

Tesis de Posgrado

Cancerogénesis química experimental en anfibios

Matos, Elena L.

1974

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Matos, Elena L.. (1974). Cancerogénesis química experimental en anfibios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1447_Matos.pdf

Cita tipo Chicago:

Matos, Elena L.. "Cancerogénesis química experimental en anfibios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1974.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1447_Matos.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

CANCEROGENESIS QUIMICA EXPERIMENTAL
EN ANFIBIOS

Elena E. Matos

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas.

1974

9

Director de Tesis:

Dra. Eugenia S. de Lusti,

Consejero de Estudios:

Dr. J.M. De Carlo

A Leandro, María Luisa y Julián

Agradezco especialmente la paciencia, el afecto y el apoyo de mi tutora, Dra. Eugenia S. de Lustig.

También mi sincero agradecimiento a la colaboración técnica de la Sra. Consuelo de Martinez, la Srta. Lidia Castelluccio y el Sr. Isidoro Tolcachir.

INDICE

INTRODUCCION.	6
MECANISMOS DE ACCION DE LOS HIDROCARBUROS	
POLICICLICOS AROMATICOS CANCERIGENOS. . . .	13
Moléculas reactivas.	14
Zonas mesofenántrénica y mesoantracénica.	15
Intermediarios metabólicos.	17
Sistema enzimático hidroxilasa de los arilhidrocarburos.	20
Blancos moleculares nucleofílicos. . . .	21
Localización intracelular.	22
Teoría actual para la cancerogénesis química.	25
CANCEROGENESIS EXPERIMENTAL EN ANFIBIOS. .	28
INTRODUCCION.	29
I. Acción del 20-Metilcolantreno, 3,4-Ben- zopireno y 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno. sobre renacuajos de Bufo arenarum.	35
II. Influencia de un campo regenerativo sobre la cancerogenesis química en rena- cuajos de Bufo arenarum.	44
III. Efectos teratogénicos del implanto de hidrocarburos cancerígenos en renacuajos de Bufo arenarum.	52
ANENDICE. Lista de abreviaturas.	62

BIBLIOGRAFIA. Parte 1. 63

BIBLIOGRAFIA. Parte 2. 69

INTRODUCCION

Entre los agentes etiológicos químicos, físicos y biológicos del cáncer humano, los primeros fueron detectados muy tempranamente en base a las observaciones clínicas de Sir Percival Pott, quien describió el cáncer de escroto de los deshoilladores como enfermedad profesional industrial.

Pasados 120 años (1895), Rhen atribuyó la mayor incidencia del cáncer de vejiga entre los obreros de la industria textil a la presencia de aminas aromáticas en las tinturas utilizadas.

Pero las bases de la cancerogénesis química experimental recién se establecieron en 1915, cuando Yamagiwa e Ichikawa anunciaron la inducción experimental de tumores en orejas de conejo mediante la aplicación de alquitrán de hulla. La siguiente etapa en la investigación se debe a Cook, Kennaway, Hieger y colab. quienes identificaron las sustancias cancerígenas presentes en el alquitrán, fraccionando y ensayando los distintos extractos experimentalmente, (citado por Badger 1954, 1962).

Estos trabajos permitieron que, en 1935, se aislara uno de los cancerígenos químicos más potentes, el 3,4-Benzopireno. En el mismo año Barry y colab. sintetizaron 20-Metilcolantreno mediante una serie de degradaciones del ácido deoxicólico, un constituyente normal de la bilis humana.

En 1944 Berenblum y colab. sugirieron la posible existencia de agentes químicos cocancerígenos, como

por ejemplo el aceite de crotón, que no serían cancerígenos por sí mismos, sino que aumentarían la incidencia de tumores por agentes cancerígenos, estableciendo 2 fases independientes para la cancerogénesis, una de iniciación y otra de promoción (Greenstein 1959) (Tabla I).

Este concepto de cocancerogenesis adquirió un significado especialmente importante en estos últimos años, debido a la creciente industrialización que llevó a la incorporación indiscriminada al medio ambiente de materiales sintéticos y sustancias químicas, así como deshechos de fabricación, en los que se identificaron una variedad de compuestos cancerígenos que pueden actuar solos, como cancerígenos, o como cocancerígenos en conjunto con agentes físicos o biológicos como los virus u hormonas.

Entre estos compuestos que contaminan la atmósfera de grandes ciudades, los alimentos y las aguas se pueden citar: hollín, negro de carbón, aceites minerales, caucho procesado, productos de combustión de la gasolina, gas de carbón, etc. (Weisburger y Weisburger 1967).

En la tabla II se enumeran una serie de sustancias de origen sintético así como elementos inorgánicos o productos naturales, que se conocen en la actualidad, todos ellos de probada acción cancerígena en animales y de posible riesgo para el hombre (IARC Monografías N° 1 y 3, 1972-1973).

Para el estudio de la carcinogenesis química experimental se ha recurrido a diversos sistemas biológicos ya sea "in vivo" como "in vitro". Los animales de

laboratorio más frecuentemente utilizados para estudios "in vivo" han sido ratas, ratones, conejos y cobayos. Las cepas puras de ratones han permitido homologar resultados evitando variables individuales. In vitro, el agregado al medio de cultivo celular de drogas cancerígenas ha producido la transformación maligna de líneas celulares, comprobado con el posterior injerto a animales de laboratorio.

En la primera parte de esta tesis nos proponemos hacer una puesta al día sobre los mecanismos de acción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en sistemas biológicos, por ser estos los utilizados en nuestro trabajo.

La segunda parte se refiere al trabajo experimental realizado sobre renacuajos de *Bufo arenarum* para probar la acción de tres cancerígenos: 3,4 Benzopireno, 20-Metilcolantreno y 7,12-Dimetilbenzantraceno.

TABLA I

PRIMERAS ETAPAS EN LA CANCEROGENESIS QUIMICA
EXPERIMENTAL MEDIANTE HIDROCARBUROS AROMATICOS
POLICICLICOS (x).

- 1915.- Inducción de cáncer de piel Yamagiwa e
en conejos mediante alquitrán. Ichikawa.
- 1930.- Inducción de tumores mediante Kennaway e
el primer cancerígeno puro: Hieger.
1,2,5,6-Dibenzantraceno.
- 1935.- Aislamiento del 3,4 Benzopireno Cook e
del alquitrán. Hieger.
- 1935.- Aislamiento del 20-Metilco- Barry y colab.
lantreno.
- 1944.- Estudios de iniciación y pro- Berenblum.
moción de la cancerogénesis de
piel con alquitrán y 3,4 Benzo-
pireno.

(x)(Modificado de Miller 1970).

PRINCIPALES SUSTANCIAS DE PROBADO PODER CANCERIGENO

<u>Sustancia</u>	<u>Contaminación ambiental</u>
<u>Hidrocarburos aromáticos policíclicos.</u>	
Benzopireno	Alquitrán, humo de cigarri
Dimetilbenzantraceno	llo, contaminación del aire
Metilcolantreno	Humo de cigarrillo, aire contaminado.
<u>Hidrocarburos aromáticos heterocíclicos.</u>	
Benzacridinas	Humo de cigarrillo,
7-H-dibenzocarbazoles	contaminación del aire.
<u>Hidrocarburos clorinados</u>	
Tetracloruro de carbono	Fumigación, antihelmintico, extinguidor de incendios.
Cloroformo	Refrigerante, propelente de aerosoles, industria farmacéutica.
<u>Aminas aromáticas</u>	
Auramina	Colorante, antiséptico en cirugía de nariz y oídos, colorante para alimentos, droga para tratamiento gonorrrea.
Benzidina	Utilizados en la manufactura de colorantes (250 derivan de la benzidina).
Naftilamina	
<u>Compuestos Azo</u>	
4-Dimetilaminoazobencenos: (Rojo escarlata, azul trypan, Sudan I,II,III)	Colorantes en la industria alimenticia:(amarillo de mantequilla) y otros usos.

TABLA II

<u>Sustancia</u>	<u>Contaminación ambiental</u>
<u>Compuestos N-nitroso</u>	
Dietilnitrosamina	Solventes en la industria plástica, aditivos para lubricantes, trazas en alimentos conservados con nitritos, en quesos, trigo, en humo de cigarrillo. Se forma en el estómago por ingestión de nitritos y aminas. Se encuentra en el fruto de <u>Solanun incanum</u> .
Dimetilnitrosamina	
<u>Agentes alquilantes</u>	
Mostazas nitrogenadas y sulfuradas.	Gases de guerra vesicantes.
<u>Elementos inorgánicos</u>	
Asbestos	Industria de la construcción para reforzar cemento y plástico.
Arsénico y compuestos derivados.	Distribuido en el suelo; aguas (especialmente en Córdoba y Formosa-ARGENTINA)
Berilio	Aleaciones con cobre, aluminio y níquel, cerámicas, esmaltes.
Cadmio, cromo, níquel, hierro.	En la naturaleza (suelo, agua, aire).
Plomo y sales de plomo.	En la naturaleza, aditivo para gasolina, aceite de motores, etc.
<u>Productos naturales</u>	
Aflatoxinas	Micotoxinas, que en condiciones favorables de humedad y temperatura, contaminan alimentos, especialmente cereales y legumbres.

TABLA II

<u>Sustancia</u>	<u>Contaminación ambiental</u>
<u>Productos naturales</u>	
Cycasina	Presente en semillas, raíces y hojas de las plantas de la familia de la Cycadaceae, muy común en las regiones tropicales y subtropicales del mundo.
Safrole	Presente en aceites esenciales, uso en perfumería y droguería.
Helecho Pteridium aquilinum (Evans y colab. 1971)	Alimento humano en Japón, alimento de bovinos, exposición mediada también por leche y productos de granja.

ALCA. ISLOS ACTION LOS ALCA. ISLOS
POLICIALES A. ALCA. ISLOS. SANO ALCA. ISLOS.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS
CANCERÍGENOS.

Desde el descubrimiento de los hidrocarburos cancerígenos se han hecho continuos esfuerzos, tanto teórica como experimentalmente, para entender las propiedades moleculares que distinguen a los sistemas de anillos condensados cancerígenos de aquellos que no lo son. Estos estudios determinaron el reconocimiento de varios puntos reactivos en los hidrocarburos cancerígenos y se han hecho intentos de relacionar estos puntos reactivos o regiones con sus propiedades cancerígenas.

Moléculas reactivas: Desde un principio se pensó que la actividad cancerígena estaba intimamente conjugada con la configuración electrónica y la densidad de electrones del hidrocarburo.

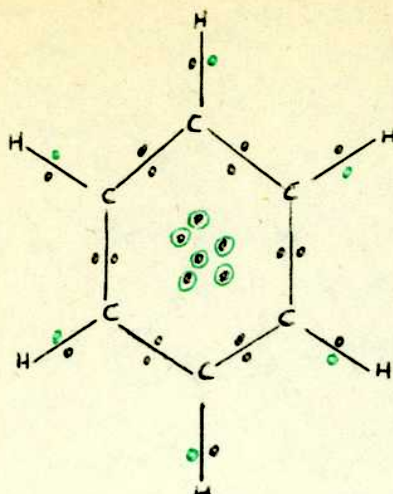
Las moléculas de hidrocarburos policíclicos no son simétricas como el benceno y por consecuencia los átomos de carbono no tienen todos el mismo orden del enlace.

Si se analiza el valor electrónico de la molécula de benceno (fig. 1) se observa que hay un total de 30 electrones de valencia (24 de los carbonos y 6 de los hidrógenos).

