

Original

Tumores de partes blandas inducidos en ratas Wistar mediante Ni₃S₂ y/o 3,4-benzopireno

J. Fernández-Sanz, S. Rivero-García, F.J. Torres-Olivera, M. Salguero-Villadiego, R. González-Cámpora y H. Galera-Davidson

Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla.

SUMMARY

Background: The authors studied the capacity of nickel sulphide (Ni₃S₂) and of 3,4-benzopyrene (BZP) to induce soft-tissue neoplasms. Materials and Methods: 10 mg of Ni₃S₂ and 10 mg of 3,4 BZP individually or in conjunction were administered to 120 male white Wistar rats by subcutaneous, intramuscular and retroperitoneal routes, suspended in 0.4 ml, penicillin G procaine by means of a single injection. As controls, a group of 30 rats were injected with the vehicle used to administer the carcinogen only. The experiment lasted 53 weeks (a natural year). Results: A total of 64 sarcomas were obtained: 42 malignant fibrohistiocytomas, 11 rhabdomyosarcomas, 8 leiomyosarcomas, 1 fibrosarcoma, 1 neurogenic sarcoma and 1 non-differentiated tumor. A shorter latent period was observed in the groups injected with BZP and in those animals injected intramuscularly. Similarly, a greater incidence of rhabdomyosarcomas in the group treated with Ni₃S₂ was observed, whilst in the groups injected with Ni₃S₂ malignant fibrohistiocytomas predominated. Conclusion: The experimental model we used and the performance of several biopsies by other authors may be of great assistance in histogenetic studies, and may perhaps clarify an eventual convergent or divergent differentiation in malignant fibrous histiocytomas.

Patología 1997; 30(2): 127-133.

Key words: Soft tissue tumours - Nickel sulphide - 3,4-benzopyrene - Wistar rats

RESUMEN

*Planteamiento: Los autores estudian la capacidad del sulfuro de níquel (Ni₃S₂) y del 3,4-benzopireno (BZP) para inducir neoplasias en los tejidos blandos. Material y Métodos: Se administraron 10 mg de Ni₃S₂ y 10 mg de 3,4-benzopireno, individual o conjuntamente, a un total de 120 ratas Wistar macho por vía intramuscular, subcutánea y retroperitoneal, suspendidos en 0,4 ml de penicilina G procaína mediante una inyección única. Se utilizaron como control un total de 30 ratas, que fueron inyectadas únicamente con el vehículo usado para administrar el carcinógeno. El experimento duró un año natural. Resultados: Se obtuvieron un total de 64 sarcomas: 42 fibrohistiocitomas malignos, 11 rhabdomyosarcomas, 8 leiomyosarcomas, un fibrosarcoma, un sarcoma neurogénico y un tumor indiferenciado. Se observó un periodo de latencia más corto en los grupos tratados con BZP y en los que se empleó la vía i.m. Asimismo, se observó mayor incidencia de rhabdomyosarcomas en el grupo tratado con Ni₃S₂, mientras que en los grupos de BZP y BZP+Ni₃S₂ predominaron los fibrohistiocitomas malignos. Conclusión: El modelo experimental utilizado, asociado a sucesivas tomas biopsicas por otros autores, permitiría estudiar aspectos histogenéticos que podrían aclarar una eventual diferenciación convergente o divergente de los fibrohistiocitomas malignos. **Patología 1997; 30(2): 127-133.***

Palabras clave: Tumores de partes blandas - Sulfuro de níquel - 3,4-benzopireno - Ratas Wistar

INTRODUCCIÓN

En 1962, Gilman (1) describió un sencillo método de carcinogénesis mediante sales de níquel que se utilizó posteriormente para inducir sarcomas y carcinomas en diferentes órganos (2, 3). Maenza y cols. (4) consiguieron una más rápida y eficaz inducción de los sarcomas utilizando como cocarcinógeno el 3,4-benzopireno (BZP). Si bien la tipificación exacta de estos tumores con las técnicas rutinarias resulta difícil, la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas y ultraestructurales ha permitido una precisa caracterización en la mayoría de los casos (5-12). Asimismo, se han estudiado, mediante biopsias sucesivas, las diferentes etapas y el mecanismo de inducción tumoral en estas neoplasias (13).

