

Methode histo-chimique en bloc pour la demonstration des diaphorases et etude sur la presence de l'activité enzymatique et oxydo reductrice dans les tissus normaux, pretumoraux et tumoraux de la peau et son rapport avec le metabolisme de la cellule cancerouse

JUAN VALENZUELA Y CHACON

Professeur Adjoint de la Chaire d'Histologie de Madrid.
Section d'Histochimie de l'Institut Cajal. Madrid.

RESUMEN

Se estudian en cinco tipos tumorales de piel, así como en tejidos normales y adyacentes, las actividades de un grupo de enzimas óxido-reducción y se hace un estudio comparativo entre tejidos normales, adyacentes y tumorales, observándose la disminución en los tumores de la actividad diaforasas TPN y DPN y del citocromo b como consecuencia lógica del aumento de los procesos anaerobios en los tumores.

Se prevé una enorme formación de ácidos grasos en los tumores y preponderancia en los mismos de la vía oxidativa de la glucosa del ácido fosfogluónico, con la consiguiente formación de pentosas y ácidos nucleicos.

En este mismo trabajo se describe un nuevo método para diaforasas en bloque, de gran sencillez y buenisimos resultados.

RESUME

L'auteur étudie dans 5 types tumoraux de la peau, ainsi que dans les tissus adjacents et normaux, les activités d'un groupe d'enzymes oxydo-réduction, et met en évidence une étude comparative entre les tissus normaux, adjacents et tumoraux, qui permet d'observer la diminution dans les tumeurs de l'activité diaforase TPN et DPN et du cytochrome b comme conséquence logique de l'augmentation des processus anaérobies dans les tumeurs. Il prévoit une énorme formation d'acides gras dans les tumeurs et une prépondérance dans ces dernières de la voie oxydative de la glucose de l'acide phosphogluconique avec la formation conséquente de pentosases et d'acides nucléiques.

Dans ce même travail, l'auteur décrit une nouvelle méthode pour les diaphorases en bloc, d'une grande simplicité et dont les résultats ont été excellents.

SUMMARY

The activity of a group of oxide-reducing enzymes are studied in five types of skin tumors and a comparative study is made between normal, adjacent and tumor affected tissues, observing the decrease of the TPN and DPN diaphoretic activity in the tumors as well as that of the b cytochrome as the logical consequence of the increase of the anaerobian processes in the tumors.

A great formation of grease acids is foreseen in the tumors and a preponderance of the oxidating passage of the glucose of the phosphogluconic acid in the same with the subsequent formation of pentoses and nucleus acids.

This report also describes a new method characterized by its great simplicity and excellent results for mass diaphoretics.

К Р А Т К И Й О В З О Р

Исследуется в 5-ти типах кожных опухолей, а также в нормальных и прилегающих тканях, активность группы окислительно-восстановительных энзим и проводится сравнительный анализ между нормальными, прилегающими и опухолевыми тканями; наблюдается при этом уменьшение активности диафаз "ТРН" и "ДРН" и цитохрома "в" в опухолях, как логичное следствие увеличения анаэробных процессов в опухолях.

Предусматривается образование в больших количествах жирных кислот в опухолях и преобладание в них процесса окисления глюкозы фосфорно-глюкозного окисла. со следовательным образованием пентоз и нуклеиновой кислоты.

в этой же работе описывается новый простой метод для групповых диафаз, дающий хороший результат.

Dans un travail précédent, nous avons étudié toute une série d'enzymes hydrolytiques dans les tumeurs de la peau ainsi que dans les tissus normaux et adjacents. Les enzymes étudiées étaient les suivantes: les phosphatases, tant acides qu'alcalines, les lipases, estérases non spécifiques, β glucuronidases, amylopeptidases, cholinestérases et phosphorilases.

Dans le présent travail, nous étudions, comme suite à l'étude précédente, les enzymes oxydo réductrices dans les mêmes tissus normaux adjacents et tumoraux de la peau.

En vue de leur étude, nous avons groupé ces enzymes de la façon suivante:

A) Oxydases.—En catalysant le passage de l'hydrogène d'une manière spécifique sur l'oxygène moléculaire.

I) Cytocromes oxydases, indophénoloxydases.

B) Deshydrogénases anaérobies. — En catalysant le passage de l'hydrogène sur un accepteur dans des conditions anaérobies.

I) Système du succin deshydrogénase.

II) Système DPN deshydrogénase.

III) Système TNP deshydrogénase.

IV) Diaphorases DPN et TPN.

A la suite des résultats obtenus et de ceux qui ont été mis en lumière au cours du travail sur l'étude des enzymes hydrolytiques, nous pouvons établir toute une série de conclusions qui, à notre sens, présentent un intérêt spécial pour l'éclaircissement des métabolismes tumoraux.

Matériel

Nous avons utilisé du matériel humain récent en provenance de biopsies et d'autopsies. Le nombre total de tumeurs utilisées a été de 22 dont 5 étaient de simples basaliomes, 4 épino cellulaires, 4 papillomes malins, 4 mélanomes et 5 nevus.

