

# Inducción experimental transplacentaria y neonatal de tumores nerviosos a ratas Wistar con etilnitrosourea

Teresa Ribalta Farrés

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

R. 194.504

INDUCCION TRANSPLACENTARIA Y NEONATAL  
DE TUMORES NERVIOSOS EN RATAS WISTAR  
CON ETILNITROSOUREA

T E S I S   D O C T O R A L

TERESA M. RIBALTA FARRES

DIRECTOR: PROF. DR. A. CARDESA

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
JULIO 1985

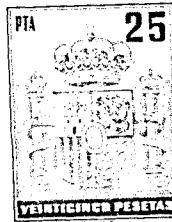
**A la meva família**



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA  
CATEDRA DE ANATOMIA PATOLOGICA

Prof. Dr. A. CARDESA



Casanova, 143  
Tel. 254 68 18  
BARCELONA-36

D. ANTONIO CARDESA GARCIA; Catedrático numerario de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

C E R T I F I C A :

Que la Tesis Doctoral efectuada por Dña. Teresa M. Ribalta Farrés, que tiene por título "Inducción experimental transplacentaria y neonatal de tumores nerviosos en ratas Wistar con etilnitrosourea", ha sido realizada bajo mi dirección en esta Cátedra y se encuentra en condiciones de ser presentada para la obtención del grado de Doctor.

Para que conste a todos los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Barcelona a 25 de Junio de 1985.



*A. Cardesa*

Fdo: Prof. Dr. A. Cardesa

## I N D I C E

	página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	6
I.- REVISION HISTORICA DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO. ....	7
II.- INCIDENCIA DE LOS TUMORES NERVIOSOS .....	14
III.- FRECUENCIA DE LOS DISTINTOS TIPOS HISTOLOGICI- COS. ....	17
IV.- PATOGENESIS DEL CANCER DEL SISTEMA NERVIOSO .....	21
V.- TUMORES NERVIOSOS EXPERIMENTALES .....	30
V.A.- Tumores nerviosos experimentales indu- cidos en el ratón. ....	31
V.B.- Tumores nerviosos experimentales indu- cidos en el hamster. ....	34
V.C.- Tumores nerviosos experimentales indu- cidos en la rata. ....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	51
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	53
I.- MATERIAL	
I.A.- Carcinógeno. Estructura química, pro- piedades biológicas y mecanismo de acción neurocarcinogénica. ....	54
I.B.- Animales y tratamiento .....	59

II.- METODOS	
II.A.- Autopsia. ....	62
II.B.- Técnicas de fijación de los tejidos.....	63
II.C.- Estudio de microscopía óptica conven- cional. ....	63
II.D.- Estudio de microscopía óptica con técnicas inmunohistoquímicas. ....	69
II.D.1.- Proteína ácida fibrilar glial. ....	72
II.D.2.- Proteína S-100. ....	75
II.E.- Estudio de microscopía electrónica. ....	78
II.F.- Análisis estadístico . ....	80
<b>RESULTADOS</b> .....	81
I.- INCIDENCIA TUMORAL. ....	82
II.- LOCALIZACION DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES. ....	83
III.- ASPECTO MACROSCOPICO DE LOS TUMORES EXPERI- MENTALES. ....	86
IV.- ASPECTO MICROSCOPICO DE LOS TUMORES EXPERI- MENTALES. ....	91
V.- DISTRIBUCION DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES EN LOS DISTINTOS GRUPOS. ....	99
VI.- ESTUDIO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES CON TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS. ....	103

VI.A.- Proteína ácida fibrilar glial. ....	103
VI.B.- Proteína S-100. ....	104
VII.- ESTUDIO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES CON MICROSCOPIA ELECTRONICA. ....	107
VII.A.- Aspecto ultraestructural de los tumores del sistema nervioso cen- tral. ....	107
VII.B.- Aspecto ultraestructural de los tumores del sistema nervioso perifé- rico. ....	112
<b>DISCUSION</b> .....	117
I.- TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. ....	119
II.- TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO. ....	132
III.- CONSIDERACIONES FINALES. ....	138
<b>CONCLUSIONES</b> .....	143
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	154
<b>TABLAS Y GRAFICAS</b> .....	225
<b>FIGURAS Y LEYENDAS</b> .....	242

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Dr. Antonio Cardesa García, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y Jefe del Departamento Asistencial de Anatomía Patológica del Hospital Clínico y Provincial y Director de esta Tesis Doctoral, por haberme brindado la oportunidad de introducirme en el fascinante campo de la carcinogénesis experimental, del cual es un prestigioso contribuyente científico a nivel nacional e internacional. A él debo todos los conocimientos que he adquirido sobre este tema, así como la forma más útil y científica de utilizarlos. También quiero agradecerle su paciente labor directora, así como su siempre buena disposición a proporcionarme todas las facilidades que han estado en su mano para la realización de este trabajo.
  
- A la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia, gracias a cuyo valioso apoyo económico ha sido posible la realización de esta tesis.
  
- Al Dr. Baer von Schilling, Jefe del Departamento de Toxicología y Patología Animal de los Laboratorios Merck Química, S.A. de Barcelona, por la precisión y meticulosidad que han dispensado él y sus colaboradores en el cuidado de los animales, en la recogida de los datos clínicos y en la organización general del

estudio. Su abierta colaboración en diversos aspectos técnicos ha sido para mí de gran utilidad.

- Al Dr. Isidro Ferrer Abizanda, neuropatólogo del Hospital de Bellvitge y Profesor Adjunto del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Barcelona, por su gran profesionalidad y voluntariosa dedicación al campo de la neuropatología que siempre me ha servido de estímulo y referencia para introducirme en este área. Debo agradecerle también su desinteresada colaboración en el estudio ultraestructural de varios casos y en la facilitación de material bibliográfico.
  
- Al Dr. Sergi Serrano Figueras, Jefe del Servicio de Patología del Hospital Nuestra Sra. de la Esperanza, por las facilidades que ha puesto en la utilización del microscopio electrónico y de parte de su personal técnico.
  
- Al Dr. Josep Lloreta Trull, mi marido y médico Residente de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Sra. de la Esperanza, por las horas y el esfuerzo que ha sumado a su ya apretado programa de formación en la especialidad, al colaborar en el estudio ultraestructural de los casos.

- A las Srtas. M<sup>a</sup> Luisa Mariñoso Barba, Licenciada en Biología y Rosa Martínez Domenech, técnica de Laboratorio, ambas del Departamento de Patología del Hospital Nuestra Sra. de la Esperanza, por su eficaz y totalmente desinteresada dedicación a la preparación del material para el estudio ultraestructural de los casos.
- A las Srtas Carmen Ubach y Francisca Isart Catalá, técnicas del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico y Provincial que han cargado con todo el peso del procesamiento de más de 5.000 cortes histológicos y del estudio inmunohistoquímico, respectivamente, por su paciencia y siempre buena disposición a perfeccionar sus resultados.
- A la Srta. Rosario Gómez Monge, secretaria del citado Departamento, por su rapidez y eficacia en el mecanografiado.
- Al Dr. Eduard Escrich, biólogo y experto en Bioestadística y Programación de ordenadores, por su asesoramiento en el manejo estadístico de los resultados.
- A los compañeros del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad y del Hospital Clínico, porque gracias a su apoyo moral y laboral ha sido posible la finalización y escritura de

esta Tesis.

- A mi hija Mariona, que ha nacido entre papeles y tablas, por haber sido como es, tranquila y paciente, y haberme dejado las suficientes horas libres para dedicarlas a este trabajo.

I N T R O D U C C I O N

## REVISION HISTORICA DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO

El conocimiento de las neoplasias del encéfalo se remonta, como tantos capítulos de la histopatología tumoral, a los estudios de Virchow, que fué el primero en sugerir la posibilidad de que la neuroglía formase tumores, a los que denominó gliomas <sup>356</sup>. Años más tarde, Ribbert, en 1918 <sup>266</sup>, profundizando en este sentido, llegó a la conclusión de que estos tumores se desarrollaban a expensas de restos tisulares aislados durante la ontogénesis, o bien de elementos que habrían interrumpido su desarrollo en cualquier fase de la misma, a la vez que amplió los conocimientos de Virchow describiendo la existencia de diversos tipos histológicos, tales como el espongioblastoma, el glioblastoma, el glioma y el neuroblastoma. Estas variedades, según su orientación, representarían distintas etapas de la diferenciación de los elementos nerviosos.

Hacia finales del primer cuarto de este siglo se describieron dos nuevos elementos celulares, gracias a los trabajos de la escuela española de histología <sup>50, 268 b, 268 c</sup>: la microglía y la oligodendroglía. Este mejor conocimiento de la trama nerviosa y el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica fueron el caldo de cultivo para el establecimiento de la primera clasificación de

los tumores nerviosos por los americanos Bailey y Cushing <sup>9</sup>.

El gran impulso lo dió Bailey, en 1916, al establecer la primera y revolucionaria clasificación de los tumores encefálicos (ver Tabla I), en colaboración con el eminente neuro-cirujano Harvey Cushing, el cual pudo disponer de un abundante material operatorio, además de una experiencia clínica y un criterio anatomopatológico nada comunes.

El interés de los anatomopatólogos por el estudio de los tumores del sistema nervioso despertó, por tanto, al ritmo de los grandes avances de la neurocirugía, lo cual permitió disponer de tejidos frescos en condiciones ideales para ser estudiados con las técnicas más adecuadas, requisito que no cumplían las piezas obtenidas en las necropsias.

Aquella primera clasificación de Bailey y Cushing, edificada en base al desarrollo embriológico del tejido nervioso y orientada según los estudios histogenéticos de la escuela de Cajal (Cajal, Del Río Hortega y De Castro) <sup>40, 50, 268b, 268c, 271</sup>, de valor indiscutible, recibió algunas críticas, no obstante, en algunos aspectos, de otros estudiosos, entre los que se contaba Del Río Hortega <sup>272</sup> (ver Tabla II). Este, con sus impregnaciones argénticas, demostró la naturaleza neuroblástica de los llamados por Bailey, meduloblastomas, es decir tumores de células

indiferenciadas germinales del embrión que tendrían la capacidad de diferenciarse, según él, en dos sentidos: a neuroblastos y a glioblastos. Posteriormente, se reconoció que los tumores gliales bien diferenciados podían evolucionar hacia formas más indiferenciadas, más anaplásicas. Por tanto, aunque en general la de Bailey y Cushing fué una clasificación bien aceptada por patólogos y clínicos, desde un principio sufrió retoques y críticas que llevaron a un gran barroquismo en la nomenclatura de los tumores nerviosos, especialmente por Penfield <sup>246,247</sup>, Del Río-Hortega, <sup>269,270,272</sup>, Roussy y Oberling <sup>278</sup> y Bergstrand <sup>15</sup>. Esta situación confusa dió pié a Kernohan, en 1949 <sup>157</sup> (ver Tabla III), a elaborar una nueva clasificación más simplificada, que rompía con el criterio histogenético, basada en el grado de malignidad del tumor (grados 1 a 4 por orden creciente de malignidad). Según este autor, las células gliales tumorales proceden de un proceso de desdiferenciación de las células gliales adultas. Sin embargo, esta nomenclatura, si bien parece clara para los astrocitomas, resulta bastante confusa cuando se aplica al grupo de los oligodendrogliomas y, sobretodo, al de los neuroastrocitomas (gangliogliomas). Además, hay que tener en cuenta que la heterogeneidad de los patrones histológicos, en muchos tumores neuroectodérmicos, presenta problemas para el uso rígido de un sistema de grados cuando se aplica a material de

biopsia. EL fragmento examinado puede estar constituido por un área bien diferenciada de un tumor que en otras regiones puede ser peor diferenciado. A pesar de estas desventajas, sin embargo, es una clasificación ampliamente usada por patólogos y clínicos aunque, por las razones antes mencionadas, debería restringirse a los tumores examinados en autopsias.

Más recientemente, Russell y Rubinstein <sup>282,283</sup>, partiendo de nuevo del esquema original de la clasificación de Bailey y Cushing, realizaron algunas modificaciones y elaboraron un esquema de trabajo (ver Tabla IV) que incluye, de nuevo, algunas de las entidades que habían sido eliminadas anteriormente.

En cuanto a los tumores de los troncos nerviosos, fue igualmente Virchow, en 1871 <sup>356</sup>, quien distinguió ya tres formas diferentes: Los neuromas "verdaderos", según él debidos a una proliferación aislada de fibras nerviosas, los neuromas "falsos", por proliferación del tejido conjuntivo del nervio, y las formas "mixtas", en las que habría una combinación de ambos elementos.

Más tarde, en 1882, von Recklinghausen <sup>357</sup> consideró a todos estos tumores como fibromas desarrollados a expensas del tejido conjuntivo de los nervios, y admitió un origen disontogenético para todos ellos, relacionándolos, más o menos directamente, con la enfermedad que lleva su nombre.

Thomson <sup>340</sup> introdujo por primera vez el concepto de neuroma solitario y múltiple, sin sospechar que esta distinción entrañaba una diferencia en la constitución histológica. Efectivamente, Bard <sup>11</sup> sostuvo que la célula proliferante del neuroma solitario era la célula de Schwann y, en cambio, en los tumores múltiples, la célula tumoral era el fibroblasto, lo que entroncaba con el concepto de neurofibromatosis de von Recklinghausen.

La hipótesis de Bard fué aceptada posteriormente por Verocay <sup>351</sup> y Antoni <sup>8</sup>, llegándose a la conclusión de que los tumores de los nervios se deben, ordinariamente, a la proliferación de los elementos no nerviosos de los mismos, y que se pueden distinguir dos grupos: los neurinomas, producidos por la proliferación de las células de Schwann, y los neurofibromas, en los que dominan los elementos conjuntivos del epi, peri y endoneuro.

Si bien puede afirmarse que el conocimiento de los tumores encefalomedulares ha progresado rápidamente, gracias principalmente a la estrecha colaboración que ya desde el principio se estableció entre patólogos y clínicos, debemos asumir que en la actualidad todavía estamos lejos de entender completa y adecuadamente la biología, la histogénesis y los mecanismos patogénicos que conducen al origen y desarrollo de la mayor parte de neoplasias en el sistema nervioso humano.

