

# Variaciones Diarias en la Proliferación de los Hepatocitos Neoplásicos del Tumor ES15.

BARBEITO, C.G. <sup>1, 2</sup>; BADRAN, A.F. <sup>2,3</sup> y MORENO, F.R. <sup>1,2,3</sup>.

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias<sup>1</sup>, 60 y 118. Instituto de Embriología, Biología e Histología, Facultad de Ciencias Médicas<sup>2</sup>, 60 y 120. Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Exactas<sup>3</sup>, 47 y 115. U.N.L.P. (1900), La Plata.

## RESUMEN

Como numerosos procesos biológicos, la proliferación de diversas poblaciones celulares animales presenta un ritmo circadiano. La respuesta diferencial a la ciclofosfamida ha sido relacionada con la periodicidad mitótica diaria en un carcinoma mamario de ratón. El presente trabajo analiza la evolución de la actividad mitótica, a lo largo de un ciclo de 24 horas, de los hepatocitos neoplásicos del tumor ES15 (hepatocarcinoma diferenciado, de crecimiento lento). 38 ratones machos, adultos de la cepa C3H/S, fueron injertados con el tumor en el tejido celular subcutáneo. Al cabo de 10 semanas los portadores fueron colocados durante tres semanas en condiciones de estandarización para análisis de periodicidad. Pasado ese lapso los mismos se repartieron en 6 lotes (n=5-8) que se sacrificaron cada 4 horas a partir de la hora 00:00 hasta abarcar un período de 24 horas, tras recibir una dosis de Colchicina (2 µg/g/0,01 ml), por vía intraperitoneal, cuatro horas antes de su muerte. Las muestras del tumor se procesaron para observación microscópica bajo objetivo de inmersión. En los cortes se determinó por conteo mitótico el índice de metafases colchicínicas por 1.000 núcleos. Con los datos individuales se calculó la media aritmética ± ES de cada lote. La significación de las diferencias entre los valores de los puntos horarios controlados se estableció con la prueba de t de Student. Se observó que la actividad mitótica presenta su valor mínimo a las 04:00 horas y el máximo a las 16:00 horas. Esta diferencia es estadísticamente significativa (P < 0,001). Este conocimiento es de utilidad para cualquier ensayo experimental que implique aspectos relacionados con la regulación del crecimiento del mismo tumor.

## Palabras claves.

Hepatomas - Ritmos circadianos - Ciclo celular - Colchicina - Factores de crecimiento .

## Circadian Variation in the neoplastic Hepatocytes Proliferation From the ES 15 Tumor.

## SUMMARY

As most of biological processes, the proliferation of a variety of mammalian cell populations shows a circadian rhythm. The differential response of a mouse mammary carcinoma to the endoxan (cyclophosphamide) administration, has been related to its daily mitotic periodicity. In this work we analyse the evolution of the mitotic activity, through a 24 h period, of the ES15 tumor hepatocytes (Slow growing differentiated hepatocarcinoma). Thirty eight C3H/S inbred male adult mice, were grafted with the tumor in the hypodermis. Ten weeks later they were standardized for periodicity analysis during three weeks. After this time, they were separated in six groups ( N=5-8) and one group every 4 h for a day was sacrificed. Four hours before killing, the mice received an IP injection of colchicine in a dosis of 2µg per gram of body weight in 0,01 ml of distilled water. Samples of the tumors were processed for microscopical study (1000 X magnification). The colchicine metaphases were controlled on slides and the mitotic index per 1000 nuclei was determined. With the individual values the arithmetic mean of each group and the standard error of the means were calculated. The statistical significance of differences between the values from each time - points controlled, were established with Student's "t" test. The lowest mitotic activity at 04:00 h and the highest at 16:00h were observed. The difference was highly significant (p < 0,001). The knowledge of this data is very useful for experimental assays related to any aspect of the same tumor growth regulation.

## Key words.

Hepatomas - Circadian rhythms - Cell cycle - Colchicine - Growth factors.