Méthodes

Nous avons employé les méthodes de Nachlas - Tsou - Souza - Cheng et Seligman pour le succin deshydrogénase. Méthode de Hess - Scarpelli - Pearse pour la lacticodeshydrogénase glucose-6-phosphato deshydro-

génase, isocitricadeshydrigénase. Méthode de Nachlas pour la cytochrome oxydase et la méthode en bloc de Valenzuela y Chacón 1966 pour la diphosphopiridin diaphorase et la triphosphopiridindiaphorase.

DPN et TPN DIAPHORASES

Méthode:

1° Pièces de 3 mm d'épaisseur, récemment extraites. Les submerger dans le mélange suivant et laisser incubé durant 1-2 heures.

DPNH ou TPNH	7 mgr.
Solution de tironine à 1/500	2 c. c.
Tampon "tris" 0,2 M pH 10,4	3 c. c.
Chlorure de Cobalt 0,5 M	2 c. c.
NT à 1 %	10 c. c.
Chlorure de magnésium 0,05 M	0,5 c. c.
Solution 0,003 M de phényluréthane	2 c. c.

2° Laver dans de l'eau distillée avec 2 gouttes d'acide clordrique normal pendant 5 minutes.

3° Fixer dans du formol, pendant 15 minutes, dans une étuve à 37°.

4° Laver dans de l'eau distillée pendant 3 minutes.

5° Coller le bloc avec de la gomme arabique sur une pièce de bois et effectuer des coupes de 10 µ.

6° Deshydratation dans de l'alcool suivant la règle détaillée ci-dessous:

	Minutes
Alcool 30 %	1
Alcool 40 %	1
Alcool 60 %	1
Alcool 95 %	1
Alcool absolu	1
Xylol et Baume	

CONSIDERATIONS SUR LA METHODE EN BLOC DPN ET TPN DIAPHORASES

Les pièces-blocs ne doivent pas avoir une épaisseur supérieure à 3-4 mm. Par contre, la surface de la pièce-bloc peut avoir celle que l'on désire. L'avantage est que l'on peut obtenir, de cette façon, de grandes coupes de tissus, ce qui facilite l'interprétation topographique de l'activité enzymatique.



FIG. 1.—Réaction fortement active de DPN diaphorase. Naevus Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle num. 9.

L'incubation peut être réalisée entre 60 minutes et deux heures. Néanmoins, chaque tissu a, naturellement, des temps différents d'incubation. Pour cette raison, il convient donc d'introduire dans le même flacon deux pièces du même tissu. A partir de la première heure d'incubation, on retire une des deux pièces et, tout en lavant légèrement, on effectue deux ou trois coupes par congélation. On met ensuite l'une des coupes sur un couvre-objet avec une goutte d'eau et l'on regarde au microscope pour contrôler la réaction. En cas de réaction positive, on retire les deux pièces et l'on continue les stades suivants de la méthode. Par contre, si elle est négative et si l'incubation est insuffisante, on introduit la pièce congelée, à nouveau, dans le flacon et l'on continue toutes les demi-heures en faisant des contrôles jusqu'à l'obtention de la réaction désirée. Si après trois heures environ d'incubation la réaction n'apparaît pas, nous pouvons tranquillement la dénommer "réaction négative".

Une fois les coupes réalisées et après avoir monté le tout avec de la gomme ara-



FIG. 2.—Réaction de forte activité enzymatique DPN diaphorase dans un tissu normal de la peau. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

bique, on peut continuer à contrôler la réaction au microscope. On peut également introduire, à nouveau, les coupes pendant 2' à 50° dans la même solution incubatrice afin de renforcer la réaction.

La fixation dans du formol du stade 3 de la méthode dans se faire dans une étuve et avec du formol à 10 % neutralisé et

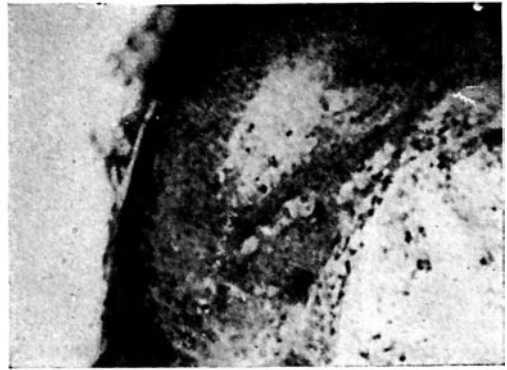


FIG. 3.—Réaction de forte activité enzymatique isocitric-co-deshydrogénase. Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

concret que l'on emploiera après avoir été filtré.

On peut également mettre le bloc dans une solution de 2 % d'agar. Après l'avoir laissé refroidi, on le coupe parfaitement en coupes atteignant jusqu'à 2 mm, d'une propreté et d'une précisions extraordinaires. L'avantage est que l'on peut garder le bloc dans un réfrigérateur pendant plus d'un mois sans que l'on observe un changement quelconque. Nous préférons l'introduction dans de l'agar au montage avec de la gomme arabique car les coupes sont aussi extraordinaires que celles que l'on obtient avec la celoïdine dans les techniques classiques histologiques. Et l'avantage est que l'opération avec l'agar s'effectue en deux ou trois minutes.

En ce qui concerne le pH parfait du mi-

lieu d'incubation, après plusieurs essais à différentes échelles de pH, nous sommes arrivés à la conclusion que, pour appliquer cette méthode, il se situait en 9 et 10 approximativement.

