

Influencia de la administración sistémica de factor de crecimiento nervioso sobre el desarrollo de tumores cerebrales inducidos por etil-nitroso-urea

Influence of the systemical administration of nervous growth factor on the development of ethyl-nitroso-urea induced brain tumors

Unidad de Investigación de Neurociencias
Fundación MAPFRE Medicina
Hospital Universitario Puerta de Hierro
Madrid

Vaquero J.
Zurita M.
Oya S.
Aguayo C.

RESUMEN

Introducción: Existen evidencias a favor de que los tumores cerebrales experimentales inducidos en roedores por exposición prenatal a etil-nitroso-urea (ENU) pueden ser considerados de naturaleza neuroblástica.

Objetivo: Estudiar en este modelo experimental, el posible efecto de la administración sistémica de factor de crecimiento nervioso (FCN 7S) actuando como un agente biomodulador, capaz de lograr la maduración y diferenciación de las células tumorales, en una fase inicial del desarrollo tumoral inicial.

Material y métodos: Se han estudiado dos grupos experimentales, compuestos cada uno de ellos por 35 ratas Wistar que fueron expuestas en el período prenatal, al efecto del carcinógeno. El grupo de animales tratados recibió dos ciclos de FCN 7S por vía sistémica, a la dosis de 15 mg cada tres días, entre los días 30 y 60, y entre los días 75 y 90 de edad.

Resultados: Tras un período de seguimiento evolutivo de diez meses tras el nacimiento, todos los animales del grupo control fueron sacrificados por detección de sintomatología neurológica atribuida al desarrollo de un tumor intracraneal. En este grupo de animales se detectaron 54 tumores, cuya sintomatología se hizo evidente entre la 14 y 32 semanas de vida (media de 22 ± 3). Por el contrario, en el grupo de animales tratados, sólo 24 fueron sacrificados por detección de sintomatología neurológica, apreciándose en este grupo un total de 28 tumores, que se hicieron evidentes entre las 26 y 40 semanas de edad (media de 32 ± 3). El análisis comparativo de las curvas de supervivencia mostró una mayor supervivencia ($p < 0,0001$) en el grupo de animales tratados con FCN. Estos datos sugieren el efecto biomodulador del FCN en el modelo de neurocarcinogénesis por ENU y sugieren su utilidad clínica en el caso de tumores neuroblásticos o neuroectodérmicos indiferenciados que conserven capacidad de diferenciación neuronal.

Palabras clave: Etil-nitroso-urea, tumores cerebrales, factor de crecimiento nervioso.

Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C
Influencia de la administración sistémica de factor de crecimiento nervioso sobre el desarrollo de tumores cerebrales inducidos por etil-nitroso-urea
Mapfre Medicina, 2004; 15: 171-175

Correspondencia:

J. Vaquero
Hospital Universitario Puerta de Hierro
San Martín de Porres, 4
28035 Madrid

ABSTRACT

Introduction: Recent evidences showed that brain tumors induced in rats by ethyl-nitroso-urea (ENU) can be considered of neuroblastic nature.

Objective: To study, in this experimental model, the possible effect of the systemic administration of nervous growth factor (NGF 7S) in a phase of initial tumor development, as a biological agent able to achieve the maturation and differentiation of the tumor cells.

Material and methods: Two experimental groups, each one of them with 35 Wistar rats previously exposed in the prenatal period to the effect of the carcinogen, have been studied. The group of treated animals received two cycles of NGF 7S by systemic route, at a dose of 15 mg every three days, between the days 30 and 60, and between the days 75 and 90 of age.

Results: After a follow-up of ten months after the birth, all the animals of the control group were sacrificed due to detection of neurological symptoms attributed to the development of an intracranial tumor. In this group, 54 intracranial tumors were detected whose symptoms became evident between the 14 and 32 weeks of age (mean of 22 ± 3). On the contrary, in the group of treated animals, alone 24 were sacrificed after detection of neurological symptoms, being appreciated in this group a total of 28 tumors that became evident between the 26 and 40 weeks of age (mean of 32 ± 3). The comparative analysis of the survival curves showed a greater survival ($p < 0,0001$) in the group of treated animals. These findings show a biomodulator effect of the NGF in the ENU-model of neurocarcinogenesis, and suggest its clinical utility in human neuroblastic tumors or in the case of undifferentiated neuroectodermal tumors with capacity for neuroblastic differentiation.