En la actualidad, la mayoría de neuropatólogos se decantan por una de las dos grandes tendencias históricas en la clasificación de los tumores nerviosos. Por una parte se encuentran los seguidores del criterio histogenético, propuesto inicialmente por Bailey y Cushing <sup>9</sup>, seguido también, aunque con algunas modificaciones, por Del Río-Hortega <sup>270</sup> y, más recientemente, revitalizado por Russell y Rubinstein <sup>282</sup>, según el cual los tumores nerviosos se originan a partir de células indiferenciadas, aisladas en el interior del parénquima nervioso, que no terminaron su evolución, la cual podría ser reconducida de una forma anómala por un agente cancerígeno y determinar su proliferación incontrolada. Las células tumorales recapitularían, pues, los distintos estadios de evolución durante la ontogénesis. Además, esta clasificación incluye una serie de características biológicas, ya que a cada grupo tumoral se le asigna una localización preferente, edad y sexo más frecuentes y también el grado de malignidad.

Otra gran tendencia actual gira en torno a la concepción, con intención simplificadora, propuesta por Kernohan y col. <sup>157</sup>, de que los tumores nerviosos se desarrollan a partir de células ya maduras por un proceso de dediferenciación, concepto más en consonancia con la corriente predominante hoy en día en oncología general.

Ambas posturas, cuando se las somete a críticas estrictas, adolecen de defectos semejantes. Hay que tener presente que, si bien es verdad que hoy en día la mayor parte de los patólogos aceptan la hipótesis de que las neoplasias surgen como consecuencia de un proceso de desdiferenciación de células adultas, las cuales por la acción de estímulos cancerígenos se transformarían en una especie celular nueva, la célula neoplásica, resulta difícil admitir que, por ejemplo, una mutación celular u otra alteración en el código genético capaz de transformar una célula adulta normal en neoplásica, pueda darse simultáneamente en varias células localizadas en distintas áreas, tal como ocurre en los tumores multicéntricos, situación no infrecuente en neurooncología. Desde el punto de vista actual, no se puede aceptar que la existencia de una heterotopia hística o de células detenidas en su evolución, tengan que ir seguidas necesariamente de la aparición de una neoplasia, pero tampoco se puede deducir de ello que tales células embrionarias no puedan ser alcanzadas y alteradas también por los agentes cancerígenos.

Problemas como el de la existencia de verdaderos neuroblastomas encefálicos, de gliomas mixtos, de la histogénesis de los glioblastomas multiformes, de la naturaleza de las células proliferantes en los sarcomas neurogénicos, etc...<sup>283,38,95,235</sup> siguen siendo, aún hoy en día, objeto de numerosas especulaciones. De ello se desprende el interés de contar con modelos

experimentales de carcinogénesis que permitan analizar, de forma comparativa con la especie humana, la génesis y el comportamiento de los tumores nerviosos.

### INCIDENCIA DE LOS TUMORES NERVIOSOS

Los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) y sus meninges tienen una incidencia de alrededor del 1,2% de todas las autopsias y de un 9% de todas las neoplasias primarias. Un 85% de los mismos se encuentran en la cavidad craneal <sup>280</sup>. Otras revisiones, más antiguas, recogen cifras similares. Así, por ejemplo, Weil en 1946 <sup>363</sup> reunió los datos de 4 centros europeos y observó que los tumores primarios y metastásicos del encéfalo se encontraban en un 1,81% de un total de 62.142 autopsias, siendo el 1,4% de ellos, tumores primarios. Los gliomas se observaban en el 0,7% y constituían el 49% de todos los tumores cerebrales primarios. Estas cifras son equiparables a las obtenidas por autores de otros países <sup>283</sup>.

Según estadísticas más recientes <sup>105</sup>, en los E.E.U.U., el cáncer del SNC comprende aproximadamente el 1,5% de todos los nuevos casos de cáncer y se sitúa en el 9º lugar en el orden de frecuencia de órganos afectados por neoplasias malignas. Aproximadamente el 94% se originan en el encéfalo y meninges craneales y el 6% restante lo hacen en los nervios craneales y otros puntos

del SNC. La mortalidad por cáncer del SNC en una serie de países europeos y en Nueva Zelanda se cifra entre un 4,0 y 6,1 por 100.000 varones y del 2,7 al 4,6 para las mujeres. Los valores correspondientes de los E.E.U.U. de 5,1 y 3,5, respectivamente, se encuentran en la mitad de este espectro. La tasa de mortalidad en pacientes de raza blanca aumentó del 3,8% por 100.000 habitantes en 1940, al 5,8% en 1977, y se observó el mismo patrón de incremento, aunque a niveles inferiores, en la raza negra (de 2,15 a 3,85) <sup>105</sup>.

La tasa de mortalidad por edades <sup>105</sup> muestra patrones similares en varones y hembras: alrededor del 2 por 100.000 por debajo de los 10 años, un descenso al 1 por 100.000 en los 10 años, para volver a aumentar hasta un pico de alrededor del 20 por 100.000 en varones entre los 70 y 74 años y del 14 para mujeres entre los 65 y 69 años, con otro descenso rápido a partir de los 75 años. En la infancia, los tumores del SNC ocupan el segundo lugar de frecuencia después de las neoplasias hematológicas, tanto en varones como en hembras de menos de 15 años <sup>280, 44, 105</sup>.

En Inglaterra y País de Gales <sup>368</sup>, los tumores del SNC son la sexta causa más frecuente de cáncer en los adultos y la segunda en los niños, tras revisión de un total de 123.782 pacientes fallecidos en 1975 por tumores malignos, que representan el 21% de 582.825 muertes por todas las causas. Un 2% de todos los tumores en adultos de este país se localizan en el cerebro y

cerca del 0,7% son de origen neuroectodérmico.

En España, según cifras recogidas por la O.M.S. en 1982 de datos procedentes de los registros del Cáncer de Navarra y de Zaragoza durante el periodo 1973-1977 <sup>41</sup>, la incidencia anual por 100.000 habitantes se encuentra entre el 7,4 y el 9,4, en el sexo masculino, y entre el 5,4 y el 7,1, en el sexo femenino. Según estos mismos datos, el cáncer del SN ocupa de un 7º a un 9º puesto en los varones y de 6º a un 8º puesto en las mujeres, tras los tumores de la esfera digestiva, respiratoria, urogenital y cutánea, respectivamente, y por encima, entre otras, de las neoplasias hematológicas, endocrinas o esqueléticas.

Es de destacar que, a nivel mundial, existen considerables diferencias topográficas en la incidencia del cáncer del SN.<sup>41</sup> Así por ejemplo, mientras que en los países occidentales, las cifras oscilan entre el 6 y el 8 por 100.000 habitantes, en países orientales como China o la India, la incidencia es más baja, del 1 al 2 por 100.000 habitantes en los mismos periodos de tiempo analizados, comprendidos entre los años 1973 y 1977.

Salvo contadas excepciones, no existen diferencias significativas en la incidencia entre ambientes urbanos y rurales en los diversos países <sup>41</sup>.

### FRECUENCIA DE LOS DISTINTOS TIPOS HISTOLOGICOS

Entre los tumores intracraneales, los gliomas son los más frecuentes. Un 40-50% de todos los tumores, tanto primarios como secundarios, diagnosticados en todas las edades, pertenecen a esta categoría <sup>280</sup>.

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral más frecuente dentro de las neoplasias primarias (más del 50%) seguido del astrocitoma, grados I y II (alrededor del 12%). No existen diferencias importantes entre varones y hembras. Estos porcentajes se obtuvieron sobre un total de casos estudiados, que ascendió a 2521 varones y 1925 hembras, durante el periodo de 1973-1978, según datos aportados por el NCI (National Cancer Institute), programa SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) de los E.E.U.U.<sup>105</sup>. En segundo lugar, por orden de frecuencia tras los gliomas, se desarrollan, en el adulto, los meningiomas (13-18%), seguidos de los Schwannomas del nervio acústico (8%). La incidencia de adenomas hipofisarios y de tumores metastásicos difiere ampliamente según los centros neuroquirúrgicos de referencia: La incidencia de adenomas hipofisarios varía desde el 3,4 al 17,8% de tumores intracraneales; la de neoplasias secundarias entre el 4,2 y el 37%. Esta disparidad depende de si las cifras provienen de autopsias generales o de fuentes neurológicas o neuroquirúrgicas <sup>280</sup>.

En una revisión de 496 tumores primarios encefálicos de todas las edades, hallados en autopsias a lo largo de 22 años <sup>282</sup>, los porcentajes de los distintos tipos tumorales son los siguientes:

Glioblastoma	55%
Astrocitomas	20,5%
Ependimomas	6%
Oligodendroglioma	5%
Papiloma plexos	2%
Quiste coloide	2%

Por debajo de los 15 años, los gliomas comprenden del 80 al 90% de tumores intracraneales, con una incidencia mucho menor de meningiomas y schwannomas <sup>280</sup>. En el estudio del NCI, programa SEER <sup>105</sup>, se observó una diferencia en la frecuencia de los distintos tumores gliales, antes y después de los 20 años. En los jóvenes, predominaron el astrocitoma grado I y el meduloblastoma (22% cada uno), mientras que los tumores más frecuentes en los adultos fueron el glioblastoma y el astrocitoma de grados III y IV (alrededor del 64%).

En la infancia, según una estadística basada en 129 tumores <sup>25</sup>, los gliomas intracraneales se distribuyen de la siguiente forma:

Astrocitoma	48%
Meduloblastoma	44%
Ependimoma	8%

Otra diferencia importante, en cuanto a la incidencia por edades,

es la localización del tumor en la cavidad craneal: en los niños, el 70% de los tumores son infratentoriales, mientras que, en los adultos, el 70% son supratentoriales <sup>280,38</sup>.

En España, se han publicado escasas revisiones estadísticas basadas en series largas de tumores del sistema nervioso. Una de las más relevantes por su extensión y rigurosidad en el estudio es la aportada por Bullón <sup>37</sup>, en la que el autor expresa los resultados de la aplicación de diversas técnicas argénticas de Rio-Hortega en un total de 282 casos. Entre los tumores más frecuentes de dicha serie destacan el glioblastoma multiforme con 39 casos, el glioblastoma "isomorfo", con 10 casos, 23 astrocitos (todas las variedades), 15 oligodendrogliomas, 7 ependimomas, 11 neurinomas, 13 meduloblastomas, 14 "neuroblastomas" de retina, 41 meningiomas, 11 sarcomas, 13 angiomas, 15 craneofaringiomas, 16 tumores metastásicos y 10 tumores no clasificados, entre otros.

Por lo que se refiere a los tumores intraespinales, representan un 15% de todos los tumores primarios del SNC y sus coberturas y nervios <sup>311</sup>. Su distribución es la siguiente :

Schwannomas	29%
Meningiomas	25,5%
Gliomas	22%
Sarcomas	11,9%
Angiomas	6,2%

Cordomas	4%
Tumores epidermoides y otros	1,4%

Entre los gliomas intraespinales, el grupo más numeroso corresponde a los ependimomas <sup>311</sup>, un 60% de los cuales se desarrolla en el "filum terminale". Se distribuyen de la siguiente forma:

Ependimomas	63%
Astrocitomas I y II	24,5%
Glioblastoma y astro- citomas III y IV	7,5%
Oligodendrogliomas	3%
Otros	2%

Los gliomas intracraneales tienen una incidencia doble en los varones que en las hembras tanto en la infancia como en la vida adulta <sup>41</sup>. Esta relación tiende a igualarse en los gliomas espinales. Por el contrario, los schwannomas intracraneales son relativamente más frecuentes en las hembras. Los meningiomas craneales ocurren con una frecuencia doble en el sexo femenino y cuádruple en la localización espinal <sup>311</sup>.

## PATOGENESIS DEL CANCER DEL SISTEMA NERVIOSO

Se conoce verdaderamente poco sobre los factores etiopatogénicos que inducen la aparición de tumores en el sistema nervioso humano.

Aparte de la bien establecida incidencia familiar de retinoblastomas y el desarrollo ocasional de meduloblastomas de cerebelo en gemelos, no se ha podido demostrar una **predisposición genética** que influya en la incidencia, en conjunto, de los tumores intracraneales primarios, con excepción de unos pocos casos de astrocitomas familiares <sup>387, 283</sup>.

Los síndromes disgenéticos o facomatosis constituyen una situación especial. Se consideran dentro de este grupo los siguientes síndromes <sup>281</sup>: 1) neurofibromatosis o enfermedad de von Recklinghausen, 2) síndrome de Sturge-Weber, 3) síndrome de von Hippel-Lindau, y 4) esclerosis tuberosa. Recientemente se ha añadido al grupo el síndrome de la melanosis neurocutánea y se ha propuesto incorporar, también, al síndrome del nevus basocelular. Todos ellos cursan con frecuencia con neoplasia o lesiones hamartomatosas del sistema nervioso. En la neurofibromatosis, la enfermedad de Lindau y en la esclerosis tuberosa son frecuentes los tumores del sistema nervioso central y es característica la multiplicidad de tumores nerviosos centrales y/o periféricos.



Sólo la neurofibromatosis y el síndrome de la melanosis neurocutánea cursan con una afectación prominente del sistema nervioso periférico.

Todas estas enfermedades están relacionadas de algún modo con alteraciones del desarrollo durante la etapa embrionaria o fetal. En algunos, los tumores se manifiestan en el momento del nacimiento, por tanto son indiscutiblemente congénitos. En otros, no aparecen los síntomas hasta la adolescencia o la vida adulta y, en algunos casos incluso, los pacientes permanecen asintomáticos durante toda la vida. Muchas de estas enfermedades son hereditarias y se transmiten con una herencia de tipo autosómico dominante, sin embargo en todas ellas se describen casos esporádicos. En el síndrome de Lindau, la incidencia familiar es del 20% <sup>181</sup>; en la esclerosis tuberculosa la incidencia familiar es del 50% con una herencia autosómica dominante y penetrancia variable <sup>14</sup> y en la neurofibromatosis, aproximadamente el 50% de los casos también son hereditarios con una transmisión de tipo autosómico dominante de expresión variable con penetrancia del 100% <sup>269</sup>.