L'emploi de cette technique en bloc permet d'obtenir des précipités d'une grande

SUCCIN-DESHYDROGENASE

Méthode:

1° Coupes au cryostat de 10-15.

2° Incubation pendant 10'-2 h. dans le substrat suivant:



FIG. 4.—Réaction de forte activité enzymatique isocitrico-deshydrogénase. Naevus. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle num. 9.

finesse des localisations spécifiques qui évitent les diffusions.

CYTOCHROME-OXYDASE

Méthode:

1° Coupes au cryostat de 10 μ d'épaisseur.

2° Incubation dans le mélange suivant pendant une demiheure:

Tampon de phosphate 0,1 M, pH 7,4	3 c. c.
Naphtol 0,1 %	4 c. c.
4-amino-1-N, N-diméthyl naphthylamine à 0,2 %.	4 c. c.
Catalase à 30 μ g/c. c.	1 c. c.

3° Introduire rapidement dans du chlorure de sodium à 0,9 %.

4° Montage en glycérine.

Localisations en couleur pourpre.

Solution à 0,1 % de nitre B-T	10 c. c.
Solution de succin tamponné	10 c. c.

3° Laver pendant 1 minute dans une solution de NaCl à 1 %.

4° Deshydrater dans de l'alcool suivant la règle suivante:

	Minutes
Alcool à 30 %	5
Alcool à 40 %	5
Alcool à 60 %	3
Alcool à 80 %	2
Alcool absolu	2
Xylol	20 à 30

5° Montage en baume du Canada.

On obtient de bons résultats avec l'acide malique comme inhibiteur de l'activité et du contrôle enzymatique. Il détruit en effet l'activité enzymatique en bloquant les grou-



FIG. 5.—Réaction positive d'activité lactico-deshydrogénase. Naevus. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

pes -SH. On obtient également l'inhibitions avec l'acide oxalate-acétique.

REMARQUES CONCERNANT LA METHODE

Il faut rejeter tout type de fixateur car il détruit l'activité enzymatique.

Les coupes doivent être de 10 à 20 p. Les résultats sont meilleurs avec la plus grande épaisseur qu'avec la petite.

Etant donné que cette enzyme est insoluble et qu'il ne se produit pas de diffusions, il n'y a aucune crainte à prolonger le temps des incubations.

D'accord avec Farher et Louvière (1956) on obtient d'une façon franchement ostensible l'accélération de la réduction de tétrazolium si l'on ajoute au mélange incubateur de petites quantités d'un colorant d'oxyde-réduction car il augmente sa sensibilité. Nous y avons ajouté 1 c.c. d'une solution de bleu de méthylène à 1 P. 500 et nous avons pu réduire le temps de l'incubation de 8-12 minutes. Nous avons vu le cas que dans des incubations présentant des résultats négatifs au bout de 10 mi-

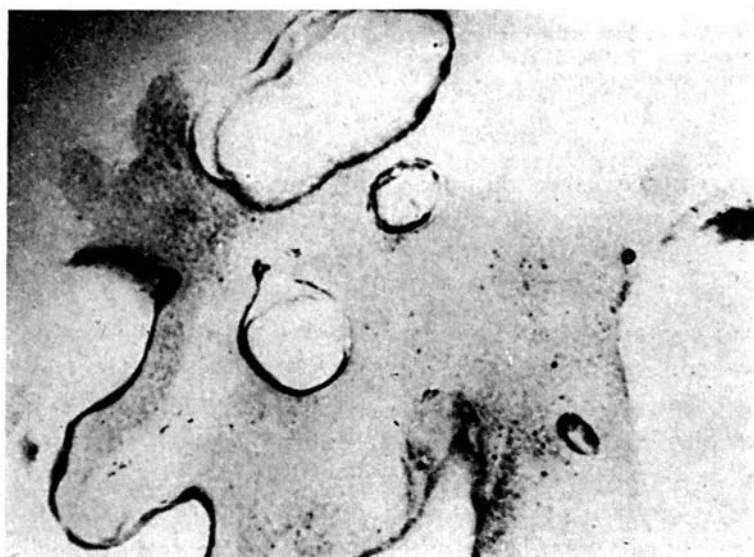


FIG. 6.—Réaction de forte activité lactico-deshydrogénase. Mélanome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

minutes, ceux-ci devenaient fortement positifs au bout de 15 minutes après avoir ajouté le colorant transporteur d'oxyde réduction. Ces résultats ont une plus grande fermeté d'image et de localisation que dans



FIG. 7.—Réaction positive de forte activité lactico-deshydrogénase. Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

les incubations normales avec du succin mais sans le bleu de méthylène. Nous avons obtenu des résultats positifs dans 100 % des cas.

Dans les méthodes de contrôle nous avons employé ou bien l'inactivation par l'acide malique dans de petites quantités 1 c.c. à 1 % ou bien le réchauffement préalable à 80 ° pendant 1 heure. Une méthode effective de contrôle est de traiter la préparation pendant une demi-heure avec une lipase et en employant du succinate dans l'incubation postérieure. On ne réduit

pas le tétrazolium si nous ajoutons du bleu de méthylène à l'oxyde réducteur.

