

## Cuantificación de la capacidad de inhibición de la tripsina en el suero de animales con cáncer experimental

J. MILLAN NUÑEZ-CORTES, A. SENRA VARELA y D. ESPINOS PEREZ.

Cátedra de Patología General y Propedéutica Clínica. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz y Cátedra II de Patología y Clínica Médicas. Universidad Complutense. Madrid.

(Recibido, 10 de septiembre de 1982.)

Se ha realizado un estudio experimental en ratones albinos Swiss, a los que se ha inoculado cáncer ascítico de Ehrlich, valorando las modificaciones de la capacidad de inhibición de la tripsina (TIC) en el suero en función del desarrollo del tumor.

Se encontraron variaciones estadísticamente significativas del TIC, con elevación progresiva, en los días sucesivos de crecimiento del tumor. Asimismo, la elevación del TIC fue paralela y guarda correlación directa con el peso del tumor ( $r = 0,92$ ) y con la celularidad del mismo ( $r = 0,92$ ).

Por ello, la capacidad de inhibición de la tripsina es un índice de desarrollo tumoral y de masa tumoral. Dicha actividad antitripsina puede estar en relación con la actividad proteásica tumoral.

### INTRODUCCION

En base a la actividad proteolítica de las células tumorales, que es un hecho ya demostrado<sup>1-6</sup>, debe existir una actividad antiproteásica, cuantificable, en presencia de dichas células. La actividad proteolítica debe producir modificaciones en los niveles de inhibidores de proteasas, que se pueden cuantificar en diversos medios orgánicos del animal con cáncer, y dichas modificaciones pueden ser un reflejo, a su vez, de la presencia del tumor y correlacionarse con el desarrollo de éste.

Nuestro objetivo ha sido disponer de un modelo de tumor experimental de corta evolución y de características sobradamente conocidas, donde poder estudiar las variaciones de los inhibidores de proteasas, en concreto de la actividad antitripsina, durante todo el curso de la enfermedad cancerosa. Por ello, hemos escogido el cáncer ascítico de Ehrlich inoculado al animal de experimentación, en el que hemos seguido la evolución tumoral en función de los datos objetivos del proceso: peso del tumor en cada momento y celeridad tumoral. Nuestro objetivo ha sido observar la posible correlación y paralelismo entre las variaciones de la actividad antitripsina y la evolución del tumor.

### MATERIAL Y METODOS

El tumor experimental escogido ha sido una línea celular de cáncer ascítico de Ehrlich existente en el Instituto Nacional de Oncología, procedente del Instituto Gustave Roussy. Se trata de un tumor suficientemente conocido y experimentado, condiciones para un ensayo de esta índole.

El animal de experimentación escogido ha sido el ratón albino Swiss, habiendo seleccionado hembras (por ser más fácil la inoculación intraperitoneal de líquido ascítico) de edad aproximada de 3 meses, con peso de unos 25 g. cada animal.

La extensión tumoral se puede evaluar de dos formas: peso del tumor (diferencia entre el peso total del animal inoculado en el momento del sacrificio y el peso del animal sin tumor) y grado de celularidad cancerosa en el líquido ascítico. Los dos parámetros son un buen índice de la extensión tumoral, dado que el cáncer ascítico de Ehrlich puede producir un crecimiento estrictamente ascítico, sin

que existan implantes sólidos, si es que se ha inoculado correctamente; esto permite tener un peso bastante exacto del tumor sólo mediante el avenado de la ascitis en el momento del sacrificio. Por otra parte, la medida de la celularidad (determinando incluso el porcentaje de células vivas y muertas) es de técnica relativamente sencilla<sup>7</sup>.

La inoculación intraperitoneal del tumor procedente de una cepa en el 12.º día de evolución se ha realizado a 4 grupos de 10 animales cada uno, manteniendo un grupo de 10 animales como grupo control, con inoculación «ficticia». Una vez inoculado el tumor se fue sacrificando una camada de 10 animales, en los días 7, 9, 12 y 15 del experimento, mientras que el grupo control llegó hasta el final (día 15). La cepa celular utilizada por nosotros tiene una evolución de unos 16 días por término medio, pero no hemos querido arriesgarnos hasta llegar al día 16 por el riesgo de que murieran antes del sacrificio, en cuyo caso los fenómenos de descomposición son muy rápidos por el grado de caquexia extrema del animal, lo cual puede interferir el experimento.