Key words: Ethyl-nitroso-urea, brain tumors, nerve growth factor.

Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C
Influence of the systemical administration of nervous growth factor on the development of ethyl-nitroso-urea induced brain tumors
Mapfre Medicina, 2004; 15: 171-175

Fecha de recepción: 10 de diciembre de 2003

El estudio ha sido realizado por medio de una Beca de Investigación de la Fundación MAPFRE Medicina.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de controlar la progresión de tumores por medio de tratamientos biológicos ofrece interesantes perspectivas y ha llevado en las últimas décadas a la identificación de ciertas sustancias conocidas como «modificadores de respuesta biológica». Sin embargo, en el momento actual, la eficacia de tratamientos biomoduladores en el campo de la neuro-oncología parece muy limitada, posiblemente porque cualquier intento de actuación terapéutica con estas técnicas requiere, para que sea útil, que se actúe sobre un pequeño número de células tumorales, lo que nunca se da en la práctica, porque cuando se diagnostica un tumor cerebral, el número de células que lo constituye es ya muy elevado y, por lo tanto, el crecimiento tumoral es difícilmente controlable (1). Por esta razón, se han hecho intentos de conocer la eficacia de sustancias biomoduladoras del crecimiento tumoral utilizando modelos experimentales que permiten actuar en fases precoces del desarrollo neoplásico.

Una de estas estrategias sería la utilización de estas sustancias en fases iniciales tras la implantación de un tumor experimental. Sin embargo, esta técnica de estudio tiene el problema de que siempre puede haber un rechazo espontáneo del tumor implantado, lo que llevaría erróneamente a atribuir la falta de progresión tumoral a un efecto terapéutico de la sustancia biomoduladora ensayada. Por ello, se han hecho estudios que tratan de conocer la influencia de posibles modificadores biológicos del crecimiento tumoral, actuando sobre neoplasias experimentales, en el momento en que supuestamente se inicia la acción del carcinógeno administrado (2). En esta línea de trabajo, las neoplasias cerebrales inducidas por etil-nitrosourea (ENU) en roedores ofrecen un modelo experimental extraordinariamente útil, por cuanto que se conoce con gran precisión el período de latencia para el desarrollo de los tumores inducidos tras la exposición prenatal al carcinógeno (3-11). Como consecuencia de ello, se conoce que en este modelo de neurocarcinogénesis, en los tres primeros meses de edad, las ratas Wistar, cuyas madres fueron expuestas a la acción del carcinógeno durante la segunda mitad de la gestación, desarrollan tumores cerebrales que en ese momento evolutivo pueden considerarse en fase pretumoral o bien de microtumores (3, 12) (Figura 1).

Teniendo en cuenta publicaciones previas que muestran que la mayor parte de los tumores cerebrales ENU-inducidos en la rata Wistar pueden

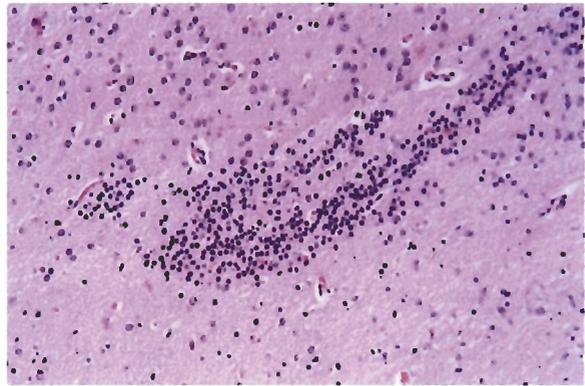


Figura 1. Típico foco de microtumor en sustancia blanca subcortical, en el modelo de neurocarcinogénesis química por ENU. Estos focos se aprecian antes de los tres meses de edad y evolucionan a los típicos tumores intracerebrales (hematoxilina-eosina).