Especial interés cobra en nuestro contexto la **neurofibromatosis o enfermedad de von Recklinghausen**, que se caracteriza clínicamente por asociación de múltiples neoplasias del sistema nervioso

periférico, neoplasias del sistema nervioso central, alteraciones cutáneas como las manchas "café au lait" o la elefantiasis, alteraciones óseas y articulares, gigantismos localizados, etc. 122,283. Los tumores del sistema nervioso periférico pueden ser schwannomas benignos, schwannomas malignos, pero los más frecuentes y característicos de la enfermedad son los neurofibromas. Estos tumores son típicamente múltiples y pueden ser histológicamente difusos o plexiformes. La variedad plexiforme se considera patognomónica de la enfermedad 122. Estos neurofibromas se desarrollan en cualquier punto del recorrido de los principales nervios periféricos y vegetativos, o en las proximidades de sus ramas terminales en la dermis y vísceras, respectivamente. También se afectan frecuentemente los ganglios simpáticos y raquídeos. Rara vez se asocian a feocromocitomas o ganglioneuromas periféricos. El embarazo y la pubertad aumentan el número y tamaño de estos tumores. También son frecuentes los neurofibromas localizados en las raíces de los nervios craneales, principalmente del VIII par y del V par con el ganglio de Gasser, siendo típica la afectación bilateral, y los localizados en las raíces y nervios de la médula espinal, en donde dan lugar a tumores en forma de reloj de arena, en parte intra y en parte extrarraquídeos. Las raíces de la "cauda equina" son las más habitualmente afectadas. La transformación maligna de los neurofibromas es una complicación totalmente comprobada. Su verdadera incidencia es

difícil de obtener pero se han apuntado cifras desde el 10%<sup>273,235</sup> hasta el 29% a la edad de 40 años<sup>30</sup>. Se considera que el cambio responsable del desarrollo de un neurofibroma se basa, con gran probabilidad, en una alteración del desarrollo que afecta a las células que forman las vainas nerviosas, es decir, a las células de Schwann, peri y endoneurales, en las zonas de contacto ectomesodérmico<sup>267</sup>.

Los tumores del sistema nervioso central se desarrollan, en esta enfermedad, en un 5-10% de los casos y son, prácticamente en su totalidad, gliomas<sup>276</sup>, siendo los más frecuentes el astrocitoma pilocítico de tipo "juvenil" del III ventrículo y el glioma del nervio óptico, que no es más que un astrocitoma pilocítico con gran tendencia a infiltrar las leptomeninges. También se han descrito gliomas difusos con gran tendencia a la infiltración meníngea y de los espacios perivasculares, ependimomas en médula espinal, a menudo múltiples, oligodendrogliomas, meningiomas múltiples, incluso glioblastomas multiformes. También se han descrito schwannomas difusos, con o sin contigüidad con un nervio periférico. En el sistema nervioso central, además de las neoplasias, se han descrito lesiones de carácter malformativo que pueden ser microscópicas, pero algunas alcanzan dimensiones comparables a verdaderos tumores. Estas lesiones se han referido como schwannosis, meningiomatosis, angiomatosis, heterotopias

gliales así como anomalías neuronales. En cuanto a otros tumores no nerviosos, se ha referido una mayor incidencia de nefroblastomas (tumores de Wilms), rhabdiosarcomas y leucemias en esta enfermedad <sup>267</sup>.

Su etiología exacta es desconocida. Solamente se tienen algunos indicios generales. Según Bolande <sup>28,30</sup>, se trataría de una neurocristopatía, dado que la mayoría de componentes celulares de las lesiones características de la enfermedad, tienen su origen en la cresta neural. El mayor conocimiento de esta estructura embrionaria ha permitido clarificar que la migración de las células de la cresta neural, su desarrollo y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas están ampliamente determinadas por el medio ambiente celular y extracelular inmediato de los tejidos por los que estas células circulan o se detienen <sup>370</sup>. Ello significa que los elementos clave de la patogenia de la neurofibromatosis pueden ser extrínsecos a las propias células derivadas de la cresta neural, ya sea en términos de interacciones célula-célula o en cambios químicos en la sustancia fundamental intercelular. Según Riccardi <sup>267</sup>, autor de una reciente revisión de la enfermedad, el defecto primario residiría en una alteración del sistema de membranas secretoras del aparato de Golgi y del Retículo endoplásmico de las células de la cresta neural y que la expresión de este defecto estaría determinada por

las interacciones intercelulares locales entre elementos derivados de la cresta neural y no derivados de la misma. Asimismo postula que los mastocitos y sus secreciones participarían en tales interacciones con el efecto de desenmascarar la presencia latente del defecto de la neurofibromatosis.

Los estudios genéticos <sup>67,301</sup> han demostrado que la enfermedad clásica es debida a una mutación autosómica dominante, de distribución mundial. Ambos sexos se afectan por igual. La expresión es variable pero la penetrancia es del 100%. Se cree que es una de las mutaciones más frecuentes de la humanidad. Su frecuencia se ha estimado en  $10^{-4}$  mutaciones por gameto y por generación. Como mínimo, un 50% de los casos son producto de nuevas mutaciones. Para explicar esta elevada frecuencia de mutaciones se han invocado factores como la edad paterna, en los pacientes que inician la enfermedad en una familia, que muestra dos picos, uno que coincide con la media de la población general (32 años) y otro desviado hacia alrededor de los 40 años. Otra explicación alternativa es que esta enfermedad no sea una entidad única sino un grupo de enfermedades heterogéneo desde el punto de vista genético.

Las anomalías cromosómicas son un hallazgo no infrecuente en los gliomas poco diferenciados, lo cual no es sorprendente dado el

carácter anaplásico de estos tumores. Parece, por el contrario, más significativo el hecho de encontrar una ausencia de un cromosoma G, identificado como el nº 22, en muchos meningiomas benignos. En estos tumores también se han detectado otras anomalías cromosómicas así como inmunofluorescencia positiva contra un antígeno tumoral relacionado con el SV-40<sup>365</sup> y se han demostrado morfológicamente papovavirus<sup>366</sup>.

Excepto para los meningiomas, los traumatismos craneales no parecen estar relacionados causalmente con el desarrollo de neoplasias intracerebrales. Lo que sí se admite es la aparición de quistes dermoides y epidermoides en la región lumbar tras punciones repetidas sobre la misma<sup>280</sup>.

Existe el acuerdo general de que, hasta el momento presente, no hay ninguna evidencia inequívoca de que alguna neoplasia de la esfera neurológica sea inducida por un virus. La simple observación de partículas víricas en tumores humanos o, incluso, en tumores experimentales, no tiene, necesariamente, un significado etiológico inmediato<sup>283</sup>. En este contexto, el interés se centra sobre la naturaleza de la relación entre la oncogénesis vírica y la leucoencefalopatía multifocal progresiva. En esta enfermedad degenerativa desmielinizante, se forman unos astrocitos atípicos gigantes con núcleos monstruosos, con características de células

neoplásicas y se ha demostrado, tanto morfológica como virológicamente, que la transformación de estas células se debe a la replicación en su interior de viriones pertenecientes al grupo papova <sup>388,364</sup>. Por otra parte, se han descrito nódulos gliomatosos microscópicos en el centro de los focos desmielinizantes, sin que se hayan podido reconocer partículas víricas en las células tumorales <sup>49</sup>. Asimismo, una de las cepas de virus que causan esta enfermedad (JC virus) ha demostrado ser oncogénica experimentalmente, dando lugar al desarrollo de tumores neuroepiteliales malignos en gran número de hamsters inoculados intracerebral o subcutáneamente, tras el nacimiento <sup>358</sup>. Otra cepa del mismo grupo papova ha demostrado transformar células cerebrales humanas en cultivo <sup>288</sup>.

En relación con posibles alteraciones inmunológicas, se ha notado en los últimos años un incremento en la incidencia de neoplasias, especialmente de tipo hematológico, como secuela de los trasplantes de órganos. La afectación selectiva del SNC se ha atribuido a la supresión inducida en la respuesta inmunológica combinada con la relativamente elevada tolerancia inmunológica de este órgano <sup>297</sup>.

En la infancia y adolescencia, los tumores más primitivos y malignos, como el meduloblastoma, el neuroblastoma y el meduloblastoma

pitelioma, se originan probablemente de **precursores** neuronales o de células bipotenciales. Algunos de estos tumores son congénitos, presentándose clínicamente a las pocas semanas del nacimiento. Los restantes parecen originarse a partir de **restos embrionarios** persistentes normalmente en la vida postnatal inmediata (capa granular externa del cerebelo) o de naturaleza patológica. También se han descrito gliomas congénitos, teratomas congénitos, meningiomas, tumores de plexos coroideos y tumores vasculares <sup>315</sup>. Se ha apuntado, por otra parte, la posibilidad de origen de tumores en **focos hamartomatosos o ectópicos** de células neurogliales, demostrados en material quirúrgico procedente de niños o jóvenes con historia prolongada de epilepsia <sup>52</sup>, así como de forma experimental, inducidos por diversos agentes con reconocida capacidad de producción de malformaciones corticales o de núcleos grises <sup>287,97</sup>. En un caso, se ha demostrado el desarrollo de un oligodendroglioma parcialmente quístico, calcificado, en el lóbulo temporal de un joven de 15 años, con historia de retraso mental y epilepsia mal controlada durante 13 años, en el que, tras el estudio microscópico minucioso del encéfalo, se demostró la existencia de ectopias neuronales y focos gliales displásicos en la corteza y sustancia blanca de las circunvoluciones temporales media e inferior <sup>280</sup>.

Algunos sarcomas intracraneales se han descrito como evidencia circunstancial de que la **irradiación** podría ser un probable

factor incitador de su desarrollo, con un intervalo medio de 5-10 años (de 2 a 20 años) 359,5,59,314 .

Finalmente, es preciso tener en cuenta que cualquier aproximación a los factores causales que subyacen en la génesis de los tumores del SN debe tomar en consideración la situación marcadamente protegida de este órgano que está normalmente menos expuesto a los diversos agentes exógenos, físicos y químicos, que se invocan como factores causales de muchos cánceres de otras regiones del organismo. Aparte de las radiaciones penetrantes y de los traumatismos cerebrales y espinales, el SNC sólo puede ser influenciado a través de la circulación sanguínea. Esta condición, unida a la de las grandes modificaciones que experimenta el tubo neural durante el desarrollo ontogenético, para convertirse en el sistema nervioso del adulto ha sido, sin duda, una de las razones por las que mejor acogida ha tenido, desde un principio, la teoría histogenética dentro del campo de la etiopatogenia de las neoplasias del sistema nervioso.

#### TUMORES NERVIOSOS EXPERIMENTALES

Se han publicado, desde los comienzos de la neurocarcinogénesis experimental hasta la actualidad, una abundante cantidad de trabajos dentro de este campo, ya sea en investigación de nuevos

carcinógenos, ya sea en la clasificación de las neoplasias obtenidas, la biología tumoral, etc...

Los animales de laboratorio que han demostrado mayor utilidad en estos experimentos son el hamster, el ratón y la rata, y en ellos se centran la mayoría de las investigaciones.

#### Tumores nerviosos experimentales inducidos en el RATON

Los tumores espontáneos del sistema nervioso en el ratón son muy raros. En el estudio autopsico de 11.188 ratones, Slye en 1931<sup>310</sup>, no encontró más que 3 tumores cerebrales. Un año antes, Ngowyang<sup>237</sup>, había descrito un ependimoma en el lóbulo temporal de un ratón albino. En 1941, Cloudman<sup>60</sup> describió un meduloblastoma en un ratón C57BL y un glioma en otro ratón de la misma raza. No obstante, Scherer<sup>291</sup> cuestionó la verdadera existencia de gliomas espontáneos en el ratón. Andervont<sup>6</sup> observó un glioblastoma multiforme en un ratón hembra de 20 meses que había recibido una implantación subcutánea de dietilestilbestrol-colesterol, pero los autores pensaron que el tumor cerebral no estaba relacionado con el implante. Posteriormente, Cottier<sup>64</sup> observó un oligodendroglioma en el cerebro de un ratón albino Swiss a los 495 días de edad y, en 1963, Luginbühl<sup>184</sup> añadió otro glioblastoma multiforme a la lista de tumores espontáneos en el ratón. El primer astrocitoma cerebral parece ser que lo describió

Marsh, en 1969 <sup>192</sup>, en uno de los 800 ratones a los que inyectó material procedente de un visón con encefalopatía degenerativa transmitida por virus. En 1971, Fraser <sup>103</sup> publicó 32 gliomas astrocitarios hallados incidentalmente en el examen de más de 10.000 cerebros de ratón de la cepa VM en un estudio sobre el scrapie (una enfermedad nerviosa contagiosa de las ovejas y cabras). En 1970, Zimmerman <sup>382</sup> tuvo ocasión de estudiar un tumor cerebral espontáneo de un ratón macho de la raza ICI que resultó ser un ependimoma.

Gran número de investigadores han trabajado en inducción experimental de tumores nerviosos en el ratón <sup>78,374,147,383</sup>. La extensa revisión de Zimmerman <sup>384</sup>, publicada por la O.M.S. dentro de la serie "Pathology of Tumors in Laboratory Animals", se extiende al uso de diversos agentes carcinógenos químicos, método de fabricación de las pastillas, elección del punto de implantación del carcinógeno, técnica de la craneotomía y cuidados postoperatorios. También menciona que el mejor rendimiento se obtiene con las cepas C3H, ABC albina, Bagg albina y C57 BL. Todos los animales empleados estaban próximos a la madurez y, por tanto, capaces de soportar la intervención quirúrgica, a la vez que eran lo suficientemente jóvenes para sobrevivir durante el largo periodo de tiempo (200-500 días) requerido para el desarrollo de los tumores gliales. Se han realizado escasos experimentos en ratón con metilnitrosourea o etilnitrosourea <sup>12</sup>.