## INTRODUCCION

En un estudio pionero, nuestro grupo de trabajo demostró en la actividad mitótica de un carcinoma mamario la presencia de una ritmicidad diaria semejante a la que posee la glándula mamaria normal (Echave Llanos y Badran, 1963). Esta observación condujo, seguidamente, a la demostración experimental de que la eficacia del tratamiento anti-tumoral con ciclofosfamida varía según la hora de administración del citostático (Badrán y Echave Llanos, 1965) y sentó, al mismo tiempo, las bases para el desarrollo de la cronoterapia. El conocimiento de la distribución temporal de la fase M del ciclo celular de los hepatocitos normales (Surur et al. 1985) y neoplásicos (Barbeito, et al. 1993) ha sido sumamente útil ya que permitió planear experimentos que demostraron los efectos inhibidores de extractos de tumores, sobre el crecimiento de poblaciones hepatocíticas (Echaves Llanos, et al. 1986). Estos resultados nos llevaron a la conclusión de que esos extractos contienen factores inhibidores del crecimiento y que los tratados tienen, a su vez, receptores para dichos inhibidores en las células blanco.

Seguidamente se demostró que la administración prolongada de extracto del hepatocarcinoma SS1K de Wilson estimula significativamente el crecimiento del mismo tumor. El factor o factores de esta estimulación por tejido homólogo es termoestable (Badrán y Moreno, resultados no publicados).

En los últimos años las técnicas aportadas por la biología molecular permitieron demostrar la gran importancia que tendrían un grupo de sustancias denominadas "factores de crecimiento" en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Respecto a su participación en el crecimiento hepatocítico se ha señalado, principalmente, que: a) el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) producido por poblaciones celulares no hepatocíticas -especialmente las células perisinusoidales de Ito- se comporta como un inhibidor paracrino; b) el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), localizado en las células de Ito y de Kupffer, también paracrino, pero con acción estimulante del crecimiento; c) el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) con acción estimulante que recae sobre los mismos hepatocitos que lo producen (Michalopoulos 1992).

La baja actividad mitótica hepatocítica que se observa en el animal adulto podría obedecer prin-

cialmente a la presencia de factores inhibitorios como el TGF  $\beta$ . Por el contrario, la elevada actividad mitótica que se observa después de la intoxicación con hepatotóxicos como el tetracloruro de carbono o de la hepatectomía parcial se acompaña de un incremento de factores estimulantes del crecimiento como HGF o TGF  $\alpha$  (Michalopoulos 1992).

En el presente trabajo se analiza la evolución de la actividad mitótica de un hepatocarcinoma injertado, a lo largo de un período circadiano, con el objeto de definirlo como modelo de ensayo para explorar la acción de agentes capaces de modificar parámetros representativos del crecimiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Se utilizaron 38 ratones machos, adultos de la cepa endocriada C3H/S provenientes del bioterio del Instituto de Embriología, Biología e Histología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

Desde el nacimiento, los animales viven sometidos a un régimen normal de iluminación (luz fluorescente, 40 vatios, ubicadas sobre las cajas y que iluminan todas las zonas de las mismas) desde las 06:00 hasta las 18:00 horas alternando con 12 horas de oscuridad, disponiendo de agua y comida ad-libitum.

### Tumor

Se utilizó un hepatoma ES15 (E: espontáneo; S: de la cepa C3H/S; 15: decimoquinto tumor tomado para transplante en el I. de E. B. e Histología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.) en su vigésimo pasaje.

El tumor toma en el 80% de los receptores, alcanza 1 cm en 10 semanas, y mata al 50% de los portadores en 4,5 meses. Por su cuadro microscópico es un hepatocarcinoma diferenciado y por su velocidad de crecimiento es un tumor lento. Requiere, para su mantenimiento, ser transplantado en receptores compatibles cada 4-5 meses.

### Transplante del tumor

Para el implante subcutáneo se utilizaron trozos del tumor, sin cambios necróticos aparentes, obtenidos de portadores previamente sacrificados por decapitación y sangría. Los tumores fueron convertidos en un fino picadillo con una tijera curva en una cápsula de Petri, suspendidos en solución fisiológica (1:2) e inyectados (0,2ml) en el tejido celular subcutáneo del dorso de los receptores.