ser considerados tumores neuroectodérmicos indiferenciados, cuyas células pueden mostrar diferenciación neuroblástica (3, 12-15) y que existen sustancias biomoduladoras capaces de lograr la maduración y diferenciación de células de neuroblastomas (16), nos hemos planteado estudiar la posible influencia que la administración sistémica de factor de crecimiento nervioso (FCN), con un conocido efecto biomodulador, capaz de lograr la maduración y diferenciación neuronal de células neuroectodérmicas (17), podría tener sobre la inducción y desarrollo de los tumores cerebrales ENU-inducidos. Si se objetivara que la administración de FCN modifica el patrón de aparición de tumores ENU-inducidos en animales expuestos en período prenatal al carcinógeno, no sólo se obtendría un argumento a favor de la naturaleza neuroblástica de los tumores cerebrales ENU-inducidos, sino que igualmente se confirmaría la hipótesis de que factores madurativos de las células tumorales, en tumores neuroectodérmicos indiferenciados, podrían tener un efecto antitumoral siempre que pudieran actuar sobre un determinado volumen tumoral o pudieran ejercer su efecto en una fase inicial del desarrollo neoplásico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se seleccionaron 12 ratas Wistar adultas que iniciaron simultáneamente su período de gestación. En el día 17 de gestación, cada una de ellas recibió una única inyección intraperitoneal de ENU, a la dosis de 50 mg/kg di-

suelto en suero fisiológico. Una vez que concluyó el período de gestación y durante un intervalo de 24 horas, todas las ratas alumbraron un total de 72 crías. A los 25 días de edad, las crías fueron distribuidas al azar en dos grupos experimentales de 35 animales cada uno de ellos (en ese momento habían fallecido dos crías por razones desconocidas). El grupo de animales tratados recibió por vía intraperitoneal un total de 255 µg de FCN 7S, en el transcurso del segundo y tercer meses de vida, en dos ciclos de tratamiento (15 µg cada tres días, entre los días 30 y 60 de edad y entre los días 75 y 90 de edad). Cada inyección se realizó disolviendo el FCN en un volumen de 1 ml de suero fisiológico. Los 35 animales del grupo control recibieron la misma pauta de administración de suero fisiológico, sin FCN. Todos los animales fueron examinados diariamente, hasta la aparición de síntomas neurológicos atribuibles al desarrollo de un tumor intracraneal o hasta finalizar el período de seguimiento (final del décimo mes de vida). Cuando se detectaron estos síntomas, o al finalizar el período de seguimiento de los animales, éstos fueron sacrificados mediante sobredosificación anestésica y sometidos a estudio necrópsico. Los tumores cerebrales encontrados se fijaron en formol-salino para su posterior estudio con técnicas de microscopía óptica.

La supervivencia de los animales en los dos grupos experimentales se analizó por medio de las curvas de Kaplan-Meier y se compararon dichas curvas utilizando el *log-rank* test. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como índice de significación estadística. En el manejo de todos los animales se siguió la normativa vigente referente al cuidado de animales de experimentación médica.

RESULTADOS

Todos los animales del grupo control tuvieron que ser sacrificados, tras la aparición de sintomatología neurológica, en un intervalo de edad entre las 14 y 32 semanas de vida (media de 22 ± 3 semanas). En este grupo experimental se detectaron anatomopatológicamente un total de 54 tumores intracraneales, con aspecto de tumores neuroectodérmicos indiferenciados (Figuras 2, 3 y 4). Por el contrario, en el período de seguimiento de los animales y en el grupo de animales que recibieron FCN, 24 de ellos mostraron sintomatología atribuida al desarrollo de un tumor intracraneal, oscilando el momento de aparición de síntomas, entre las 26 y 40 semanas (media de 32 ± 3 semanas). Tras el sacrificio de estos 24 anima-