Con respecto a la utilización de virus, Kumanishi en 1967<sup>171</sup> empleó la cepa Schmidt-Ruppin del virus del sarcoma de Rous (VSR) para producir tumores cerebrales en ratón adulto. Duffy<sup>89</sup> indujo sarcomas leptomeníngeos múltiples por inoculación intracerebral de VSM (murino) a ratones BALB/c de 3 días de edad. Estos tumores tardaron unas 6 semanas en desarrollarse. Rabson,<sup>259</sup> indujo tumores cerebrales en ratón con adenovirus humano 12. En 1965, Thomas<sup>338</sup> describió infiltrados leucémicos menínges difusos en ratón tras inoculaciones subcutáneas de células leucémicas L1210. Cuando estas células eran tratadas con metotrexate, alcanzaban la aracnoides por propagación directa y crecimiento a lo largo de los espacios perineurales y perivasculares de nervios y vasos, respectivamente, que atraviesan el espacio subdural. También se encontraron células tumorales en el "area postrema", el "tuber cinereum" y otras áreas "no neurales" del cerebro murino.

En médula espinal, solamente se han descrito dos casos de tumor nervioso<sup>321</sup> y ello quizás está motivado por el pequeño tamaño de este órgano en el ratón, que facilita el que cualquier lesión a este nivel pase desapercibida. Por el contrario, se han inducido tumores en nervio periférico mediante la implantación en su interior de carcinógenos químicos<sup>384</sup>. Si la sustancia se pone en contacto además con la fascia o el músculo adyacentes, se desarrollan sarcomas o rabdomiosarcomas.

Los tumores desarrollados en los nervios son neuromas malignos (sarcomas neurogénicos) y aparecen al cabo de unos 100 días tras el implante del carcinógeno. No ha podido determinarse si se originan de las células de Schwann o de las células perineurales.

Existe un gran parecido morfológico entre los gliomas experimentales en el ratón y su contrapartida humana. El tipo más frecuente en el ratón es el glioblastoma multiforme, que es también el más frecuente en la especie humana.

Además se producen oligodendrogliomas, ependimomas y meduloblastomas muy parecidos a los humanos, lo mismo que tumores mixtos de naturaleza glial y sarcomatosa. El meningioma, sin embargo no ha podido ser inducido experimentalmente en esta especie <sup>384</sup>.

#### Tumores nerviosos experimentales inducidos en el HAMSTER.

No se han descrito tumores espontáneos del SNC en el hamster <sup>185</sup>. En el SNP, solamente se han descrito unos pocos tumores: algunos neurofibromas <sup>102,160</sup>, sarcomas neurogénicos <sup>102</sup>, neurilemonas <sup>104</sup>, ganglioneuomas de la glándula suprarrenal <sup>160</sup>, paragangliomas no cromafines <sup>160</sup> y tumores de células granulares <sup>253</sup>.

En cuanto a los tumores experimentales, se ha demostrado en la

última década, que tanto los virus como los carcinógenos químicos son agentes efectivos en la inducción de tumores nerviosos en el hamster. La inyección intracraneal de determinados virus oncogénicos en hamsters recién nacidos, induce la formación de tumores en el SNC. Rabson <sup>258</sup>, describió sarcomas intracraneales tras inoculación de virus de polio al cerebro de hamsters dentro de las primeras 24 horas tras el nacimiento. Eddy <sup>91</sup>, tras inyección del virus simiesco 40 (SV-40) en cerebro, consiguió el desarrollo de verdaderos tumores neurogénicos del tipo de los ependimomas. El virus del sarcoma de Rous induce astrocitomas en hemisferios cerebrales <sup>256</sup> y papilomas de plexos coroideos <sup>257</sup>. El adenovirus simiesco y humano produce meduloblastomas y neoplasias indiferenciadas cerebrales <sup>243</sup>. El adenovirus simiesco tipo 7 también causa glioblastomas multiformes y sarcomas <sup>263</sup>, así como ependimomas y papilomas de plexos coroideos malignos <sup>177</sup>. El adenovirus bovino tipo 3 produce schwannomas malignos tras su inyección subcutánea <sup>178</sup>. El adenovirus de las aves produce ependimomas <sup>189</sup>. El SV 40 induce ependimomas <sup>91</sup>, papilomas de plexos coroideos <sup>88</sup> y fibrosarcomas intracraneales <sup>111</sup>. El virus del polio <sup>258, 277, 73</sup>, el virus del papiloma bovino <sup>275</sup> y el virus del sarcoma murino <sup>126</sup> producen sarcomas leptomenígeos e intracerebrales. El papovavirus humano JC induce principalmente glioblastomas multiformes <sup>358</sup>. Shein, en 1968 <sup>303</sup> y 1970 <sup>304</sup> describió un método de inducción en dos fases: la primera

consistió en transformar en células neoplásicas, astrocitos y células de plexos coroides en cultivo, mediante virus SV40 y virus polioma. A continuación inoculó por vía subcutánea o intracerebral las células transformadas en hamsters recién nacidos y obtuvo astrocitomas y tumores de plexos coroides. En el mismo experimento, la inoculación de astrocitos transformados clonados, dió lugar al desarrollo de glioblastomas multiformes.

La inducción tumoral en hamsters por sustancias químicas se logró mediante etilnitrosourea (ENU) y sus precursores gracias a los trabajos de IvanKovic, en 1968 <sup>141</sup>, y Rustia, en 1974 <sup>285</sup>, respectivamente. Estas sustancias nitrogenadas tienen la propiedad de cruzar las barreras placentaria y hematoencefálica e inducir tumores del sistema nervioso en los descendientes, tanto en el hamster como en la rata. La administración de 60 mg/Kg de etilnitrosourea mediante tubo intragástrico a hamsters en el día 11 de gestación, indujo gliomas mixtos en los hemisferios cerebrales y médula espinal así como neurinomas y neurosarcomas en los descendientes <sup>141</sup>. La inyección intravenosa de 30 mg/kg de ENU a hamsters en el día 15 de gestación <sup>212</sup> provocó neurinomas y neurosarcomas del nervio trigémino, que aparecieron primero, y particularmente de los nervios periféricos, que aparecieron más tarde, en los descendientes. No se observaron tumores del SNC en este experimento. Los descendientes de hamsters gestantes

tratadas con 100 mg/kg de etilurea y 50 mg/kg de nitrito sódico, administrados simultáneamente por intubación intragástrica, en los días 12 al 15 de la gestación, así como los descendientes de hamsters que recibieron una sola dosis de 200 mg/Kg de etilurea y 100 mg/kg de nitrito sódico, en administración simultánea por tubo intragástrico, en el día 15 del embarazo <sup>284</sup>, desarrollaron astrocitomas, ganglioneuromas y neurofibromas, pero principalmente neurinomas y neurosarcomas. Los animales adultos que recibieron un tratamiento similar, también desarrollaron tumores neurogénicos <sup>284</sup>. La dibutilnitrosourea, inyectada por vía subcutánea a hamsters lactantes, indujo neurosarcomas en varias localizaciones <sup>198</sup>. La inyección subcutánea de nitrosohexametilenimina a hamsters adultos produjo 4 neurosarcomas subcutáneos <sup>3</sup>. La dietilnitrosamina indujo estesiopiteliomas olfatorios <sup>128,225,318</sup>, administrada subcutáneamente, lo mismo que la dimetilnitrosamina <sup>128</sup>. En otro experimento <sup>132</sup> se inyectó dimetilbenzantraceno (DMB) por v.e. (500 mg/kg) a hamsters gestantes en el día 10 ó 11 de la gestación. Se sacrificaron los animales tratados al cabo de una hora y se inyectaron intracerebralmente fragmentos cerebrales de los embriones a hamsters de diversas edades. Se obtuvieron gangliogliomas y astrocitomas en los animales inoculados <sup>132</sup>. En el mismo experimento, la inoculación de fragmentos de cerebros embrionarios no tratados dió lugar a la inducción de hamartomas, y también de teratomas, al

contaminar el material inoculado con músculo, piel y otros tejidos no nerviosos.

Tras administración intragástrica de metilcolantreno se obtuvo un ganglioneuroma periférico <sup>75</sup>.

Una revisión completa de los tumores nerviosos de estos animales es la de Cardesa <sup>45</sup>, publicada en la serie "Pathology of Tumors in Laboratory Animals" de la O.M.S.

Existen grandes similitudes entre las neoplasias nerviosas inducidas en el hamster con los correspondientes tumores humanos <sup>16,376</sup>, lo cual parece razonable dado el gran parecido existente en el substrato morfológico del sistema nervioso en todos los mamíferos <sup>386</sup>. Los tumores nerviosos humanos son muy frecuentes en la infancia y juventud (segunda neoplasia más frecuente). Esta observación clínica apoya la validez del hamster como modelo de neurocarcinogénesis dado que tanto la inducción vírica como química por vía transplacentaria conducen al desarrollo de tumores nerviosos, en cortos espacios de tiempo.

En el hombre, los astrocitomas pueden desarrollarse a cualquier edad. En la infancia y juventud se localizan preferentemente en la línea media del cerebro, pero especialmente en tronco cerebral y cerebelo. Los astrocitomas hemisféricos son más frecuentes en los adultos <sup>280</sup>. En el hamster, los astrocitomas aparecen en épocas tempranas de la vida, a las 4-8 semanas después de la

inyección intracerebral de virus del sarcoma de Rous a los recién nacidos <sup>256</sup>, pero su patrón de distribución es más cercano al de los astrocitomas humanos del adulto. Por otra parte, los gliomas inducidos por vía transplacentaria aparecen más tarde, tras un periodo de latencia de 35-80 semanas, en la descendencia de hamsters gestantes que recibieron ENU durante el embarazo <sup>141</sup>. Los astrocitomas inducidos por la cepa Mill Hill del virus del sarcoma de Rous y transplantados a la mejilla del hamster se parecen morfológicamente a los astrocitomas protoplasmáticos humanos. Los trasplantes subcutáneos del mismo tumor, guardan un gran parecido con el astrocitoma pilocítico tipo adulto humano. El glioblastoma multiforme, que se localiza preferentemente en los hemisferios cerebrales en el hombre adulto, ha sido inducido en el hamster mediante astrocitos clonados, transformados por el virus del polioma, tras inoculación intracerebral o subcutánea <sup>304</sup>. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el glioblastoma se origina por transformación neoplásica y posterior desdiferenciación histológica de astrocitos <sup>282,283</sup>. Se ha comunicado también el desarrollo de glioblastomas multiformes en hamsters, a las 24 semanas de inoculación, con papovavirus humano JC, aislado de un paciente con leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) <sup>358</sup>. En el hombre, se han descrito dos casos de gliomas múltiples malignos originados en lesiones de LMP, con demostración de papovavirus en las células astrocitarias y oligodendrocitarias de

los focos desmielinizados, pero no en las células tumorales adyacentes <sup>308,49</sup>.

Los meduloblastomas son tumores que aparecen en épocas tempranas de la vida humana y se localizan principalmente en el cerebelo <sup>280</sup>. En el hamster, se han observado meduloblastomas a las 4-8 semanas de la inyección intracerebral de adenovirus humanos y simioscos <sup>243,263</sup> pero estos tumores se localizan en distintas regiones del encéfalo. Por el contrario, Merkow <sup>213 b</sup> ha observado con frecuencia tumores indiferenciados, indistinguibles del meduloblastoma, inducidos por SV20, en el vermis cerebeloso. La similitud de estos tumores con los del ser humano ha sido resaltada por Rapp <sup>263</sup>.

Los ependimomas humanos se producen en todas las edades, a excepción de los originados en las paredes del IV ventrículo, que ocurren preferentemente durante la primera década de la vida <sup>101</sup>. En los hamsters, la inducción de esta variedad de tumor por el SV40 <sup>91</sup> y un adenovirus de las aves (CELO) <sup>189</sup> muestra un periodo de latencia más largo, de 6 a 32 semanas, que el observado en la inducción de meduloblastomas, sarcomas y papilomas de plexos coroideos los cuales son típicos tumores infantiles y juveniles en la especie humana. Morfológicamente, en el hamster, los ependimomas suelen ser papilares, a diferencia de los humanos que sólo lo son ocasionalmente. Los papilomas de plexos coroideos son tumores poco frecuentes en el hombre, que suelen manifestarse

durante la primera década de la vida<sup>280</sup>. En hamsters, neoplasias similares morfológicamente han podido ser inducidas a las 4-8 semanas de la inyección intracraneal de cepa Bryan del VSR<sup>257</sup> y a las 12-18 semanas, tras la inyección de SV40<sup>88</sup>. También se han obtenido tumores malignos de esta estirpe<sup>177,304</sup>.

Los sarcomas en el SNC humano aparecen con mayor frecuencia en la época infantil y, por el contrario, son muy infrecuentes en los adultos<sup>280</sup>. En los hamsters, los sarcomas meníngicos e intracerebrales se desarrollan en 5-10 semanas, tras inyección intracerebral de diversos virus a recién nacidos. Los sarcomas inducidos por el virus polioma guardan un gran parecido con los originados en las meninges del cerebro humano<sup>258</sup>.

Los gangliogliomas inducidos en hamsters por Hosobuchi, en 1967<sup>132</sup> y aparecidos tras 4-13 semanas, muestran un gran parecido con su contrapartida humana. En el hombre, se ha postulado una patogénesis hamartomatosa<sup>280</sup>. Tiene cierto interés el hecho de que en el hamster, los gangliogliomas y los hamartomas se hayan inducido simultáneamente en el mismo grupo de experimentos.