La extracción de sangre se ha realizado por punción intracardiaca, extrayendo sangre en cantidad suficiente para obtener 20 mcl. de suero. El procesamiento del suero para determinar la capacidad de inhibición de la tripsina se ha llevado a cabo el mismo día de su extracción.

La medida del TIC sérico (capacidad de inhibición de la tripsina) se ha realizado siguiendo el método de ERLANGER y cols.<sup>8</sup>, utilizando como sustrato el BAPNA (N-alfa-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilina), sobre el que actúa la tripsina en presencia del inhibidor del suero. La actividad detectada en un espectrofotómetro se mide a través del color amarillo originado por la liberación de grupos p-nitroanilina, expresándose el TIC en mg. de tripsina inhibidos por ml. de suero<sup>7</sup>.

### RESULTADOS

El grupo de 10 animales controles tenía un peso medio de  $26 \pm 1,2$  g. al inicio del experimento y  $26,5$  g. al final, sin variación significativa.

En todos los animales inoculados el crecimiento fue exclusivamente líquido, sin implantes sólidos peritoneales. Asimismo, el líquido ascítico nunca fue hemorrágico. A cada animal se le inocularon 650.000 células, con una viabilidad del 96 % (porcentaje de células vivas). El grupo de animales sacrificados el 7.º día (grupo A) pesó al inicio  $20,2 \pm 1,32$  g., alcanzando un peso de  $23,2 \pm 3,42$  g. el día de su

sacrificio. Los animales sacrificados el 9.º día (grupo B) tenían un peso medio de  $24,2 \pm 1,46$  g. al inicio y  $30 \pm 3,52$  g. en el momento del sacrificio. En el grupo sacrificado el 12.º día (grupo C) varió su peso desde  $26,5 \pm 0,5$  g. hasta  $32,12 \pm 1,74$  g. (día 12), mientras que en los sacrificados el día 15 (grupo D) la variación fue desde  $26,8 \pm 0,97$  g. hasta  $33,45 \pm 3,83$  g. (día 15). Las diferencias entre el peso final y el inicial vienen a significar el peso del tumor, y sus variaciones se pueden observar en la figura 1.

La celularidad media del tumor en los días 7, 9, 12 y 15 la podemos encontrar en el cuadro 1, y su representación gráfica en las figuras 2 (células/ml. de ascitis) y 3 (número total de células).

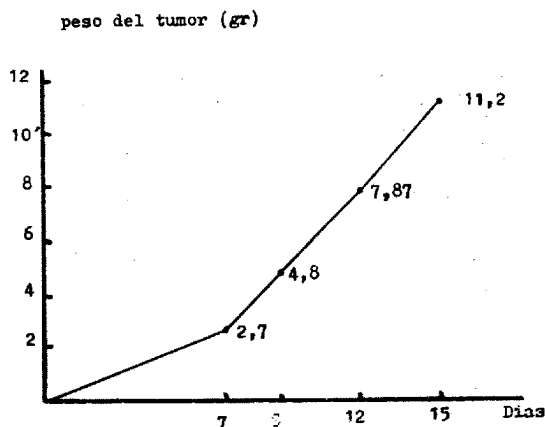


Fig. 1.—Evolución del peso del cáncer ascítico de Ehrlich.