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos empleado un total de 120 ratas Wistar macho, de la misma camada, con un peso medio de $443,67 \pm 42,35$ g y 5 meses de edad, distribuidas en cuatro grupos y doce subgrupos de 10 animales cada uno, según se indica en la Tabla 1. El sulfuro de níquel (Ni_3S_2) (Aldrich Chem, Co.), con una pureza de 99,9%, se administró a la dosis de 10 mg y el 3,4-benzopireno (BZP), del mismo laboratorio y 98% de pureza, a la dosis de 10 mg, ambos suspendidos en 0,4 ml de penicilina G procaína (Antibióticos SA, España). La inyección subcutánea (s.c.) se realizó en el

área interescapular, la intramuscular (i.m.) en los músculos extensores de la pata posterior derecha y la retroperitoneal (r.p.), previa anestesia intraperitoneal, con 0,25 ml de solución de ketamina en 100 mg/l, abertura de la pared abdominal, separación del paquete intestinal y acceso a la grasa perirrenal en condiciones de asepsia. El cierre de la musculatura abdominal se realizó en catgut estéril 2/00, y la piel con seda de igual calibre. Con las ratas del grupo control se procedió de forma idéntica a los tres grupos anteriores, si bien tan sólo se administró 0,4 ml del vehículo utilizado.

Todos los animales se examinaron dos veces por semana, sacrificando para su estudio a aquellos que habían desarrollado un tumor ≥ 3 cm de diámetro, así como aquellos otros cuyo estado general deteriorado comprometiese su vida. En este caso se anestesiaban con éter previamente a su sacrificio, que, en los animales supervivientes, se realizó transcurrido el año natural desde el comienzo del experimento.

Microscopia óptica

Se tomaron uno o varios bloques de tejido, según el tamaño del tumor y de las metástasis, y se fijaron en formol tamponado al 10%, incluyéndose rutinariamente en parafina. Los cortes de 4 μm se tiñeron con HE. Aquellos casos que lo precisaron se tiñeron, además, con azul alciano, tinción de plata para reticulina y tricrómico de Masson.

Tabla 1. Grupos experimentales, incidencia tumoral, periodo de latencia y metástasis.

Grupo	Nº de ratas	Vías de administración	Incidencia (%) ¹	Latencia (días) ²	Metástasis (%)
I (Ni_3S_2)	30	A: s.c.	2/7 (28,5)	343 \pm 16	0/2 (0)
		B: i.m.	10/10 (100)	213,5 \pm 25,6	4/10 (40)*
		C: r.p.	0/9 (0)	Sin tumores	0/0 (0)
II (BZP)	30	A: s.c.	9/10 (90)	238 \pm 53,1	1/9 (11) (pulmón)
		B: i.m.	9/9 (100)	160,4 \pm 25,7	5/9 (55)**
		C: r.p.	9/9 (100)	221,1 \pm 60,2	0/9 (0)
III (Ni_3S_2 +BZP)	30	A: s.c.	7/10 (70)	280,4 \pm 68,3	1/7 (14) (pulmón)
		B: i.m.	10/10 (100)	200,5 \pm 37,3	2/10 (20)***
		C: r.p.	8/8 (100)	268,9 \pm 64,1	2/8 (25) (pulmón)
IV (Control)	30	A: s.c.	0/10 (0)	Sin tumores	0/0 (0)
		B: i.m.	0/10 (0)	Sin tumores	0/0 (0)
		C: r.p.	0/9 (0)	Sin tumores	0/0 (0)

¹Ratas con sarcomas/ratas valorables. ²Media \pm desviación típica. *Un tumor con metástasis en pulmón; dos en linfáticos, r.p., y otro en pulmón y linfáticos, r.p. **Dos metástasis en pulmón; una en pulmón, hilio pulmonar y linfáticos, r.p., y dos en linfáticos, r.p. ***Una en linfáticos, r.p., y otra retroperitoneal.