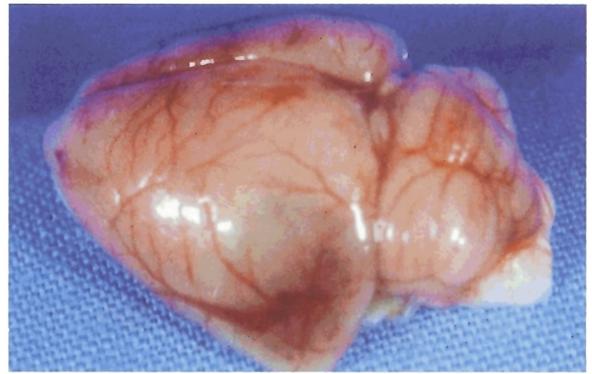


Figura 2. Aspecto macroscópico del cerebro de una rata Wistar con un tumor cerebral ENU-inducido. Se observa el edema cerebral en el hemisferio donde se localiza el tumor.



Figura 3. Aspecto macroscópico de un tumor cerebral ENU-inducido.

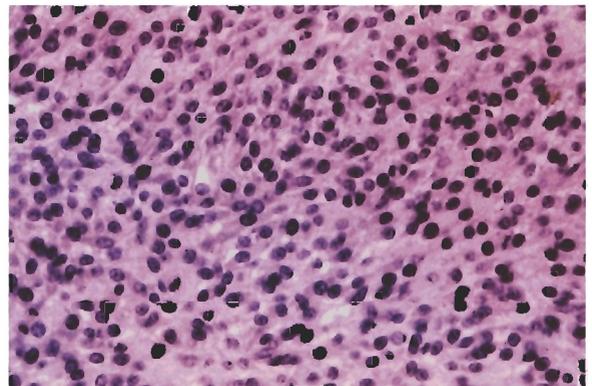


Figura 4. Aspecto histológico de un tumor cerebral ENU-inducido en la rata Wistar. Se observa el aspecto indiferenciado de las células tumorales, con imágenes de mitosis (hematoxilina-eosina).

les se detectaron, anatomopatológicamente, 28 tumores con las mismas características histológicas que las que presentaban los tumores del grupo control (Figura 5). El análisis de supervivencia glo-

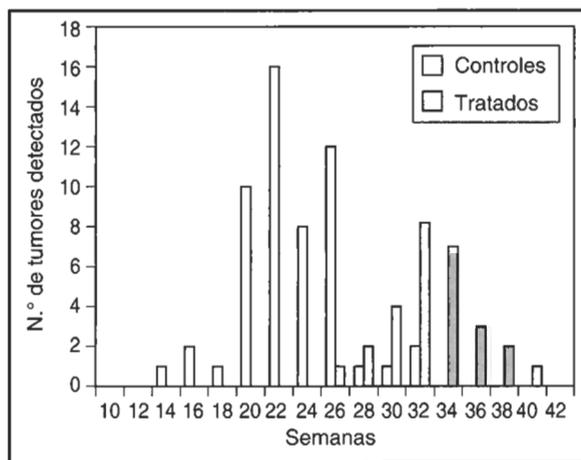


Figura 5. Gráfica que muestra los tumores detectados en los dos grupos experimentales del estudio, a lo largo de las 40 semanas de seguimiento de los animales. En el grupo de animales tratados con FCN se observa un menor número de tumores y un retraso en su aparición.

bal de ambos grupos experimentales, correspondiente al tiempo de seguimiento, mostró una marcada diferencia estadística ($p < 0,0001$) con mayor supervivencia de los animales que recibieron FCN en el intervalo de edad comprendido entre los 60 y 90 días tras el nacimiento (Figura 6).

DISCUSIÓN

La exposición a ENU durante la segunda mitad de la gestación es un modelo experimental bien conocido y considerado como un modelo válido para la obtención de tumores neurogénicos en las ratas hijas (3, 12). Con esta técnica se consiguen tumores intracraneales prácticamente en el 100% de la descendencia, con un período de latencia también conocido y que depende, sobre todo, de la cepa del animal y de la cantidad de carcinógeno administrado a la rata madre gestante. En la rata Wistar, los tumores se hacen patentes clínicamente tras una latencia de algunos meses tras el nacimiento, apareciendo en primer lugar tumores con aspecto de schwannomas malignos (entre los tres y seis meses de edad) y unos meses más tarde (entre los 6 y 12 meses) tumores que recuerdan a los oligodendrogliomas de la neuropatología humana. Independientemente del aspecto histológico de estos tumores, los estudios de inmunohistoquímica y de microscopía electrónica permiten su clasificación como tumores neuroectodérmicos indiferenciados, con tendencia a la diferenciación neuroblástica (3, 12-15).