Pour préparer la solution tamponnée de succinate, on mélange à parties égales une solution de succinate de sodium 0,2 M et un tampon de phosphate 0,2 M à pH 7,6. Mais on obtient un meilleur résultat avec un pH plus acide. Nous avons ajusté le pH dans toute son échelle et nous avons obtenu les meilleurs résultats avec un pH de 5,6.

Pour ces deshydrogénases, nous avons employé parfois les techniques par coupes

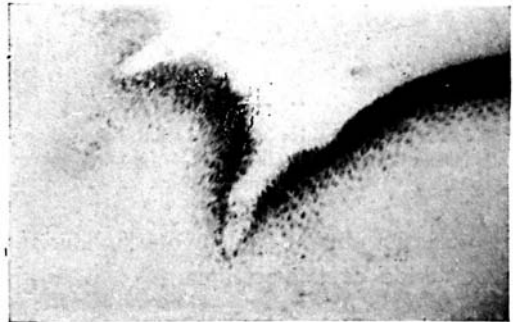


FIG. 8.—Réaction de forte activité isocytrico-deshydrogénase. Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

et d'autres fois les techniques en bloc. Les résultats sont identiques dans l'une ou l'autre variété technique. Cette dernière a été effectuée de la façon de 9 c.c. à 1 % de NT; 0,1 M de phosphate buffer à pH 7,4 + 1 c.c. de 0,3 M de succinate de sodium. Incubation à 37° pendant 1-2 h. Fixation postérieure dans du formol neutralisé. Coupes de 10 μ - 15 μ après avoir monté le bloc avec de la gomme arabique.

Méthode de Hess - Scarpelli - Pearse pour le lactique deshydrogénase, deshydrogénase isocytrique.



FIG. 9.—Réaction positive forte d'activité lactico-deshydrogénase dans les papillomes malins. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

1° Coupes au cryostat après une immersion dans un mélange d'acétone + Co2 solide. Epaisseur de 6-10. Les coupes sont montées sur un couvre-objet.

2° Déposer sur le coupe le milieu d'incubation que nous donnons ci-après.

3° Incuber 15' à 37°. Parfois si l'activité est faible on peut augmenter ce temps jusqu'à 1 h.

Milieu d'incubation:

Solution du substrat M/1	0,1	c. c.
+ DPN ou TPN selon les cas M/10	0,1	c. c.
+ Solution de chlorure de magnésium 0,05 M	0,1	c. c.



FIG. 10.—Réaction de forte activité lactico-deshydrogénase. Mélanome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

+ Tampon, différent selon les cas	0,25	c. c.
+ Solution nitre BT à 0,1 %	0,25	c. c.
+ De l'eau distillée afin de compléter	1	c. c.
+ Polyvinylpyrrolidone	75	mgr.

Pour la deshydrogénase isocytrique, on emploi l'acide isocytrique comme substrat en ajustant le pH à 7 par le "tris". Comme tampon, on peut employer le tampon de phosphate 0,06 M à pH 7.

Pour le lactique on emploi: al-lactate de sodium et un tampon de phosphate 0,06 M à pH 7.

4° Après l'incubation on lave les coupes dans du ClH 0,1 M et, ensuite, dans de l'eau distillée.



FIG. 11.—Réaction de forte activité isocytrico-deshydrogénase. Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

5° Fixation pendant 10' dans du formol à 10 %.

6° Laver dans de l'alcool à 10 %.



FIG. 12.—Réaction de forte activité isocytrico-deshydrogénase. Papillome malin. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

- 7° Lavage dans de l'eau distillée.
- 8° Montage en glycérine-gélatine.

Véronal buffer à pH 7,6 + 1 c.c. de 0,1 MgCl₂ et un autre de 0,5 M MnCl₂ en solution + 7 c.c. de TPN. Incubation pendant 1 h.

REMARQUES SUR LA METHODE

La TPN doit être employé avec les deshydrogénases suivantes: glucose 6 phosphate, isocytrique et le DPN avec le lactique.

Dans l'étude de ces enzymes, il est très important que le pH du substrat se trouve en 7. Nous avons réalisé des études avec différents pH et les meilleurs résultats ont été obtenus avec le pH 7.

RESULTATS

Après avoir réalisé ces méthodes, nous avons obtenu les résultats suivantes:

Disphophopyridine nucléotide diaphorase.
Dans un tissu normal de la peau cette enzyme se présente avec une grande activité. Dans l'épiderme et le cytoplasma cellulaire