Inmunohistoquímica

Si los cortes histológicos seleccionados inicialmente no permitían un diagnóstico de certeza, a otros nuevos se aplicó una seleccionada batería de anticuerpos con el propósito de identificar un patrón de diferenciación; no se pretendió realizar un estudio de la distribución o coexpresión de marcadores en estas neoplasias. Se utilizó la técnica de la avidina-biotina peroxidasa con anticuerpos comerciales contra la proteína S-100, 1:100 (Dako, Dinamarca), desmina, prediluido (Biomed, EE.UU.), mioglobina, 1:200 (Dako, Dinamarca), panactina, 1:100 (Dako, Dinamarca) y α_1 -antitripsina, 1:200 (Dako, Dinamarca), previa tripsinización en los tres últimos casos.

Microscopia electrónica

Se fijaron bloques milimétricos en glutaraldehído-ácido ósmico y se incluyeron en Spurr, según las técnicas habituales. Se practicaron cortes ultrafinos con un micrótomo LKB, que se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uracilo. La observación se realizó en microscopio electrónico ZEISS EM 900.

Tratamiento estadístico de los resultados

Hemos empleado el test de Student, el de Kulber y Leiber con la corrección de Ku, y el de χ^2 de Pearson con la corrección de Yates.

RESULTADOS

Los resultados de la carcinogénesis en cada grupo con sus datos más relevantes se resumen en la Tabla 1 (los tipos histológicos aparecen reflejados en la Tabla 2). En el grupo testigo se observó un linfoma mediastínico espontáneo, y en los grupos IIIA y IIIC, tres fibromas subcutáneos también espontáneos.

El periodo de latencia más corto entre la inyección de los carcinógenos y la aparición de tumores (Tabla 1) se obtuvo empleando el BZP ($p < 0.001$), seguido del que recibió Ni₃S₂+BZP. El más largo fue el del Ni₃S₂, que incluso no llegó a provocar tumores por vía r.p. Si consideramos la vía de administración, independientemente del carcinógeno administrado, la i.m. fue la que mostró un periodo de latencia más corto ($p < 0.02$), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre la s.c. y la r.p. ante el mismo carcinógeno. En cuanto a la capacidad carcinogénica, el BZP, administrado aisladamente o en combinación con el Ni₃S₂, indujo significativamente más tumores ($p < 0.001$) que el Ni₃S₂, independientemente de la vía de administración empleada. La vía i.m. en cualquiera de los grupos presentó una incidencia tumoral del 100%, significativamente superior a las demás vías ($p < 0.001$). Por el contrario, las vías s.c. y r.p., que no mostraron diferencias significativas entre sí, registraron una incidencia tumoral significativamente más baja con cualquiera de los carcinógenos empleados. Además, se apreciaron asociaciones estadísticamente

Tabla 2. Clasificación histológica de los tumores.

Grupo	Vías de administración	Nº de sarcomas	Rabdomio-sarcomas	Fibrohistiocitomas malignos	Leiomiomas	Fibrosarcomas	Sarcomas neurogénicos	Tumores indiferenciados	Tumores espontáneos
I (Ni ₃ S ₂)	A: s.c.	2	0	2	0	0	0	0	1 linfoma
	B: i.m.	10	6	1	3	0	0	0	0
	C: r.p.	0	0	0	0	0	0	0	0
II (BZP)	A: s.c.	9	0	5	2	1	0	1	0
	B: i.m.	9	1	5	2	0	1	0	0
	C: r.p.	9	0	8	1	0	0	0	0
III (Ni ₃ S ₂ +BZP)	A: s.c.	7	2	5	0	0	0	0	2 fibromas
	B: i.m.	10	1	9	0	0	0	0	0
	C: r.p.	8	1	7	0	0	0	0	1 fibroma
IV (Control)	A: s.c.	0	0	0	0	0	0	0	1 linfoma
	B: i.m.	0	0	0	0	0	0	0	0
	C: r.p.	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		64	11	42	8	1	1	1	5

significativas ($p < 0.001$) entre los tipos tumorales provocados por el Ni_3S_2 y rhabdomyosarcomas, y entre BZP y fibrohistiocitomas malignos, con independencia de la vía de administración. Tales diferencias no fueron significativas entre los grupos II y III. Finalmente, tan sólo en el grupo I, y por vía i.m., hemos hallado una proporción de rhabdomyosarcomas y leiomyosarcomas más alta que la de fibrohistiocitomas malignos.

