

123
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA

EVALUACION HISTOLOGICA DE LA ACTIVIDAD
ONCOLITICA DE LOS EXTRACTOS DE
GERMINACION DE
Clostridium M-55 y Bacillus megaterium QMB 1551
EN UN MODELO ANIMAL DE FIBROSARCOMAS.

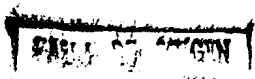
PROYECTO DE INVESTIGACION (TESIS)

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Ma. del Carmen Mejia Vázquez





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página.
RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	18
DISCUSION.....	46
CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	58

RESUMEN

Para evaluar claramente el fenómeno de oncolisis que se produce al utilizar extractos de germinación de *Clostridium M-55* y *Bacillus megaterium* QMB 1551, en el modelo de fibrosarcomas en hamster que anteriormente habíamos estandarizado, fue necesario analizar los cambios que sufre esta tumoración en relación a su tiempo de evolución en ausencia de los extractos a probar (cambios degenerativos propios de un tumor con una elevada tasa de crecimiento).

Para esto, se observaron diariamente las tumoraciones y a diferentes tiempos (8, 10, 13, 15, 17 y 21 días) se sacrificaron los animales para extirpar los tumores, los que se analizaron en cuanto a su aspecto macroscópico (tamaño, consistencia, áreas de necrosis) e histopatológico (características de las células, áreas de necrosis y hemorragia), encontrando que aproximadamente hasta los 15 días de evolución del tumor, éste conserva características típicas de un fibrosarcoma, además de que se observan áreas dispersas de necrosis asociada a hemorragia en un porcentaje de menos del 50 %; pero a partir de los 17 días de evolución se encuentran fibroblastos indiferenciados, aumenta la necrosis asociada a hemorragia encontrándose hasta en un 50 %, aumento en el número de mitosis y la vascularización del tejido adiposo se hace más evidente.

Por tal motivo, para poder apreciar el fenómeno de oncolisis debido a productos específicos presentes en los extractos de germinación que se analizaron, se utilizaron animales con fibrosarcomas de 7 días de evolución, los cuales generalmente tenían un tamaño de 1 cm².

Cuando estos tumores recibieron los extractos de germinación correspondientes a los 90 min para *Bacillus megaterium* QMB 1551 y a los 150 y 185 min para *Clostridium* M-55, encontramos que macroscópicamente disminuye la consistencia 5 días después de haber recibido el extracto, e histológicamente las áreas de necrosis no asociadas a hemorragia se encontraron en un porcentaje mayor al 50 %. Las áreas de necrosis no asociadas a hemorragia fueron más evidentes cuando se utilizaron los extractos de *Bacillus megaterium* QMB 1551.

INTRODUCCION

La Anatomía Patológica surgió en el siglo XV de una preocupación por conocer las causas de las enfermedades. Fue desarrollada primeramente por Antonio Benivieni (1440-1502) y dos siglos después se consideró una ciencia formal, siendo sustentada por Giovanni Battista Morgagni (1682-1771). Al realizar las primeras disecciones en cadáveres humanos, el anatomista francés Xavier Bichat (1771-1802) observó las capas y estructuras macroscópicas apreciando las diferentes texturas y denominándolas "tissus" (12, 21).

Con el uso de técnicas más refinadas y potentes se amplió el campo de la Anatomía Patológica y de este modo fue posible conocer que las células son unidades funcionales y anatómicas de la vida y pueden sufrir alteraciones nutricionales, funcionales, pasivas o formativas, llegando incluso a alterarse significativamente, de tal manera que se originen neoplasias (21).

El término Histología fue creado en 1819 por el especialista en microscopía A.F.J.K. Mayer (8) y se definió como el estudio de los diferentes tejidos de un organismo (11). La Histología y la Anatomía Patológica son ciencias que se encuentran íntimamente ligadas, para ésta última el campo de acción es el estudio científico de la naturaleza de la enfermedad, sus causas,

procesos, desarrollo y consecuencias (21). El objetivo de la Histopatología es el saber cuando un tejido se encuentra en un estado anormal, por lo que se hace necesario tomar en cuenta varias características específicas de cada entidad.

Los tejidos normales pueden volverse anormales perdiendo las características de crecimiento regulado y transformarse en neoplasias debido a factores intrínsecos y extrínsecos del huésped (24). Pueden presentarse tanto en plantas como en animales y comparten características comunes, como es el hecho de que todas las neoplasias provienen de células preexistentes y una vez desencadenado el proceso, su crecimiento es atípico, continuo e irreversible y en la mayoría de los casos no hay causa aparente (12).

Las neoplasias se clasifican en benignas y malignas de acuerdo a su estirpe histológica y al comportamiento biológico que presenten. Las primeras no son agresivas y generalmente no ponen en peligro la vida; a diferencia de las malignas que son poco diferenciadas, crecen rápido, presentan muchas figuras mitóticas, producen metástasis e invaden tejidos cercanos (4).

La clasificación de las neoplasias toma en cuenta las características tanto macroscópicas y microscópicas.

Macroscópicamente los órganos y tejidos con neoplasias benignas y malignas presentan aumento de volumen, cambio de color, textura y consistencia. Microscópicamente, las neoplasias benignas

mostrarán células con escasos cambios en relación con las células normales y en el caso de las malignas las células pueden presentar un tamaño más grande lo normal, con bordes irregulares, formas bizarras, pleomórficas, con presencia de células gigantes, vacuolización citoplasmática y nuclear, nucleólos prominentes pudiendo ser más de uno, escotaduras nucleares, pérdida de la relación núcleo-citoplasma y mitosis anormales (4).

Las neoplasias en nuestro país ocupan el 4° lugar dentro de las causas más importantes de mortalidad. En adultos, de entre las 15 localizaciones anatómicas más frecuentes del cáncer destacan: el de mama, el cérvico-uterino, el de tejido linfático (linfomas), próstata, estómago, sistema hematopoyético (leucemias) y pulmón, representando más del 50 % del total de casos registrados durante 1987 (1987 casos, registro más reciente) (5).

En niños los tipos más frecuentes de cáncer a nivel mundial son: leucemias, linfomas, retinoblastoma, neoplasias reticuloendoteliales, del Sistema Nervioso Central, intracraneal e intraespinal, del Sistema Nervioso Simpático, tumores malignos de hueso, renales, hepáticos, neoplasias de tejido suave, gonadales, de células germinales y trofoblásticas (20).

Desde hace años se han intentado encontrar alternativas terapéuticas para el cáncer diferentes a la radioterapia y la cirugía, como pueden ser una gran variedad de sustancias de bajo peso molecular y de origen microbiano (24). Se observó por

ejemplo, que algunos microorganismos clostridiales como *Clostridium histolyticum* y *Clostridium perfringens* al ser inoculados en animales con tumores, producían un efecto lítico sobre éstos (13, 18).

En 1884 Möse y Möse, reportaron que al inocular las esporas de la cepa número 55 de *Clostridium butyricum* en ratones con tumores sólidos de Ehrlich, se producía licuefacción de la zona central del tumor por destrucción celular, pero quedaba siempre una corona de células cancerosas capaces de originar un crecimiento tumoral secundario. A esto se le conoce como "Fenómeno de Möse" (17).

Diez años después, Fredette inició su trabajo con la misma cepa (6), dándole el nombre de *Clostridium oncolyticum*. Usando ratones con tumores sólidos de Ehrlich de 1 cm², encontró reducción en la tasa de crecimiento tumoral e incluso regresión total en 3 de 10 animales que habían sido inoculados con extractos de las esporas de algunos de los lotes (7). Sin embargo, en el año de 1976 murió Fredette y su trabajo quedó inconcluso.

En ese mismo año, en el Departamento de Microbiología de la E.N.C.B. se inició el Proyecto Bacterioterapia de Cáncer, cuyo objetivo general es la obtención de metabolitos microbianos que pudieran ser utilizados como una alternativa más en la terapia del cáncer.