Los neurinomas y neurofibromas humanos, incluidas sus formas malignas, se manifiestan clínicamente con mayor frecuencia durante la 4ª, 5ª y 6ª décadas de la vida y son de dos a tres veces más frecuentes en el sexo femenino que en el masculino<sup>54</sup>. En hamsters, estos tumores pueden ser inducidos por vía transplacentaria en los descendientes, de 35 a 80 semanas tras la

administración a las madres de ENU o etilurea y nitrito sódico 141,212,284,285. Desde el punto de vista macroscópico, los neurinomas del nervio trigémino del hamster <sup>141</sup> son comparables al clásico neurinoma del nervio acústico humano y, en particular, al menos frecuente neurinoma del ganglio de Gasser o raíz trigeminal <sup>294</sup>. Histológicamente, estos tumores de los hamsters se parecen mucho a los humanos <sup>178, 212</sup>. Incluso se han observado estructuras parecidas a corpúsculos táctiles <sup>198</sup>. La inducción por etilurea y nitritos de ganglioneuromas, neuromas y neurosarcomas con patrón que remeda al neurofibroma plexiforme, en algún caso asociado a astrocitoma de la protuberancia <sup>284,285</sup> como se ha visto anteriormente, tiene un gran interés considerando el hecho de que, en el hombre, el neurofibroma plexiforme representa el substrato morfológico de la neurofibromatosis o enfermedad de von Recklinghausen la cual, en casos severos, puede asociarse a astrocitomas de la línea media y neurosarcomas <sup>122</sup>.

#### TUMORES NERVIOSOS EXPERIMENTALES INDUCIDOS EN LA RATA

En la rata, los tumores espontáneos del SNC y SNP son extremadamente raros <sup>316 b</sup>, tal como se desprende de las cifras obtenidas por Guérin <sup>118</sup>, que solamente observa 4 casos entre 567 tumores de múltiples localizaciones en 16.500 animales, por Saxton <sup>290</sup>, que encuentra un solo caso en 498 ratas Osborne-Men-

del, por Gilbert <sup>109</sup> que observa dos tumores intracraneales entre 1.114 neoplasias correspondientes a 1342 ratas Wistar, y por Bots <sup>33</sup> que encuentra sólo 3 tumores cerebrales en 1100 ratas Wistar. En ratas Sprague-Dawley, la frecuencia es ligeramente superior: 3 tumores nerviosos en 177 ratas <sup>341</sup> y 3 tumores cerebrales en 250 ratas <sup>136 b</sup>. Estos tumores fueron identificados como glioblastomas multiformes (Saxton), gliomas (Guérin, Rosen, Gilbert), meningiomas (Rosen, Thompson, Gilbert), oligodendrogliomas y gangliogliomas (Bots), ependimomas, pinealoma y papiloma de plexos coroideos (Thompson). Bullock <sup>36</sup> describió un glioma de la protuberancia, una sarcomatosis, un sarcoma pleomórfico y un ganglioneuroma. Garner <sup>106</sup> describió 35 tumores del SNC pero sin especificar detalles histológicos.

Con respecto a los tumores inducidos por virus, se han observado sarcomas menínges en ratas tras inyección e implantación de virus del polioma <sup>348,349</sup>. Se observó una sarcomatosis meníngea difusa primaria tras inyección intravenosa y subcutánea del virus, así como tras inoculación directa cerebral. La implantación en las meninges fue, no obstante, la que dió un mayor rendimiento. La mayor parte de los tumores descritos por Rabson <sup>258</sup> en ratas y hamsters fueron sarcomas. Ribacchi <sup>265</sup> observó glioblastomas y hemangioendoteliomas tras inoculación intracerebral de virus Moloney. Para obtener los mejores resultados, los

animales debían ser jóvenes y el virus tenía que ser inoculado directamente. Utilizando cepas Schmidt-Ruppin <sup>371</sup> o Bratislava 77 <sup>63</sup> se obtienen gliomas diversos y glioblastomas, muy similares a los humanos. Yung <sup>377</sup> ha demostrado la producción de glioblastomas tras inoculación, en rata, de virus del sarcoma murino, que muestran una proliferación endotelial vascular superponible a la de los tumores humanos. Entre los virus ADN, el adenovirus humano 12 muestra una especial afinidad por las neuronas primitivas y produce tumores en rata muy similares a los neuroblastomas <sup>229</sup>. Si se inyectan en el globo ocular, se producen retinoblastomas <sup>230</sup>. No se conoce la razón de esta especificidad celular.

Respecto a la inducción tumoral con carcinógenos químicos, en una primera fase, la producción de tumores nerviosos como resultado de la implantación de hidrocarburos policíclicos, pareció ser menos fructífera en la rata <sup>328,154</sup> que en el ratón <sup>381</sup>. Sin embargo, Caputo y Giovanella <sup>42</sup> indujeron 45 tumores en 92 ratas con metilcolantreno, 15 en 43 ratas con benzopireno y 3 en 38, con dibenzantraceno. En los experimentos de Jänisch en 1966 <sup>146</sup>, el más efectivo fué un derivado del benzantraceno, seguido del metilcolantreno. El benzopireno no produjo tumores. Ishida <sup>137</sup>

obtuvo 24 tumores cerebrales en 158 ratas Donryu, por implantación de metilcolantreno, y, en cambio, ningún resultado en 54 ratas Wistar, lo que demuestra la importancia de las diferencias de cepa en cuanto a la susceptibilidad frente a los distintos carcinógenos. La morfología tumoral en estos experimentos era variable. La mayoría de tumores fueron clasificados como gliomas, con gran tendencia a la combinación con elementos mesodérmicos (gliosarcomas, sarcomas polimorfos).

La implantación local de carcinógenos no tiene, lógicamente, una correlación directa con la oncogénesis humana, pero tiene interés en cuanto al estudio morfológico de los tumores y en la investigación terapéutica.

La administración por vía oral de acetilaminofluoreno en la rata, dió como resultado la inducción de gliomas, meningiomas y neurilomas, así como tumores en otros órganos <sup>313,350,131,244</sup>.

El descubrimiento de los compuestos nitrogenados, que podían ser administrados por otras vías distintas a la implantación local, ya sea por vía endovenosa (v.e.), vía subcutánea (v.s.), vía intraperitoneal (v.i.) o vía oral (v.o.), representó un gran avance en neuropatología experimental.

Los pioneros de estos experimentos fueron Druckrey, en el año 1964 <sup>81</sup>, y, posteriormente, Menel en el año 1966 <sup>211</sup>, los cuales

demonstraron que la N-nitrosopiperidina y la dinitrosopiperazina, inyectadas por v.s., inducían tumores en la cavidad nasal posterior de ratas BD. Estos tumores invadían posteriormente el cerebro y fueron identificados por Thomas, en 1965<sup>338</sup> como esteseoneuroblastomas. A partir de este momento se fueron utilizando otras sustancias, especialmente derivados de las nitrosoureas como la metilnitrosourea, la trimetilnitrosourea, la etilnitrosourea y el metilnitrosobiuret<sup>84,324,146 b</sup>, capaces de producir gran cantidad de tumores en SNC y SNP de ratas Wistar y ratas BD. La incidencia depende de la dosis, el modo de aplicación, la edad del animal y la estructura química de la sustancia aplicada<sup>82,139,148</sup>. Aunque se han utilizado otros animales como el ratón, el hamster y el perro, la rata de laboratorio, en sus diversas razas, es el animal de elección. El conejo es también muy susceptible. Los compuestos nitrogenados más usados son la metilnitrosourea (MNU) y la etilnitrosourea (ENU). El neutropismo se mantiene cualquiera que sea la vía de administración utilizada. La inyección de MNU por v.e., repetidamente a ratas jóvenes, da lugar a tumores nerviosos en el 97% de los animales<sup>329</sup>.

De todos los compuestos nitrogenados, la ENU ha demostrado ser el neurocarcinógeno más potente. Esta sustancia, administrada por vía transplacentaria, es decir, en una única dosis por vía endovenosa, a ratas gestantes a partir del día 11-12 de la

gestación, o bien a las crías, en las primeras horas tras el nacimiento, produce tumores nerviosos en, virtualmente, el 100% de la descendencia, por tanto su rendimiento es óptimo <sup>141,164</sup>. Se ha comprobado además que existe una relación directa dosis-respuesta <sup>329</sup>. El efecto carcinogénico de la ENU es alto a partir del día 11-12 de la gestación hasta el primer día post-natal, a partir del cual va descendiendo, y, a los 30 días, el efecto es bajo, aproximándose al de las ratas adultas <sup>141,86</sup>. Resultados parecidos se han obtenido con otras sustancias relacionadas, tales como los hidrazo, azo, azoxialcanos, aril-dialquiltriazenos y metilazoximetanol <sup>254,316</sup>. También se han inducido tumores nerviosos por medio de agentes alquilantes directos como el dimetilsulfato, metilmetanosulfonato y la 1,3-propanosulfona <sup>326,83,86</sup>.

La localización preferente de los tumores inducidos transplacentariamente por ENU, ha sido estudiada por Wechsler <sup>361</sup>: Los tumores de los nervios craneales se desarrollan con mayor frecuencia en el nervio trigémino y, ocasionalmente, en el nervio vago. De los nervios periféricos, los más frecuentemente afectados son los plexos lumbosacros, el nervio ciático y los plexos braquiales. En el SNC, los tumores se desarrollan preferentemente en zonas periventriculares de los hemisferios cerebrales, menos frecuentemente en la médula espinal y muy

raramente en el cerebelo. En cuanto al tipo histológico, la mayoría de los tumores centrales se describen como gliomas y ependimomas, con diversos grados de diferenciación y anaplasia. Los tumores de origen neuronal parecen ser extremadamente raros. Los tumores del SNP se han clasificado como neurinomas malignos. Los gliomas más frecuentes que se describen en este tipo de experimentos en rata son denominados de formas muy diversas por los distintos autores que basan sus interpretaciones en la observación de material generalmente procesado sólo con métodos convencionales. En el mismo modelo experimental se han descrito oligodendrogliomas puros, oligodendrogliomas anaplásicos, oligoependimomas, ependimomas, oligodendrogliomas con áreas blásticas, oligoastrocitomas, oligodendrogliomas con astrocitos reactivos, etc..., según la orientación particular de cada autor. Se han realizado escasos estudios ultraestructurales de estos tumores, con resultados a menudo contradictorios <sup>213</sup>, 58, 137, 141, 148, 149, 172, 190, 101, 112 principalmente en relación con los supuestos ependimomas. Si bien existe en la actualidad una relativamente abundante literatura sobre el comportamiento de diferentes gliomas frente a la determinación inmunohistoquímica de proteínas específicas o características de las células neurogliales, en nuestra revisión hemos constatado una ausencia prácticamente total de referencias relativas a los oligodendrogliomas experimentales en ratas.

En cuanto a los tumores de los nervios craneales y periféricos, se describen casi unánimemente como schwannomas malignos o anaplásicos, diagnóstico basado la mayoría de las veces más en la localización que en un estudio detallado de este tipo de tumor 294,320,322,331 .

Con respecto al estudio histológico en profundidad de los tumores nerviosos originados en nervios, inducidos con ENU por vía transplacentaria, destaca la observación por primera vez de un patrón plexiforme en la trama de algunos de estos tumores por Cardesa y col. <sup>46</sup>. En este experimento, en el que se administró una sola dosis de 15 mg/kg p.c. de ENU, en el día 15 de la gestación, a ratas Wistar, se observaron simultáneamente con gliomas centrales y algunos nefroblastomas, setenta y cinco tumores de nervios periféricos en distintas localizaciones, 19 de los cuales (25 %) contenían estructuras plexiformes y el resto, eran de tipo difuso. Este hallazgo sugirió a los autores la posibilidad de que pudieran hallarse frente a un modelo experimental de la neurofibromatosis o enfermedad de von Recklinghausen, dado que en el hombre los neurofibromas plexiformes son patognomónicos de dicha enfermedad. A pesar de ser común en la especie humana (1 caso de cada 3000 nacidos vivos) <sup>267,67</sup>, no existe una enfermedad comparable conocida entre otros mamíferos, solamente se han descrito neurofibromas múltiples desarrollados sobre una base no hereditaria en otras especies

animales como el pez bicolor "Pomacentrus partitus" de ciertas regiones del Caribe, el perro o en animales del género bovino<sup>267,296</sup>. Por tanto, podría resultar útil disponer de un modelo animal, relacionado con la exposición prenatal a un carcinógeno ambiental, para estudio de diferentes aspectos de esta enfermedad y más teniendo en cuenta que, si bien la neurofibromatosis es considerada una enfermedad hereditaria, de hecho en más del 50% de los afectados no se puede demostrar ningún antecedente familiar y se consideran casos esporádicos surgidos de nuevas mutaciones<sup>267</sup>.

OBJETIVOS

- 1) - Intentar aportar nuevos datos sobre la histogénesis de los tumores experimentales del sistema nervioso central inducidos con etilnitrosourea, a la luz de las modernas técnicas inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica de transmisión.
  
- 2) - Confirmar la existencia de estructuras plexiformes en los tumores nerviosos inducidos mediante E.N.U. y la variación de su incidencia en relación con las fechas de inyección pre y postnatal del carcinógeno.
  
- 3) - Intentar determinar la histogénesis de las células constituyentes de los tumores con estructuras plexiformes y su comparación con las de los que carecen de ellas.

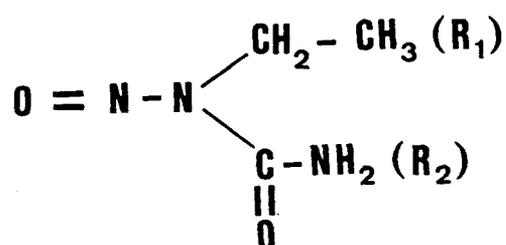
M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

CARCINOGENO. ESTRUCTURA QUIMICA, PROPIEDADES BIOLOGICAS Y MECANISMO DE ACCION NEUROCARCINOGENICA.

La **etilnitrosoarea (ENU)** es un compuesto nitrogenado absorbible, de bajo peso molecular (117,1), que responde a la fórmula siguiente:



Los compuestos nitrogenados absorbibles son, al igual que otros agentes alquilantes, mutágenos, teratógenos y carcinógenos 283,83,362. Una de sus características más sobresalientes es su organoespecificidad, atribuida a su radical guía (R<sub>2</sub>), aunque también se acepta el papel importante que pueden jugar otros factores como el tipo específico de carcinógeno, la concentración del mismo en cada dosis, el modo de aplicación, así como la especie y cepa del animal utilizados. Las nitrosoareas, a diferencia de las nitrosaminas, no requieren una activación enzimática previa para ejercer su acción carcinogénica y, por consiguiente, su organoespecificidad no está supeditada a la dotación enzimática de los distintos órganos y tejidos <sup>330</sup>.