Rhabdomyosarcomas

Presentaron patrones pleomórfico y embrionario, similares a los descritos en el hombre, y frecuentemente entremezclados con el mismo tumor. En los pleomórficos abundaban las células multinucleadas con amplio citoplasma acidófilo, que recordaban a mioblastos diferenciados y a miotúbulos (Fig. 1). Ultraestructuralmente, las células menos diferenciadas mostraron escaso citoplasma, pobre en organelas y miofilamentos; en cambio, las más diferenciadas poseían un amplio citoplasma rico en mitocondrias, vesículas pinocitóticas, ribosomas libres, y retículo endo-

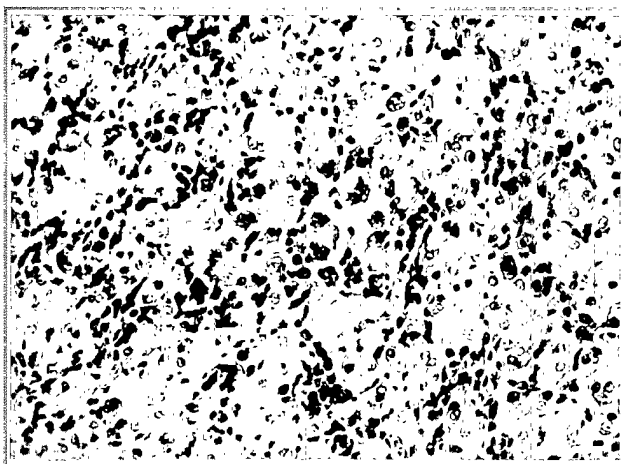


Figura 1. Rhabdomyosarcoma que muestra células pequeñas más indiferenciadas y grandes multinucleadas y de citoplasma acidófilo que parecen microtúbulos (original, HE $\times 160$).

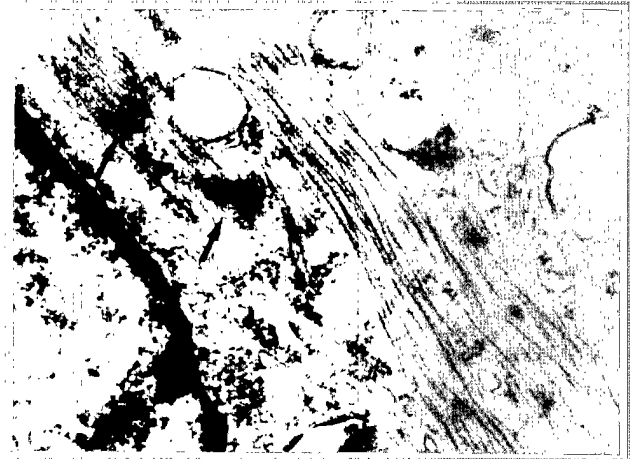


Figura 2. Rhabdomyoblasto con filamentos citoplásmicos agrupados en bandas Z primitivas (flechas) (original, ME $\times 20.000$).

plásmico rugoso prominente. Aunque observamos miofilamentos agrupados en bandas Z primitivas (Fig. 2), nunca pudimos demostrar la presencia de sarcómeras bien organizadas. Inmunohistoquímicamente (Fig. 3 y Tabla 3)

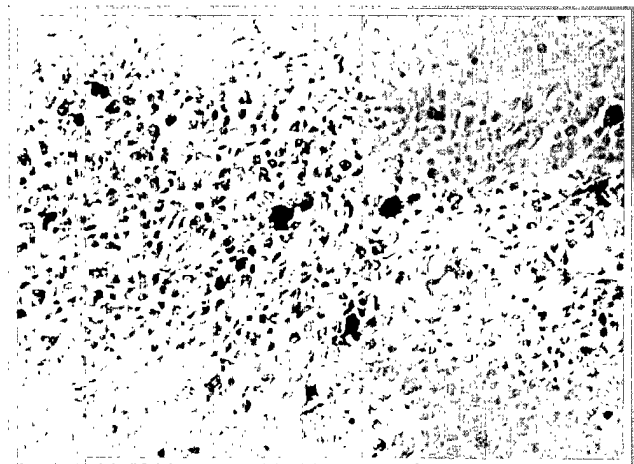


Figura 3. Rhabdomyosarcoma con células de diferentes tamaños que muestran positividad citoplásmica para la mioglobina inmunoperoxidasa (original, $\times 100$).

