanning electron microscopically study of changes in the colonic mucus layer during chemical carcinogenesis. *Cancer* 51: 1847–1853.
25. **Ward JM, Yamamoto RS, Benjamin T.** 1974. Experimentally induced cancer of the colon in rats and mice. *J. Am. Med. Assoc.* 164: 729–732.
26. **Williamson RCN, Rainey JB.** 1984. The relationship between intestinal hyperplasia and carcinogenesis. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 19: 55–75.
27. **Zusman I, Zimmer A, Nyska A.** 1991. Role of morphological methods in the analysis of chemically induced colon cancer in rats. *Acta Anat.* 142: 351–356.
28. **Zusman I, Zimmer A, Madar Z, Nyska A.** 1992. Morphological, histochemical and immunohistochemical differences between tumorous and adjacent tissues in chemically induced colon cancer in rats. *Acta Anat.* 145: 29–34.
29. **Zusman I, Madar Z, Nyska A.** 1992. Individual variability of pathological parameters in chemically induced rat colon tumors. *Acta Anat.* 145: 106–111.