12 electrones intervienen en las uniones C-C y otros 12 en las uniones C-H, quedando 6 electrones libres o electrones π que se disponen formando una nube de electrones. (Fig. 1).

En estructuras de anillos condensados hay posiciones favorables que tienen un mayor orden de enlace debido a la distribución de los electrones π , siendo estas posiciones las que se atacan con mayor facilidad en las reacciones de sustitución.

Fig.1: Estructura electrónica de la molécula de benceno



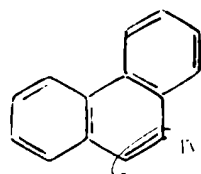
•: Electrones de valencia de los átomos de C_o electro
nes de valencia de los pátomos de H.(•):electrones π

Zona K o zona mesofenantrénica: En 1946 los esposos Pullman sugirieron que la actividad cancerígena estaba asociada con una carga óptima de electrones π (mayor que el valor crítico que es de 1.290) en un enlace de tipo fenantreno al que denominaron zona K (Krebs= cáncer) (Fig. II).

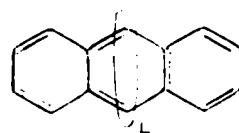
El aumento de electrones en dicha zona hasta un valor crítico, aumenta la actividad cancerígena. Esto se consigue, por ejemplo, con la introducción de grupos metilo que inducen cargas negativas por variación del momento dipolar de la molécula.

En moléculas que contienen 4 a 5 anillos bencénicos fusionados puede existir una zona mesoantracénica, o zona L, que debe ser de baja actividad para el poder cancerígeno sea alto. (Fig. II).

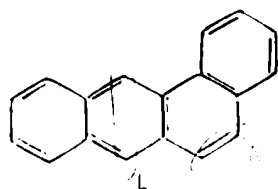
Fig. II: Zonas reactivas en hidrocarburos aromáticos policíclicos.



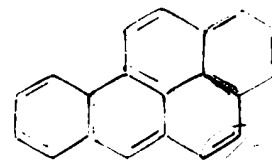
fenantreno



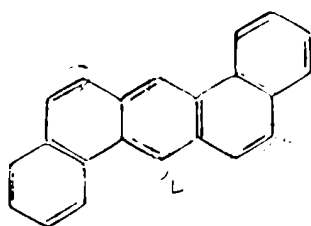
antraceno



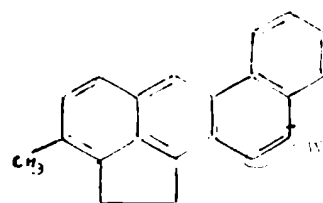
1,2-benzantraceno



3,4-benzopireno



1,2,5,6-dibenzantraceno



20-metilcolantreno

Intermediarios metabólicos de los hidrocarburos cancerígenos.

Muchos cancerígenos, a pesar de sus diferencias químicas, no actúan como cancerígenos sino como precancerígenos, siendo convertidos metabólicamente a moléculas altamente electrofílicas reactivas o cancerígenos finales (Miller, 1970, 1971), que atacan nucleófilos celulares blanco (Fig. III-IV).

El carácter electrofílico no surge de una disociación iónica sino que es el resultado del desplazamiento de un grupo nucleofílico por otro en un proceso bimolecular S_N2 (Alexander, 1954).

Figura III: Conversión metabólica de las moléculas de
cancerígenos.

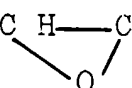
FIG. IV. NUCLEÓFILOS CELULARES QUE SON ATACADOS POR DERIVADOS
ALCARBOFILICOS DE LOS CANCERIGENOS (x).

Nucleófilo celular (a+ . . . : b-)		+ Reactivo electrofílico (X+ : Y-) → b:X	
Electrófilo desplazado:	Nucleófilo celular	Electrófilo	Nucleófilo desplazado
Ninguno C H+	S: Met	C	R-SO ₃ ⁻ , SO ₄ ⁼
	S:- Cys		
	His (N-1)		
	His (N-3)	N	PO ₄ ⁼ , CI ⁻
	G (N-7)		
	N: A (N-1)		
	A (N-3)	N +	N ⁻ , O ⁻
	G (N-2)		
	S:- Tyn(G-3)		RCOC [•] , SO ₄ ⁼
	G (C-8)		
	C-O ⁻ : G (C 6)		

(x) Extraído de Miller y Miller 1971.

Han sido propuestos básicamente 2 intermediarios metabólicos activados para los hidrocarburos policíclicos.

- a) en 1950 Boyland postuló una forma epóxido del hidrocarburo ($R-C H-C H_2$).



Esta teoría es defendida actualmente por Huberman, Selkick y Heidelberger (1971); trabajos del mismo grupo sostienen que el epóxido se formaría en la zona K (Marquandt, Kuroki y colab. 1972 - Kinoshita y colab. 1973).

- b) El intermediario sería un ion carbonium según Dipple y colab. (1968) y Cavalieri y Calvin (1971).

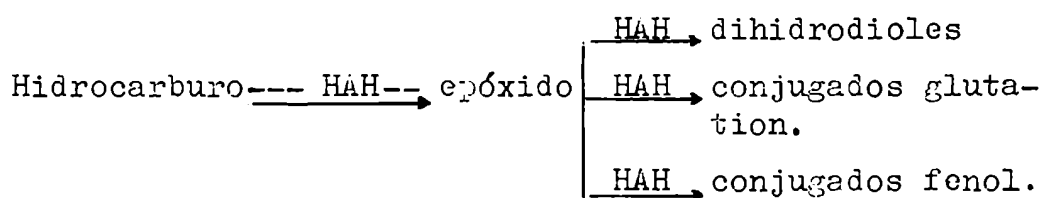
Se sabe que una vez administrado el compuesto primitivo gran cantidad del mismo puede ser disipada en reacciones de desactivación en cada nivel. Pero una vez que el cancerígeno final ha reaccionado con los nucleófilos celulares críticos por un tiempo suficientemente largo el agente no es más necesario para que el proceso cancerogenético continúe hacia la formación de tumores.

Se encontró también que cuando se aislan o sintetizan estos cancerígenos finales y se administran exógenamente, no muestran la actividad cancerígena esperada. Lo mismo se observa para cancerígenos alquilantes directamente electrofílicos como la β propiolactona.

Parece ser que la alta actividad de estas sustancias y también su naturaleza iónica impiden la entrada de cantidades suficientes del compuesto dentro de la célula antes que reaccione con componentes extracelulares o de membrana celular.

Sistema enzimático hidroxilasa de los arilhidrocarburos
(HAH)

Actualmente se piensa que el efecto cancerígeno de los hidrocarburos policíclicos estaría dado por el ba lance entre las concentraciones y actividades de las enzimas del sistema HAH que los activan a epóxidos y aquellas que convierten al epóxido en metabolitos menos cancerígenos tales como dihidrodioles, fenoles, conjugados glutatión y otros compuestos solubles en agua (Huberman y colab. 1971, Grover y colab. 1971).



Dichas enzimas (HAH) formarían parte del sistema "oxidasa de función mixta" que está íntimamente asociado con membranas microsomales derivadas del retículo endoplásmico de la célula intacta (Williams y Rabin 1971). Se sabe hoy que la HAH forma parte del citocromo P450 (Kinoshita y Gelboin, 1972).

Se ha podido estimular la formación de HAH en distintos sistemas celulares "in vitro" con hidrocarburos cancerígenos y otras drogas (tabla III).

Otros trabajos demuestran que el sistema HAH es el responsable de la susceptibilidad celular al efecto citotóxico del BP producido por la conversión del mismo a un metabolito citotóxico (Gelboin y Sachs 1969; Benedict y colab. 1972).

El rol del sistema HAH parece ser altamente específico para cada hidrocarburo policíclico con respecto

a la activación o de toxificación del mismo hacia una forma carcinogénica (Kinoshita y Gelboin 1972b). Estos mecanismos enzimo dependientes son procesos finamente balanceados muy peligrosos de manipular ya que el que un hidrocarburo transforme o no células dependería del balance entre la actividad de las enzimas formadoras de epóxidos y las destructoras de las mismas (Marquandt y Heidelberger, 1972).

Blancos moleculares nucleofílicos

Una vez formados, los reactivos cancerígenos electrófilos se combinan con sitios nucleofílicos celulares predominantes que incluyen una variedad de residuos aminoácídicos en proteínas y ácidos nucleicos (fig. IV). La formación de complejos de moléculas electrófilas con DNA, RNA y/o proteínas estaría catalizada por la HAH (Kinoshita y Gelboin, 1972 a,b).

Los primeros que demostraron la unión del BP a proteínas fueron los esposos Miller (1947), siendo este hecho posteriormente confirmado por otros (Anghileri 1967, Kuroki y Heidelberger, 1971- revisión bibliográfica de Heidelberger 1967, 1970).

En 1969 Brookes y Heidelberger establecieron, en células de roedores en cultivo, que el DMBA se une al DNA. Lo mismo fue demostrado en 1972 por Kinoshita y Gelboin en piel de ratón y por Marquandt, Philips y Bendich (1972) en hígado del mismo animal.

También se sabe que la Actinomicina D impide que en células de roedores en cultivo, el DMBA sea transformado hacia metabolitos solubles en agua, (Diamond, 1968). Se confirmó por otra parte su acción sobre el DNA

por su actividad mutagénica en *Drosophila*.

Tanto el DIBA como el 3-MC son sumamente activos en los locus heterocromáticos de DNA involucrados en la transcripción de RNA, o sea los genes r-RNA y t-RNA, (Fahmy y Fahmy, 1972).

También otros cancerígenos, como el acetil amino fluoreno (AAF), tienen acción sobre ácidos nucleicos. Weinstein y colab. (1971) sugirieron que un residuo del 2-AAF se uniría al t-RNA distorsionando su conformación y alterando las sintetasas aminoacil t-RNA, en codones y/o ribosomas.

Localización intracelular

Las investigaciones sobre la localización intracelular de los cancerígenos químicos han sido encaradas con el estudio de la localización de la fluorescencia en los tejidos tratados y por otra parte, analizando los componentes celulares aislados.

En 1964, Allison y Mallucci observaron, utilizando las propiedades fluorescentes de ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos, que la distribución de los gránulos fluorescentes correspondía a la de los lisosomas. Según estos autores, los cancerígenos podrían concentrarse en los lisosomas, disminuyendo la estabilidad de las membranas de los mismos, como se evidencia con la coloración de fosfatasa ácida en macrófagos no fijados. Una concentración alta de cancerígenos produciría una liberación considerable de enzimas lisosomales al citoplasma y a ello se debería la toxicidad de los hidrocarburos cancerígenos.

Con concentraciones menores se liberarían gradualmente al citoplasma enzimas como la DNasa, RNasa y

proteasas, que dañarían los mecanismos de control de la división celular, sin impedir su capacidad de reproducción.

Diamond (1965) postuló que la localización intracitoplasmática de los gránulos fluorescentes del BP podría deberse a la solubilidad de los hidrocarburos en los componentes celulares lipídicos.

Por otra parte según Arcos y colab. (1968), algunos cancerígenos hepáticos distorsionarían el metabolismo celular normal desnaturalizando los sitios control de las membranas mitocondriales y del retículo endoplásmico.