Los primeros resultados demostraron que la germinación

de las esporas de *Clostridium* M-55 sobre cultivos celulares, destruye células de origen tumoral sin dañar a las células diploides normales. Así mismo, germinando las esporas "in vitro", a diferentes tiempos en un medio sintético, algunos de los productos liberados al medio de crecimiento al inicio de la germinación también provocaron la destrucción de células tumorales (25).

Al obtener la cinética de liberación de proteínas durante la germinación, se encontraron dos máximos de liberación que también coincidieron con el efecto oncolítico: 45 y 135-150 minutos (25)

Para continuar con el proyecto, se estableció un modelo de fibrosarcomas en hamster, donde los tumores fueron inducidos por inoculación subcutánea de células transformadas (células BHKpSV). En este modelo, se demostró que la inoculación de las esporas de *Clostridium* M-55 y de *Bacillus megaterium*, produce la destrucción de las células de la neoplasia y reduce el crecimiento tumoral (3).

Ahora, deseamos determinar cuál es el extracto de germinación de *Clostridium* M-55 y de *Bacillus megaterium* QMB 1551 que produce efecto oncolítico en este modelo tumoral. Se sabe que el proceso de germinación de ambos microorganismos es análogo (26), además de que *Bacillus megaterium* se ha estudiado ampliamente, lo que puede hacer más factible la localización del

producto responsable de la destrucción celular.

Para evaluar el efecto oncolítico fue necesario realizar un detallado estudio histológico del desarrollo del tumor, en ausencia de los extractos de germinación de ambos microorganismos y en base a ésto observar los cambios que se producen después de la inoculación de los extractos.

OBJETIVOS

- A) CARACTERIZAR HISTOPATOLOGICAMENTE UN MODELO TUMORAL DE FIBROSARCOMAS EN HAMSTERS.
- B) EVALUAR EL EFECTO ONCOLITICO DE LOS EXTRACTOS DE GERMINACION DE CLOSTRIDIUM M-55 Y BACILLUS MEGATERIUM QMB 1551 SOBRE EL MODELO TUMORAL.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL.

Reactivos.

Aceite de inmersión (Leitz)

Acido picrico (Merck)

Alcohol absoluto (Sigma)

Cloroformo (J. T. Baker)

Eosina (Sigma)

Etanol (Merck)

Formaldehído (J. T. Baker)

Gelatina (DIFCO)

Hematoxilina de Harris (Merck)

Parafina con punto de fusión de 58.5 ± 0.5 °C.

(Fisher Scientific Company).

Resina sintética (Harleco)

Xilol (J. T Baker)

- Medio para Germinación de las esporas:

Medio E 50 X (28):

$\text{HgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g

Ac. Citrico H_2O 100 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 500 g

$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 175 g

Volumen final un litro pH 7

Añadir 1 ml de cloroformo como preservativo

Al momento de usarse se debe diluir 1/50.

MÉTODOS.

Extractos de Germinación.

Fueron obtenidos en el Laboratorio de Virología de la E.N.C.B. del I.P.N. por los pasantes de Q.B.P. Homero Flores Sánchez y J. Antonio Raya Moreno.

Se utilizó la misma metodología para obtener los extractos de germinación de *Clostridium* M-55 y de *Bacillus negaterium* QMB 1551:

Se sembraron 10^7 esporas por ml, en 10 ml de medio E adicionado de glucosa al 1.5 %. Las esporas se activaron por calor (ebullición por 3 minutos para *Clostridium* M-55 y 67°C , 17 minutos para *Bacillus negaterium* QMB 1551) y se incubaron a 37°C .

La germinación se paró cada 15 minutos, retirando el tubo respectivo y poniéndolo en hielo. Los extractos se centrifugaron para separar las esporas y se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.2 μ m. Con el sedimento de cada uno de los extractos centrifugados, se hizo un frotis y se tiñó por la técnica de Gram para comprobar la germinación. Los sobrenadantes se congelaron hasta su uso para pruebas de oncolisis "in vivo", previa determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry (14).

Evaluación del Modelo de Fibrosarcomas.

A) Inducción Tumoral.

1.- Lotes de hamsters sirios de 7 días de edad, se inocularon con 10^7 células transformadas (BHK/pSV) por vía subcutánea, en la región dorsal.

2.- Los animales se midieron y observaron diariamente hasta y después de la aparición de los tumores.

3.- Los animales se sacrificaron en cámara letal, a diferentes tiempos post-aparición de los tumores: 8, 10, 13, 15, 17, y 21 días.

4.- Los tumores y los órganos susceptibles de presentar metástasis como son: riñones, pulmones, hígado, corazón, bazo y timo, se fijaron en formaldehído al 10 % para coagular los componentes y aumentar su afinidad por los colorantes.

B) Ganancia de Peso por Día del Animal y Tasa de Crecimiento Tumoral.

1.- Los animales se pesaron diariamente después de la aparición de los tumores. La ganancia de peso por día (G.P./día) del animal, se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$G.P./DIA = \frac{P_F - P_I}{D_E}$$

P_F = Peso final del animal del día en que se termina el experimento.

P_I = Peso inicial del animal del día en que se inicia el experimento.

D_E = Días que duró el experimento.

2.- Los tumores se midieron diariamente en sus dos dimensiones (largo y ancho) con la ayuda de un vernier. La tasa de crecimiento tumoral (T.C.T.) se obtuvo con la fórmula:

$$T.C.T. = \frac{M_F - M_I}{D_E}$$

M_F = Medida final del Tumor en cm^2 , del día en que se sacrificó el animal.

M_I = Medida inicial en cm^2 , del día en que se inicia el experimento.

D_E = Días que duró el experimento.

C) Estudio Histopatológico.

1.- Porciones del tumor y de los órganos fijados, se deshidrataron para sustituir toda el agua del tejido por alcohol y poderlos incluir en parafina. Se hizo de la siguiente manera: - Deshidratación en alcohol al 70 %, de 30 a 45 minutos en 10 veces el volumen del tejido.

- La deshidratación continuó cambiando a alcohol al 80 %, de 30 a 45 minutos.

- Deshidratación con alcohol al 98 %, de 30 a 45 minutos haciendo dos cambios.

- Posteriormente se deshidrató con alcohol absoluto de 30 a 45 minutos.

- Finalmente en cloroformo durante 45 minutos como último paso en la deshidratación.

- Los bloques se formaron por vaciado en parafina con un punto de fusión de $58.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, dejándose solidificar durante 12 a 18 horas.

2.- Los bloques una vez solidificados se cortaron en microtomo, obteniendo cortes de 5 μm .

3.- Los cortes se colocaron en un baño de flotación con gelatina, que ayuda al corte a adherirse al portaobjetos.

4.- Una vez secos, los cortes se colocaron en la estufa de 50°C para empezar su desparafinización, que duró 20 minutos. La

desparafinización e hidratación de los cortes continuó de la siguiente manera:

- 2 cambios de 10 minutos cada uno en xilol, (el uso de agentes aclarantes es para sustituir el alcohol y transparentar el tejido).

- hidratación en alcohol absoluto, 2 minutos.
- hidratación en alcohol al 98 %, 2 minutos.
- hidratación en alcohol al 70 %, 2 minutos.
- hidratación en agua.

5.- Los cortes se tiñeron usando la tinción de Hematoxilina-Eosina:

- tinción con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos.
- diferenciación con agua corriente hasta obtener un color liláceo.
- tinción con Eosina.

6.- Los cortes se deshidrataron (se extrae el agua del corte pasándolo por soluciones de alcohol de concentración creciente en la forma ya descrita), llegando hasta xilol.

7.- Montaje en resina.

8.- Observación al microscopio (11, 15).

Evaluación de la Actividad Oncolítica de
Clostridium M-55 y *Bacillus negaterium* QMB 1551.

A) Inducción Tumoral.

1.- Se hizo de la forma descrita con anterioridad.

B) Inoculación con Extractos de Germinación.

Los animales se dividieron en grupos experimentales (de 4 animales cada uno); cada grupo fue inoculado intratumoralmente con alguno de los diferentes extractos de germinación de *Clostridium M-55*, o de *Bacillus negaterium* QMB 1551. Los grupos Testigo no fueron inoculados.

C) Determinación de la Actividad Oncolítica.