La ENU es uno de los compuestos de este grupo más ampliamente utilizados en neurooncología, debido a la facilidad con que

difunde a través de la barrera hematoencefálica y alcanza al sistema nervioso. Esta propiedad, que se atribuye a su radical ureico, juntamente con el bajo peso molecular y la fácil solubilidad en los lípidos, compensa la marcada inestabilidad de este compuesto, el cual se descompone rápidamente "in vivo" <sup>327</sup>. En efecto, una vez administrada, ya sea por vía digestiva, intravenosa o transplacentaria, esta sustancia alcanza en poco tiempo los tejidos nerviosos centrales y periféricos <sup>82,324,147,-361</sup>. También actúa directamente por inoculación intracerebral <sup>283</sup> pero, a diferencia de la metilnitrosourea (MNU), es un típico carcinógeno sistémico. La excreción de esta sustancia se efectúa por vía renal.

La ENU está considerada actualmente como el más potente carcinógeno conocido para el sistema nervioso <sup>84</sup>. El resultado de su acción, con una sola dosis, es la producción de tumores nerviosos, a menudo múltiples, en el sistema nervioso central y periférico. Estudios cuantitativos han puesto de manifiesto que existe una relación dosis-respuesta, de manera que aumenta la incidencia tumoral y el número de tumores por animal y disminuye el tiempo de latencia, a medida que se aumenta la dosis de la sustancia <sup>329</sup>.

La brevedad de la exposición del carcinógeno a las macromoléculas

celulares, aproximadamente ocho minutos <sup>332</sup>, hace que este modelo sea de utilidad para estudios, a distintos tiempos, de las interacciones bioquímicas.

La base molecular de los fenómenos que conducen a la inducción de neoplasias por parte de los compuestos nitrogenados parece ser la alquilación, llevada a cabo por el radical efector ( $R_1$ ), de una o más bases de la cadena del ADN, lo que provoca un apareamiento anómalo de bases en la molécula <sup>182</sup>. En el sistema nervioso, la inducción neoplásica por los compuestos nitrogenados en general, y por la ENU en particular, parece depender, en último término, de un defecto en el mecanismo de reparación de la escisión de una de las bases alquiladas del ADN cerebral. Aparentemente, el cerebro es incapaz de eliminar la base guanina alquilada cuando la alquilación tiene lugar en posición  $O^6$  (átomo O-6). Como consecuencia, se produce una asociación anómala entre la guanina alquilada con timina, dando lugar a una conformación estable pero defectuosa de la molécula de ADN <sup>113,191,283,161,274</sup>. Por consiguiente, si se produce una división celular cuando en el ADN se ha inducido una lesión promutagénica, tal como la  $O^6$ -metil- o etil-guanina, puede tener lugar una mutación somática como resultado de un mal apareamiento de bases <sup>182</sup>. Se sabe que, mientras que la  $O^6$ -alquilguanina es rápidamente eliminada del hígado, la eliminación del cerebro es mucho más lenta, acumulán-

dose allí tras las administraciones repetidas, necesarias en el caso de la MNU <sup>379,380,215</sup>. Es muy posible que esta base alquilada, que persiste en el cerebro durante meses, sea confinada a las neuronas, que son células que no se dividen y que, además, no parecen estar involucradas en la neurooncogénesis <sup>386</sup>. Más bien debe ser la reproducción de las células gliales, portadoras de una lesión promutagénica del ADN durante los días que siguen a la exposición al carcinógeno, lo que inicia la transformación neoplásica <sup>332</sup>. Hoy en día, se considera que la modificación química del ADN en alrededor de una alquilación por  $10^6$  bases de ADN, puede provocar tumores apreciables en animales sensibles, aunque los factores que condicionan esta susceptibilidad son todavía desconocidos. No se sabe si estos factores son positivos, es decir, si, por ejemplo, se requiere la presencia de oncogenes en la célula "target", o bien negativos, es decir que, por acción citotóxica, se inactiven posibles mecanismos protectores frente a la oncogénesis, tales como los inmunológicos <sup>176</sup>. Probablemente existan otros condicionantes adicionales como el estado fisiológico del tejido, con su grado de proliferación celular, que influirá en el número posible de mutaciones y en el bloqueo de la replicación del ADN, con efectos letales sobre las células <sup>274</sup>, o bien otro tipo de modificaciones como la desrepresión de provirus o de oncogenes complementarios a porciones de genomas virales, o bien una toxicidad específica

dirigida contra las células involucradas en el control inmunológico <sup>332</sup>.

Las nitrosoureas inhiben la actividad mitótica de las células que están proliferando durante los últimos días de vida prenatal y los primeros tras el nacimiento, que son fundamentalmente los precursores gliales, produciendo una detención temporal del ciclo celular en, o poco antes, de la fase S <sup>32</sup>. Probablemente la re-entrada en el ciclo celular tenga lugar mucho antes de que las alteraciones en las macromoléculas celulares, inducidas por la sustancia, hayan podido ser reparadas.

Por último es interesante el hecho de que algunos derivados alquilados sintéticos de la nitrosourea (BCNU, CCNU, MeCCNU), tengan efectos quimioterápicos sobre el desarrollo de tumores humanos, entre ellos los del sistema nervioso central <sup>252</sup> y experimentales, inducidos por vía transplacentaria en ratas con ENU <sup>292</sup>. El mecanismo de acción quimioterápica sólo es parcialmente conocido: El BCNU inhibe la síntesis de DNA, de RNA y de proteínas, por orden decreciente; tanto el BCNU como el CCNU son, a la vez, drogas específicas de la fase S y no específicas del ciclo celular. Estas sustancias retrasan la incorporación de la timidina tritiada, ya sea por efecto indirecto sobre la síntesis del DNA y/o por efecto retardado, debido al requerimiento de la activación metabólica de estas sustancias <sup>292</sup>.

### ANIMALES Y TRATAMIENTO:

Se utilizó un total de 80 ratas Wistar hembra (Laboratorios de Bio-Investigación MERCK-QUIMICA, S.A., Barcelona) que fueron cruzadas con 20 ratas macho de la misma cepa. El día siguiente del apareamiento, tras comprobación de la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal, fue considerado día 1 de la gestación. Los animales fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de 20 animales cada uno y se mantuvieron individualmente en cajas de Macrolón. Recibieron como alimento pienso de rata común en "pellets" y agua "ad libitum". La temperatura ambiente fue de 20-23°C, con una humedad relativa del 60%.

La planificación del experimento y su desarrollo se encuentran resumidos en la Tabla V. Los animales, repartidos en cuatro grupos, fueron sometidos a las siguientes condiciones experimentales:

- Grupo I: Se administró una dosis única de 15 mg/kg p.c. de E.N.U.\* por vía intraperitoneal (v.i.p.), a cada rata, en el día 15 de la gestación.
- Grupo II: Se administró la misma dosis a cada animal, en el día 21 de la gestación.
- Grupo III: Se esperó hasta después del parto y se administró la misma dosis de la sustancia a cada uno de los

descendientes, por vía subcutánea (v.s.), dentro de las primeras 24 horas de vida postnatal.

-Grupo IV: No recibió ningún tratamiento y se consideró grupo control.

Las crías fueron destetadas a los 20 días del nacimiento y transferidas a jaulas individuales, recibiendo el mismo pienso que las madres y agua "ad libitum" y bajo las mismas condiciones de laboratorio mencionadas anteriormente.

Se observó el desarrollo general de los animales, y se registró el peso a intervalos semanales, tanto en los cuatro grupos de descendientes como en las madres. En todos ellos, cuando se hizo evidente algún signo externo de tumor, malestar general, déficit neurológico o pérdida de peso significativa, se procedió a sacrificar al animal con éter. Aquellos animales que no mostraron ningún síntoma clínico fueron observados hasta su muerte natural o sacrificados junto con el último animal portador de tumor, lo mismo que los controles y las madres.

\* La E.N.U. fué cedida por el Profesor U. Mohr del Instituto de Patología Experimental de la Escuela de Medicina de Hannover (RFA). La substancia había sido sintetizada por el Profesor Preussmann del Centro Alemán para la Investigación del Cáncer en Heidelberg (RFA).

La duración total del ensayo fue de 26 meses desde el comienzo del tratamiento (1 de Mayo de 1982 a 1 de Agosto de 1984).

### AUTOPSIA:

Se realizó una autopsia completa a todos los animales, tanto experimentales como controles, que incluía un estudio macroscópico detallado de todos los órganos, especialmente del encéfalo, médula espinal con sus raíces y nervios, plexos nerviosos braquiales, nervios ciáticos y, en cada caso, del tumor o tumores desarrollados. Se pesaron, en cada animal, el encéfalo, los riñones, los órganos macroscópicamente patológicos y las tumora- ciones libres. Se tomaron fotografías de todas las estructuras patológicas con una cámara Leitz Reprovit IIa.

De cada animal, se tomaron muestras sistemáticas de cortes coronales del cerebro, cortes transversales de tronco y cerebelo, especialmente a nivel del origen del V par, y cortes transversales de médula espinal a nivel cervical y torácico, y longitudinales en la región lumbo-sacra, con los nervios del "filum terminale". Asimismo se tomaron muestras de ambos riñones, en cortes sagitales, siempre que se observó un tumor o cualquier otra lesión patológica. Se estudiaron también, sistemáticamente, los plexos braquiales y los nervios ciáticos.

De cada tumor se tomaron varios fragmentos de distintas áreas cuando su tamaño era voluminoso.

### TECNICAS DE FIJACION DE LOS TEJIDOS:

Todas las muestras extraídas se fijaron inmediatamente, en parte en una solución de formol tamponado al 10%, pH 7 (Formalina 40%:100 cc.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ :6,5 g.,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :4 gr.,  $\text{H}_2\text{O}$ :900 cc., mezclado con Formalina 40%:100 cc.,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :18,6 g.,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :21g.,  $\text{NaOH}$ :4,2g.,  $\text{H}_2\text{O}$ :900 cc.) y, en parte, en glutaraldehído al 2,5% en solución tampón de cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,4 (10,7 g. de cacodilato sódico, 500 cc. de agua destilada), para estudio óptico rutinario de material incluido en parafina, estudio óptico de cortes semifinos y estudio ultraestructural de cortes finos de material incluido en resina Epon, respectivamente.

### ESTUDIO DE MICROSCOPIA OPTICA CONVENCIONAL:

Tras la inclusión en parafina se obtuvieron varios cortes histológicos de 4-5 micras, a distintas profundidades, de cada tumor u órgano patológico, así como cortes de control de las estructuras macroscópicamente normales. En todos los casos se efectuó una tinción de Hematoxilina-Eosina. En casos seleccionados, se realizaron tinciones de P.A.S., tricrómico de Masson, de Gomori para fibras de reticulina, Klüver-Barrera y Gross-Bielschowsky, según los procedimientos que se sintetizan a continuación:

- Método de la Hematoxilina-Eosina:

- Se desparafinan los cortes mediante 3 pases de 10 minutos cada uno en sucesivos xiloles.
- Hidratación de los cortes en alcoholes de graduación decreciente hasta el H<sub>2</sub>O.
- Hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
- Lavado en H<sub>2</sub>O corriente durante 20 minutos.
- Contraste con eosina durante 1 minuto.
- Lavado rápido en H<sub>2</sub>O.
- Deshidratación rápida en alcoholes de graduación creciente hasta alcohol absoluto.
- Aclaramiento en xilol-eucaliptol en tres pases sucesivos de 2 minutos cada uno.
- Montaje con DPX.

- Método del P.A.S.:

- Se desparafinan e hidratan los cortes de la misma forma que en la técnica anterior.
- Solución de ácido peryódico al 0,5% en agua destilada, durante 5 minutos.
- Lavado en agua destilada
- Solución del reactivo de Schiff (1 gr de fucsina básica en

200 ml de agua destilada caliente, se hierve y enfría hasta 50°C, se filtra y se añade 20 ml de HCl normal y 1 gr de bisulfito sódico anhidro o metabisulfito sódico), durante 15 minutos.

- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Hematoxilina de Harris durante 6 minutos.
- Lavado en H<sub>2</sub>O corriente.
- Diferenciar en 1% HCl-alcohol.
- Lavado en agua corriente
- Introducción en H<sub>2</sub>O amoniacada hasta azulear los cortes
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Deshidratación en alcoholes, aclaramiento en xilol-eucaliptol y montaje con DPX.

#### - Método del tricrómico de Masson

- Se desparafinan e hidratan los cortes hasta agua destilada.
- Solución de Bouin (750 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 250 ml de Formol al 40% y 50 ml de ácido acético glacial) durante 1 hora a 56°C
- Enfriar y lavar en agua corriente hasta que desaparece el color amarillo.
- Lavar en H<sub>2</sub>O destilada.
- Solución de Hematoxilina férrica (solución de 1 gr de cristales de Hematoxilina de Weigert en 100 ml de Alcohol de

95% y solución de 4 ml de cloruro férrico con 29% agua, 95 ml de agua destilada y 1 ml de HCl concentrado, a partes iguales) durante 10 minutos.

- Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
- Pasar al agua destilada.
- Solución de fucsina ácida-escarlata Biebrich (90 ml de escarlata Biebrich con un 1% de agua, 10 ml de fucsina ácida con 1% de agua, 1 ml de ácido acético glacial) durante 2 minutos.
- Lavar en agua destilada
- Solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico (5 gr. de ácido fosfomolibdico, 5 gr de ácido fosfotungstico y 200 ml de agua destilada) durante 15 minutos.
- Solución de azul de anilina (2,5 gr de azul de anilina, 2 ml de ácido acético glacial y 100 ml de agua destilada) durante 5 minutos.
- Lavar en agua destilada.
- Solución de ácido acético glacial (1 ml de ácido acético glacial en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada) durante 5 minutos.
- Deshidratar, aclarar y montar en DPX.

#### - Método de Gomori para reticulina

- Desparafinar e hidratar hasta aguda destilada.