TABLA III

INDUCCION DEL SISTEMA HYDROXILASA DE LOS ARIL-HIDROCARBUROS (HAH) MEDIANTE
HIDROCARBUROS CANCERIGENOS Y OTRAS DROGAS

Investigador	año	inductor	sistema biológico utilizado
Nebert and Gelboin	1968	B (a) A	-Cels fetales Hamster.
Watanabe, Potter and Morris.	1970	MC	Hepatoma 9633 hígado fetal rata hígado adulto rata
Whitlock, Cooper and Gelboin	1972	B(a)A fito hemaglutinina	linfocitos perifé- ricos humanos.
Kinoshita and Gelboin	1972a,b	B(a)A 7,12 DMB(a)A (x) 7,8Benzoflavone	piel de ratón
Bast, Shears, Rapp y Gelboin.	1973	B(a)A	macrófagos de cobayo.

(x) Inhibidor de la HAH.-

TEORIA ACTUAL PARA LA CANCEROGENESIS QUIMICA

La cancerogénesis consistiría en una pérdida de control de la multiplicación celular heredable y casi permanente.

Los cambios en el comportamiento celular podrían atribuirse en primer lugar a la interacción cancerígeno-genoma o mecanismos genéticos que involucrarían cambios hereditarios en el DNA (mutación somática) ya sea por:

- a) modificaciones directas en el DNA.
- b) transcripción al DNA de alteraciones producidas en el RNA (se explicaría por el nuevo fenómeno de transcripción reversa).
- c) alteraciones que disminuyen, por lo menos temporalmente, la fidelidad de la copia del DNA, como por ejemplo alteraciones en la DNA polimerasa.

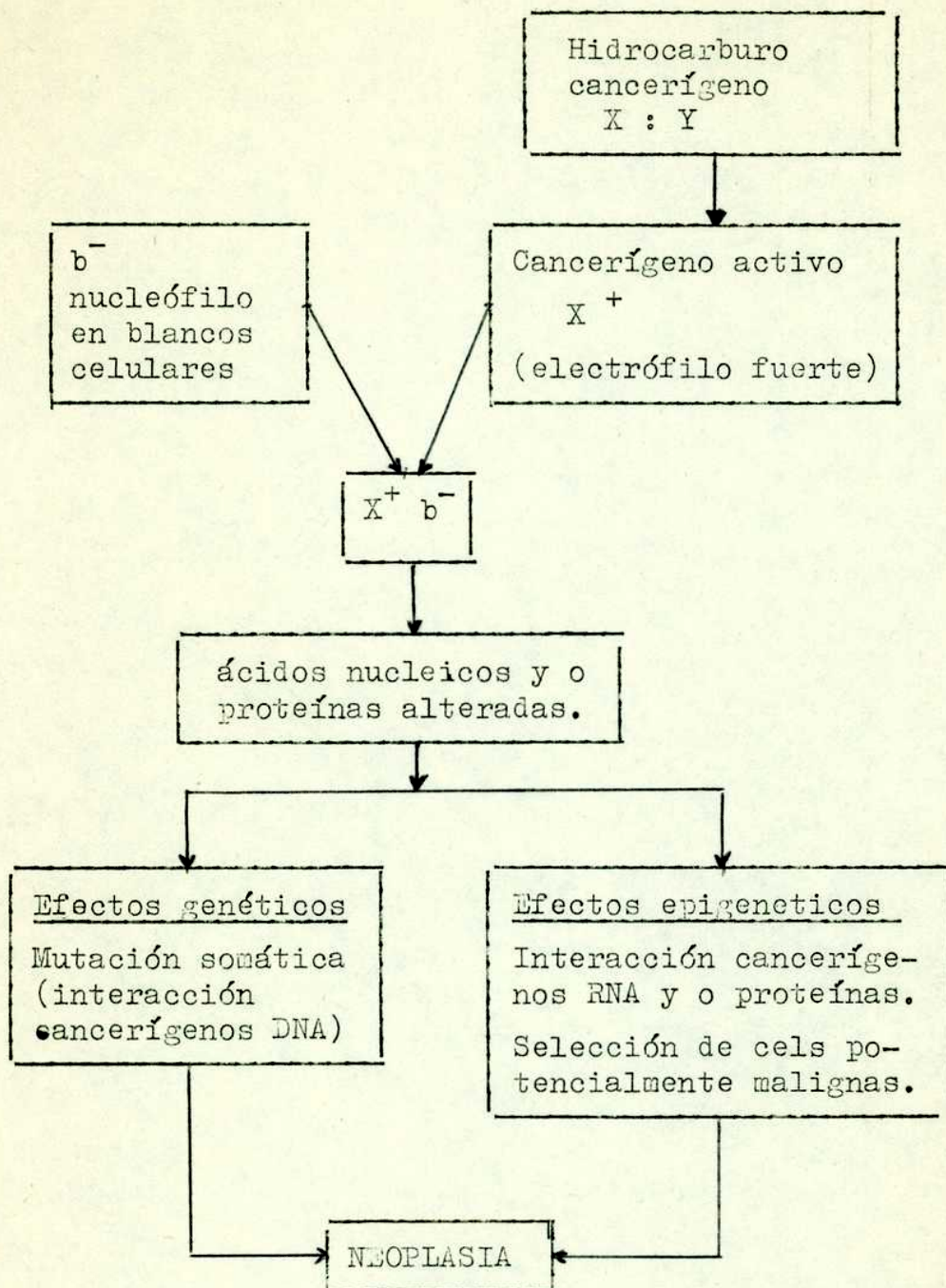
En segundo lugar cabe consignar los mecanismos epigenéticos que comprenden:

- a) interacción de cancerígenos con distintos tipos de RNA y proteínas. Algunas de estas proteínas alteradas formarían parte de sistemas enzimáticos esenciales en el control de la diferenciación y crecimiento celular, lo que llevaría a la alteración en la lectura del código genético por represión o derepresión genética efectuada por estas enzimas modificadas (Heidelberger 1967-1970). Así sería posible la expresión de antígenos embrionarios y variaciones enzimáticas en tumores inducidos químicamente e incluso la derepresión de los oncógenos o genomas virales integrados de Huebner y Todaro (Miller y Miller 1971).
- b) selección clonal de células potencialmente malignas

que tendrían una capacidad proliferativa preferencial ante la toxicidad diferencial del cancerígeno para las células normales (Frehn, 1964).

TEORIA ACTUAL PARA LA CANCEROGENESIS
POR HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS.

(Miller y Miller, 1970)



02113 210422

CANCEROGENESIS EXPERIMENTAL EN ANFIBIOS

La cancerogénesis química experimental ha sido objeto de numerosas investigaciones en mamíferos, no así en anfibios.

En diversas especies se han descrito una serie de tumores espontáneos (Balls, 1962) lo que da la pauta que estos poiquilotermos son tan susceptibles al crecimiento neoplásico como otros vertebrados.

Una cantidad de trabajos exitosos describen la inducción de alteraciones precancerosas o la formación de verdaderos tumores en anfibios como consecuencia de la aplicación de diversos hidrocarburos policíclicos (tabla IV).

Sin embargo, los intentos de utilizar sustancias cancerígenas para interferir en los procesos de diferenciación embrionaria y de regeneración, han sido escasos.

Específicamente conocemos sólo 3 trabajos en los que se utilizan estadios embrionarios de anfibios.

En 1940 Briggs inyectó 154 renacuajos de Rana pipiens con Metilcolantreno y obtuvo 3 tumores, uno de los cuales dió metástasis en músculo y pulmón.

También en renacuajos de ranas, Neukom (1944) menciona la obtención de 1 tumor sobre 16 animales inyectados con hidrocarburos policíclicos.

Se comprobó por otra parte, que el uretano, otro agente cancerígeno, es capaz de producir hiperplasia de epitelio en estadios tempranos de desarrollo de Rana pipiens (blástulas, gástrulas y embriones recién eclosionados) Mc Millan y colab. (1954).

Nosotros elegimos trabajar con renacuajos de Bufo arenarum. Específicamente nos interesaba observar, en primer término si era posible obtener respuesta a la acción de hidrocarburos policíclicos cancerígenos (se trabajó con 3,4 Benzopireno, 20-Metilcolantreno y 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno.

En segundo lugar si un campo en regeneración activa, tal como la cola de los renacuajos, era capaz de interferir de alguna manera en dicha respuesta.

Se describen a continuación los resultados obtenidos en nuestras investigaciones.

TABLA IV: SUMARIO DE NEOPLASIAS MALIGNAS Y ALTERACIONES QUIMICAMENTE INDUCIDAS EN ANFIBIOS. (x)

Autor	Especie usada	Cancerígeno o agente químico	Diagnosís
Stekfo 1924	Rana temporaria. Bufo viridis.	Alquitrán	Proliferación epidérmica.
Hellmich 1928	Triturus cristatus	Sudan III	Proceso preblastomatoso.
Koch, Schreiber y Schreiber 1939	Triturus cristatus. Triturus taeniatus.	Alquitrán BP ¹	Neoplasia epitelial
Briggs 1940	Rana pipiens (renacuajos)	MC ¹ en ácido coléico	Sarcoma.
Schevchenko 1941	Siredon mexicanum	Cristales MC	Sarcoma
Fedotov 1941	Siredon mexicanum	DBA ¹	Proliferación.
Neukom 1944	Triturus cristatus. Triturus alpestris. (adultos y renacuajos)	Alquitrán BP., MC.	Neoplasia epitelial con células típicas y atípicas.
Finkelstein 1944	Siredon mexicanum	MC	Hiperplasia no maligna

(x) Modificada de Balls (1964).

TABLA IV

Autor	Especie usada	Cáncerígeno o agente químico	Diagnosís
Lugfelder 1949	Triturus cristatus <i>Rana ridi- bunda.</i>	Hidrato de cloral.	Adenoma pa- pilomatoso.
Raunich 1949	Triturus Cristatus	BP.	Prolifera- ción epite- lial.
Overton 1950.	Amblystoma opaca. Amblystoma punctatum.	MC.	Prolifera- ción epi- telial.
Moretti y Bellini 1951.	Triturus cristatus.	BP.	Hiperplasia epidérmica.
Strigazzi 1952	Triturus cristatus.	BP.	Núcleos de epitelio neoplásico.
Breedis 1951.	Triturus vi- ridiscens.	MC en acei- te oliva.	Sarcoma.
Breedis 1952.	Triturus vi- ridiscens.	Alquitrán MC, BP, AAF.	Sarcoma.
Leone 1953.	Triturus cristatus.	BP.	Epitelioma.
Schreiber y Franceschi 1954.	Triturus cristatus.	Celofán	Reacción epitelial.

TABLA IV

Autor	Especie usada	Cancerígeno o agente químico	Diagnosis
Mc Millan, Donald y Battle.1954.	Rana pipiens (estadio em- bionarios tem- pranos.	Uretano	Hiperplasia de epitelio
Leone 1957.	Triturus cristatus.	Cristales de MC.	Linfosar- coma.
Capuani 1957.	Triturus cristatus.	BP.	Reacción epitelial.
Stolk 1961.	Triturus alpestris.	Solución de DNA de esperma de arenque.	Carcinoma.
Arffman y Christensen 1961.	Triturus cristatus.	MC,BP,DBA.	Prolife- ración epitelial.
Seilern-As- pang y Kra- tochwill 1962.	Triturus cristatus.	DBA,BP, MC.	Tumores epitelia- les.
Balls 1962-1963.	Xenopus laevis.	Cristales MC en aceite.	Linfosar- coma.
Strauss y Mateyko 1963-1964.	Rana pipiens.	BP,MC,DBA en aceite oliva.	Adeno- carcinoma.
Ruben y Balls 1963.	Xenopus laevis.	Cristales MC.	Linfo- sarcoma.