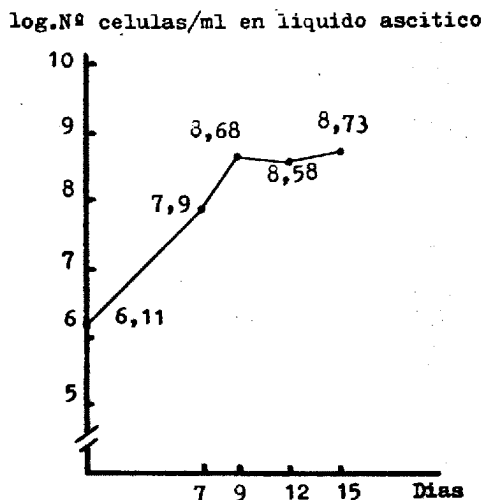


Fig. 2.—Evolución de la concentración celular del cáncer ascítico de Ehrlich.

Las variaciones del TIC sérico fueron las siguientes: en el grupo control; el día 1, encontramos un valor medio de 0,70 mg/ml. y 0,71 mg/ml. al finalizar el ensayo (día 15), sin evidenciarse, por lo tanto, variaciones estadísticamente significativas. El grupo A, sacrificado el 7.º día, tenía un TIC en suero con un valor medio de  $0,91 \pm 0,05$  mg/ml.; el grupo B (9.º día),  $0,95 \pm 0,042$  mg/ml., el grupo C (12.º día),  $0,964 \pm 0,03$  mg/ml., y el grupo D (15.º día),  $0,977 \pm 0,027$  mg/ml. La evolución de la cifra del TIC en los distintos grupos se puede ver en la figura 4. Las diferencias alcanzaban los valores de significación que se expresan en el cuadro 2.

Se correlacionaron el peso del tumor en las distintas fases con la celularidad del mismo, encontrando un coeficiente de correlación de  $r = 0,99$ , lo que nos indica que ambos parámetros son indicativos, juntos o por separado, del gra-

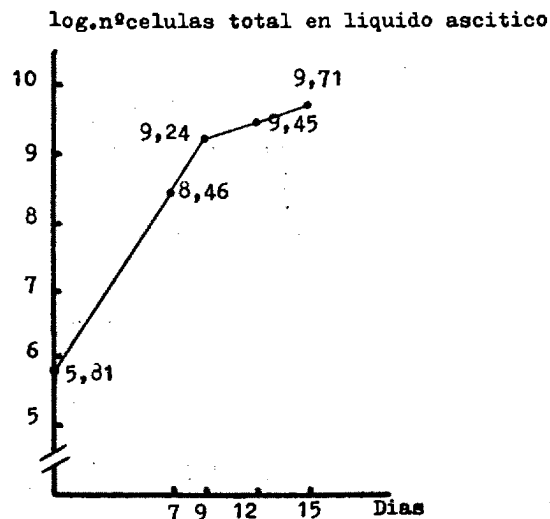


Fig. 3.—Evolución de la celularidad total del cáncer ascítico de Ehrlich.

do de extensión tumoral (Fig. 5). Por otra parte, existe una buena correlación ( $r = 0,92$ ) entre el TIC sérico y el peso del tumor (Fig. 6), así como entre el TIC en suero y la celularidad del tumor, ya sea concentración celular, con un coeficiente de correlación de 0,92 (Fig. 7), o número total de células tumorales en la ascitis ( $r = 0,92$ ) (Fig. 8).

#### DISCUSION Y COMENTARIOS

Los estudios en tumores ascíticos han abierto un nuevo campo en la «oncología cuantitativa»<sup>9</sup>. El cáncer ascítico de Ehrlich fue obtenido en 1932 a partir de una forma ascítica de adenocarcinoma mamario del ratón<sup>10</sup>. Es un tumor especialmente útil para valorar el crecimiento en función del aumento numérico de las células neoplásicas. Es un tumor experimental de fácil manejo, de crecimiento relativamente rápido y de características bien conocidas. Por ello nos ha parecido el ideal para la realización de este trabajo. Las células representan un 25 % del peso del cáncer ascítico de Ehrlich y el extracto nuclear de nucleoproteínas representa el 30 % de las células cancerosas<sup>11-13</sup>. Es fácil obtener el número de células en líquido ascítico observando al microscopio una muestra de líquido, teñida para diferenciar las células muertas de las vivas (viables). Este número de células hay que corregirlo en base al volumen de líquido. Con el número total de células tenemos un índice correcto de la masa tumoral. Como la celularidad suele ser mayor en el día 12 de evolución, es en ese momento cuando debe realizarse la inoculación, que se debe hacer con prontitud, ya que la viabilidad disminuye al pasar el tiempo debido a que el porcentaje de células muertas es paralelo al fenómeno de la coagulación y estos líquidos son muy espesos y se coagulan con extrema facilidad.