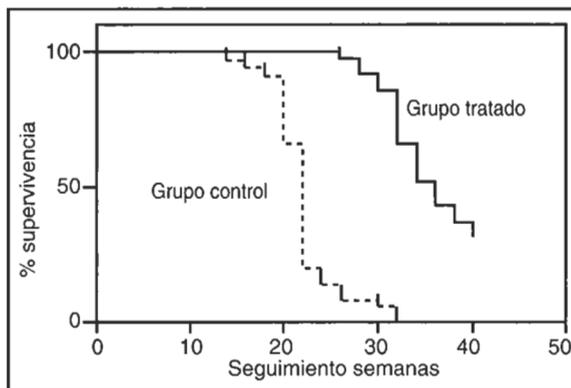


Figura 6. Gráficas de supervivencia actuarial, en los dos grupos experimentales, a lo largo del periodo de tiempo del estudio. Se observa una clara diferencia ($p < 0,0001$) con mayor supervivencia de los animales que recibieron FCN.

Teniendo en cuenta la potencial diferenciación neuroblástica de estos tumores experimentales, en el presente estudio, hemos tratado de verificar la hipótesis de que el FCN puede ser un modulador biológico, con un efecto inhibitor, sobre el desarrollo de tumores neuroblásticos, a través de una acción de maduración y diferenciación de sus células constituyentes. Para ello, a un grupo de ratas expuestas prenatalmente al carcinógeno les hemos administrado dos ciclos de FCN por vía sistémica en un momento en que se está produciendo la fase inicial del desarrollo tumoral y en el que, de acuerdo con observaciones previas, se pueden detectar los primeros focos de microtumores en localización intracerebral.

Los resultados que hemos obtenido muestran que, con el modelo experimental utilizado, la administración sistémica de FCN 7S tiene un efecto inhibitor del desarrollo tumoral, disminuyendo significativamente el número de tumores ENU-inducidos y retrasando su momento de aparición. La marcada diferencia entre las curvas de supervivencia de los dos grupos experimentales, a lo largo del período de seguimiento de los mismos, refleja el efecto antineoplásico que se ha obtenido en el grupo de animales tratados con FCN. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el modelo de neurocarcinogénesis química por ENU es susceptible de una biomodulación en las primeras fases del desarrollo neoplásico (2, 18) y están de acuerdo con descripciones previas a favor de que el FCN puede inhibir el desarrollo de tumores del nervio trigémino ENU-inducidos (19, 20). El retraso en la aparición de tumores ENU-inducidos por efecto de sustancias biomoduladoras puede ser explicado como consecuencia de que estas

sustancias hacen a las células nerviosas inmaduras más resistentes a la acción del carcinógeno, posiblemente favoreciendo y acelerando su maduración (2, 20). En cualquier caso, el FCN 7S se confirma como un claro biomodulador de los tumores cerebrales inducidos en la rata Wistar por exposición prenatal a ENU y plantea su posible utilidad clínica en patología humana, en el caso de tumores neuroblásticos o en tumores neuroectodérmicos indiferenciados cuyas células conserven potencialidad de diferenciación neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