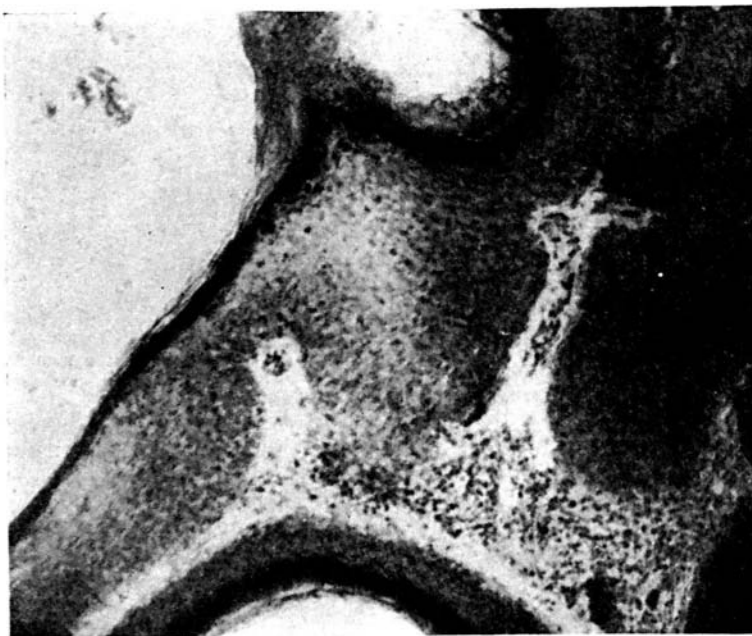


FIG. 13.—G6 P D. Réaction positive (+++) Naevus. Oc: 10 X Ob 45 X 6L.
Agrandissement échelle núm. 9.

Méthode pour la Glucose-6-phosphate deshydrogénase. La méthode employée pour cette étude a été la suivante. Coupes en cryostat. Incubation dans: 4 c.c. de 0,02 M disodium glucose-6-phosphate 3 c.c. de Nitre BT solution (5 mg/3 c³) + 11 c.c. 0,1 M

elle nous donne une réaction fortement positive, surtout dans la couche granuleuse et dans les rangées de cellules basales, avec des cercles bleutés autour du noyau. Dans les follicules pileux, les mêmes halos apparaissent et présentent une forte réaction po-

sitive. Ils se trouvent avec la même intensité et la même forme dans les glandes sébacées. La kératine présente une très faible réaction ainsi que le reste du derme.

Dans les tumeurs et les zones adjacentes normales on observe une diminution de l'activité enzymatique. Nous trouvons une

nières par rapport à leur tissu normal. Nous n'avons pas obtenu non plus d'indices réactifs dans les névus, dans les tissus normaux ou dans les tissus pathologiques.

Glucose-6-phosphate deshydrogénase.— Dans les tissus de peau normale, cette enzyme se présente avec une forte réaction



FIG. 14.—G6 P D. Réaction positive (++++). Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

réaction modérée dans les basaliomes et les papillomes malins ainsi que dans les mélanomes que nous avons étudiés. Dans les névus—tant dans le tissu normal adjacent que dans le tissu proprement tumoral—les réactions ont été d'une négativité absolue.

Triphosphopyridine nucléotide diaphorase.—La réaction de cette enzyme par rapport à la précédente est très curieuse. En effet, les résultats que nous avons observés sont identiques dans leurs réactions positives et négatives. En général, il existe la même diminution enzymatique dans les tumeurs et les zones adjacentes de ces der-

positive surtout dans les cellules superficielles de l'épiderme ainsi que dans la kératine et les follicules pileux. On n'observe aucune activité—ou alors elle est extrêmement faible dans les couches basales, dans les glandes sébacées et le reste du derme.

Dans les tissus adjacents la présence d'enzymes est modérée dans toutes les localisations mentionnées précédemment. Aucune activité digne d'être mentionnée n'a pu être observée.

Dans les basaliomes, la réaction est fortement positive dans les cellules de la superficie et, nulle ou presque, dans le reste

du tissu tumoral. Nous trouvons la même forme de localisation et d'intensité réactive dans les papillomes malins.

Les épino cellulaires présentent seulement une réaction modérée dans les cellules superficielles. Les névus et les mélanomes présentent une très faible réaction ou aucune activité.

Dans l'ensemble, il n'y a pas de changements ostensibles de la glucose-6-phosphate dans les tissus normaux et tumoraux.

Cytochrome oxydase.—Seule la couche basale de la peau normale a présenté une forte réaction positive; avec le reste des localisations étudiées, nous n'avons obtenu qu'une légère réaction modérée.

Dans les tissus adjacents tumoraux, nous

n'avons observé qu'une faible réaction dans toutes les préparations. Dans les mélanomes la réaction est modérée. Cette enzyme ne



FIG. 16.—G6 P D. Réaction positive (+++) Epithéliome épino cellulaire. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

présente qu'une faible réaction dans le reste des tumeurs que nous avons étudiées; mais cette réaction n'est pas observée dans



FIG. 15.—G6 P D. Réaction positive (+++) Papillome malin. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, número 9.



FIG. 17.—Forte activité enzymatique. Diaphorase TPN. Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

tous les cas qui ont été étudiées. Dans l'ensemble on observe peu de réactions enzymatique dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux de la peau.

Succin deshydrogénase.—On remarque de fortes réactions positives dans les localisations étudiées sur la peau normale: follicules, derme, couche granuleuse, kératine et glandes sébacées. C'est peut-être dans



FIG. 18.—Réaction positive modérée d'activité enzymatique TPN diaphorase. Papillome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

la couche granuleuse que la réactivité de cette enzyme se présente avec le moins de vigueur. Néanmoins, elle se manifeste.

Dans les mêmes localisations des tissus adjacents tumoraux on remarque une diminution enzymatique qui est beaucoup plus patente dans les tumeurs étudiées.