Después de la inoculación de los diferentes extractos se determinó: la Ganancia de Peso por Día del Animal y la Tasa de Crecimiento Tumoral. También se realizó el estudio histopatológico de la manera descrita para los animales que no recibieron tratamiento.

RESULTADOS

Evaluación del Modelo de Fibrosarcomas

A) Inducción Tumoral.

Los tumores aparecieron en un promedio de 28 días post-inoculación de las células transformadas (células BHKpSV). Se localizaron subcutáneamente en el área de la región dorsal de los animales, en el sitio de inoculación.

En ambos sexos se observó una tasa de inducción tumoral del 100 %, apareciendo éstos en forma nodular o binodular. Una vez palpables se desarrollaron rápidamente (Figura 1).

Los tumores se desarrollaron como masas sólidas, redondas, sin mostrar zonas de menor consistencia. Excepto por la presencia del tumor, los animales crecieron normalmente. Al realizar la necropsia de los animales, se pudo ver que los tumores se presentaron como masas sólidas de color blanquecino (Figura 2). Se observó también que todos los órganos examinados no mostraron alteraciones macroscópicas.

B) Gainancia de Peso por día del Animal y Tasa de Crecimiento Tumoral.

El objetivo de estas mediciones fue determinar las características del desarrollo de los animales y de los tumores

inducidos, ya que previamente se ha demostrado que los animales con tumoraciones, presentan un desarrollo corporal y ganancia de peso similar al que se observa en animales en los que no se inducen tumores (1).

En la Tabla 1 se resumen los promedios de ganancia de peso por día de los animales y las tasas de crecimiento tumoral, mostrando el desarrollo de los tumores a los diferentes tiempos en que fueron sacrificados los animales. Como se puede observar, hasta los 15 días post-aparición del tumor, éstos crecen prácticamente con la misma tasa y los animales están ganando peso de igual forma que los animales sin tumor (1). Después de los 15 días los tumores reducen notablemente su tasa de crecimiento, pero en este momento han alcanzado un gran tamaño, lo que los hace difíciles de manejar y de evaluar.

TABLA 1

GANANCIA DE PESO POR DIA Y TASA DE CRECIMIENTO TUMORAL*

TIEMPO POST-APARICION DEL TUMOR. (días)	G. P. / DIA (g/día)	T ₂ G. T. (cm ² /día)
8 - 10	1.80 ± 1.88	0.42 ± 0.21
13 - 15	0.04 ± 0.02	0.39 ± 0.04
17 - 21	0.85 ± 0.27	0.12 ± 0.02

*ESTOS VALORES CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE LAS DETERMINACIONES EFECTUADAS A GRUPOS DE 8 ANIMALES EN CADA UNO DE LOS CASOS.

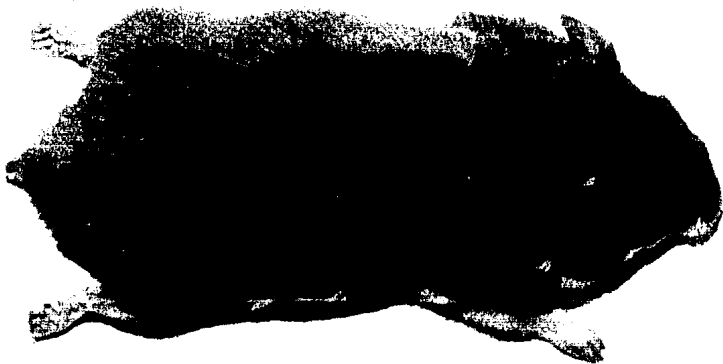


Figura 1: Animal de 5 semanas de edad con un tumor de 8 días de desarrollo.



Figura 2 : Observación macroscópica de un fibrosarcoma de 8 días de evolución.

C) Estudio Histopatológico.

El examen histopatológico mostró como características generales de estos tumores: células fibroblásticas dispuestas en haces entrelazados, áreas densas de células anaplásicas, con núcleos pleomórficos, excéntricos, hipercromáticos, con cromatina fina y difusa, con uno o dos nucleólos, escaso citoplasma y bordes celulares irregulares; además de la presencia de células gigantes de origen fibroblástico, multinucleadas, bizarras, con núcleo hipercromático. Las mitosis fueron frecuentes y generalmente atípicas (distribución anormal de cromátidas).

La histopatología reveló el carácter invasivo de la neoplasia, representado por infiltración de los haces fibroblásticos tumorales hacia el músculo estriado y en ocasiones hacia el tejido adiposo. Podemos referirnos a ella como una neoplasia de tipo maligno por sus características, compacta por la unión estrecha de los haces entrelazados de células fibroblásticas (Figura 3) y agresiva por su infiltración hacia los tejidos circundantes y su rápido crecimiento.

El estudio histopatológico de los tumores a los diferentes tiempos en que se sacrificaron los animales, reveló que los tumores hasta los 15 días post-aparición conservan sus características típicas: fibroblastos bien diferenciados y hasta un 50 % de áreas de necrosis, siempre asociadas a hemorragia (Figura 4).

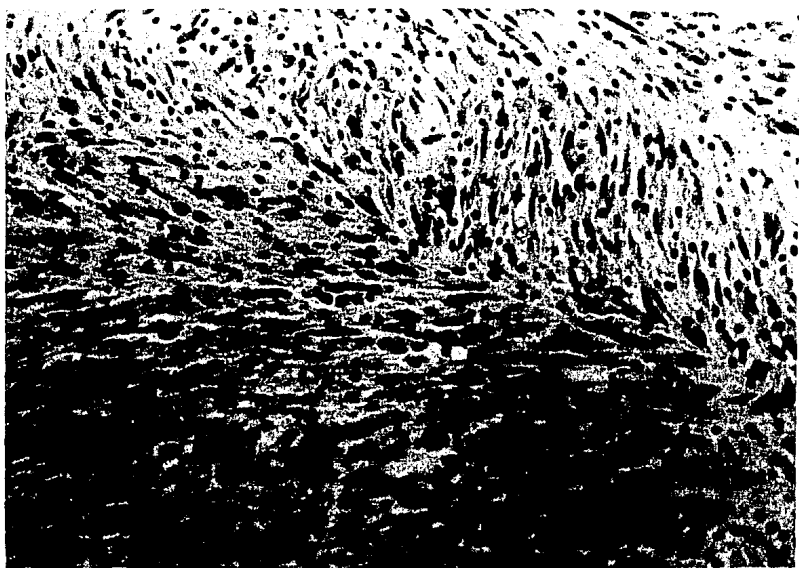


Figura 3: Imagen Histológica del corte de un fibrosarcoma típico de 8 días de evolución, teñido con Hematoxilina-Eosina (50X).



Figura 4: Imagen histológica del corte de un fibrosarcoma típico de 7 días de evolución, teñido con Hematoxilina-Eosina (50X), donde se muestra un foco incipiente de necrosis asociada a hemorragia.

A partir de los 17 días post-aparición se pierden éstas características, encontrándose fibroblastos no diferenciados y un porcentaje de necrosis asociada a hemorragia mayor del 50 %, además de que el tejido adiposo se vuelve más vacuolado (Tabla 2). La invasividad de la neoplasia así como su agresividad, aumentan en los tumores, después de 15 días post-aparición.

Para determinar la presencia o ausencia de metástasis se realizó el estudio histopatológico de todos los órganos extirpados, haciendo cortes en diferentes ángulos. No se observó metástasis en ninguno de los cortes; pero sí se encontró invasividad hacia los tejidos musculares cercanos al sitio de desarrollo del tumor.

De acuerdo con todos estos resultados, decidimos utilizar para el desarrollo de la segunda etapa de este trabajo, solamente tumoraciones que tuvieran menos de dos semanas de aparición.