La determinación del TIC es un método sencillo que permite cuantificar la actividad antitripsina, suma del efecto de los diversos inhibidores que están presentes. Las diversas técnicas con las que se puede determinar el TIC se basan en enfrentamiento del suero con tripsina en presencia de un sustrato. Si la tripsina no se neutraliza totalmente en el suero puede atacar al sustrato, dando una reacción cuantificable. La base es igual en todas las técnicas descritas, variando exclusivamente dos parámetros: el sustrato utilizado y la cantidad de suero utilizada. Para la determinación hay que tener en cuenta tres premisas: 1) El suero, si se almacena, se debe guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ . 2) La solución del sustrato debe conservarse a  $+4^{\circ}\text{C}$  durante un

CUADRO 1

CELULARIDAD DEL CANCER ASCITICO DE EHRlich EN LAS DISTINTAS FASES EVOLUTIVAS

Grupo	Día de sacrificio	Células/ml. de ascitis	N.º total de células
A .....	7	$797,77 \times 10^5 \pm 226,90 \times 10^5$	$288,76 \times 10^6 \pm 91,23 \times 10^6$
B .....	9	$4798,4 \times 10^5 \pm 2509,01 \times 10^5$	$1768,72 \times 10^6 \pm 824,27 \times 10^6$
C .....	12	$388 \times 10^6 \pm 154,62 \times 10^6$	$2826,22 \times 10^6 \pm 1656,01 \times 10^6$
D .....	15	$543,2 \times 10^6 \pm 490,57 \times 10^6$	$5213,38 \times 10^6 \pm 4679,65 \times 10^6$

CUADRO 2

SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS EN EL TIC SERICO EN LAS DISTINTAS FASES EVOLUTIVAS. P: TEST DE STUDENT. NS: NO SIGNIFICATIVO

Controles				
Grupo A .....	0,0005	< 0,0025	Grupo A	
Grupo B .....	p	< 0,0005	0,0025 < p	< 0,05
Grupo C .....	p	< 0,0005	0,005 < p	< 0,01
Grupo D .....	p	< 0,0005	0,0005 < p	< 0,0025
			Grupo B	Grupo C
			NS	NS
			NS	NS

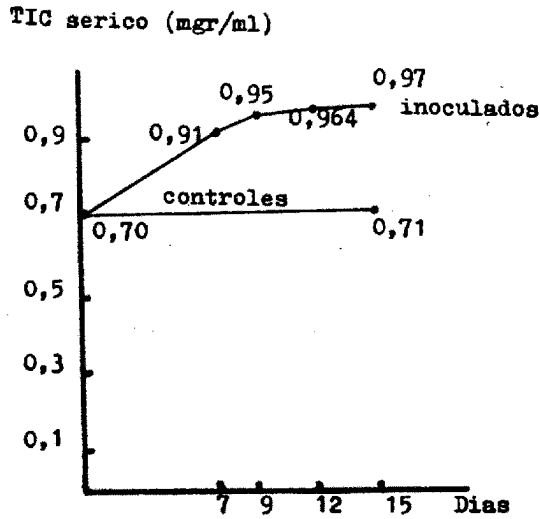


Fig. 4.—Variaciones del TIC sérico en los animales del grupo control y en los inoculados con cáncer ascítico de Ehrlich.