Nous pouvons conclure en indiquant que le succin deshydrogénase diminue quantitativement dans les tumeurs de la peau tels que les basaliomes, papillomes malins, mélanomes, névus et épino cellulaires.

Lactique deshydrogénase.—Tant dans les follicules que dans le derme, la couche granuleuse, la kératine et les glandes sébacées de la peau normale, la réaction histo chimique

de cette enzyme présente un caractère positif mais d'une faible intensité. Cette intensité demeure dans tous les tissus adjacents des tumeurs étudiées sauf dans les papillomes malins où l'activité du lactique deshydrogénase est extrêmement faible. Par contre, dans les zones de la tumeur l'intensité réactive apparaît énormément augmentée avec une réaction de quatre croix similaires. L'isocytrique deshydrogénase présente les mêmes réactions dans les tissus normaux, les tissus adjacents de la tumeur et les tissus tumoraux.

Dans l'ensemble on observe un accroissement élevé des deux enzymes dans les tumeurs de la peau que nous avons étudiées. Mais, comparativement, les réactions du lactique deshydrogénase sont encore plus intenses que celles de l'isocytrique deshydrogénase.

CONCLUSIONS

A la suite des résultats obtenus, on peut observer une grande diminution des dia-



FIG. 19.—Cytochrome oxydase. Réaction modérée. Basaliome. Temps d'incubation plus long. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.



FIG. 20.—Cytochrome oxydase. Réaction modérée. Papillome malin. Temps d'incubation plus long. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.



FIG. 21.—Réaction d'activité modérée, succin-deshydrogénase dans le tissu adjacent d'un épithéliome épino-cellulaire. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

phorases TPN et DPN car, comme dans le cancer le métabolisme anaérobie est augmenté, contrairement aux cellules normales, il y a une déficience de catalyseurs de l'oxydation: peu de diaphorases et une diminution du cytochrome C.



FIG. 22.—Réaction isocytrico-deshydrogénase. Forte activité. Tissu adjacent d'un papillome malin. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

La nicotinamide a une grande importance dans la synthèse du DPN et l'on sait que les vitamines B font partie du TPN et du DPN et que le déficit de celles-ci augmente les processus anaérobies entrant dans le cercle vicieux du déficit des catalyseurs de l'oxydation et de l'augmentation de la glucose-6-phosphate.

nucléiques, ce qui est une autre des finalités de la voie de l'acide phosphogluconique.

C'est-à-dire qu'une augmentation de la synthèse des acides gras est possible ainsi qu'une augmentation dans la synthèse d'acides nucléiques en raison de la déviation de la glucose par la voie de l'acide phospho-



FIG. 23.—Cytochrome oxydase dans un tissu adjacent d'une tumeur épino-cellulaire. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle núm. 9.

Dans l'oxydation de la glucose-6-phosphate, il se produit une réduction enzymatique de l'anneau pyridinique de TPN mais ce TPNH ne s'oxyde pas dans les mitochondries et il semble que l'une des missions du TPNH H, formé dans la voie du phosphogluconique, consiste à servir d'agent réducteur pour la synthèse des acides gras; l'on sait que tous les organes qui oxydent la glucose par la voie du phosphogluconique sont d'actifs formateurs d'acides gras et de stérols.

Nous avons dit que dans les tumeurs étudiées, il y a une grande quantité de glucose-6-phosphate deshydrogénase et celle-ci peut faire que la glucose-6-phosphate passe à 6-phosphogluconate lactone et, continuant la réaction, finisse par former des pentosanes forts pour la synthèse d'acides



FIG. 24.—Réaction de forte activité isocytrico-deshydrogénase. Basaliome. Oc: 10 X Ob 45 X 6L. Agrandissement échelle, núm. 9.

gluconique, et un accroissement de la phosphogluconate. Cet accroissement peut avoir un rapport avec le commencement du processus néoplasique puisque cette enzyme semble être l'enzyme de la croissance.

La diminution du cytochromooxydase est expliquée par la prédominance de facteurs anaérobies dans le métabolisme des cellules cancéreuses, ce qui explique l'accroissement très grand des deshydrogénase iso-

cytrique et lactiques et une diminution du succin deshydrogénase.

En résumé, un fait semble patent: l'augmentation de la fermentation dans les processus cancéreux en raison du manque de catalyseurs respiratoires, et la grande signification de l'accroissement des acides nucléiques et la synthèse des acides gras par l'intervention de la voie oxydative de la glucose de l'acide phosphogluconique.