TABLA 2

CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS DE TUMORES NO TRATADOS *

TIEMPO POST-APARICION DEL TUMOR (DIAS)	CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS
8 - 10	FIBROBLASTOS BIEN DIFERENCIADOS. NECROSIS INCIPIENTE, ASOCIADA A LA HEMORRACIA DESIDA AL CREGIMIENTO DEL TUMOR, APROXIMADAMENTE EN UN 20 %. MENOS DE 5 MITOSIS POR CAMPO EN 25 X. TEJIDO ADIPOSEO NORMAL.
18 - 20	FIBROBLASTOS BIEN DIFERENCIADOS. NECROSIS ASOCIADA A HEMORRACIA EN UN 50 % APROXIMADAMENTE Y EN FORMA DISPERSA. MAS DE 5 MITOSIS POR CAMPO EN 25 X VACUOLIZACION DEL TEJIDO ADIPOSEO. PERDIDA DE LA RELACION DERMIS-EPIDERMIS.
17 - 21	FIBROBLASTOS INDIFERENCIADOS CON CITOPLASMA VACUOLADO. NECROSIS ASOCIADA A HEMORRACIA EN UNA MAYOR PROPORCION DEL TOTAL DEL TUMOR; MAS DEL 50 %. MAS DE 5 MITOSIS POR CAMPO EN 25 X GRAN CANTIDAD DE TEJIDO ADIPOSEO MUY VACUOLIZADO.

LAS OBSERVACIONES CORRESPONDEN A 8 ANIMALES EN CADA CASO.

Evaluación de la Actividad Oncolítica de
Clostridium M-55 y *Bacillus negaterium* QHB 1551

A) Inducción Tumoral.

Los tumores inducidos por inoculación de células transformadas, fueron utilizados para determinar el efecto oncolítico producido por la acción de los extractos de germinación, tanto de *Clostridium M-55* como de *Bacillus negaterium* QHB 1551. Los tumores se inocularon cuando alcanzaron un tamaño de 1 cm², previa determinación del crecimiento tumoral efectivo y de acuerdo a la evaluación del modelo de fibrosarcomas; las observaciones se realizaron durante los primeros 15 días post-aparición del tumor.

B) Efecto de la Inoculación con Extractos de Germinación.

Consideramos la oncolisis como un cambio drástico en las características macroscópicas y microscópicas del tumor, ocasionado por destrucción celular.

Macroscópicamente, la oncolisis como resultado de la inoculación de los extractos de germinación, fue determinada por el reblandecimiento del tumor, que se percibe por palpación, así como por la presencia o no de necrosis y hemorragia, al momento de extraer el tumor y hacer su disección.

De acuerdo a la determinación de la concentración de

proteínas de los diferentes extractos de germinación, se pudo observar lo siguiente:

a) Para *Clostridium* M-55 la cinética de liberación de proteínas muestra varios picos de máxima concentración. De acuerdo a lo observado anteriormente por nuestro grupo de trabajo (25), los extractos inoculados fueron únicamente los que presentaron las máximas concentraciones de proteínas. En la Figura 5 se muestra la cinética del lote de extractos obtenidos y probados, así como también el número que se le asignó a cada pico de proteínas.

b) Para los extractos de germinación de *Bacillus megaterium* QMB 1551 hay 3 momentos en la germinación, de máxima liberación de proteínas, lo que nos permitió definir tres zonas diferentes: A, B y C como se observa en la Figura 6. En adelante nos referiremos a estos tres periodos con las letras A (0-45 min), B (45-80 min) y C (80-135 min).

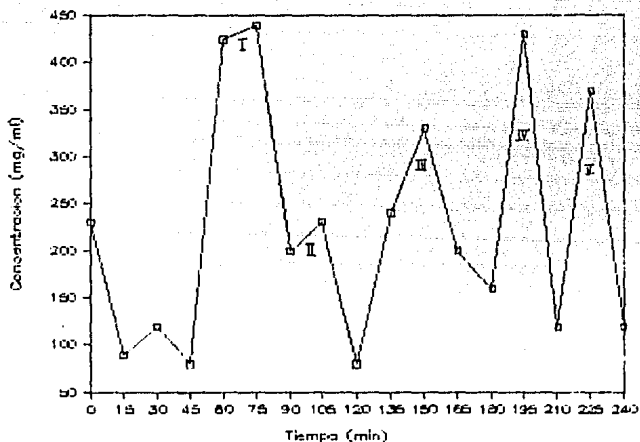
Clostridium M-55 lote 15-01

Figura 5: Cinética de liberación de proteínas durante la germinación de *Clostridium M-55*.

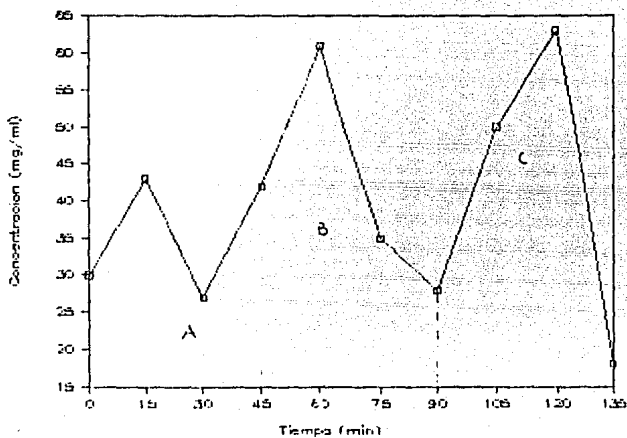
Bacillus megaterium lote 29-06-88

Figura 8: Cinética de liberación de proteínas durante la germinación de *Bacillus megaterium* QHB 1551.

En la Tabla 3 se muestran las características macroscópicas de los tumores que fueron tratados con los diferentes extractos de germinación de *Clostridium* M-55, a los 7 y 14 días post-inoculación del extracto; en donde puede observarse que los signos de hemorragia y necrosis no son privativos de los tumores tratados. No hay una diferencia significativa entre los tumores tratados y los de los Testigos, sólo el extracto de germinación del tiempo 0 min, provoca destrucción celular notable con respecto a los Testigos. En todos los tumores se presenta reblandecimiento al séptimo día, excepto los tratados con los extractos de 75 y 150 min de germinación.

TABLA 3

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LOS TUMORES TRATADOS CON LOS
EXTRACTOS DE GERMINACION DE *Clostridium M-55*.

FIGO	EXTRACTO INOCULADO ¹	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS								
		A		N		H		V		
		7	14	7	14	7	14	7	14*	
	TESTIGO	-	+++	++	++++	++	++++	+	++	
	0 min	++++	ND	+++	ND	+++	ND	+++	ND	
I	60 min	+++	+	+	++++	+	++++	++	+	
		75 min	-	++	+	++	++	++	+	++
II	105 min	++	ND	++	ND	+	ND	++	ND	
III	120 min	++	ND	++	ND	++	ND	++	ND	
		135 min	+++	ND	++	ND	+	ND	+++	ND
		150 min	-	+	+++	+++	+++	++	++	++
IV	165 min	++	++	-	++	++	++	+	+	
V	225 min	++	++	+	++++	++	+++	++	++	

A = ABLANDAMIENTO

N = NECROSIS

H = HEMORRAGIA

V = VASCULARIZACION

PRESENTE = +

AUSENTE = -

ND = NO SE DETERMINO.

¹ LOS EXTRACTOS INOCULADOS INTRATUMORALMENTE,
CORRESPONDEN A LOS DIFERENTES TIEMPOS EN QUE SE DETUVO LA
GERMINACION.

LAS OBSERVACIONES PERTENECEN A GRUPOS DE 4 ANIMALES EN
PROMEDIO, POR CADA UNO DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE GERMINACION
INOCULADOS. LOS TESTIGOS NO FUERON INOCULADOS.

* DIAS POST-INOCULACION A LOS QUE FUERON
SACRIFICADOS LOS ANIMALES.

Del mismo modo se trabajó con animales inoculados con extractos de germinación de *Bacillus megaterium* QMB 1551. Los animales fueron sacrificados a los 8 y 14 días post-inoculación de los extractos de germinación. Cada grupo de 4 animales recibió un extracto diferente. Los cambios detectados macroscópicamente, se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 7.

Se puede apreciar que los Testigos no presentan necrosis ni hemorragia y el tumor se desarrolla sin ninguna alteración, a diferencia de los tumores tratados con los extractos de germinación correspondientes a los tiempos 30, 45 80 y 105 min. Se pudo observar que tras la inoculación de estos extractos, todos los parámetros que evaluamos macroscópicamente, en conjunto muestran que hay destrucción del tejido tumoral. Aunque para el extracto de los 80 min de germinación no hay necrosis ni hemorragia a los 8 días, la necrosis tan abundante que se presenta a los 14 días junto con el reblandecimiento del tumor, nos permite considerar un efecto oncolítico positivo.