Tabla 3. Patrón inmunohistoquímico de los distintos tipos tumorales.

	Desmina	Actina	Mioglobina	Lisozima	α_1 -antitripsina	S-100
Fibrosarcomas	—	0/1	0/1	0/1	—	0/1
Fibrohistiocitomas malignos	—	0/1	0/2	1/2	0/1	0/1
Rhabdomyosarcomas	2/2	7/7	9/9	0/8	—	0/7
Leiomyosarcomas	1/1	7/7	0/6	0/6	—	0/6
Sarcomas neurogénicos	—	0/1	0/1	0/1	—	1/1
Tumores indiferenciados	0/1	0/1	0/1	0/1	—	0/1
Linfomas	—	0/1	0/2	0/1	—	0/1

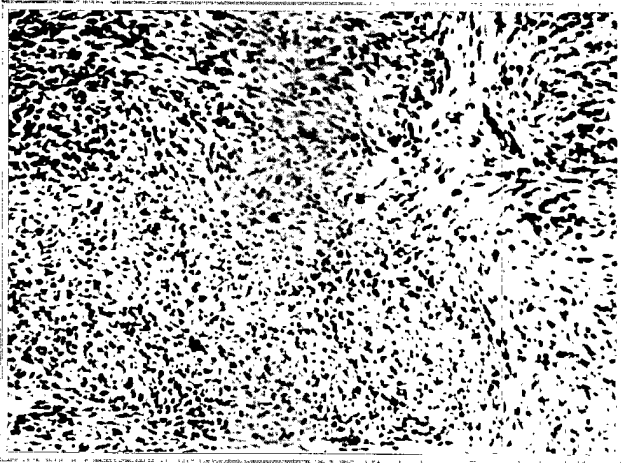


Figura 4. Área de un fibrohistiocitoma maligno constituido por células fusiformes que adoptan un patrón estoriforme (ángulo superior derecho) (original, HE $\times 133$).

encontramos positividad para la panactina, la desmina y la mioglobina.

Fibrohistiocitomas malignos

De mayor a menor frecuencia fueron pleomórficos (34), fusocelulares (5) y sarcomas histiocíticos (3), compuestos de variables proporciones de células redondas de hábito histiocítico, entremezcladas con otras fusiformes, dispuestas con el característico patrón verticilar o estoriforme (Fig. 4). Con cierta frecuencia se detectaron células gigantes multinucleadas tipo Touton y áreas con estroma mixoide. Tan sólo en un caso pleomórfico apareció positividad débil para lisozima (Tabla 3). Ultraestructuralmente mostraron una varia-

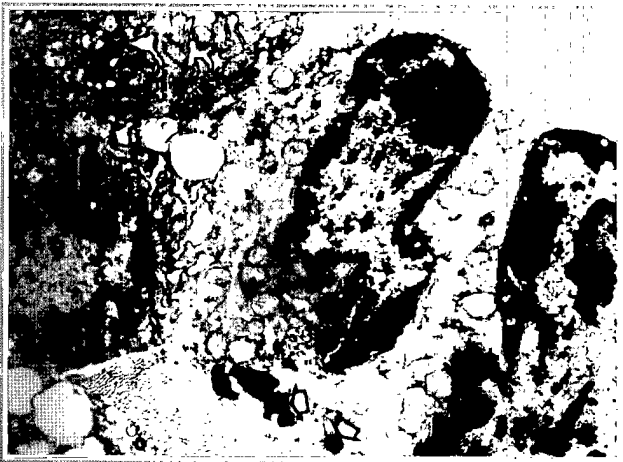


Figura 5. Fibrohistiocitoma maligno pleomórfico. Se aprecia un fibroblasto característico (izqda.) y un histiocito multinucleado con lisosomas y mitocondrias citoplásmicas (flechas) (original, ME $\times 400$).

ble cantidad de mitocondrias, abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso, cuerpos lisosomales y vesículas lipídicas (Fig. 5).