TABLA IV

Autor	Especie usada	Cancerígeno o agente químico.	Diagnosis
Balls 1964.	Xenopus laevis.	Cristales BP.	Linfosar- coma.
Ingram 1971.	Ambystoma mexicanum.	DBA en acei- te de oliva.	Sarcoma hepatoma.
Ingram 1972.	Ambystoma mexicanum.	DMNA	Tumores hepáticos.

- - - - -

I. ACCION DEL MC, BP, y DIBBA SOBRE RENACUAJOS DE BUFO ARENARUM.

Se describirán a continuación los efectos obtenidos por la introducción de hidrocarburos policíclicos aromáticos en renacuajos de anuros.

Material y Método

Los renacuajos de Bufo arenarum fueron recolectados durante la primavera en los alrededores de Buenos Aires. En el invierno se obtuvieron por fecundación artificial. En la época del tratamiento las larvas tenían una longitud de 20-30 mm. y recién habían iniciado la metamorfosis.

Cancerígenos utilizados: 20-Metilcolantreno (MC), 3,4-Benzopireno (BP) y 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DIBBA).

El MC se usó en solución de aceite de oliva (0.25g/ml) para el lote A. El lote B recibió implantos de cristales puros.

Como controles se utilizaron aceite de oliva, fluoreno y parafina.

Lote A: Se inyectaron 214 renacuajos con 0.02 ml. de solución de MC en la base del tronco cerca de la cola. Otros 163 recibieron aceite solo y se usaron como control.

Lote B. De 194 renacuajos, 150 se implantaron subcutáneamente en el medio de la cola con cristales de cancerígenos mediante agujas de vidrio.

A los 44 restantes se les introdujo fluoreno o parafina.

No se utilizó anestesia. Los cristales, retenidos en el sitio de introducción, producían la depigmentación de la piel.

Entre los 3 y 30 días posteriores al implanto se fijó el material "in toto" en solución de Bouin, se incluyó en parafina y se cortó. Los cortes (7 μ) se tiñeron con Hematoxilina-Eosina.

RESULTADOS

Descripción histológica de un corte transversal de un renacuajo no tratado.

El tegumento de un renacuajo de Bufo arenarum en el estadio utilizado está formado por 2 capas de células epiteliales grandes, cúbicas, con núcleo basófilo, que yacen sobre una membrana basal. No se observan divisiones mitóticas. No hay tejido conectivo organizado presente, salvo unas escasas células mesenquimáticas.

En la cola este tegumento rodea a 4 haces de músculo estriado, de los cuales solamente lo separa una capa continua de cromatóforos. Centralmente se distingue la notocorda, formada por grandes células vesiculosas envueltas por la vaina notocordal.

Dorsalmente, el tubo neural, destacándose a ambos lados del mismo dos ganglios nerviosos. Ventralmente se observa un vaso sanguíneo. (Fig.1).

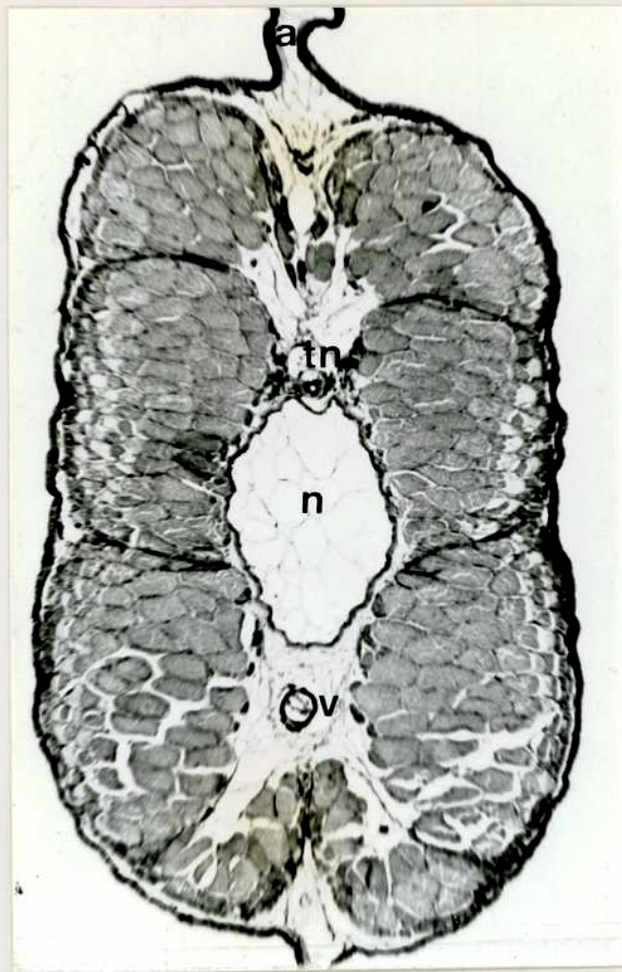


Fig. 1: Sección transversal de la cola de un renacuajo no tratado. Aletas (a) notocorda (n) tubo neural (tn) vaso (v).

LOTE A: Renacuajos inyectados con MC en solución de aceite de oliva.

Durante los primeros 9 días el área de tegumento en contacto con el cancerígeno presenta una gran hiperplasia de epitelio, que puede llegar a 8-9 capas. Esta se acompaña de desorientación celular, anisocitosis e incremento de la actividad mitótica. La

membrana basal aparece engrosada (Fig.2).

Al mismo tiempo se produce un intenso proceso inflamatorio caracterizado por aumento y migración de los cromatóforos, proliferación de fibroblastos y neoformaciones vasculares.

Entre los 10 y 20 días decrece la inflamación pero suele ocurrir que el epitelio hiperplasiado rompa la membrana basal e invada la cavidad del cuerpo. También se observan nódulos linfomatosos y protensiones papilomatosas epiteliales. (Fig. 3).

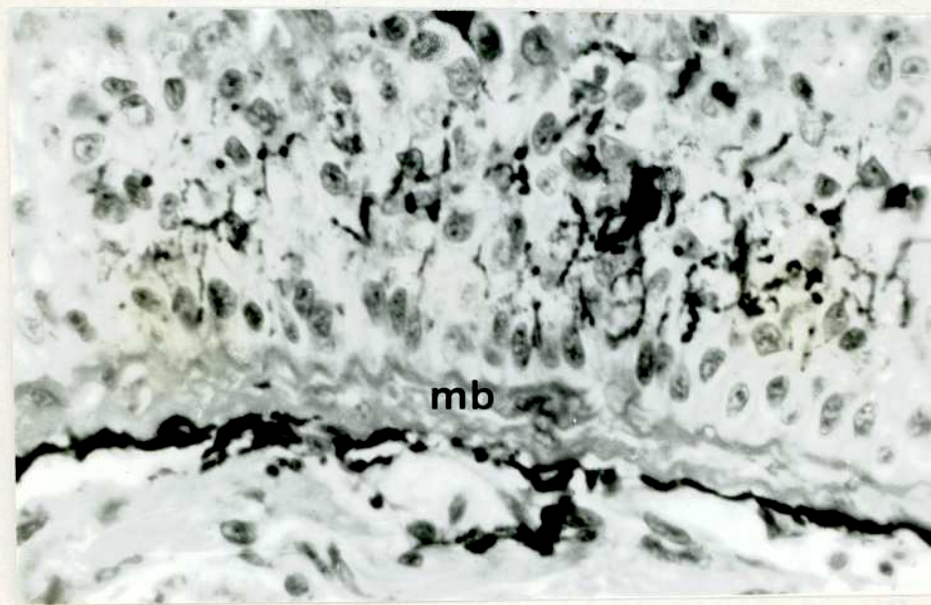


Fig. 2: Hiperplasia de epitelio en renacuajo
inyectado con MC en aceite de oliva.
Engrosamiento de la membrana basal
(MB) abundante pigmento.



Fig. 3: Formación papilomatosa en renacuajo
inyectado 20 días antes con MC.

LOTE B: Renacuajos implantados con cristales de MC.

A la observación microscópica se comprobó la formación de nódulos de células de tipo linfocitario y fibroblastos sarcomatosos que invaden el músculo y destruyen la notocorda. En algunos casos se obtuvieron formas papilomatosas de la epidermis con ruptura de la membrana basal o esbozo de una tercera aleta en la cola.

Renacuajos implantados con cristales de BP:

Los resultados obtenidos fueron microscópicamente muy llamativos, siendo la respuesta positiva en casi el 100% de los casos. No solamente se observa hiper-

plasia, invaginación del epitelio y ruptura de la membrana basal, sino destrucción del músculo e invasión de la notocorda. Entre los 10 y 30 días los nódulos linfomatosos de células atípicas, invaden al canal neural y a los ganglios que aparecen rodeados de cromatóforos. La reacción inflamatoria es escasa. (Fig.4).

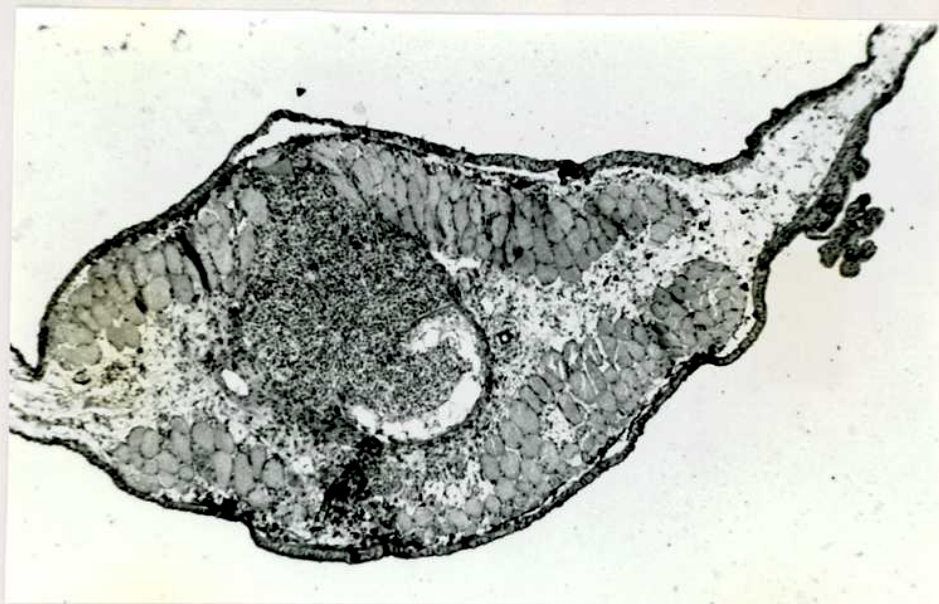


Fig. 4: Nódulo linfomatoso que invade la mayoría de las estructuras en un renacuajo tratado con BP.

Renacuajos implantados con cristales de DMBA:

Macroscópicamente se observan protuberancias en la zona del implanto de color grisáceo. A partir del 5º día la respuesta es espectacular. Se forma rápidamente un nódulo de tipo linfomatoso de gran tamaño que sustituye al músculo. Al mismo tiempo el epitelio responde con formaciones papilomatosas, presencia de mitosis en algunos casos y casi siempre con una

profunda invaginación del epitelio acompañada de ruptura de la membrana basal. A medida que el proceso avanza, el nódulo aumenta de tamaño y llega a sustituir totalmente la estructura normal, incluyendo canal neural y ganglios, lo que se acompaña con una gran migración de cromatóforos (Fig. 5).