- LILLEHEY K O, MITCHELL D H, JOHNSON S D, Mc CLEARLY E L, KRUSE C A. Long-term follow-up of patients with recurrent malignant gliomas treated with adjuvant adoptive immunotherapy. *Neurosurgery*. 1991; 28: 16-23.
- VAQUERO J, ARIAS A, ZURITA M, COCA S, OYA S, MORALES C. Influence of recombinant interleukin-2 and tumor necrosis factor- α on the development of ethyl-nitrosourea-induced brain tumors. *Oncol Res*. 1992; 4: 275-280.
- VAQUERO J, ARIAS A, ZURITA M, COCA S, OYA S, MORALES C. Tumores cerebrales experimentales inducidos por Etil-nitrosourea en la rata Wistar. *Neurocirugía*. 1992; 3: 206-211.
- CLAISSE P J, LANTOS P L, ROSCOE, P J. Analysis of N-ethyl-nitrosourea-induced brain carcinogenesis by sequential culturing during the latent period. II. Morphology of the tumors induced by cell cultures. *J Natl Cancer Inst*. 1978; 61: 391-398.
- GROSSI-PAOLETTI E, PAOLETTI P, PEZZOTTA S, SCHIFFER D, FABIANI A. Experimental brain tumours induced in rats by nitrosourea derivatives. Part 2. Morphological aspects of nitrosoethylurea tumours obtained by transplacental induction. *J Neurol Sci*. 1970; 11: 573-581.
- JÄNISCH W, SCHREIBER D. En: D D Bigner, J A Swenberg (eds), *Experimental tumors of the Central Nervous System*. Michigan: Upjohn Co Michigan, 1977.
- JONES E L, SEARLE C E, SMITH W T. Tumours of the nervous system induced in rats by the neonatal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *J Pathol*. 1973; 109: 123-139.
- LANTOS P L, COX D J. The origin of experimental brain tumours: a sequential study. *Experientia*. 1976; 32: 1457-1468.
- LANTOS P L, PILKINGTON G J. The development of experimental brain tumours a sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. *Acta Neuropathol*. 1979; 45:167-175.
- LANTOS P L. Chemical induction of tumours in the nervous system. En: D G T Thomas, D. I. Graham (eds), *Brain Tumours. Scientific basis, clinical investigation and current therapy*. London: Butterworth, 1980; pp 85-108.
- SWENBERG J A, WECHSLER W, KOESTNER A. The sequential development of transplacentally induced neuroectodermal tumors. *J Neuropath Exp Neurol*. 1972; 31: 202-210.
- VAQUERO J, OYA S, COCA S, ZURITA M. Experimental induction of primitive neuro-ectodermal tumours in rats: a re-appraisal of the ENU-model of neuro-carcinogenesis. *Acta Neurochir (Wien)*. 1994; 131: 294-301.
- VAQUERO J, COCA S, MORENO M, OYA S, ARIAS A, ZURITA M, MORALES C. Expression of neuronal and glial markers in so-called oligodendroglial tumors induced by transplacental administration of ethyl-nitrosourea in the rat. *Histol Histopathol*. 1992; 7: 647-651.
- VAQUERO J, COCA S, ZURITA M, OYA S, ARIAS A, MORALES C. Expression of neuronal markers in the so-called ENU-induced schwannomas. *Neuro Report*. 1992; 3: 619-621.
- VAQUERO J, COCA S, ZURITA M, OYA S, ARIAS A, MORENO M, MORALES C. Synaptophysin expression in ependymal tumors induced by ethyl-nitrosourea in rats. *Am J Pathol*. 1992; 141: 1037-1041.
- DIMPFEL W, MÖLLER W, MENGES U. Ganglioside-induced neurite formation in cultured neuroblastoma cells. En: M M Rapport, A Gorio (eds), *Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development, and Repair*. New York: Raven Press, New York. 1981; pp 119-134.
- MC ALLISTER A K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58: 1054-1060.
- SCHIFFER D, GIORDANA M T, PEZZOTTA S, PAOLETTI P. Chemotherapeutic effects of some alkylating derivatives on the development of tumors transplacentally induced in rats by ENU. *Acta Neuropathol*. 1976; 34: 21-31.
- VINORES S A. Nerve growth factor modification of the ethyl-nitrosourea model for multiple schwannomas. *Ann N Y Acad Sci*. 1986; 486: 124-131.
- VINORES S A, KOESTNER A. Reduction of Ethylnitrosourea-induced neoplastic proliferation in rat trigeminal nerves by nerve growth factor. *Cancer Res*. 1982; 42: 1038-1040.