TABLA 4

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LOS TUMORES TRATADOS CON LOS
EXTRACTOS DE GERMINACION DE *Bacillus megaterium* QMB 1531.

ZONA	EXTRACTO INOCULADO ¹	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS							
		A		N		H		V	
		B	14	B	14	B	14	B	14*
	TESTIGO	-	-	-	-	-	-	-	-
A	0 min	-	-	+	++	+	++	+	++
	15 min	-	-	+	+	+	+	-	+
	30 min	+	+	+	+	++	-	++	-
B	45 min	+	+	++	+++	+	+++	++	-
	60 min	-	-	-	++	-	++	-	-
	75 min	-	-	+	+	+	+	-	-
C	90 min	+	-	-	++++	-	-	++	-
	105 min	+++	+	+	+	+	-	++	-
	120 min	+	-	+	+	-	+	-	-
	135 min	+	-	+	+	+	+	-	-

A = ABLANDAMIENTO

PRESENTE = +

N = NECROSIS

AUSENTE = -

H = HEMORRAGIA

V = VASCULARIZACION

¹ EXTRACTOS DE GERMINACION INOCULADOS INTRATUMORALMENTE
CORRESPONDIENTES A LOS DIFERENTES TIEMPOS DEL PROCESO DE
GERMINACION.

LAS OBSERVACIONES SON EL PROMEDIO DE LAS DETERMINACIONES
HECHAS A GRUPOS DE 4 ANIMALES POR CADA EXTRACTO INOCULADO, EXCEPTO
LAS OBSERVACIONES AL OCTAVO DIA PARA LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A LOS
30, 45, 60 Y 105 MIN QUE SE HICIERON POR DUPLICADO 18 ANIMALES EN
TOTAL.

* DATOS QUE CORRESPONDEN A LOS DIAS EN QUE FUERON
SACRIFICADOS LOS ANIMALES.

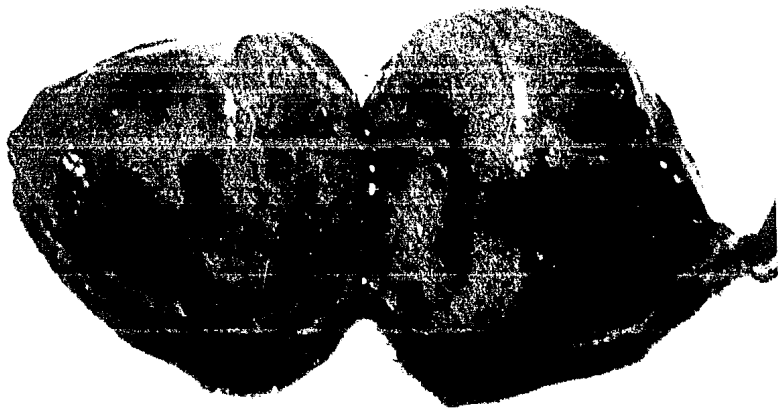


Figura 7: Fotografía de un tumor de 14 días post-inoculación con el extracto de germinación de 90 min de *B.nogaterium* QMB 1551.

C) Ganancia de Peso por día del Animal y Tasa de Crecimiento Tumoral.

Estos parámetros se tomaron en cuenta para determinar numéricamente el estado general de los animales y la actividad oncolítica de los extractos de germinación de ambos microorganismos al afectar el crecimiento diario del tumor.

En la Tabla 5 se muestran la Ganancia de Peso por día (G. P./día) del animal y la Tasa de Crecimiento Tumoral (T.C.T.) de los animales, con tumores inoculados con los extractos de germinación de *Clostridium* M-55, donde puede observarse que los extractos de los tiempos 0, 150, 195 y 225 min de germinación al ser inoculados, provocan una reducción mayor del 10 % al séptimo día post-inoculación en la T.C.T. con respecto a los Testigos no inoculados.

TABLA 5

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE GERMINACION DE *Clostridium* M-55
SOBRE LA GANANCIA DE PESO / DIA Y LA TASA DE CRECIMIENTO TUMORAL.

FIGO	EXTRACTO INOCULADO ¹	G. P. / DIA (g/día)	T. C. T. (cm ³ /día)	% REDUCCION de T. C. T.
	Testigos 7 días	1.12 ± 1.05	0.89 ± 0.20	-
	14 días	1.50 ± 0.10	0.47 ± 0.01	-
	0 min 8 días	1.72 ± 0.46	0.85 ± 0.22	10
I	60 min 8 días	1.72 ± 0.43	0.42 ± 0.09	0
		14 días	1.38 ± 0.9	0.17 ± 0.04
	75 min 7 días	1.54 ± 0.31	0.42 ± 0.15	0
		18 días	3.50 ± 0.05	0.46 ± 0.19
II	105 min 8 días	1.78 ± 0.30	0.50 ± 0.23	0
III	120 min 8 días	1.61 ± 0.46	0.41 ± 0.10	0
		185 min 8 días	1.76 ± 0.38	0.53 ± 0.28
	150 min 7 días	1.08 ± 0.28	0.31 ± 0.09	21
		18 días	4.00 ± 0.14	0.85 ± 0.05
IV	165 min 7 días	1.25 ± 0.11	0.28 ± 0.04	28
	14 días	5.42 ± 0.79	0.39 ± 0.12	19
V	225 min 8 días	1.25 ± 0.15	0.28 ± 0.04	28
	18 días	1.25 ± 0.24	0.18 ± 0.04	62

¹ LOS EXTRACTOS INOCULADOS INTRATUMORALMENTE CORRESPONDEN A LOS DIFERENTES TIEMPOS EN QUE FUE DETENIDO EL PROCESO DE GERMINACION.

LOS DATOS CORRESPONDEN A UN PROMEDIO DE 4 ANIMALES POR CADA GRUPO; 2 ANIMALES SE SACRIFICARON A LOS 7 (8) DIAS POST-INOCULACION CON LOS EXTRACTOS Y LOS OTROS 2 A LOS 13 (14) DIAS POST-INOCULACION.

TABLA 8
EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE GERMINACION DE *Bacillus megaterium*
QMB 1551 SOBRE LA GANANCIA DE PESO / DIA Y LA
TASA DE CRECIMIENTO TUMORAL.

SONA	EXTRACTO INOCULADO ¹	O. P. /DIA (g/día)	T. C. T. (cm ³ /día)	REDUCCION DE T. C. T.		
	TESTIGO					
	8 días	1.49 ± 0.21	0.44 ± 0.14	-		
	12 días	2.89 ± 0.14	0.38 ± 0.10	-		
A	0 min	8 días	0.84 ± 1.01	0.12 ± 0.10	78	
		14 días	2.28 ± 0.33	0.23 ± 0.04	89	
	15 min	8 días	1.00 ± 0.31	0.54 ± 0.29	0	
		14 días	1.04 ± 0.09	0.28 ± 0.07	20	
	30 min	8 días	1.43 ± 0.37	0.17 ± 0.08	61	
		14 días	1.59 ± 0.38	0.21 ± 0.25	45	
	45 min	8 días	0.00 ± 0.49	0.10 ± 0.14	64	
		14 días	2.09 ± 0.15	0.31 ± 0.09	18	
	B	60 min	8 días	1.43 ± 0.01	0.45 ± 0.22	0
			14 días	1.82 ± 0.28	0.20 ± 0.09	32
		75 min	8 días	2.18 ± 0.00	0.53 ± 0.33	0
			14 días	1.09 ± 1.30	0.21 ± 0.00	45
C	90 min	8 días	0.00 ± 0.39	0.12 ± 0.09	78	
		14 días	2.09 ± 0.00	0.11 ± 0.00	71	
	105 min	8 días	1.81 ± 0.38	0.50 ± 0.25	0	
		14 días	2.10 ± 0.28	0.28 ± 0.00	0	
	120 min	8 días	2.07 ± 1.47	0.22 ± 0.02	50	
		14 días	2.28 ± 0.75	0.35 ± 0.09	8	
	135 min	8 días	2.44 ± 0.08	0.28 ± 0.10	30	
		14 días	2.15 ± 0.07	0.32 ± 0.01	10	

¹ LOS EXTRACTOS INOCULADOS INTRATUMORALMENTE CORRESPONDEN A LOS DIFERENTES TIEMPOS EN QUE FUE DETENIDA LA GERMINACION DEL MICROORGANISMO.