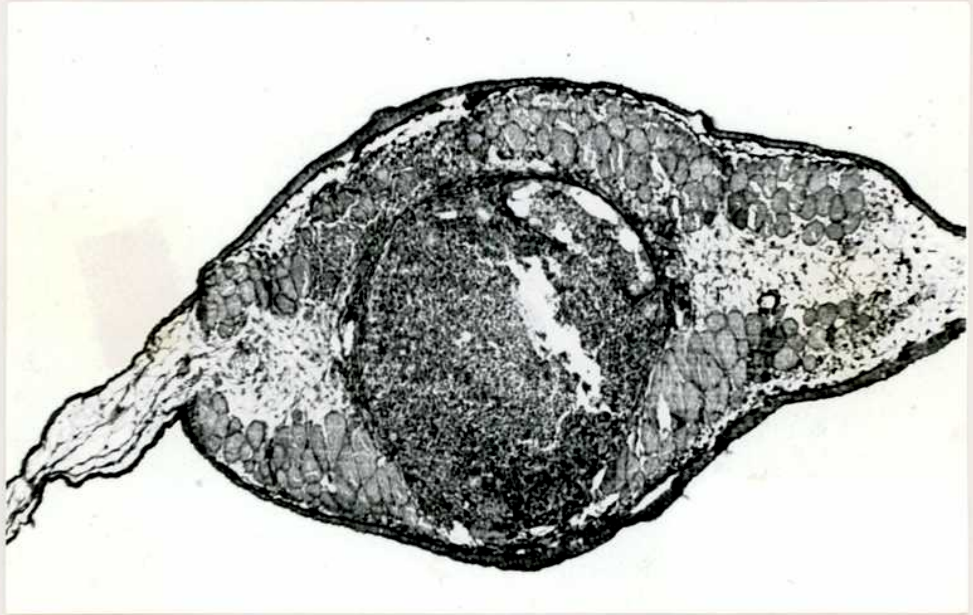


Fig. 5: Nódulo inducido con DMBA que destruye músculo, tubo neural y notocorda.

Controles con fluorene y parafina

Predomina un proceso inflamatorio con proliferación de células de tipo mesenquimático que rodean a los cristales implantados y estimulación de la vaina notocordal.

En ningún caso se observa formación de nódulos y una reacción epitelial escasa prevalece en los primeros días.

DISCUSION

Hemos observado que la respuesta a distintas sustancias cancerígenas varía en incidencia, poder invasivo y tipo celular, siendo el DIBA la sustancia que dió una respuesta más constante, a diferencia de los resultados negativos citados por Neukomm (1959) utilizando el mismo cancerígeno en Triton.

Es difícil comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos en urodelos, ya que si bien estos anfibios tienen cola, igual que los renacuajos, el nuestro es un sistema larval.

Sin embargo, una serie de autores describe, en urodelos tratados con cancerígenos, el mismo tipo de respuesta que observamos nosotros (Koch y colab. 1939, Neukomm 1944, Overton 1950, Moretti y Bellini 1951, Arffman y Christensen 1961). Estas formaciones fueron también observadas por Bells (1952-1954) en Xenopus laevis tratados con MC.

Pensamos que en el lote A, el aceite inyectado como solvente del MC puede haber actuado como estímulo continuo y a ello se debería la gran hiperplasia epitelial y respuesta inflamatoria de los primeros días. Cuando se implantaron cristales solos este tipo de respuesta fue mucho más restringida.

Los resultados de hiperplasia epitelial descriptos por Neukomm (1944) podrían deberse al mismo efecto.

No podemos hablar con seguridad de haber obtenido neoplasias malignas ya que los trasplantes realizados a sapos adultos no arrojaron resultados positivos.

En vista de nuestros resultados creemos que los

anuros embrionarios pueden ser utilizados para el ensa-
yo de sustancias cancerígenas como lo re-uso
Neukom (1957,1958) acerca los cortos tiempos de laten-
cia en ratoncillos con respecto a mamíferos.

II.- INFLUENCIA DE UN CAMPO REGENERATIVO SOBRE LA CANCEROGÉNESIS MÚLICA EN ANACARDIOS DE BUFO MACULATUS.

Waddington (1935) y Needham (1942) sugirieron que un "campo de individualización", normalmente responsable de la regeneración, sería además capaz de prevenir el desarrollo tumoral o de inducir al tejido tumoral a rediferenciarse.

En 1948 Rose y Wallingford implantaron carcinoma de Lucké de *Rana pipiens* en patas de *Pseudoeurycea viridiscens*, amputando posteriormente el miembro correspondiente. Las células tumorales, sometidas a un campo de regeneración activo se diferenciaron en cartílago, músculo y conectivo, junto con los tejidos del huésped. Demostraron así que el territorio de regeneración tiene la capacidad de poner bajo control al tumor obligándolo a diferenciarse.

Seilern Aspang y Kratochwill (1955) observaron que al iniciarse un proceso de regeneración en un organismo por amputación de una pata o de la cola, se produce regresión y diferenciación del tejido tumoral a tejidos no malignos.

Pizarrello y Wolsky (1955) comprobaron en *Pseudoeurycea viridiscens* que la regeneración inhibe el crecimiento maligno.

Neukomm (1957) constató que cuando un territorio está regenerando y dentro de un período de 36 días, el alquitrán no produce ningún tejido neoplásico epitelial que infiltre tejidos conectivos.

En oposición a estos resultados, Huben y Balls(1964) concluyeron que un campo persistente de individualización en el adulto, como por ejemplo la pata de anfibio, que tiene competencia para la regeneración, no ejerce control sobre la formación de cáncer.

Frente a estos resultados controvertidos, nos propusimos estudiar la relación cancerogénesis-regeneración en la cola de renacuajos de Bufo arenarum. Esta, como sistema embrionario, presenta mayor capacidad de regeneración y potencialidad de diferenciación que los tejidos de anfibios adultos utilizados por otros autores.

La inducción de nódulos linfomatosos con cristales cancerígenos descrita en la primera parte, ha servido de base para la realización de este trabajo.

Material y Método

El material biológico, cancerígenos y técnica de implanto fueron descritos en la primera parte (I).

Nueve días después del implanto de cristales, se procedió a amputar las colas en el centro de la zona tratada con cancerígenos con el objeto de procurar la formación de un blastema de regeneración. El tiempo de amputación se eligió en función del período de mayor incidencia de nódulos linfomatosos establecido anteriormente.

Se utilizaron 55 renacuajos: 30 fueron implantados con BI, 15 con DIBI y 10 se usaron como controles de regeneración.

RESULTADOS

Regeneración de un territorio no sometido a la acción de cancerígenos.

En los primeros 3 días que siguieron a la amputación se formó un blastema de regeneración terminal, caracterizado por la dediferenciación de la mayoría de los tejidos integrantes del muñón. Posteriormente se produjo una gran proliferación celular, específicamente de mioblastos y fibroblastos entremezclados.

Entre los 5 y los 30 días los tejidos característicos de la cola comenzaron a diferenciarse ordenadamente, en continuidad con los tejidos correspondientes del muñón (Fig. 6).

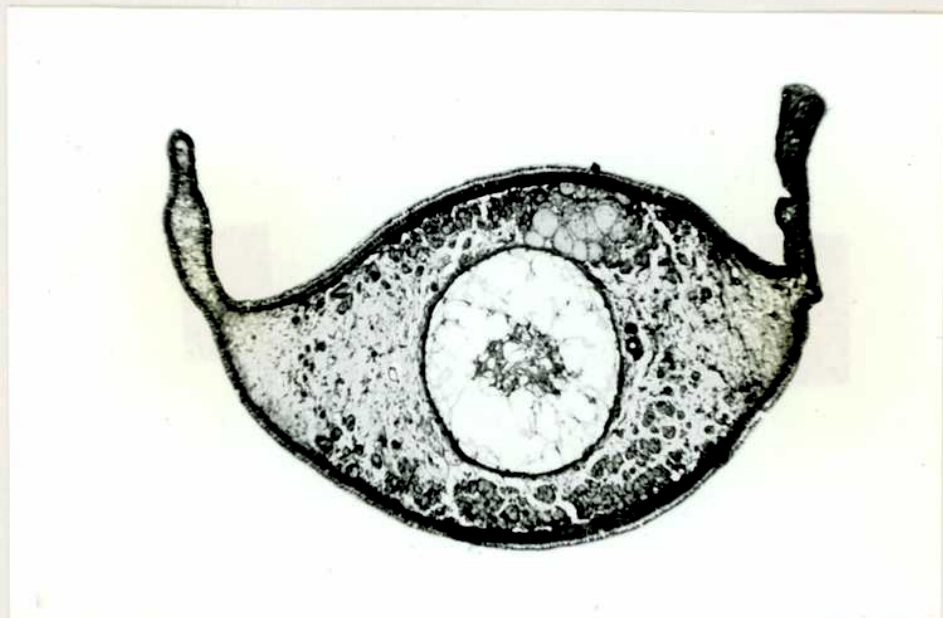


Fig. 6: Blastema de regeneración luego de 17 días de amputar la cola.

Regeneración de un territorio previamente tratado con BP y DLBA.

En esta serie de experimentos, el proceso de la regeneración, a pesar de la presencia de los nódulos neoplásicos que evolucionan independientemente, es similar al de los renacuajos no tratados.

En una primera etapa se observa el encapsulamiento de los nódulos linfomatosos preexistentes. La masa tumoral, anteriormente desorganizada, muestra una clara tendencia morfogénica que se evidencia en la organización de áreas nodulares concéntricas formadas por células epitelioideas que van evolucionando hacia estructuras tubulares que presentan una luz central (Fig. 7 y 8).

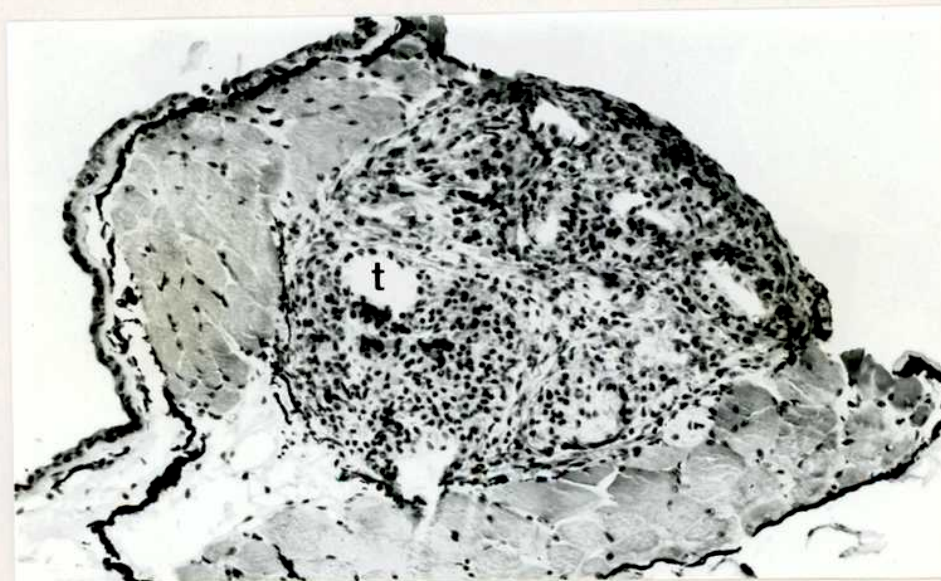


Fig. 7: Encapsulamiento y organización de un nódulo linfomatoso. Se evidencia la evolución hacia estructuras tubulares (t).