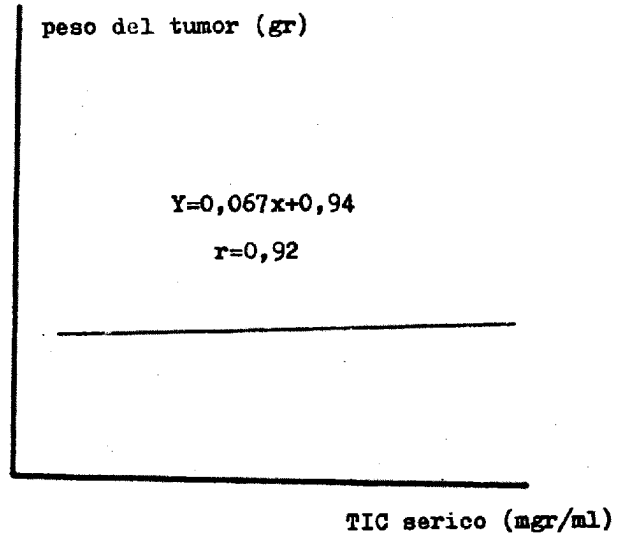


Fig. 6.—Correlación entre TIC sérico y peso del cáncer ascítico de Ehrlich.

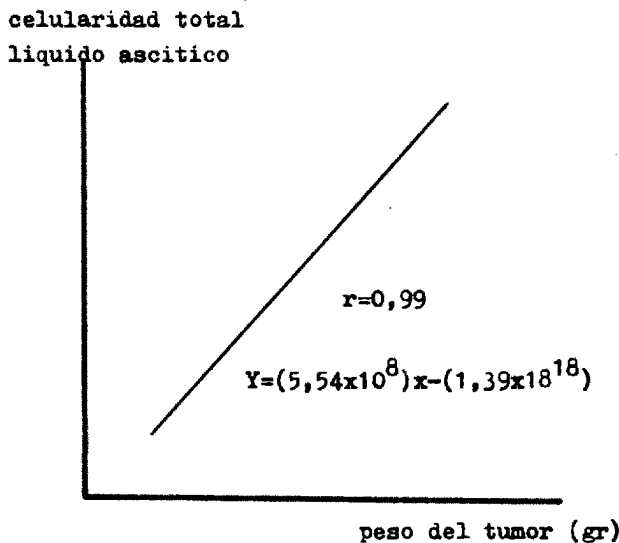


Fig. 5.—Correlación entre peso del tumor y celularidad total del cáncer ascítico de Ehrlich.

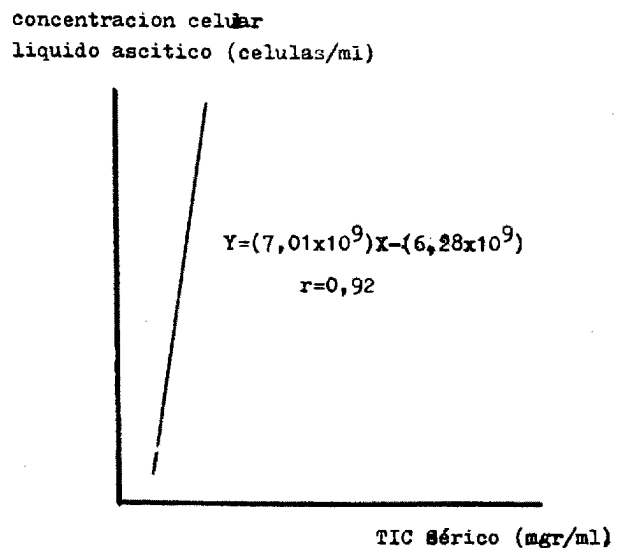


Fig. 7.—Correlación entre TIC sérico y concentración celular en líquido de cáncer ascítico de Ehrlich.