TISSU NORMAL

Enzymes	Follicules	Derme	Couche Granuleuse	Kératine	Couche Basale	Glandes Sébacées
Diaphorases DPN	+++++	+++	++++	++	++++	+++++
Diaphorases TPN	+++++	+++	++++	++	++++	++++
Cytochrome oxydase	++	++	++	++	+++	++
Succin deshydrogénase ...	+++	+++	++	+++	+++	+++
Lactique deshydrogénase.	++	++	++	++	++	++
Isocytrique deshydrogénése	++	++	++	++	++	++
Glucose-6-phosphate	+++	++	+++	+++	—	+

TISSU ADJACENT TUMORAL

Enzymes	Basaliomes	Papillomes Malins	Mélanomes	Névus	Epinocellulaires
Diaphorases DPN	++	++	++	—	+
Diaphorases TPN	++	++	+	+	+
Cytochrome oxydase.	+	+	+	+	+
Succin deshydrogénase	++	++	++	++	++
Lactique deshydrogénase	++	+	++	++	++
Glucose-6-phosphate ...	++	+	+	+	+
Isocytrique deshydrogénase	++	++	++	++	++

TISSU TUMORAL

Enzymes	Basaliomes	Papillomes Malins	Mélanomes	Névus	Epinocellulaires
Diaphorases DPN	++	++	++	—	
Diaphorases TPN	++	++	+	+	
Cytochrome oxydase.	+	+	++		
Succin deshydrogénase	+	+	+	+	+
Lactique deshydrogénase	++++	++++	++++	+++	++
Glucose-6-phosphate ...	+++	+++	+	+	++++
Isocytrique deshydrogénase	++++	+++	+++	+++	++

RESUMEN

En este trabajo estudiamos, como continuación de trabajos anteriores, las enzimas óxido-reductoras en tejidos normales, adyacentes al tumor y tumorales de la piel.

Hemos agrupado estas enzimas del modo siguiente:

A) Oxidasas.—Que catalizan el paso del hidrógeno de una manera específica sobre el oxígeno molecular.

I) Citocromo-oxidasas, indefenol-oxidasas.

B) *Dehidrogenasas anaerobias*.—Que catalizan el paso del hidrógeno sobre un aceptor en condiciones anaerobias.

I) Sistema de succino-dehidrogenasa.

II) Sistema de DPN dehidrogenasa.

III) Sistema TPN dehidrogenasa.

IV) Diaforasas DPN y TPN.

MATERIAL

Para este estudio hemos utilizado material humano reciente de biopsias y de autopsias. El número total de tumores estudiados ha sido de 22, de los cuales cinco eran basaliomas, cuatro espinocelulares, cuatro papilomas malignos, cuatro melanomas y cinco nevus.

MÉTODOS

Hemos empleado los métodos de Nachlas-Tsou-Souza-Cheng y Seligman para la succino-dehidrogenasa. Método de Hess-Scarpelli-Pearse para la láctico-dehidrogenasa, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, isocítrica-dehidrogenasa. Método de Nachlas para la citocromo-oxidasa y método en bloque de Valenzuela y Chacón para la difosfopiridín-diaforasa y la trifosfopiridín-diaforasa.

RESULTADOS

Se obtuvieron los resultados siguientes:

Difosfopiridín nucleótido diaforasa.—En tejidos normales de piel esta enzima se presenta con una gran actividad.

En la epidermis, en el citoplasma celular, observamos una fuerte reacción positiva de esta enzima, sobre todo en la capa granulosa y en las células basales. En los folículos pilosos se observa del mismo modo una fuerte reacción positiva, y de igual manera en las glándulas sebáceas. La queratina presenta una débil reacción, así como el dermis.

En las zonas adyacentes tumorales y en los tumores se observó una disminución de la actividad enzimática. Reacción moderada en basaliomas, papilomas malignos y melanomas; negatividad absoluta en todos los nevus estudiados.

Trifosfopiridín nucleótido diaforasa.—Los resultados observados son idénticos, tanto en sus reacciones positivas como en las negativas, a los resultados que se obtuvieron con la enzima precedente.

Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa.—En tejido normal de piel esta enzima se presenta con una fuerte reacción positiva, sobre todo en las células superficiales de la epidermis, así como en la queratina y en los folículos pilosos. En las capas basales, glándulas sebáceas y el resto del dermis, la actividad enzimática o bien es nula o bien es extremadamente débil.

En las zonas adyacentes al tumor, la actividad enzimática es moderada en todas las localizaciones anteriormente mencionadas.

En los basaliomas, la reacción es fuertemente positiva en las células de la superficie y muy débil en el resto del tejido tumoral. Se observó la misma forma de localización y de intensidad reactiva en los papilomas malignos.

En los espinocelulares se observó sola-

mente una reacción en las células superficiales. Los nevus y melanomas estudiados presentaron débil reacción positiva en la mayor parte de las veces, tan débil que puede considerarse como negativa.

En resumen, no se observaron cambios ostensibles de la glucosa-6-fosfato en tejidos normales y tumorales.

Citocromo oxidasa.—Solamente la capa basal de la piel normal presentó fuerte reacción positiva. En el resto de las localizaciones estudiadas no tuvimos más que ligeras reacciones moderadas.

En tejidos adyacentes tumorales, las reacciones enzimáticas observadas fueron muy débiles. En los melanomas, la reacción fue moderada, y en el resto de los tumores estudiados apareció solamente una reacción débil. En conjunto, esta enzima disminuye de intensidad en los tumores con relación a los tejidos normales.

Succino-dehidrogenasa.—Se observó fuertes reacciones positivas en las localizaciones estudiadas en piel normal: folículo, dermis, capa granulosa, queratina y glándulas sebáceas, si bien esta enzima se presentó ligeramente menos activa en la capa granulosa.

En los tejidos adyacentes tumorales se observó una disminución de la actividad enzimática, que aún fue más patente en los tumores estudiados.