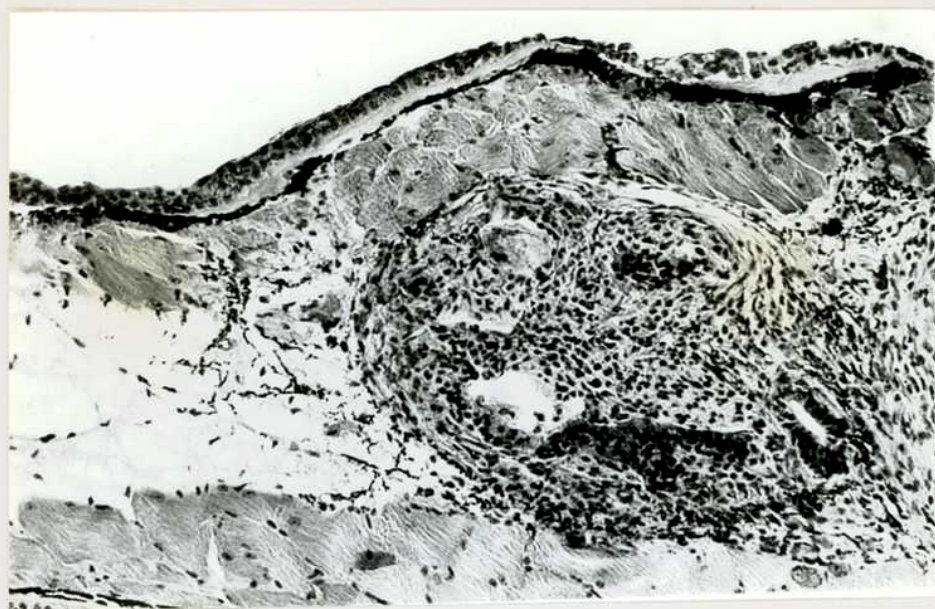


Fig. 8: Encapsulamiento y organización de un nódulo linfomatoso. Se evidencia la evolución hacia estructuras tubulares (t).

Entretanto en el tejido mesenquimático aparecen fibras musculares neoformadas. La respuesta inflamatoria es muy escasa y la notocorda y los ganglios, generalmente invadidos por las células linfomatosas, recobran su aspecto normal.

En una segunda etapa del proceso de regeneración algunos cromatóforos muy activos, provenientes de la región subepitelial rodean a los nódulos reorganizados hasta la desaparición total de los mismos (Fig. 9).



Fig. 9: Formaciones tubulares y reducción de la masa tumoral en la 2ª etapa del proceso de regeneración.

DISCUSION

Los resultados descriptos nos permiten concluir que un proceso regenerativo, inducido en la cola de renacuajos, puede controlar el crecimiento invasor autónomo de células de tipo linfomatoso formadas por la acción de cancerígenos químicos.

Entre los vegetales Braun (1968) ha podido demostrar que es posible que un crecimiento tumoral se organice. Así mismo es un hecho conocido que hasta un tumor humano como el neuroblastoma, tiene posibilidad de regresión espontánea.

En 1962 Seilern Aspang y Kratochwill observaron en

Triturus cristatus que posee un alto grado de poder regenerativo, que un tumor epitelial producido por sustancias cancerígenas, puede adquirir características de los tejidos normales de origen.

Con relación a las interacciones tumor-tejidos embrionarios en mamíferos, Whisson (1963), implantando células tumorales en embriones de rata, observó el poder organizador de los tejidos embrionarios sobre el tumor implantado.

En 1966 Pizarello y Wolsky impiden la cancerización provocando un proceso regenerativo previamente a la administración del cancerígeno. Según Ruben y Balls (1964), por el contrario, la presencia de un campo regenerativo en la pata cancerizada no modifica la actividad del cancerígeno.

La diferencia con nuestros resultados depende probablemente del sistema biológico utilizado por dichos autores que corresponde a un anfibio postmetamorfósico, mientras que el nuestro es un sistema larval, con capacidad de regeneración pronunciada, representando un campo de control más potente que la pata de un organismo adulto.

Suponemos que las influencias morfogenéticas de los tejidos del tumor pueden haber sido transmitidas a las células indiferenciadas del blastema y haber ejercido simultáneamente efecto sobre las células tumorales en desarrollo que tienen propiedades similares a las de las células embrionarias.

Una hipótesis alternativa sería que las células tumorales cayeran bajo las influencias organizadoras, recibiendo señales inductoras de las células mesenquimáticas jóvenes.

Ruben y Balls (1964) han sugerido que la regresión

de un linfosarcoma en una pata regenerante de Xenopus laevis se debería a la gran actividad de enzimas hidrolíticas ácidas en el área inflamada. Este mecanismo no explica la regresión nodular en nuestro sistema dado que la respuesta inflamatoria fue prácticamente nula.

III. EFFECTOS TERATOGENICOS DEL INFLANTO DE HIDROCARBUROS CANCERIGENOS EN RENACUAJOS DE BUFO ARENARUM.

Se conoce la acción teratogénica de algunos hidrocarburos cancerígenos. En anfibios este efecto parece estar relacionado con el tipo de cancerígeno utilizado y con el área en la cual se aplica, según tenga o no capacidad de regeneración.

En áreas no regenerativas Breedis (1952) obtuvo patas accesorias con más frecuencia que cáncer, introduciendo sustancias cancerígenas y traumatizantes en patas de *Friturus viridiscens* adultos.

Por el contrario Ruben y Balls (1964) no observaron patas accesorias como respuesta a la introducción de cristales de MC en zonas similares de Xenopus laevis, desarrollándose en cambio linfomas en un tercio de los casos.

En áreas de regeneración activa los cancerígenos han producido efectos teratogénicos (Ruben y Balls, 1964) y alteraciones morfogénicas (Neukomm, 1967).

En invertebrados, Foster (1969) produjo en planarias en regeneración, malformaciones con MC y BP.

En este trabajo describiremos los efectos teratogénicos inducidos por el MC, el BP y el DMBA en la cola de renacuajos de Bufo arenarum.

Material y Método

Se utilizó el mismo descripto en las secciones anteriores.

RESULTADOS

Entre los 15 y 30 días posteriores al implanto de cancerígenos se desarrollaron aletas supernumerarias y notocordas accesorias. Las primeras bajo la influencia de los 3 cancerígenos utilizados, mientras que las segundas se observaron solamente en los renacuajos tratados con DMBA.

Los órganos accesorios se produjeron tanto en campos regenerativos como en no regenerativos. (Tablas I y II). En el primer caso las neoformaciones coincidieron con el estadio de diferenciación y desaparición de los nódulos linfomatosos descriptos en la segunda parte. (Fig. 10).



Fig. 10: Aleta supernumeraria en un campo regenerativo de un renacuajo tratado con DMBA, el resto del nódulo está representado por unos pocos túbulos.

ALUMNAS SUPERNUMERARIAS DESARROLLADAS CON POSTERIORIDAD AL
 ELILANNO CON ALMOLOBUROS SIN ALICHO.

Droga	animales tratados	días postorio- res al iclanto.	Número de aletas supernumerarias.
IC	38	16	1
IC	52	26	1
ICX	30	27	2
ICBA	50	20	5
ICBAx	15	17	1
Fluoreno			
Carafina	44	25	0

x Denacuajos tratados sometidos a un campo regenerativo.

NOPOCOPIAS SUBMUNICIPALES DESARROLLADAS CON PRIORIDAD
AL TRATAMIENTO DE HIDROCARBUROS CANCERIGENOS.

Droga	Animales tratados	Días posteriores al in- fanto.	Número de noto- cordas accesorias.
MC	38	26	0
BP	62	33	0
BFX	30	33	0
DIBA	50	29	2
DIBAX	15	27	3
Fluoreno			
carafina	44	25	0

x Renacuajos tratados sometidos a un campo regenerativo.

DESCRIPCION DE ALAS NEOFORMADAS:

Estas formaciones se desarrollan siempre perpendicularmente al eje principal de la cola (Fig. 11, 12 y 13) coincidiendo la base con el sitio de implanto de los cristales.

En cuanto al aspecto histológico, similar al de una aleta normal, presenta una epidermis compuesta de dos capas de epitelio cúbico, apoyada sobre una membrana basal. Dicha epidermis se continúa directamente con la de la cola, (Fig. 14) y contiene un tejido amorfo, con escasos fibroblastos distribuidos entre una abundante sustancia fundamental. No se distinguen fibras ni vasos.

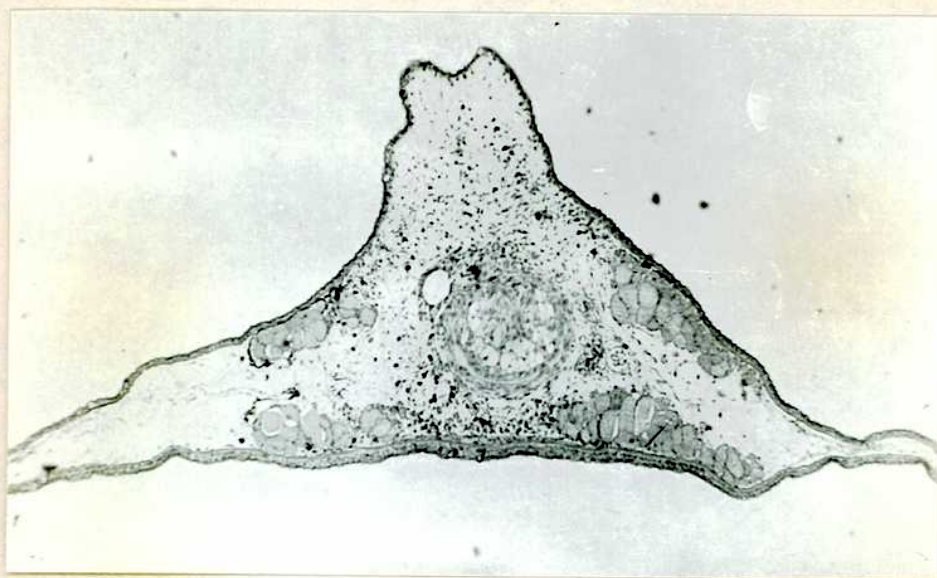


Fig. 11: Aleta neofornada en el sitio de implanto de los cristales cancerígenos.

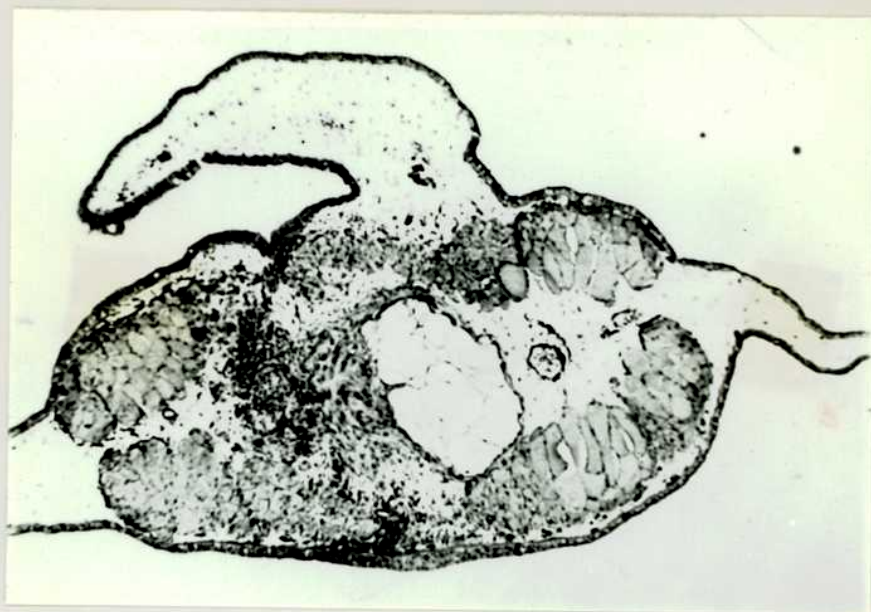


Fig. 12: Aleta neofornada en el sitio de
implanto de los cristales
cancerígenos.