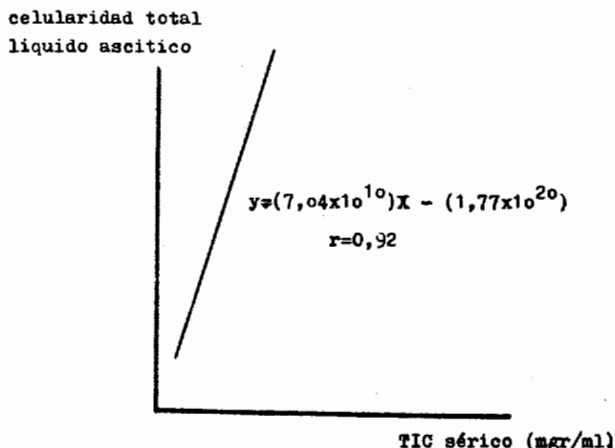


Fig. 8.—Correlación entre TIC sérico y celularidad total del cáncer ascítico de Ehrlich.

tiempo no superior a una semana, y 3) La estabilidad de la tripsina depende de que existan iones calcio en el medio, por lo que es siempre necesario usar un tampón con calcio. Los valores normales del TIC en suero humano se han cifrado entre 1,07 y 1,3 mg/ml, con desviaciones típicas entre 0,24 y 0,26<sup>14-16</sup>.

En el tumor experimental utilizado hemos conseguido que el peso del tumor, el volumen de la ascitis y la celularidad de la misma se correlacionen perfectamente, por lo que cualesquiera de ellos puede ser un parámetro del desarrollo del tumor. Por ello, hemos correlacionado el TIC en suero con el grado de extensión tumoral que se evaluó en función de estos parámetros.

En el grupo control no se modificó el peso del animal desde el comienzo del ensayo hasta el final. En el resto de los grupos de animales inoculados evolucionó el peso paralelamente al desarrollo del tumor; esta evolución del peso tumoral en los animales cancerosos fue la esperada para esta cepa y en estas circunstancias.

El TIC no se modificó en el grupo con inoculación ficticia, pero sí se hizo en los distintos grupos, produciéndose una elevación marcada en el 7.º día; es decir, la elevación de la capacidad de inhibición de la tripsina está en relación con el peso del tumor y es precoz (aumenta la actividad antitripsina a medida que progresa el tumor).

Pero resulta más exacto la determinación de la celularidad del líquido, que aumentó bruscamente al comienzo del ensayo, y el TIC sérico está igual de bien correlacionado con la concentración celular y con el número total de células cancerosas en líquido ascítico tumoral.

Por todos estos hechos constatamos que el TIC en suero se modifica de forma paralela, y todo ello en relación con la extensión tumoral. Ello quiere decir que la elevación de los inhibidores de proteasas en el organismo es secundaria a la presencia del tumor y proporcional al desarrollo del mismo. Es, por tanto, un índice de progresión del tumor y es un índice de masa tumoral. Dicha elevación reactiva a la presencia de los enzimas proteolíticos tumorales nos puede servir para seguir el desarrollo del tumor.

#### BIBLIOGRAFIA

- O'BRIEN, E. T.; THORNES, R. D.; O'BRIEN, D., y HOGAN, B.—Inhibition of antiplasmin, and fibrinolytic effect of protease in patients with cancer.—*Lancet*, 1, 173, 1968.
- GOLDBERG, D. M.; McALLISTER, R. A., y ROY, A. D.—Proteolytic enzymes in adenocarcinoma of the human colon.—*Brit. J. Cancer*, 23, 735, 1969.
- BRECHER, A. S.; PUGATCH, R. D., y KONIG, M.—The hydrolytic activity

in normal human and malignant tissue.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131, 828, 1969.