Leiomiomas

Están formados por células fusiformes alargadas de núcleo oval con extremos romos, dispuestas en fascículos entrecruzados. Su atipia nuclear fue evidente y su actividad mitótica elevada. Ultraestructuralmente destacó la presencia de filamentos de actina, formando los característicos cuerpos densos (Fig. 6), retículo endoplásmico dilatado, la abundancia de vesículas micropinocitóticas y la escasez de mitocondrias. Inmunohistoquímicamente destacó la positividad citoplásmica para la panactina y la desmina (Tabla 3).

Sarcoma neurogénico

Se trata de un tumor fusocelular de núcleos semejantes a los de los fibroblastos y moderado grado de atipia. Las técnicas de inmunohistoquímica revelaron positividad para la S-100 (Fig. 7), que fue orientativa para el diagnóstico, ya que ultraestructuralmente no encontramos signos evidentes de diferenciación neurogénica.

Fibrosarcoma

Sus células, de núcleo oval con moderada cantidad de cromatina y citoplasma fusiforme basófilo pálido, se disponían en fascículos entrelazados que constituían un patrón en espina de arenque. La matriz extracelular era rica en

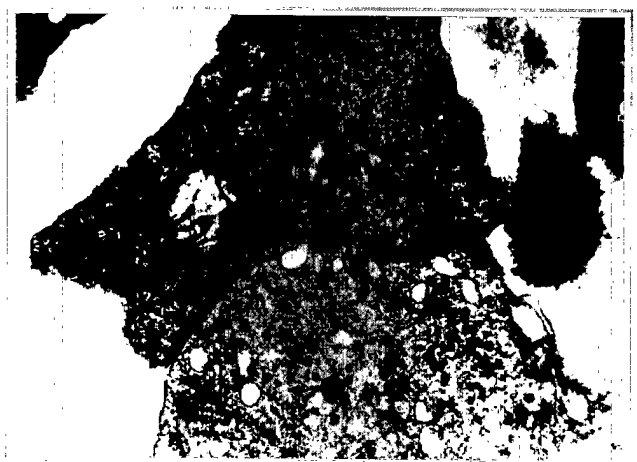


Figura 6. Leiomiomasarcoma. En la imagen puede observarse la presencia de cuerpos densos citoplásmicos (flechas) (original, ME $\times 12.000$).

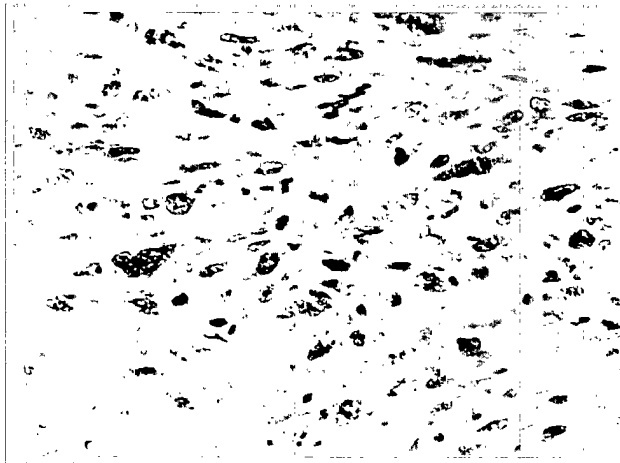


Figura 7. Sarcoma neurogénico con células fusiformes que muestran positividad predominante nuclear para la S-100 (original, inmunoperoxidasa $\times 40$).

fibras colágenas. Pese a la escasez de figuras mitóticas y a su moderada anaplasia, invadió la grasa y músculo adyacentes. Los escasos histiocitos observados son inflamatorios y carecen de atipias. Ultraestructuralmente, se observaron núcleos ovales de contornos irregulares y citoplasma con abundante retículo endoplasmático rugoso (RER) y otras organelas menos desarrolladas (Fig. 8). Inmunohistoquímicamente fue negativo para todos los antisueros empleados.