LAS OBSERVACIONES SON EL PROMEDIO DE LAS DETERMINACIONES HECHAS A 4 ANIMALES POR CADA GRUPO, EXCEPTO PARA LOS EXTRACTOS DE LOS TIEMPOS 30, 45, 60 Y 105 MIN DONDE LAS OBSERVACIONES SE HICIERON POR DUPLICADO (8 ANIMALES EN TOTAL).

D) Estudio Histopatológico.

Se realizó el estudio histopatológico de los tumores tratados con los extractos de germinación tanto de *Clostridium* M-55 como de *Bacillus megaterium* QMB 1551 con la finalidad de determinar el grado de destrucción celular causada por el tratamiento.

Microscópicamente el efecto oncolítico pudo apreciarse como zonas de necrosis no asociadas a hemorragia, circundadas por una masa condensada de células con citoplasma y núcleos picnóticos en la periferia además de fantasmas celulares.

La evaluación del fenómeno oncolítico se determinó tomando como un 100 X toda la necrosis dentro del Área total del corte del tumor observado al microscopio y estableciendo una relación porcentual, para saber cuanta de esa necrosis no está asociada a hemorragia (Necrosis No Asociada a Hemorragia), sino al tratamiento con los extractos de germinación, reflejando este parámetro la destrucción celular por el efecto oncolítico con respecto al total del tumor.

Algunos de los tumores tratados con *Clostridium* M-55 mostraron necrosis no asociada a hemorragia, estos resultados se presentan en la Tabla 7, en donde se observa que los extractos que producen mayor necrosis no asociada a hemorragia, son los correspondientes a los 60, 150 y 185 min de germinación de las

esporas, tanto a los 7 como a los 14 días.

Por otro lado, el extracto de germinación de 0 min también mostró efecto sobre el tumor (Tablas 3, 5 y 7).

TABLA 7

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE LOS TUMORES TRATADOS
CON LOS EXTRACTOS DE GERMINACION DE *Clostridium M-55*.

FIGO	EXTRACTO INOCULADO ¹	IMAGEN HISTOPATOLOGICA N NECROSIS NO ASOCIADA A HEMORRAGIA	
		7	14 *
	TESTIGO	NEC. PUNTUAL	NEC. PUNTUAL
I	0 min	40	ND
	60 min	20	100
	75 min	NEC. PUNTUAL	50
II	105 min	22	ND
III	120 min	18	ND
	185 min	10	ND
	150 min	60	50
IV	195 min	20	50
V	225 min	5	5

¹ LOS EXTRACTOS INOCULADOS INTRATUMORALMENTE
CORRESPONDEN A LOS DIFERENTES TIEMPOS EN QUE FUE DETENIDA LA
GERMINACION.

* DIAS POST-INOCULACION A LOS QUE FUERON SACRIFICADOS
LOS ANIMALES.

LOS DATOS SON EL PROMEDIO DE 4 ANIMALES POR CADA
EXTRACTO INOCULADO.

ND = NO SE DETERMINO.

El estudio histopatológico de los tumores tratados con los extractos de germinación de *Bacillus megaterium* QMB 1551 mostró que a excepción del grupo Testigo y de los tumores tratados con los extractos de la zona B, en todos los casos se indujo alguna proporción de necrosis no asociada a hemorragia. Se puede señalar, que los extractos de la zona A y de la zona C de la cinética de germinación, tienen mayor efecto sobre los tumores ya que se presentó mayor cantidad de necrosis y ésta, no estaba asociada a hemorragia.

Estos resultados pueden observarse en la Tabla 8 y en la Figura 8.

TABLA 8

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE LOS TUMORES TRATADOS
CON LOS EXTRACTOS DE GERMINACION DE *Bacillus megaterium* QHB 1551

ZONA	EXTRACTO INOCULADO ¹	IMAGEN HISTOPATOLOGICA N DE NECROSIS NO ASOCIADA A HEMORRAGIA.	
		8	14 *
	TESTIGO	0	0
A	0 min	40	70
	15 min	40	70
	30 min	40	50
	45 min	50	60
B	60 min	0	50
	75 min	0	10
C	90 min	50	60
	105 min	80	20
	120 min	60	70
	135 min	50	80

¹ LOS EXTRACTOS INOCULADOS INTRATUMORALMENTE
CORRESPONDEN A LOS TIEMPOS EN QUE FUE DETENIDA LA GERMINACION.

* DIAS POST-INOCULACION EN QUE FUERON SACRIFICADOS LOS
ANIMALES.

LAS MEDICIONES SON EL PROMEDIO DE LAS DETERMINACIONES
HECHAS A 4 ANIMALES POR CADA EXTRACTO INOCULADO, EXCEPTO LAS
OBSERVACIONES REALIZADAS AL OCTAVO DIA PARA LOS EXTRACTOS DE
GERMINACION DE LOS TIEMPOS 30, 45, 60 y 105 MIN QUE SE HICIERON
POR DUPLICADO (8 ANIMALES EN TOTAL).

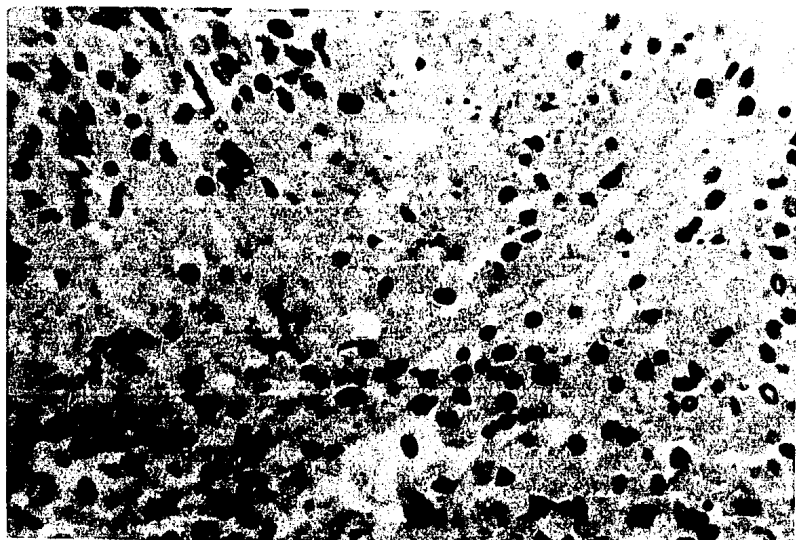


Figura 8: Imagen Histológica del corte de un tumor tratado con el extracto de germinación del tiempo 80 min de *B.negaterium* QMB 1551 teñido con Hematoxilina-Eosina (50X).

DISCUSION

En la primera parte de este trabajo, se realizó la caracterización histológica detallada de un modelo animal de inducción de fibrosarcomas en hamsters, previamente establecido (3).

De acuerdo a lo anteriormente reportado (3), la inoculación subcutánea de células transformadas (BHK pSV) en hamsters sirios de 7 días de edad, produjo tumores con formas nodulares o binodulares (Figura 1) en el 100 % de los casos sin importar el sexo.

Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos para constatar la evolución del tumor, a nivel tanto macroscópico como microscópico. Los tumores crecieron rápidamente, con una tasa de crecimiento tumoral de hasta $0.42 \pm 0.21 \text{ cm}^3/\text{día}$ (Tabla 1).

Los parámetros evaluados (necrosis y hemorragia) son características inherentes al desarrollo tumoral, así como del grado de vascularización, el cual es un buen indicador del riego sanguíneo necesario para el crecimiento del tumor (4). Al examinar macroscópicamente los tumores, se encontraron ciertas características siempre presentes: consistencia firme de la masa tumoral, una hemorragia acompañada de áreas de necrosis, además de una gran vascularización y un color blanquecino a rosado en todos los tumores (Figura 2).