- KAZAKOVA, O. V., y OREKHOVICH, V. M.—Neutral proteinase from the tissue of transplantable sarcoma of rats.—*Biokhimiya*, 34, 73, 1969.
- NICHOLSON, R. I.; BAGNALL, I., y DAVIES, M.—Lysosomal enzymes in 7, 12 dimethyl benzanthracene induced mammary carcinomas after ovariectomy.—*Eur. J. Cancer*, 9, 313, 1973.
- KAMPSCHEIDT, R. F., y WELLS, D.—Acid hydrolase activity during the induction and transplantation of hepatomas in rats.—*Cancer Res.*, 29, 1028, 1969.
- MILLAN NUÑEZ-CORTES, J.—Aspectos biológicos y clínicos de la alfa-1-antitripsina, con especial referencia a los procesos tumorales malignos.—Ed. Univ. Compl. Madrid, 1981.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N., y COHE, W.—The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.—*Arch. Biochem.*, 95, 271, 1961.
- HAUSCHAKA, T. S.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 63, 637, 1956.
- LOWENTHAL, H., y JAHN, G.—*KrebsGarsch.*, 37, 439, 1932.
- VALLADARES, Y.—Ensayos terapéuticos con nucleoproteínas extraídas de núcleos de células cancerosas.—*Rev. Esp. Oncol.*, 8, 127, 1959.
- VALLADARES, Y.—Propiedades biológicas de las nucleoproteínas cancerosas.—*Rev. Esp. Oncol.*, 8, 85, 1959.
- VALLADARES, Y.—Leucemia producida por el ácido desoxirribonucleico obtenido del cáncer ascítico de Ehrlich.—*Rev. Esp. Oncol.*, 8, 109, 1959.
- MOROZ, S. P.; CUTZ, ze.; BALFE, J. W., y SASS-KORTSAK, A.—Glomerulonefritis membranoproliferativa en la cirrosis infantil asociada a déficit de alfa-1-antitripsina.—*Pediatrics* (ed. esp.), 1, 157, 1976.
- ERIKSSON, S.—Studies in alpha-1-antitrypsin deficiency.—*Acta Med. Scand.* (suppl.), 177, 1, 1965.
- TALAMO, R. C.; ALLEN, J. D.; KAHAN, M. G., y AUSTEN, K. F.—Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency.—*New. Engl. J. Med.*, 278, 345, 1968.

#### SUMMARY

An experimental study has been carried out on Swiss albino mice, which have been inoculated Ehrlich's ascitic cancer, assessing the changes in the trypsin inhibiting capacity (TIC) in the serum, in relation to the growth of the tumour.

Statistically significant variations were found in the TIC, with a gradual increase, during the successive growth of the tumour. The increased TIC was also parallel and is directly related to the weight of the tumour ( $r = 0.92$ ) and to its cellularity ( $r = 0.92$ ).

Hence, the trypsin inhibiting capacity constitutes an index of tumour development and of tumoural mass. The said anti-trypsin activity may be linked to the tumoural, protease activity.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Verf. berichten über eine experimentelle Studie an weissen «Swiss»-Mäusen, bei denen der Aszitische Ehrlich-krebs eingepflegt wurde, sowie über die Bewertung der Modifikationen der Inhibitions-kapazität des Trypsins im Serum gemäss der Entwicklung des Tumors.

Sie stellten bei diesen Experimenten statistisch bedeutsame Veränderungen der genannten Inhibitions-kapazität, mit einer progressiven Erhöhung in den auf das Wachstum des Tumors folgenden Tagen fest. Die Erhöhung der Inhibitions-kapazität des Trypsins verlief parallel zum Gewicht des Tumors ( $r = 0,92$ ) und zu der Zellularität desselben ( $r = 0,92$ ), zu denen direkte Wechselbeziehungen bestanden.

Aus diesem Grunde kann die Inhibitions-kapazität des Trypsins als ein index für die tumorale Entwicklung und die tumorale Masse angesehen werden. Die genannte antitrypsinische Aktivität steht möglicherweise in Beziehung zu der tumorale proteaseaktiven Aktivität.

#### RÉSUMÉ

On a réalisé une étude expérimentale sur des souris albins Swiss à qui on a inoculé cancer ascitique de Ehrlich, estimant les modifications de la capacité d'inhibition de la tripsine (TIC) dans le sérum, en fonction du développement de la tumeur.

On trouva des variations statistiquement significatives du TIC, avec élévation progressive, dans les jours suivants de croissance de la tumeur. L'élévation du TIC fut de même parallèle et garde corrélation avec le poids de la tumeur ( $r = 0,92$ ) et avec sa cellularité ( $r = 0,92$ ).

C'est pour cela que la capacité d'inhibition de la tripsine est un indice de développement tumoral et de masse tumorale. Cette activité antitrypsinique peut être en rapport avec l'activité protéasique tumorale.