## Diseño experimental

Diez semanas después del injerto los portadores del tumor fueron aislados en jaulas individuales, en un cuarto ad hoc, durante tres semanas bajo las condiciones de iluminación y alimentación ya descritas. La temperatura del cuarto se mantuvo entre 20 y 24 °C. Seguidamente se lotearon (n=5-8) y se sacrificaron cada 4 horas a partir de la medianoche hasta abarcar un ciclo de 24 horas. Cuatro horas antes recibieron una dosis de 2 µg por gramo de peso corporal de colchicina por vía intraperitoneal con el fin de detener las mitosis en metafase. En ese momento los tumores medían  $1,4 \pm 0,08$  cm;  $x \pm ES$  de  $D + d / 2$  ( D: diámetro mayor, d: diámetro menor) y los portadores pesaban  $33,0 \pm 0,45$  g. Las muestras del tumor fueron fijadas en formol taponado al 10%, incluidas en parafina, cortadas en secciones de 5 µm de espesor y coloreadas con Hematoxilina-Eosina.

## Técnica de Conteo Mitótico

Las preparaciones histológicas fueron estudiadas bajo objetivo de inmersión a 1500x, revisando áreas comparables. Se registró el número de metafases colchicínicas de hepatocitos neoplásicos en 140 campos microscópicos y todos los núcleos cada 10 campos, por animal. Con estos datos se calculó el índice mitótico por 1.000 núcleos. Los valores de cada lote se expresaron por la media aritmética ( $x$ )  $\pm$  error estándar (ES). La significación de las diferencias entre las medias se calculó mediante la prueba de t de Student.

## RESULTADOS

En la tabla 1 y gráfico I se aprecia que el índice de metafases colchicínicas del tumor estudiado presenta a las 04:00 horas su valor más bajo. A partir del mismo la actividad mitótica se empina gradualmente en los sucesivos puntos horarios alcanzando su máximo valor a las 16:00 horas. A partir de este horario sus valores declinan en los sucesivos puntos explorados. La significación de la diferencia que se observa entre los valores extremos es altamente significativa ( $P < 0,001$ ).

## DISCUSION

Una vez más el método del bloqueo estagmocinético por la colchicina asociado a un control microscópico metódico permite demostrar una

Tabla 1: Actividad mitótica del hepatocarcinoma ES15 en un período circadiano.

Hora	$\bar{x}$	$\pm$	ES	n	VR
00:00	8,19	$\pm$	1,24	8	78
04:00	0,46	$\pm$	0,12	5	4
08:00	2,58	$\pm$	0,22	5	25
12:00	7,48	$\pm$	1,86	6	71
16:00	31,78	$\pm$	6,45	7	303
20:00	12,43	$\pm$	1,76	6	118
P	04-16 < 0,001				
$\bar{x}$ 24 hs	10,48	$\pm$	2,12	38	100

$\bar{x}$  : Media aritmética del lote.  
ES: Error estandar.  
n: Tamaño de la muestra.  
VR: Variación relativa (porcentual) con respecto al promedio de medias.  
P: Probabilidad de la diferencia.  
 $\bar{x}$  24 hs: Promedio de las medias.

variación circadiana de la actividad mitótica. No es ajena a esta comprobación el hecho de haber utilizado animales estandarizados para el análisis de periodicidad como el haber repartido células de una misma línea tumoral en todos los receptores del injerto. La estandarización utilizada disminuye la dispersión de los datos (Halberg et al. 1958) de la variable medida facilitando el análisis experimental.

El reparto del tumor por repique seriado provee del número necesario de tumores comparables. Los cambios que se aprecian en la evolución de la actividad mitótica -con un valor más elevado en el período de reposo del animal y el más bajo en el período de actividad- son superponibles a los de las curvas mitóticas obtenidas de tejidos normales con capacidad regenerativa (Echaves Llanos et al. 1985) y de algunos tumores injertados (Barbeito et al. 1993). La variación circadiana mitótica ha sido relacionada con las variaciones diarias de: a) las concentraciones sanguíneas de glucocorticoides y de adrenalina dado el aumento de la concentración de estas sustancias va seguido de una caída de la actividad mitótica y viceversa (Leffert et al. 1979); b) de los receptores celulares para factores de crecimiento (Scheving et al. 1989). Nuestro resultado no puede, obviamente, excluir ninguna de estas explicaciones.