El estudio histopatológico nos muestra que estos tumores son fibrosarcomas (Figura 3), al igual que las tumoraciones inducidas por la inoculación subcutánea de SV-40 en hamsters sirios recién nacidos (8). Estos tumores permanecen subcutáneamente y pueden invadir tejido muscular e incluso piel, pero no tejido óseo.

La imagen histológica de estos tumores, reveló que los animales sacrificados entre los 8 y los 15 días posteriores al momento en que aparecieron los tumores, desarrollaron fibrosarcomas típicos con células fibroblásticas dispuestas en haces paralelos o encontrados, con núcleos ovoides y cromatina granular, con formas mitóticas frecuentemente en número importante, células gigantes de origen fibroblástico, además de encontrarse altamente irrigados y producir colágena. Estas características coinciden con las más importantes descritas para un fibrosarcoma (22), además de presentar una asociación entre la necrosis y la hemorragia en una proporción constante (1:1), para una porción muy limitada de la masa tumoral aproximadamente 20 %, sobre todo en los primeros días de su desarrollo (Tabla 2, Figura 4).

En tanto que para los animales sacrificados entre los 17 y los 21 días, los tumores mostraron fibroblastos indiferenciados y con mitosis en número más frecuente que las encontradas para el grupo anterior, compartiendo con éste la proporción encontrada

para la asociación necrosis-hemorragia (Tabla 2). Estas son características típicas de un tumor con altas tasas de crecimiento, por lo que alcanza un tamaño muy grande con respecto al animal cuando han pasado más de 17 días desde su aparición, lo que lo hace difícil de manejar.

Los fibrosarcomas tienden a invadir localmente y metastatizar ampliamente (27), por lo que otro de los objetivos del estudio histopatológico fue determinar la presencia o ausencia de metástasis en este modelo tumoral; definiendo ésta como colonias de tumores que crecen en diferentes partes del organismo, originándose a partir de células malignas que se separan del tumor inicial y se desplazan por el cuerpo (por vía sanguínea o linfática) con frecuencia, hasta lugares muy alejados (4, 18). Es necesario hacer notar que en ninguno de los tejidos analizados se encontró metástasis como tal, ni manifestación alguna de ésta, aunque sí se observó el carácter invasivo de la neoplasia, puesto que ésta invade el tejido muscular cercano al sitio de implantación del tumor.

De acuerdo con estos resultados, es obvio que para los estudios de oncolisis, deberán utilizarse tumores de pocos días de evolución; por tal motivo en los experimentos posteriores se emplearon tumores de hasta 2 semanas de evolución, una vez que alcanzaron 1 cm³, lo que en conjunto no rebasa los 17 días en total.

Una vez establecidas las características macroscópicas e histopatológicas del modelo tumoral con respecto a su evolución a través del tiempo, se usó éste para estudiar el efecto oncolítico de los extractos de germinación de *Clostridium* M-55 y *Bacillus negaterium* QMB 1551.

La determinación de proteínas mediante el método de Lowry (14) de los diferentes extractos de germinación, mostró que en la cinética de liberación para *Clostridium* M-55 hay 5 máximos (Figura 5).

De acuerdo a lo que ha reportado anteriormente nuestro grupo (25), los extractos de germinación con actividad oncolítica corresponden a aquéllos que presentan las máximas concentraciones de proteínas, por lo tanto, nosotros utilizamos para la inoculación de los tumores los extractos correspondientes a los 0, 60, 75, 105, 120, 135, 150, 185 y 225 min de germinación de las esporas de *Clostridium* M-55 (picos I a V, Figura 5).

Mientras tanto para los extractos de germinación de *Bacillus negaterium* QMB 1551 la cinética de liberación de proteínas muestra tres periodos que comprenden picos de máxima liberación de proteínas. Estos periodos correspondieron a 45 min de germinación cada uno, como se muestra en la Figura 8. Todos los extractos de germinación de *Bacillus negaterium* QMB 1551 obtenidos cada 15 min, se inocularon a diferentes grupos de 4 animales cada uno. Aquellos extractos de germinación de *Bacillus negaterium* QMB

1551 que mostraron un mayor efecto oncolítico, se probaron por duplicado.

La inoculación intratumoral con algunos de los extractos de germinación produjo licuefacción del tumor, observándose como un claro ablandamiento de la masa tumoral a partir del 50. día. Al efectuar la disección se observó pérdida en la consistencia del tumor; apreciada como grandes zonas de hemorragia y gran vascularización acompañada de necrosis o destrucción celular (Figura 7). La destrucción celular se puede inducir por cambios que alteren el contenido iónico y el equilibrio hídrico de la célula, llevándola a una excesiva captación de agua, aumento de presión hidrostática y aumento de volumen. De este modo comienzan los estadios del proceso degenerativo, que tienen como punto crítico la recuperación o muerte de la misma (necrosis) (4, 23).

Al analizar macroscópicamente los tumores tratados con los extractos de germinación de *Clostridium* H-55 se observó que para cuatro de los extractos (tiempos 80, 150, 185 y 225 min), hay ablandamiento, necrosis, hemorragia y vascularización (Tabla 3).

Sin embargo, los Testigos mostraron cambios análogos, lo que no nos permite decir que es el tratamiento en sí, completamente responsable de estas alteraciones. Como se observó durante la evaluación inicial del modelo, la necrosis y la hemorragia son inherentes al desarrollo del tumor, además de que el propio manejo de los tumores puede alterar su aspecto

macroscópico.

Especialmente después de dos semanas, el tumor se encuentra en una fase de crecimiento, en donde hay deterioros propios del desarrollo de este tipo de tumor (Tablas 1 y 2). Estas alteraciones macroscópicas coinciden con la reducción en la tasa de crecimiento tumoral, que se observa cuando se sacrifica a los animales tras 14 días post-inoculación del extracto (Tabla 5).

Microscópicamente el efecto oncolítico se estableció como la necrosis no asociada a hemorragia, es decir, la destrucción que es provocada por un agente externo independiente de la hemorragia producida por efecto del desarrollo tumoral (4).

El estudio histopatológico de este grupo mostró que los extractos de *Clostridium* M-55 de los tiempos 150 y 185 min indujeron Necrosis No Asociada a Hemorragia por la aplicación del extracto (Tabla 7). Del análisis de estas características puede decirse que al menos los extractos de 150 y 185 min de germinación producen un efecto oncolítico.

De acuerdo a todos los parámetros que evaluamos, el extracto de germinación de 0 min, es decir, cuando todavía no comenzaba la germinación, también tiene efecto sobre el tumor, (Tablas 3, 5 y 7) y esto es debido a que cuando las esporas son conservadas en congelación antes de los experimentos de germinación, puede encontrarse cierta concentración de proteínas en el medio antes de que ésta comience como tal. Este es nuestro

caso ya que almacenamos las esporas por congelación.

Puede observarse un pico inicial en la cinética de liberación de proteínas (Figura 5), lo que nos hace pensar que los productos liberados en este momento, sean los responsables de los resultados obtenidos.

Anteriormente no se había determinado si los extractos de germinación de *Bacillus megaterium* QMB 1551 presentaban esta misma actividad oncolítica, por lo que se hizo la inoculación de todos los extractos de germinación obtenidos a los diferentes tiempos (0 a 135 min). En un principio, se probó el efecto oncolítico a los 8 y a los 14 días a fin de conocer las diferencias que pudieran presentarse en el modelo tumoral durante este lapso. Para los extractos que produjeron cambios en el tumor, se hizo un segundo experimento para corroborar su actividad oncolítica.

Dentro de las características macroscópicas de los tumores tratados con los extractos de germinación de los tiempos 30, 45, 90 y 105 min se observaron cambios notables, sobre todo con respecto a la consistencia de los tumores, a diferencia de los otros extractos inoculados correspondientes a los tiempos de germinación de la zona B (Tabla 4).