Se puede indicar que la succino-dehidrogenasa disminuye cuantitativamente en los basaliomas, papilomas malignos, melanomas, nevus y espinocelulares.

Láctico-dehidrogenasa.—Tanto en los folículos como en el dermis, capa granulosa, queratina y glándulas sebáceas de la piel normal, la reacción histoquímica de esta enzima presentó un carácter positivo, si bien de débil intensidad. Esta intensidad se observó del mismo modo en los tejidos adyacentes de los tumores estudiados, salvo en

los papilomas malignos, donde la actividad láctico-dehidrogenasa fue extremadamente débil. En las zonas propiamente tumorales, la intensidad reactiva apareció fuertemente. La isocítrica-dehidrogenasa presentó reacciones similares, tanto en el tejido normal como en el adyacente tumoral y tumoral.

Generalmente, se observó un aumento de la actividad enzimática de estas dos últimas enzimas en todos los tumores de piel estudiados. Comparativamente, las reacciones de láctico-dehidrogenasa son más intensas que las de la isocítrica-dehidrogenasa.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se comprueba una disminución de las diaforasas TPN y DPN, pues, como el metabolismo anaerobio en el cáncer, prevalece sobre el aerobio contrariamente a las células normales, debido a que existe una deficiencia de los catalizadores de la oxidación: disminución de diaforasas y disminución del citocromo C.

La nicotinamida tiene un papel importante en la síntesis del DPN, y se sabe, por otro lado, que las vitaminas del grupo B forman parte del TPN y del DPN. El déficit de éstas aumenta los procesos anaerobios, entrando de nuevo en el círculo vicioso del déficit de catalizadores de la oxidación y el aumento de la glucosa-6-fosfato, con lo que sigue prevaleciendo el metabolismo anaerobio sobre el aerobio.

En la oxidación de la glucosa-6-fosfato se produce una reducción enzimática del anillo piridínico del TPN, pero este TPNH no se oxida en las mitocondrias, y parece que una de las misiones de TPNH, formado en la vía del fosfogluconico, consiste en servir de agente conductor para la síntesis de los ácidos grasos.

Todos los órganos que oxidan la glucosa por esta vía son activos formadores de ácidos grasos y esteroides.

Hemos visto cómo en los tumores estudiados hay una gran cantidad de glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, y ésta puede hacer que la glucosa-6-fosfato pase a 6-fosfogluconolactona y, continuando la reacción, acabe por formar pentosanas, fuente para la síntesis de los ácidos nucleicos, lo cual es otra de las finalidades de la oxidación de la glucosa por la vía del ácido fosfogluconico.

Se ve, por todo ello, cómo es posible un aumento de la síntesis de los ácidos grasos, así como también un aumento de la síntesis de los ácidos nucleicos, debido, como hemos expuesto, a la desviación de la oxidación de la glucosa por la vía del ácido fosfogluconico, con aumento del fosfogluconato. Este aumento puede estar relacionado con el comienzo del proceso neoplásico, ya que esta enzima parece ser "la enzima del crecimiento".

La disminución de la enzima citocromo-oxidasa puede ser explicada por la preponderancia de los factores anaerobios en el metabolismo de la célula cancerosa, lo que explica el aumento tan considerable de las dehidrogenasas isocítrica y láctica y la disminución de la succino-dehidrogenasa.

En resumen, un hecho parece ser bien patente: el aumento de la fermentación en los procesos cancerosos debido a la falta de catalizadores respiratorios y la gran significación que tiene el aumento en la for-

mación de ácidos nucleicos y en la síntesis de ácidos grasos por la intervención de la vía del ácido fosfogluconico como vía oxidativa de la glucosa.

BIBLIOGRAFIA

- BURSTONE, M. S.: "Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms". New York and London Academic Press, 1962.
- CHANG, J. P., and HORI, S. H.: "A tetrazolium salt reduction method for demonstrating lipoproteins in tissue section", *J. Histochem Cytochem*, 11, 738-740 (1963).
- NACHLAS, M. M.; WALKER, D. G., and SELIGMAN, A. M.: "A Histochemical method for the demonstration of disphosphopyridine nucleotide diaphorase", *J. Biophys. Biochem Cytol.*, 4, 29-38 (1958).
- PEARSE, A. G. E., and HESS, R.: "Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry", *Experientia (Basel)*, 17, 136-141 (1961).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and applied* 2nd ed London. Churchill, 1960.
- PEARSE, A. G. E.; HESS, R., and SCARPELLI, D. G.: "Cytochemical localization of succinic dehydrogenase in mitochondria from periplanta americana", *Nature (Lond)*, 181, 702-03 (1958).
- PEARSE, and HESS, R.: "A cytochemical study of the dehydrogenase, of mitochondria and mitochondrial particulates by a monotetrazolium-cobalt chelation method", *J. Biophys. Biochem Cytol.*, 7, 243-49 (1960).
- ZIMMERMANDDIT, and PEARSE, A. G. E.: "Limitations in the histochemical demonstration of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases ("nothing dehydrogenase")", *J. Histochem Cytochem*, 7, 271-75 (1959).

Adresse: Dr. Juan VALENZUELA y CHACON.
Instituto Cajal. Velázquez, 138.
MADRID. España.