Por el contrario nos sugiere que ambos cambios podrían participar, separadamente o en conjunto, en la sincronización de la fase M de la población hepatocítica del tumor estudiado.

La existencia de tumores con variación circadiana mitótica es, potencialmente, de gran importancia práctica. La presencia de este fenómeno periódico debería ser investigada en todo tumor, a través de muestras tomadas con regularidad hasta abarcar un ciclo de 24 horas y particularmente cuando se ha de recurrir al uso de antitumorales con selectividad sobre alguna/s de las fases del ciclo celular (Echaves Llanos y Badrán 1963), dado que la posi-

ción horaria del pico mitótico permitiría inferir razonablemente la ubicación temporal de las fases quimiosensibles del ciclo de la célula blanco y por ende precisar la hora correcta de administración de un tratamiento particular. Estas consideraciones condujeron a la realización del presente estudio. El resultado obtenido probablemente contribuirá al diseño de nuevos experimentos, racionalmente planificados, donde las células del tumor ES15 sean el blanco del tratamiento con factores de crecimiento, factores de crecimiento bloqueados con anticuerpos, extractos inhibidores del tejido hepático normal y con otros agentes capaces de modificar el crecimiento.

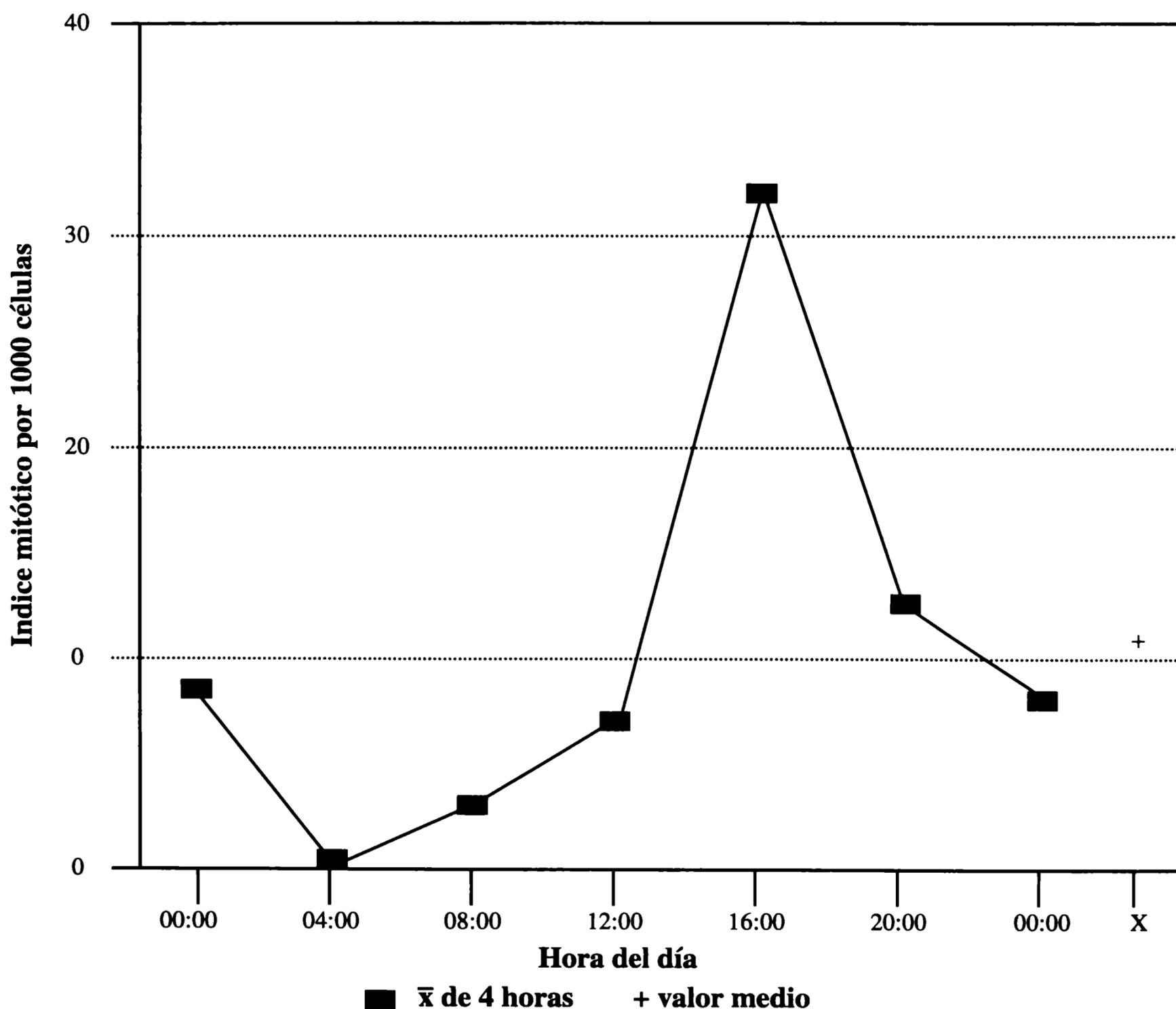


Gráfico I. Proliferación Tumoral del Hepatocarcinoma ES 15.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- BADRAN, A. F.; ECHAVE LLANOS, J.M. 1965. Persistence of Mitotic Circadian Rhythm of a Transplantable Mammary Carcinoma After 35 Generations: Its Bearing on The Success of Treatment with Endoxan. *J. Nat. Cancer Inst.* 35: 285-290.