Sarcoma indiferenciado

De hábito fusocelular y patrón arremolinado, tan sólo fue discretamente positivo para la S-100 en algunas células.

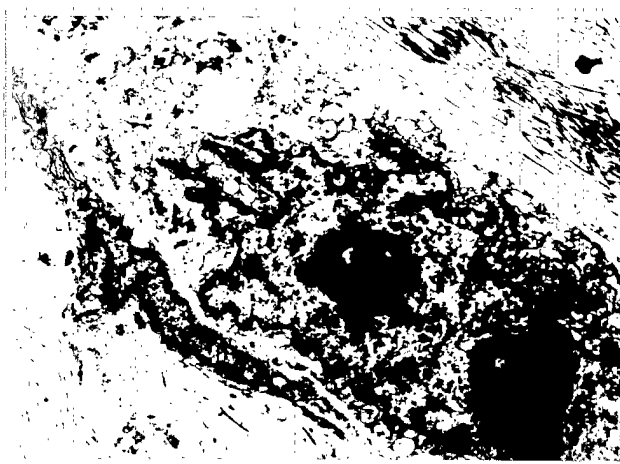


Figura 8. Fibroblastos tumorales que presentan un contorno nuclear característicamente festoneado, cromatina adosada a la membrana nuclear y dos nucléolos. Citoplasma con abundante retículo endoplasmático rugoso (original, ME $\times 3000$).

Ultraestructuralmente, las células destacaban por su pobreza en organitos citoplásmicos y por la ausencia de estructuras indicativas de diferenciación hacia cualquier estirpe celular.

DISCUSIÓN

La vía i.m., en comparación con las demás, mostró un periodo de latencia más corto en la inducción tumoral. Solamente en el grupo III (Ni_3S_2 +BZP), y por vía r.p., hemos observado un periodo de latencia más corto con respecto a la vía s.c., pero no en relación a la vía i.m. Shibata y cols. (5), utilizando Ni_3S_2 como carcinógeno, no encontraron diferencias significativas entre las vías s.c. e i.m., y además consiguieron provocar neoplasias retroperitoneales, si bien en menor porcentaje que por otras vías y con un periodo de latencia más prolongado. Nosotros no hemos encontrado en ningún caso diferencias estadísticamente significativas al comparar las vías s.c. y r.p., desconociendo el periodo de latencia de Ni_3S_2 r.p. al no haber conseguido ningún tumor en este grupo. Al estudiar la eficacia de los diferentes carcinógenos por cada una de las vías, no encontramos diferencias significativas entre los grupos BZP y BZP+ Ni_3S_2 , pero sí entre ellos y el del Ni_3S_2 aislado, que presentó una incidencia tumoral más baja ($p < 0.001$).

Al correlacionar el desarrollo de un determinado tipo tumoral con alguno de los carcinógenos administrados o la vía empleada, destacan como hechos significativos estadísticamente:

- 1) Con el Ni_3S_2 hemos obtenido una proporción más alta de rhabdomyosarcomas, mientras que con el BZP, solo o combinado con Ni_3S_2 , un predominio de fibrohistiocitomas.
- 2) No hemos podido establecer diferencias en la incidencia de los tipos tumorales en relación con la vía de administración; en consecuencia, esta última no influyó en el desarrollo de un determinado tipo tumoral. No hemos podido reproducir los resultados de Maenza y cols. (4), que consiguieron una mayor incidencia tumoral con un menor periodo de latencia asociando Ni_3S_2 a BZP respecto a la administración por separado de cada uno de los carcinógenos. Nuestro trabajo no apoya, por consiguiente, una acción cocarcinogénica entre ambos compuestos.