En tanto que la Ganancia de Peso por día, mostró que los animales estaban creciendo normalmente. Se puede notar una reducción significativa en el crecimiento diario del tumor en los

animales que recibieron los extractos de los tiempos 0, 30, 45, 90 y 120 min (zonas A y C).

En cuanto al examen histopatológico podemos notar que la Necrosis No Asociada a Hemorragia se presentó en un alto porcentaje para los extractos de germinación que corresponden a las zonas A y C de la cinética de liberación de proteínas (Tabla 8, Figura 8).

Todos los parámetros evaluados en conjunto, mostraron que los extractos de germinación de *Bacillus megaterium* QMB 1551 sí tienen un principio activo, capaz de producir un efecto oncolítico que pudo apreciarse de manera más clara, que el observado para los extractos de germinación de *Clostridium* M-55. Es posible que la concentración del principio activo fuera muy pequeña y esto no nos permitió observar claramente un fenómeno destructivo, sobre todo como una reducción en el crecimiento diario de los tumores.

Los ensayos que habrán de acometerse en el futuro, se centrarán sin lugar a dudas en la comprensión del fenómeno de oncolisis, así como en la localización, purificación y caracterización del principio oncolítico.

CONCLUSIONES

El estudio histopatológico de los tumores inducidos en hamsters, demostró que éstos tenían todas las características típicas de un fibrosarcoma, presentando además necrosis asociada a hemorragia, la cual aumenta paulatinamente con la edad del tumor. Este modelo tumoral no es metastásico aunque sí invasivo.

Una caracterización más detallada del modelo en base a observaciones macroscópicas, Tasa de Crecimiento Tumoral y examen histopatológico nos permitió determinar que es necesario utilizar los tumores en las dos primeras semanas después de su aparición, ya que a tiempos más prolongados el tamaño del tumor hace difícil el manejo de los animales, así como la evaluación de cualquier efecto externo sobre el tumor, debido a que ésta incrementa las zonas de necrosis y como consecuencia las de hemorragia.

El tratamiento del tumor con los extractos de germinación de *Clostridium M-55* no produjo un efecto oncolítico claro en conjunto, aunque sí algunas manifestaciones de destrucción celular para algunos de los extractos inoculados (150 y 185 min).

Los tumores tratados con los extractos de germinación de *Bacillus negaterium* QMB 1551 mostraron en cambio, un claro efecto oncolítico durante dos etapas bien definidas de la germinación (A y C, de acuerdo a la cinética de liberación de proteínas). Esto

nos permite decir que durante la germinación de *B. megasterium* QHB 1551 también se libera un principio o principios con actividad oncolítica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Angel, V. G. (1987). Expresión de Algunos c-Oncogenes en Tumores Inducidos con Células Transformadas con SV-40. Tesis de Maestría en Ciencias. IPN.
- 2) Barrón, B. L., N. Vales & A. Zychlinsky. (1986). Transformación de Células con el Plásmido PBR-SV40: Aislamiento y Caracterización. Revista Latinoamericana de Microbiología. 28: 373-379.
- 3) Barrón, B. L., E. López-Bayghen & H. Sandoval. (1989). Oncolytic Activity of *Clostridium* M-55 in Tumor Induced by SV-40 Transformed Cells. Revista Latinoamericana de Microbiología. 31: 159-165.165.
- 4) De Buen, A. N. (1986). Transtornos del Crecimiento Celular, p: 325-375. IN Trigo, T. F. & P. A. Mateos. (1986). Patología General Veterinaria. Ed. Impresora Bravo. México.
- 5) Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Crónicas y Accidentes. Registro Nacional del Cáncer. Resultados de 1987. Distrito Federal. (Informe Preliminar). México 1989.
- 6) Fredette, V. & C. Planté. (1970). Oncolytic Activity of *Clostridium* M 55 Spores. Can. J. Microbiol. 18: 249-252.
- 7) Fredette, V. & C. Planté. (1972). Effect of *Clostridium* M 55 Spore Extracts on Ehrlich Solid Tumor in the Mouse. Can. J. Microbiol. 18: 367-368.

- 8) Girardi, A. J., B. H. Sweet, V. B. Slotnick & M. Hillerman. (1982). Development of Tumors in the Hamsters Inoculated in the Neonatal Period with Vacuolating Virus, SV 40. Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 102: 849-880.
- 9) Ham, A. W. (1969). Tratado de Histología. 8a ed. Ed. Interamericana México. p: 4-8.
- 10) Ham, A. W. & T. S. Leeson. (1983). Tratado de Histología. Ed. Interamericana. México. p: 7-8.
- 11) Ham, A. W. & T. S. Leeson. (1984). Tratado de Histología. 4a ed. Ed. Interamericana. México. p: 3-11.
- 12) Junqueira, L. C., J. Carneiro & J. F. López-Sáez. (1986). Biología de la Célula Tumoral, p: 288-287. IN Junqueira, L. C., J. Carneiro & J. F. López-Sáez. Biología Celular. La Prensa Médica Mexicana. México.
- 13) Lapointe, J. R. & V. Portelance. (1978). Growth Retardation and Prevention of Ehrlich Solid Tumor by *Clostridium perfringens* Type A Spores and Culture Supernatant. Cancer Research. 38: 2295-2300.
- 14) Lowry, O. H., N. Rosebrough, F. Lewis & R. J. Ranall. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 285-275.
- 15) Luna, L. G. (1988). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, p: 32-48. 3rd ed. McGraw Hill Book Company. New York.

- 16) Mohr, V., W. H. Bolding, A. Enninger & H. A. Behagel. (1972). Oncolysis by a New Strain of *Clostridium*. *Cancer Research*. 32: 1122-1128.
- 17) Möse, J. R. & G. Möse. (1984). Oncolysis by Clostridia I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and Other Nonpathogenic Clostridia against the Ehrlich Carcinoma. *Cancer Research*. 24: 212-218.
- 18) Nicolson, G. L. (1978). Metástasis Cancerosas. *Investigación y Ciencia*. 32 : 22-33.
- 19) Parker, R. C., H. C. Plummer, C. O. Sieberman, & M. G. Chapman. (1947). Effect of Histolytic Infection and Toxin on Transplantable House Tumors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68: 461-467. IN Mohr, V., A. Enninger & H. A. Behagel. (1972). Oncolysis by a New Strain of *Clostridium*. *Cancer Res.* 32: 1122-1128.
- 20) Parkin, D. M., C. A. Stiller, G. J. Draper, & Breber, C. A. (1988). The International Incidence of Childhood Cancer. *Int. J. Cancer*. 42: 511-520.
- 21) Pérez-Tamayo, R. (1987). Evolución de Nuestros Conocimientos de la Enfermedad, p: 13-28. IN Pérez-Tamayo, R. *Introducción a la Patología*. 2a ed. Ed. Médica Panamericana. México.
- 22) Robins, L. S. & S. R. Cotron. (1984). *Patología Estructural y Funcional*, p: 1322. 2a ed. Nueva Editorial Interamericana. México.

- 23) Robbins, S. L., M. Angell & V. Kumar. (1985). Neoplasias. IN Robbins, S. L., M. Angell & V. Kumar. Patología Humana. 3a ed. Ed. Interamericana. México.
- 24) Rosenkranz, H. S. (1973). Aspects of Microbiology in Cancer Research. Ann. Rev. Microbiol. 27: 383-401.
- 25) Sandoval, H., E. Hinojosa, S. Ruiloba de León & B. L. Barrón. (1989). Cytotoxic Effect of Proteins Released During *Clostridium* M-55 Spores Outgrowth. Rev. Lat-amer. Microbiol. 31: 153-157.
- 26) Setlow, P. (1985). Protein Degradation During Bacterial Spore Germination. p: 285-295. IN Brantner, N. (1985). The Clostridial Tumor Phenomenon: Fundamentals in Oncolytic Tumor Research. Fundamentals and Applied Aspects of Bacterial Spores. Academic Press Inc. London.
- 27) Stedman's Medical Dictionary. (1978). p: 524. 23th ed. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- 28) Vogel, H. J. & D. M. Bonner. (1958). Acetylornithinasa of *Escherichia coli* Partial Purification and Some Properties. J. Biol. Chem. 218: 97-106.