- 2- BARBEITO, C. G.; MORENO, F.R. ; BADRAN, A. F. ; ZALDUENDO, M. A. 1993. Evolution of Mitotic Activity of the Carcinoma ES14 in Circadian Period. *Com. Biol.* 11: 154.
- 3- ECHAVE LLANOS, J. M. ; BADRAN, A. F. 1963. 24-Hour Rhythm in the Mitotic Activity of a Grafted Mammary Carcinoma in Female C3H/Mza Mice on Normal and Inverted Lighting Regimens. *J. R. Micr. Soc.* 82: 75-80.
- 4- ECHAVE LLANOS, J. M.; MORENO, F.R. ; BADRAN, A. F. 1985. The Growth of Hepatocytes and Sinusoid Litoral Cells During Liver Regeneration. *Com. Biol.* 4: 151-158.
- 5- ECHAVE LLANOS, J. M.; BADRAN, A. F.; MORENO, F.R. 1986. Inhibiting Effect of a Hepatoma Extraxt on the Mitotic Rate of Regenerating Liver. *Virchows Arch. [Cell Pathol]* 51: 17-27.
- 6- HALBERG, F; BARNUM, C. P., SILBER, R. H. ; BITTNER, J. J. 1958. Twenty Four Hour Rhythms at a Several Levels of Integration in Mice of Different Lighting Regimens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97: 897-900.
- 7- LEFFERT, H. L. ; KOCH, K. S. ; MORAN, T ; RUBALCAVA, B. 1979. Hormonal Control of Rat Liver Regeneration. *Gastroenterology.* 76: 1470-1482.
- 8- MICHALOPOULOS, G. 1992. Liver Regeneration and Growth Factors: Old Puzzles and New Perspectives. *Laboratory Investigation.* 67: 413-415.
- 9- SCHEVING, L. A. ; TSAI, T. H. ; CORNET. L. E. ; FEXERS, R. J. ; SCHEVING, L. E. 1989. Circadian Variation of Epidermal Growth Factor Receptor in Mouse Liver. *Anat. Rec.* 224: 459-465.
- 10- SURUR, J. M. ; MORENO, F. R. ; BADRAN, A. F. ; ECHAVE LANOS, J. M. 1985. Variations in DNA Synthesis and Mitotic Indices in Hepatocytes and Sinusoid Litoral Cells of Adult Intact Male Mouse Along a Circadian Time Span. *Chronobiology International* 2: 161-168.