Consideramos nuestro caso de linfoma mediastínico y fibromas subcutáneos de naturaleza espontánea al haberse desarrollado lejos del punto de aplicación de los carcinógenos y fuera de sus eventuales vías de drenaje linfático. Los

tumores espontáneos aparecen hasta en un 5% de las ratas según algunos autores (12). Tan sólo un tumor presentó un patrón histológico sugestivo de diferenciación mixta: fibrosarcoma/fibrohistiocitoma maligno; pero como no mostró evidencias inmunohistoquímicas ni ultraestructurales que apoyasen tal diagnóstico, finalmente fue clasificado como indiferenciado. La inmunohistoquímica, si se dispone de los antisueros adecuados, es de gran ayuda en la caracterización de buena parte de los tumores de partes blandas (6, 10-12). A nosotros nos ha sido de gran valor discriminativo para distinguir los tumores fusocelulares de los tumores con células multinucleadas más o menos pleomórficas. La microscopia electrónica también es un apreciable recurso para este propósito, si bien las limitaciones de muestreo que implica la técnica pueden hacerla a veces, como en nuestro sarcoma neurogénico, menos eficaz que la anterior. Precisamente en este caso, sabemos que la positividad para la S-100, si bien no es específica ni aparece en todos los casos, al expresarse en un sarcoma fusocelular, aporta un dato de indudable valor para el diagnóstico de esta entidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gilman, J.P.W. *Metal carcinogenesis. II. A study of the carcinogenic activity of cobalt, copper, iron, and nickel compounds.* Cancer Res 1962; 22: 158-162.
2. Damjanov, I., Sunderman, F.W., Mitchell, J.M., Alpass, P.R. *Induction of testicular sarcoma in Fischer rats by intratesticular injection of Ni_3S_2 .* Cancer Res 1978; 38: 268-276.
3. Jazmin, G., Ropelle, J.L. *Renal carcinomas and erythrocytosis in rats following intrarenal subsulfide.* Laboratory Invest 1976; 71-78.
4. Maenza, R.M., Pradhan, A.M., Sunderman, F.W. *Rapid induction of sarcomas in rats by combination of nickel sulfide and 3,4-Benzopyrene.* Cancer Res 1971; 31: 2067-2071.
5. Shibata, M., Izumi, K., Sano, N., Nobuya, S., Akiko, A., Otsuka, H. *Induction of soft tissue tumours in F 344 rats by subcutaneous, intramuscular, intra-articular, and retroperitoneal injection of Nickel sulphide (Ni_3S_2).* J Pathol 1989; 157: 263-274.
6. Sano, N., Shibata, M., Izumi, K., Otsuka, H. *Histopathological and immunohistochemical studies on Nickel Sulphide Induced tumours in F 344 rats.* Jpn Cancer Res 1988; 79: 212-221.
7. Brooks, J.J. *Immunohistochemistry of soft tissue tumors. Progress and prospects.* Human Pathol 1982; 13: 969-974.
8. Brooks, J.J. *The significance of double phenotypic patterns and markers in human sarcoms. A new model of mesenchymal differentiation.* Am J Pathol 1986; 125: 113-123.
9. Johnson, T.L., Lee, M.W., Meiss, J.M., Zarbo, R.J., Crissman, J.D. *Immunohistochemical characterization of malignant peripheral nerve sheath tumors.* Surg Pathol 1991; 4: 121-135.
10. Altmansberger, M., Weber, K., Droste, R., Osborn, N. *Desmin is a specific marker for rhabdomyosarcomas of human and rat origin.* Am J Pathol 1985; 118: 85-95.
11. Miettinen, M., Lehto, V.P., Badley, R.A., Virtanen, I. *Antibodies to expression of intermediate filament proteins in the prognostic and classification of human tumors.* Ultrastruct Pathol 1984; 7(2-3): 83-107.
12. Graves, P., Barsoum, N. *Tumors of soft tissues.* En: Turusov, V.S., Muhr, R. (Eds.). Pathology of tumors in laboratory animal. Vol I: Tumors of the rat (2ª ed.). International Agency for Research on Cancer (IARC) Scientific Publications Nº 99, Lyon, Francia 1990; 597-623.
13. Lumb, G., Sunderman, W. *Mechanism of malignant tumor induction by nickel subsulphide.* A Clin and Laboratory Science 1988; 18(5): 353-366.