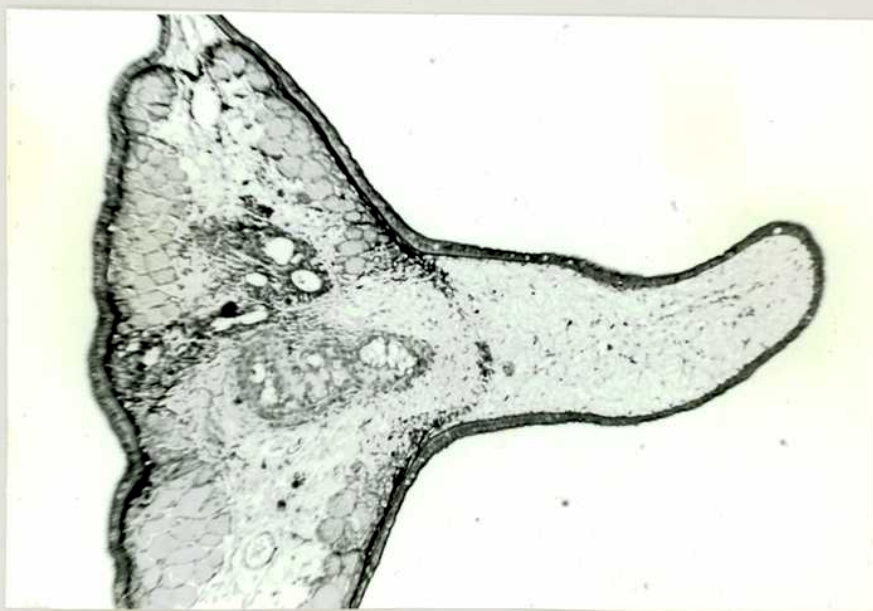


Fig. 13: Aleta neofornada en el sitio de im-
planto de los cristales cancerígenos.



Fig. 14: Aspecto histológico de una sleta supernumeraria.

Descripción de notocordas supernumerarias:

Alrededor de los 30 días y coincidiendo con la diferenciación o desaparición de los nódulos linfonatosos, parte de la vaina notocordal comienza a relicarse activamente dentro de la notocorda.

Se forman verdaderos septos que la dividen en 2,3 o 4 compartimentos. (Fig. 15 y 16).

Al mismo tiempo tanto la notocorda primitiva como las accesorias, se agrandan y pierden su forma característica.

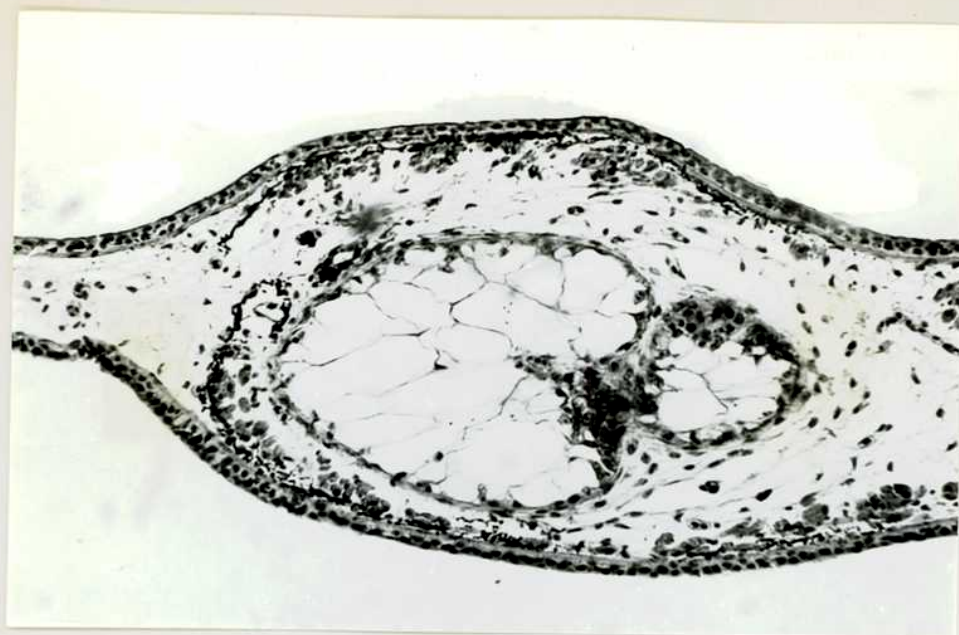


Fig. 15: Agrandamiento y duplicación de la notocorda durante el proceso de regeneración en una cola implantada con DIBA.

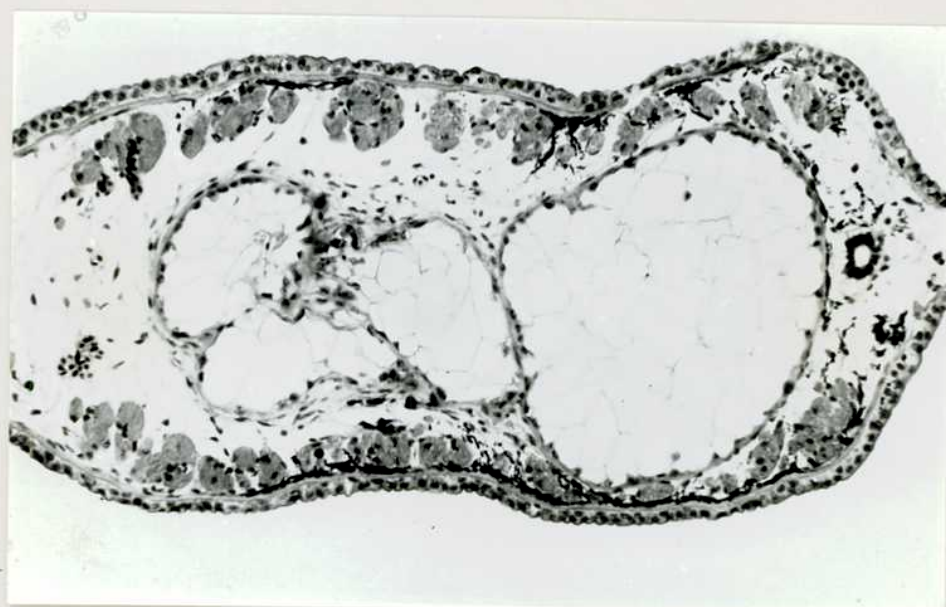


Fig. 16: Notocorda cuadruplicada.

DISCUSION

Nuestras experiencias sugieren que la regeneración procede independientemente de la presencia de los nodulos y de su regresión.

El implanto del cancerígeno no perjudicó ni inhibió la regeneración, en oposición a los resultados de Lizzarello y Wolsky (1966). Tampoco se observaron alteraciones del tejido mesenquimático como las descritas por Neukomm (1967).

El MC produjo efectos limitados en nuestro sistema, contrastando con los resultados de Ruben y Balls (1964) en anuros adultos.

Con respecto a los cancerígenos utilizados el más efectivo fue el DMBA. Además de una mayor incidencia de nodulos produjo más aletas supernumerarias que el BP y MC.

Se caracterizó también por un efecto estimulante específico sobre la notocorda, que fue más evidente en el caso de colas en regeneración.

En 1971, Laale obtuvo cordalización y neoformación de notocorda en blástula tardía de peces como efecto experimental del etanol, pero hasta ahora no se había descrito el desarrollo de notocordas accesorias en el estadio metamorfofísico de anfibios utilizado por nosotros.

Al igual que Ruben y Balls (1964) hemos observado que las formaciones supernumerarias se desarrollan siempre cerca de las zonas de introducción de los cancerígenos pero, dichos autores, difieren con nosotros en que obtienen efectos teratogénicos

solamente en campos regenerativos.

Se han descripto anormalidades de desarrollo en anfibios tratados ya sea con sustancias no cancerígenas (Ruben y Stevens, 1963 a,b), como con vinblastina (Francocur y Wilber, 1968) o Streptomicina (Procaccini y Doyle, 1970).

También se obtuvieron patas supernumerarias implantando un fragmento de celoidina en urodelos larvales en un campo no regenerativo. Este efecto fue interpretado como una alteración traumática de la regeneración (Ruben 1957).

Nuestros resultados no pueden ser atribuidos a causas traumáticas inespecíficas ya que sustancias no cancerígenas como el fluoreno o la parafina fueron inactivas.

Queda por comprobar experimentalmente si la acción específica del DMBA sobre la notocorda de renacuajos se debe a la estimulación directa de la misma por el cancerígeno o a un efecto inductor de la diferenciación de células mesenquimáticas pluripotentes pre-existentes.

ANENDICELISTA DE ABRVIAATURAS UTILIZADAS

AAF: acetilaminofluorene

B(a)A: benz(a)antraceno.

BP: benzo(a)pireno.

DBA: dibenzantraceno.

DMBA: dimetilbenzantraceno.

DMNA: dimetilnitrosamina.

HAH: hidroxilasa de los arilhidrocarburos.

HC: metilcolantreno.

BIBLIOGRAFIA I

Alexander, Peter. 1954. The reactions of carcinogens with macromolecules. Adv. Cancer Res. II: 1-72. Ac. Press. Inc. Publ. N.Y.

Allison A.C. and Mallucci L. 1964. Uptake of hydrocarbon carcinogens by lysosomes. Nature 203: 1024-1027.

Anghileri L.J. 1967. Electrophoretic study of the "in vitro" binding of 3,4-Benzopyrene to the plasma proteins. Experientia 23: 661.

Arcos J.C., Argus H.F. and Wolf G. 1968. Chemical induction of cancer. Ac. Press. N.Y.

Badger G.L. 1954. Chemical constitution and carcinogenic activity. Adv. Cancer Res. II: 73-127. Ac. Press Inc. Publ. N.Y.

Badger G.L. 1962. Mode of formation of carcinogens in human environment. Natl. Cancer Inst. Mon. 9: 1-16.

Bast R.C. jr., Shears B.W., Rapp H.J., Gelboin H.V. 1973. Aryl hydrocarbon (Benzo(a)pyrene) hydroxylase in guinea pig peritoneal macrophages. Benzo(a)anthracene induced increase of enzyme activity in vivo and in cell culture. J. Natl. Cancer Inst. 51: 675-678.

Benedict W.F., Gielen J.J. and Nebert D.W. 1972.

Polycyclic hydrocarbon-produced toxicity transformation and chromosomal aberrations as a function of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in cell cultures. *Int. J. Cancer* 9: 435-451.

Boyland W. 1952. Different types of carcinogens and their possible mode of action. A review. *Cancer Res.* 12: 77-84.

Brookes P. and Heidelberger Ch. 1969. Isolation and degradation of DNA from cells treated with tritium labeled 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. Studies on the nature of the binding of this carcinogen to DNA. *Cancer Res.* 29: 157-165.

Cavalieri R. and Calvin H. 1971. Molecular characteristics of some carcinogenic hydrocarbons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68: 1251-1253.

Diamond L. 1965. The effect of carcinogenic hydrocarbons on rodent and primate cells in vitro. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66: 183-198.

Diamond L., Sardet C. and Rothblat G.H. 1968. The metabolism of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in cell cultures. *Int. of Cancer* 3: 838.

Dipple A., Lawley A.D. and Brookes P. 1968. Theory of tumour induction by chemical carcinogens: dependence of activity on structure of ultimate carcinogen. *Europ. J. Cancer* 4: 493-506.

Evans I.A., Widdop B., Jones R.S., Barber G.D.,
Leach H., Jones D.L. and Mainwaring-Curton R. The
 possible human hazard of the naturally occurring
 bracken carcinogen. *Biochem. J.* 124/2: 28-29.

Fahmy O. F. and Fahmy H.J. 1972. Mutagenic selectivity
 for the RNA-forming genes in relation to the carcino-
 genicity of alkylating agents and polycyclic aroma-
 tics. *Cancer Res.* 32: 550-557.

Gelboin H.V., Huberman L. and Sachs L. 1971.
 Enzymatic hydroxylation of benzopyrene and its
 relationship to cytotoxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*
64: 1188-1194.

Greenstein J.L. 1959. *Bioquímica del Cáncer* ed Rev.
 de Occidente, Madrid.

Grover P.L., Sins E., Huberman L., Marquant H.,
Kurorrit E., Heidelberger Ch. 1971. In vitro trans-
 formation of rodent cells by K-region derivatives
 of polycyclic hydrocarbons. *Proc. Nat. Acad. Sci.*
 USA. 68: 1093-1101.

Heidelberger Ch. 1967. Some reflections and specula-
 tions about chemical carcinogenesis. *Can.Cancer Conf.*
7: 326-350.

Heidelberger Ch. 1970. Studies on the cellular and
 molecular mechanisms of hydrocarbon carcinogenesis.
Europ. J. Cancer. 6: 161-172.

Huberman L., Solkirk J.K. and Heidelberger Ch. 1971.
 Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in cell
 cultures. *Cancer Res.* 31: 2161-2167.

IARC Monograph 1. 1972. Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man; World Health Organization International Agency for Research on Cancer.

IARC Monograph 3. 1973. Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. World Health Organization International Agency for Research Cancer.

Kinoshita N. and Gelboin H.V. 1972 a. The role of aryl hydrocarbon hydroxylase in 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene skin tumorigenesis. On the mechanism of 7,8-Benzoflavone inhibition of tumorigenesis. Cancer Res. 32: 1329-1339.

Kinoshita N. and Gelboin H.V. 1972b. Aryl hydrocarbon hydroxylase and polycyclic hydrocarbon tumorigenesis effect of the enzyme inhibitor 7,8-benzoflavone on tumorigenesis and macromolecule binding. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69: 848-328.

Kinoshita N., Shears B. and Gelboin N. 1973. K region and non K region metabolism of Benzo(a)pyrene by rat liver microsomes. Cancer Res. 33: 1937-1944.

Kuroki T. and Heidelberger Ch. 1971. The binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to the DNA, RNA and proteins of transformable cells in culture. Cancer Res. 31: 2168-2176.

Marguand H. and Heidelberger Ch. 1972. Influence of "Feeder Cells" and inducers and inhibitors of microsomal mixed-function oxidases on hydrocarbon induced malignant transformation of cells derived from C3H mouse prostate. Cancer Res. 32: 721-725.

Marquandt H., Kuroki T., Huberman L., Selkirk J.S., Heidelberg Ch., Grover Ph.L. and Sims P. 1972. Malignant transformation of cells derived from mouse prostate by epoxides and other derivatives of polycyclic hydrocarbons. Cancer Res. 32: 716-720.

Marquandt H., Phillips F.S. and Bendich A. 1972. DNA binding and inhibition of DNA synthesis after 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene administered during the early prereplicative phase in regenerating rat liver. Cancer Res. 32: 1810-1813.

Miller J.A. 1970. Carcinogenesis by chemicals. An Overview Cancer Res. 30: 559.

Miller J.A. and Miller J.C. 1971. Chemical carcinogenesis. Mechanisms and approaches to its control. J. Natl. Cancer Inst. 47: V-XIV.

Nebert D.W. and Gelboin H.V. 1968. Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture II. Cellular responses during enzyme induction. J. Biol. Chem. 243: 6250-6261.

Prehn R.T. 1964. A clonal selection theory of carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 32: 1-17.

Watanabe M., Van Potter R. and Morris H.P. 1970. Benzopyrene hydroxylase activity and its induction by methyleholanthrene in Morris hepatomas, in host livers, in adult livers, and in rat liver during development. Cancer Res. 30: 263-273.

Weinstein B., Grunberger D., Fujimura S. and Fink L.M.
1971. Chemical carcinogens and RNA. Cancer Res. 31:
651-655.

Weisburger J.H. and Weisburger E.K. 1967. Test for
chemical carcinogens. Methods Cancer Res. 1: 307-398.

Whitlock J.P., Cooper H.L. and Gelboin H.V. 1972.
Aryl hydrocarbon (Benzopyrene) hydroxylase is stimu-
lated in human lymphocytes by mitogens and benz(a)
anthracene. Science 77: 618-619.

Williams D.J. and Rabin B.R. 1971. Disruption by
carcinogens of the hormone dependent association of
membranes with polysomes. Nature 232: 102-.

BIBLIOGRAFIA II

- Arffmann E. and Christensen N., B.C. 1961. Studies on the newt test for carcinogenicity. Acta path. microbiol. scand. 52: 330-342.
- Balls H. 1962a. Spontaneous neoplasms in Amphibia: a review and descriptions of six new cases. Cancer Res. 22: 1142-1154.
- Balls H. 1962b. Methyleholanthrene induced lymphosarcomas in Xenopus laevis. Nature 196: 1327-1328.
- Balls H. 1963. Methyleholanthrene induced lymphosarcomas in the anuran amphibian Xenopus laevis. Rev. Suisse de Zool. 70: 596-610.
- Balls H. 1964a. Benzopyrene induce tumors in the clawed toad, Xenopus laevis. Experientia 20: 143-145.
- Balls H. 1964b. A review of the chemical induction of neoplasms in Amphibia. Experientia 20: 241-247.
- Braun A.C. 1968. The multipotential cell and the tumor problem. In "The stability of the Differentiate State", ed. Ursprung, H. 128-135.
- Breedis Ch. 1951. Transplantable sarcoma of the salamander induced by Methyleholanthrene. Cancer Res. 11: 239.
- Breedis Ch. 1952. Induction of accessory limbs and of sarcoma in the newt (Triturus viridiscons) with carcinogenic substances. Cancer Res. 12: 861-866.

Briggs R.W. 1940. Tumor induction in Rana pipiens tadpoles. Nature, Lond. 146: 29.

Detterlbach H.C. 1952. Histostatic and cytostatic effects of some aminoketones upon tail regeneration in Xenopus larva. Rev. Suis. Zool. 59: 339-398.

Foster J.A. 1969. Malformations and lethal growths in Planaria treated with carcinogens. Nat. Cancer Inst. Monog. 31: 683-691.

Francoeur R.P. and Wilber C.G. 1968. Amphibian regeneration and the teratogenic effects of vinblastine. Oncology 22: 302-311.

Ingram A.J. 1971. The reactions to carcinogens in the axoloth (Ambystoma mexicanum) in relation to the "regeneration field control" hypothesis. J. Embryol. exp. Morph. 26: 425-441.

Ingram A.J. 1972. The lethal and hepatocarcinogenic effects of Diethylnitrosamine injection in the newt Triturus helveticus. Br. J. Cancer 26: 206-215.

Koch R.S., Schreiber B. et Schreiber G. 1939. Tumeurs produites par le goudron et le Benzopirene chez les Amphibiens urodeles. Bull. Ass. franc. Cancer. 28: 852-859.

Laale H.W. 1971. Ethanol in induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the Zebra-fish, Brachydanio rerio. J. Exp. Zool. 177: 51-64.

Leone V. 1953. Ricerche e considerazioni sulla cancerogenesi negli anfibi. Tumori 39: 420-422.

- Leone V. 1957. Tumori da Methylcholanthrene in tritoni. Rend. Ist. Lomb. Sci. Lettere 92: 220-240.
- Luckó B. and Schlusberger H.G. 1949. Neoplasia in cold blooded vertebrates. Physiol. Rev. 29: 91-126.
- Mc Millan, Donald B. and Battle H.I. 1954. Effects of ethyl carbamate (urethan) and related compounds on early developmental processes of the Leopard frog, Rana pipiens. Cancer Res. 14: 319.
- Moretti G.P. and Bullini L. 1951. Azione del Benzo-pirene in Anfibi Urodeli, gasteropodi e Insetti. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 27: 1966.
- Needham J. 1942. in Biochemistry and Morphogenesis Cambridge Univ. Press. London, England. 239-243.
- Neukomm S. 1944. Le probleme de la cancérisation par le goudron et les substances cancerigenes chez les Tritons. Mém. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 8: 137-213.
- Neukomm S. 1957. Un test sensible et ultra-rapide du pouvoir cancérigene de certaines substances chimiques. Oncology 10: 107-119.
- Neukomm S. 1959. The newt test for rapid biological assay of certain carcinogenic substances. Acta Un. int. Cancer. 15: N° 3-4.
- Neukomm S. 1967. Action of a carcinogenic for on the regeneration of the tail of the crested Newt. Excerpta Medica Intern. Congress Series N° 173, Teratology: 11-22.

- Overton J. 1950. Mitotic stimulation of amphibian epidermis by underlying grafts of central nervous tissue. *J. Exp. Zool.* 115: 521-559.
- Pizarelli J. and Wolsky A. 1966. Carcinogenesis and regeneration in newts. *Experientia* 22: 387-388.
- Procaccini D.J. and Doyle C.M. 1970. Streptomycin induced teratogenesis in developing and regenerating amphibians. *Oncology* 24: 378-387.
- Raunich L. 1949. Sull'azione del Benzopirene negli urodoli adulti (Triton cristatus Laur) *Riv. Biol.* 41: 91-101.
- Rose S. M. and Wallingford H.H. 1948. Transformation of renal tumors of frogs to normal tissue in regenerating limbs of salamanders. *Science* 107: 457.
- Ruben L.N. 1957a. Supernumerary limb formation in adult urodeles. *Anat. Rec.* 128: 612.
- Ruben L.N. 1957b. The unspecific nature of the "induction" of supernumerary limbs in urodeles. *Anat. Rec.* 128: 613.
- Ruben L.N. and Stevens J. 1963. Postembryonic induction in urodeles limbs. *J. Morph.* 112: 297-302.
- Ruben L.N. and Balls M. 1964a. The implantation of lymphosarcoma of Xenopus laevis into regenerating and non-regenerating forelimbs of that species. *J. Morph.* 115: 225-238.

Ruben L.N. and Balls H. 1964b. The implantation of Methylcholanthrene crystals into regenerating and non-regenerating forelimbs of Xenopus laevis. J. Morph. 115: 239-254.

Seilern Aspang F. and Kratochwill K. 1962. Induction and differentiation of an epithelial tumour in the Newt (Triturus cristatus). J. Emb. Exp. Morph. 10: 337-356.

Seilern Aspang F. and Kratochwill K. 1965. Relation between regeneration and tumour growth, in "Regeneration in Animals and Related Problems" eds. V. Kiortsis and H.A.L. Fraumush: 452-473.

Stekfo W. 1924. Beiträge zur experimentellen untersuchung der Morphogenese und der Histogenese der Neubildungen. Z. Krebsforsch. 21: 432-449.

Strauss L. and Mateyko G.H. 1964. Chemical induction of neoplasms in the kidney of Rana pipiens. Cancer Res. 24: 1969-1974.

Whisson H.J. 1968. The interaction of tumour and embryonic tissue in vivo. Cell differentiation (Ciba Foundation Symposium) 213-230.

Waddington C.H. 1935. Cancer and the theory of organizers. Nature, Lond. 135: 606-608.