- Oxidar en solución de permanganato potásico (0,5 gr de permanganato potásico en 100 ml de agua destilada) durante 1 minuto.
- Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
- Diferenciar con metabisulfito potásico (2 gr de metabisulfito potásico en 100 ml de agua destilada) durante 1 minuto.
- Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
- Pasar a solución de sulfato amónico férrico (2 gr de amónico férrico en 100 ml de agua destilada) durante 1 minuto.
- Lavar en agua corriente durante 2 minutos y pasar a H<sub>2</sub>O destilada.
- Impregnar en solución argéntica (2,5 ml de solución acuosa al 10% de hidróxido potásico e hidróxido amónico del 28% en 10 ml de solución de nitrato de plata al 10%) durante 1 minuto.
- Lavar en agua destilada durante 20 segundos.
- Reducir con solución de formol al 20% durante 3 minutos.
- Lavar en agua corriente durante 3 minutos.
- Pasar a solución de cloruro aúrico al 0,2% durante 10 minutos.
- Lavar en agua destilada.
- Reducir en solución de metabisulfito potásico al 2% durante 1 minuto.
- Fijar en solución de tiosulfato sódico durante 1 minuto.
- Lavar en agua destilada durante 2 minutos.

- Deshidratar en alcoholes crecientes, aclarar y montar con DPX.

- Método de Klüver-Barrera:

- Se desparafinan e hidratan los cortes hasta alcohol de 95%
- Solución de Luxol-Fast-Blue (0,1 gr LFB en 100 ml de alcohol del 95% con 0,5 ml de ácido acético glacial del 10% por cada 100 ml de solución) a 56°C, toda una noche.
- Lavar en alcohol del 95%.
- Lavar en agua destilada.
- Inmersión rápida en solución de carbonato de litio (0,05 ml de C.L. en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada).
- Continuar diferenciando en alcohol del 70% en agua destilada.
- Lavar en agua destilada.
- Finalizar la diferenciación lavando con solución de carbonato de litio y pasando por varios cambios de alcohol del 70% hasta que la sustancia blanca contrasta con la gris.
- Lavar en agua destilada.
- Violeta de cresilo (0,1 gr V.C. en 100 ml de agua destilada) durante 6 minutos
- Diferenciar en varios cambios de alcohol del 95%.
- Deshidratar, aclarar y montar con DPX.

- Método de Gross-Bielschowsky:

- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- Solución de nitrato de plata al 2% (2 gramos nitrato de plata en 100 ml de agua destilada) durante 48 horas en la oscuridad.
- Lavar en agua bidestilada
- Solución de plata amoniacal (5 ml de nitrato de plata al 10% y 5 gotas de hidróxido sódico del 40%) durante 10-20 minutos hasta que los cortes se ennegrecen.
- Lavar en agua destilada
- Reducir en solución de formol al 20% durante 5 minutos.
- Lavar intensamente con agua destilada.
- Solución de cloruro aúrico (3 gotas de cloruro aúrico con 1% de agua en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada) durante 1 hora.
- Lavar en agua destilada.
- Solución de tiosulfato sódico al 5% (5 gr de tiosulfato sódico en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada) durante 1 minuto.
- Lavar en H<sub>2</sub>O corriente.
- Deshidratar, aclarar y montar con DPX.

ESTUDIO DE MICROSCOPIA OPTICA CON TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS:

En casos seleccionados se determinó la presencia de proteína ácida fibrilar glial (PAFG) (28 casos) y proteína S-100 (28 casos)

de tumores del SNC y 58 casos del SNP), mediante el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) de Sternberger <sup>319</sup> que se describe a continuación:

Los cortes histológicos de 3-4 micras de grosor se desparafinaron mediante tres pases en sucesivos xiloles, de diez minutos cada uno. Se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pura al 1,8% en alcohol metílico, durante 30 minutos. Posteriormente, se hidrataron los cortes de forma progresiva a través de alcoholes decrecientes de 95%, 70%, 40% y 20% hasta el agua destilada. La supresión de la tinción de fondo se llevó a cabo mediante una solución combinada de PBS, pH 7,2, más un 5% de SNC (suero normal de cerdo) y un 1% de SAB (seroalbúmina bovina), durante 30 minutos. Se decantaron las preparaciones, sin secarlas, y se pasó a la incubación de los cortes con el antisuero primario específico. La proteína S-100 de la Dako se diluyó a 1:300 en una solución de PBS pH 7,2, 5% SNC y 1% SAB. La incubación se mantuvo durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Se lavaron abundantemente los cortes, en tres pases sucesivos de PBS pH 7,2 durante 30 minutos y se trataron con el antisuero "puente" de cerdo anti-IgG de conejo (1 gota de Biotina de la Vectastain PK.4001 en 10 cc. de solución PBS más 5% SNC y 1% SAB), durante 30 minutos. Se lavaron nuevamente en tres cambios sucesivos de PBS pH 7,2 durante 30 minutos y se pasó a la incubación en PAP

con una gota del componente A y una gota del componente B (IgG de conejo) de Vectastain PK.4001 en 5 cc. de Trizma pH 7,4 de Sigma, durante 30 minutos. Finalmente, tras lavados en tres cambios sucesivos de Trizma pH 7,4 durante 30 minutos, se procedió a revelar la peroxidasa con 5 mg de DAB (diaminobenzidina)-4ClH, más 10 cc de Trizma pH 7,4, y 0,03 cc. de  $H_2O_2$  al 3%, durante 2 minutos. Se practicó un lavado abundante en agua destilada y se pasó a contrastar con Hematoxilina de Hill y viraje con agua acetificada, deshidratar en alcoholes crecientes hasta alcohol absoluto, aclarar en xilol-eucaliptol y montar en DPX. Las células positivas tomaron un color ocre o marrón oscuro sobre un fondo negativo en azul.

Para la detección de la PAFG, se utilizó un sistema Kit de PAP de la Dako N°507, el cual incluye un revelado con amino-etil-carbazol (AEC) que proporciona un color rojizo a las células positivas.

Ambas técnicas (Proteína S-100 y PAFG) se aplicaron, al comienzo del estudio, en tejidos normales y en diferentes tumores de la rata para observar la efectividad y la sensibilidad de las mismas en este animal, constatándose, en cada tejido, la positividad o negatividad de las diversas estructuras con el fin de tomarlas posteriormente como elementos de referencia.

- Proteína ácida fibrilar glial (PAFG)

Es un marcador antigénico citoplásmico para el estudio de las células gliales normales, en vías de desarrollo y patológicas 17,71,72,92,110,18,19,20,74,79,90,144,200. Fue inicialmente aislada a partir de placas antiguas de un caso humano de esclerosis múltiple. Se encuentra en una gran variedad de especies animales, entre ellas la rata <sup>62</sup>. Esta proteína tiene, en la especie humana, un peso molecular de  $48.000 \pm 2.000$  daltons y contiene cantidades relativamente importantes de ácido glutámico, aspártico, alanina, leucina y arginina. Existen evidencias del todo fiables de que se trata de la subunidad química de los filamentos intracitoplásmicos de 8-10 nanómetros, característicos de los astrocitos <sup>375,241</sup>. Su función exacta es desconocida pero se cree que actúa de soporte mecánico <sup>114</sup>.

El descubrimiento de la técnica inmunohistoquímica PAP (peroxidasa-antiperoxidasa) por Sternberger en 1979 <sup>319</sup>, la demostración de su aplicación a los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina <sup>335</sup>, y la obtención de antisueros altamente específicos frente a la PAFG purificada <sup>234</sup> así como el más reciente advenimiento de las técnicas con utilización de anticuerpos monoclonales <sup>165</sup>, han revolucionado la patología quirúrgica humana y, en particular, han permitido un gran avance en la identificación más precisa de los tumores nerviosos. Las

conclusiones a las que se ha llegado en diversos estudios con esta técnica, realizados en su gran mayoría en tejidos humanos 92,281, se resumen a continuación :

- Los astrocitos, tanto reactivos como neoplásicos, muestran una marcada reacción positiva. En los neoplásicos, la positividad es, cuantitativa y cualitativamente, inversamente proporcional al grado de anaplasia del tumor. Esta propiedad es de una gran utilidad no sólo para la especie humana sino también para otros mamíferos, en los cuales los métodos clásicos de tinción, como el método de Holzer, resultan caprichosos y poco reproducibles 279.
- En los tumores mixtos del sistema nervioso central, este método permite la diferenciación rápida entre elementos astrocitarios y no astrocitarios.
- Algunas células tumorales no astrocitarias, como las endimarias, tienen también la capacidad de formar fibras gliales y por tanto suelen dar, aunque no invariablemente, un resultado positivo con esta técnica. Por otra parte, tumores de línea astrocitaria que no suelen manifestar fibrillas neurogliales con métodos neurohistológicos clásicos (tinción de Holzer, PTHA de Mallory), como el astroblastoma, muestran una intensa positividad con esta técnica. Ello es debido a que en estos casos, la PAFG no está polimerizada en forma de filamentos.

- Este método es particularmente útil para la identificación de células astrocitarias en localizaciones extraneurales, como la invasión de meninges o metástasis extraneurales o en casos de diagnóstico difícil por una respuesta esclerosante del tejido conectivo frente a la invasión por un glioma.
- Facilita la exclusión de neoplasias no gliales que pueden tener un parecido morfológico con ciertos astrocitomas (sarcoma alveolar de partes blandas) con métodos convencionales de tinción.

En resumen, se demuestra una reacción positiva para la PAFG en los siguientes tumores: astrocitomas, astroblastomas, áreas diferenciadas de glioblastomas, ependimomas, subependimomas, y astrocitos de los gliomas mixtos del SNC. Son negativos los tumores neuroepiteliales primitivos, células ganglionares, oligodendrocitos, epitelio de los plexos coroideos, endotelio vascular, células meningeas, fibroblastos y otros elementos de origen mesenquimal.

Si bien se considera mayoritariamente que esta proteína es exclusiva del sistema nervioso central <sup>17,71</sup>, recientemente se han descrito dos casos de positividad en el sistema nervioso periférico: Jessen y Mirsky <sup>150</sup>, han observado positividad en las células gliales acompañantes de las neuronas ganglionares en

ganglios entéricos por inmunofluorescencia, y Yen y Fields<sup>375b</sup> han observado positividad en el nervio ciático. Una posible explicación de estos hechos es que algunas células de Schwann sintetizan mínimas cantidades de PAFG, en tanto elementos neurogliales que son. No puede descartarse, sin embargo, que el antisuero anti-PAFG reconozca un segmento proteico que sea compartido con otras proteínas filamentosas<sup>92</sup>.

#### - Proteína S-100

La proteína S-100 fue descrita por primera vez por Moore, en 1965<sup>226</sup>, como una proteína específica del tejido nervioso. Su denominación se debe a su solubilidad en solución de sulfato amónico al 100% a pH neutro. En el sistema nervioso, esta proteína se encuentra principalmente en los astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y en algunas neuronas<sup>56,134,34,94,199</sup>. Estudios de reactividad cruzada demuestran que esta proteína se encuentra en el encéfalo de una gran variedad de especies, desde los seres humanos hasta los reptiles<sup>227</sup>. Por tanto, esta proteína universal no es específica de especie y manifiesta un grado muy elevado de constancia en la escala filogenética. Su función es desconocida pero existen ciertos indicios de que está involucrada en los mecanismos del aprendizaje y la memoria<sup>135</sup>.

Desde el punto de vista bioquímico, Isobe y col. en 1978<sup>138</sup>,

demonstraron que la proteína S-100 era una combinación de dos proteínas similares, la S-100a (subunidades alfa y beta) y la S-100b (subunidades beta y beta). El peso molecular de la proteína S-100a es de 20.907 y el de la S-100b, es de 21.014. Hasta el presente, las aplicaciones diagnósticas de esta proteína se han orientado a los tumores del tejido nervioso central humano <sup>120</sup>: Se han demostrado cantidades variables de esta proteína en astrocitomas, ependimomas, glioblastomas, oligodendrogliomas y neurinomas del nervio acústico y, por el contrario, no se ha podido detectar en meningiomas, meduloblastomas y tumores metastásicos. Recientemente se ha descrito la presencia de esta sustancia en melanomas y nevos pigmentados <sup>107,233</sup>. En los tumores del sistema nervioso periférico humano <sup>233</sup> se ha comprobado que existen cantidades variables de la proteína en schwannomas, neurofibromas, tumores de células granulares y sarcomas neurogénicos. Asimismo, resultan positivas las células de Schwann o células satélites de los ganglioneuromas y ganglioneuroblastomas. También un 50% de los carcinoides se tiñen débilmente con esta técnica. Además de los tumores nerviosos y carcinoides, se ha encontrado en una serie de tumores no nerviosos de muy distintas categorías y también en ciertos tejidos normales <sup>233</sup>. Por ejemplo, se ha demostrado positividad en condrosarcomas, cordomas, adenomas pleomórficos de las glándulas salivales, histiocitosis X, tumores mamarios (células

mioepiteliales), etc... No es, por consiguiente, una proteína neuroespecífica.

En el sistema nervioso periférico, se observa una marcada positividad en los núcleos y citoplasmas de las células de Schwann de las fibras nerviosas mielínicas y amielínicas. Las células perineurales y endoneurales no son inmunoreactivas y tampoco las células ganglionares de los ganglios sensitivos y vegetativos. Entre los tumores nerviosos periféricos, el schwannoma es el que muestra una positividad más intensa en sus células tumorales, tanto en los núcleos como en los citoplasmas. En los neurofibromas alternan células positivas con células negativas. En los schwannomas malignos o sarcomas neurogénicos suele observarse una positividad difusa, aunque menos intensa que en los schwannomas o neurofibromas. También pueden mostrar áreas negativas, que coinciden con los focos más anaplásicos del tumor. No parece haber diferencia alguna entre los neurofibromas plexiformes y sarcomas neurogénicos asociados a la enfermedad de von Recklinghausen y los tumores no relacionados con la misma. En ambos grupos hay tumores positivos y negativos para la determinación de esta proteína <sup>367</sup> .

### ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Se ha realizado un estudio ultraestructural en 30 tumores, 16 de localización en sistema nervioso central y los restantes, de localización periférica.

El procesamiento del material se llevó a cabo de la forma siguiente:

En cada tumor, se tallaron, inmediatamente tras su extracción, bloques de tejido de  $1 \text{ mm}^3$  y se introdujeron en glutaraldehído al 2,5% disuelto en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Al cabo de 3 a 5 horas de permanencia en el fijador, se realizaron dos cambios en la solución de lavado del tampón cacodilato y, a continuación, se efectuó una postfijación con tetraóxido de Osmio al 1%, durante una hora. Para la deshidratación, se pasaron los bloques de tejido por el tampón durante 10 minutos y, a continuación, por una escala de etanoles en concentraciones progresivas, según la siguiente pauta: etanol al 70%, 15 min; etanol al 80%, 15 minutos; etanol al 95%, 15 minutos; etanol al 100%, 15 minutos y etanol al 100%, otros 15 minutos. A continuación, se sustituyó el etanol al 100% por óxido de propileno y se efectuaron dos cambios de 20 minutos cada uno. Posteriormente, se sustituyó el óxido de propileno del segundo lavado por una solución a partes iguales de óxido de propileno y mezcla completa de resina con acelerador,

permaneciendo los fragmentos en esta solución durante una hora. Para su inclusión, se colocaron en cápsulas de gelatina y se rellenaron con la mezcla de resinas Epon 812 según el método de Luft ( ). La polimerización de la resina se realizó en estufa, en tres pases de 12 horas con temperaturas de 35°C, 50°C y 60°C, respectivamente. Finalizada la incubación, los bloques resultantes estuvieron listos para ser cortados a partir de las tres horas.

El tallado de los bloques se realizó en un ultramicrotomo Ultracut E de Reichert-Jung, del Servicio de Patología del Hospital de Nuestra Sra. de la Esperanza de Barcelona. Los cortes de control, de 1 micra de grosor, se tiñeron con Azul de Toluidina. Para los cortes ultrafinos, se utilizó el mismo ultramicrotomo. Las rejillas conteniendo los cortes finos se tiñeron con solución saturada de acetato de uranilo, durante 30 minutos, en estufa a 60°C. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se procedió a la tinción con citrato de plomo según técnica de Reynolds <sup>264</sup>.

Para el estudio ultraestructural, se utilizaron dos microscopios electrónicos Philips 301 pertenecientes a los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales "Nuestra Sra. de la Esperanza" de Barcelona y "Príncipes de España" de Bellvitge. Las fotografías se realizaron con placas "Kodak electron microscope film" 4489 de 6,5x9 cm.

## ANALISIS ESTADISTICO

La estrategia que se ha seguido para el análisis de los datos se ha basado en tres caracteres cualitativos: el momento cronológico en que se administró el carcinógeno, el sexo del animal y la incidencia de los diferentes tumores. Dado el número importante de tumores obtenidos en todos los grupos, se ha aplicado el test del  $\chi^2$ . No se ha acordado previamente un nivel de significación (P) determinado en la comparación de los datos, ateniéndose al criterio generalizado de que una  $p < 0,05$  indica que existe una diferencia significativa entre los valores comparados, una  $p < 0,01$  indica que la diferencia es muy significativa y que una  $p < 0,001$  es indicativa de que la diferencia es altamente significativa.

## RESULTADOS

## INCIDENCIA TUMORAL

Los datos numéricos referentes a la progenie efectiva, la distribución por grupos, los animales que han desarrollado un tumor, el número total de tumores, así como el número de animales portadores de más de un tumor, están recogidos en la Tabla VI.

Se han desarrollado tumores nerviosos en el 88,60% de los animales experimentales, mientras que ningún animal control ha presentado un tumor de esta estirpe. El porcentaje más alto de animales con tumores nerviosos se ha observado en el Grupo II con un 90,69%, seguido por el Grupo III, con un 89,17%, y por el Grupo I, con un 86,11%.

El número total de tumores nerviosos observados ha sido superior al de animales portadores de tumor. Ello es debido a que varios animales experimentales (un 23,94% de los animales portadores de un tumor nervioso) han presentado más de una neoplasia hasta un máximo de cinco. La relación número de tumores/animal ha sido del 1,34. Esta multiplicidad tumoral ha sido más acusada en el Grupo II que en los Grupos III y I, ordenación que ha mostrado un paralelismo con la del número de animales portadores de más de un tumor: Grupo II, con un 33,33%, Grupo III, con un 22,14% y Grupo I, con un 16,12% ( Tabla XI ).

El Grupo IV, de animales control, ha desarrollado un 3,84% de tumores malignos espontáneos, ninguno de los cuales muestra las características de los tumores experimentales.

La incidencia tumoral general es parecida en ambos sexos, sin embargo destaca un predominio de tumores en los animales del sexo femenino del Grupo II, con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ) con respecto a los animales hembra del Grupo I (Tabla XV). Igualmente se observa una diferencia significativa entre ambos sexos del Grupo I ( $p < 0,005$ ) con predominio de la incidencia tumoral en el sexo masculino (Tabla XV).

La mayor incidencia de tumores del sistema nervioso central en los animales del Grupo I se ha visto entre las 36 y 39 semanas después del nacimiento, en los animales del Grupo II, entre las 56 y 59 semanas y en los animales del Grupo III, también entre las 56 y 59 semanas. Los tumores del sistema nervioso periférico han presentado su incidencia más elevada siempre antes que los tumores del sistema nervioso central en todos los grupos: En el Grupo I, entre las 28 y 31 semanas, en el Grupo II también entre las 28 y 31 semanas y en el Grupo III, entre las 24 y 31 semanas (Figs. 141-143 ).

#### **LOCALIZACION DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES:**

Considerados conjuntamente, los tumores originados en el sistema

nervioso periférico han sido los más frecuentes, con una incidencia del 55,40% de los animales, y en segundo lugar, los originados en el sistema nervioso central, cuya incidencia ha sido del 52,84%.

La distribución de los tumores en las distintas localizaciones está pormenorizada en las tablas VIII y IX. Dentro de los tumores nerviosos periféricos, en primer lugar por orden de frecuencia, se encuentran los tumores nacidos en una o varias **raíces o nervios espinales** y/o sus prolongaciones transvertebrales que se han observado en un 25,54% de animales. El nivel medular más frecuentemente afectado ha sido la región lumbo-sacra, si bien se han observado tumores en todos los demás territorios (Figs. 1-6).

En segundo lugar, con proporciones prácticamente idénticas a las del grupo anterior, se encuentran los tumores desarrollados en la región de la **raiz del nervio trigémino**, en el ganglio de Gasser o en sus ramas oftálmica o maxilar, lo cual ha ocurrido en un 24,95% de los animales. Un 22% de los mismos se originó en la raíz y/o ganglio de Gasser y un 2,94% lo ha hecho exclusivamente en las regiones oftálmica, maxilar o mandibular. Algunos de estos tumores han alcanzado un gran tamaño en el momento de la autopsia, extendiéndose por la base del cráneo de forma difusa, englobando a la hipófisis, siguiendo el trayecto de la rama

oftálmica, hasta alcanzar el globo ocular, o de la rama maxilar, hasta infiltrar los tejidos paranasales. En algunos casos, los tumores han presentado unas dimensiones tan considerables, constituyendo grandes masas tumorales en la base del cráneo, que han impedido el que, en algunos casos, pudiera aclararse el punto exacto de origen de la neoplasia (Figs. 7-12).

Un 6,28% de los animales ha desarrollado un tumor nervioso en **situación periférica**, originado ya sea en algún nervio intercostal, en un nervio crural, en los plexos braquial o lumbosacro, en el tejido subcutáneo o bien en una víscera (Figs. 13-20). Se excluyen de este grupo los tumores renales, recogidos en un grupo aparte y que han aparecido en un 1,17% de los animales (Figs. 29-30).

En el sistema nervioso central (SNC) se han desarrollado tumores nerviosos en el 52,84% de los animales. Sólo un 9,62% se han originado en la **médula espinal** y el resto (41,06%) han aparecido en el **encéfalo**. La gran mayoría de tumores encefálicos se han localizado en el cerebro y, por el contrario, los originados en cerebelo y tronco cerebral han sido muy escasos. Las áreas cerebrales más afectadas son la sustancia blanca de los núcleos ovals, las regiones periventriculares y el hipocampo (Figs. 24-28). Un 2,16% de los animales experimentales ha desarrollado un tumor limitado, aparentemente, a las leptomeninges craneales,

sin ninguna relación con un tumor intracerebral (Figs. 21-23).

En el grupo integrado por las ratas madres se han observado tumores en tejidos subcutáneos y distintas vísceras, indistinguibles de los tumores experimentales, en el 11,66% de los animales.

#### **ASPECTO MACROSCOPICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES**

Los tumores aparecidos en el SNC, en su mayoría cerebrales, son de un tamaño que varia entre 0,1 y 1 cm de diámetro. En general, el tumor es unilateral y hemisférico pero en algunos casos sobrepasa la línea media e infiltra el hemisferio contralateral o bien es multifocal. En los tumores de mayor tamaño, la superficie del hemisferio afectado suele hacer protusión y muestra un color violáceo con algún foco hemorrágico. En la superficie de corte puede apreciarse una buena delimitación periférica, una forma redondeada u ovalada, con el eje mayor orientado en sentido anteroposterior, un color grisáceo, un aspecto translúcido y una consistencia muy blanda, casi gelatinosa. Con elevada frecuencia, los tumores más grandes se acompañan de focos hemorrágicos y de quistificación, que suele ser única y central. Los tumores más pequeños, casi imperceptibles macroscópicamente, de un diámetro entre 0,1 y 0,4 cm, son completamente intraparenquimatosos y no

hacen relieve en la superficie cerebral. En general han sido un hallazgo inesperado en la autopsia, en muchos casos acompañando a otro tumor clínicamente más evidente de cualquier localización. En la médula espinal, los tumores siempre han sido de pequeño tamaño, inferiores a 0,4 cm de diámetro, en ocasiones aflorando a la superficie de la médula como pequeños nódulos grisáceos y translúcidos, bien delimitados y muy blandos, sin fenómenos de hemorragia ni de quistificación (Figs. 24-28).

Los tumores originados en **raíces o nervios espinales** han mostrado una preferencia por la localización en las últimas raíces lumbares y sacras y han formado masas tumorales fusiformes que han seguido el trayecto de una raíz, interesando también el ganglio espinal y el nervio correspondientes, a lo largo del cual se han propagado periféricamente. En los tumores limitados a las estructuras intrarraquídeas, la superficie externa es lisa, brillante y de color grisáceo. La superficie de corte suele ser muy homogénea, grisácea y translúcida. La consistencia es muy blanda y friable. Sin embargo, muchos de estos tumores, en el momento de la autopsia, han presentado un gran tamaño y han desbordado los límites vertebrales por infiltración, a través de los agujeros de conjunción, hacia los tejidos blandos prevertebrales, formando en muchos casos una masa tumoral acompañante en el mediastino, en el retroperitoneo o en un flanco (Figs. 1-6).

El aspecto de los tumores del V par craneal ha sido muy similar al de los espinales. Externamente, los tumores se han manifestado como un engrosamiento fusiforme de la raíz y generalmente también del ganglio de Gasser, de color más grisáceo que el nervio, aspecto también translúcido y consistencia muy blanda, prácticamente gelatinosa. En áreas más distales y en los tumores infiltrantes, el color ha sido más blanquecino y la consistencia ligeramente mayor. Con frecuencia se han observado focos hemorrágicos. La mayoría de tumores han alcanzado grandes proporciones en el momento de la autopsia y se han observado muy extendidos por la base del cráneo, generalmente ocupando la hemibase correspondiente y produciendo una impronta, con atrofia por compresión, del parénquima cerebral subyacente. La infiltración tumoral de la base del cráneo ha englobado con frecuencia la hipófisis e infiltrado difusamente las meninges, generalmente de esta zona pero, en ocasiones, también de la convexidad. Estos tumores han mostrado una extensión en sentido anterior, siguiendo el trayecto de la rama oftálmica hasta la órbita, en donde los límites del tumor se pierden por confundirse con la grasa y los músculos extrínsecos de esta región. El globo ocular se ha conservado siempre indemne. Unos pocos casos se han originado en el área de distribución de la rama maxilar, observándose un tumor muy difícil de delimitar por su marcada infiltración local en los tejidos blandos de la región del hocico (Figs. 7-12).

Los tumores localizados en **vísceras, cavidades serosas o tejido subcutáneo** han sido característicamente de tamaño siempre grande, entre 3 y 7 cm de diámetro, superficie externa con frecuencia lobulada y lisa y color blanco-grisáceo con extensas áreas amarillentas y rojizas que les han proporcionado un aspecto muy abigarrado. La consistencia ha sido siempre muy blanda. En la superficie de corte, además de las características descritas en la parte externa, se ha observado con gran frecuencia la existencia de áreas quísticas de diversos tamaños y formas, la mayoría con un contenido sanguinolento o un líquido viscoso transparente (Figs. 13-20).

Los tumores observados en los **riñones** son de tamaños variables, entre 0,3 y 4 cm, situados en el polo renal superior, de color blanquecino homogéneo y consistencia media. Los de pequeño tamaño están bien delimitados y hacen una pequeña protusión en la superficie cortical. Los más grandes son tumores voluminosos que infiltran masivamente la cápsula y las estructuras pielocaliciales, destruyendo gran parte del parénquima renal, con compresión y rechazo del parénquima residual. La superficie de corte es discretamente lobulada o fasciculada en la mayor parte de los casos. Más detalles macroscópicos de estos tumores están resumidos en la Tabla XII (Figs. 29-30)

Todos los tumores mencionados han mostrado una tendencia general a la infiltración local de los tejidos vecinos pero en ningún caso se ha observado la existencia de metástasis por lo que estas neoplasias deben incluirse en la categoría de tumores malignos de potencial agresivo local.

## ASPECTO MICROSCOPICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES

Los tumores originados en el SNC han ofrecido un aspecto histológico variable según el tamaño del tumor. Los tumores pequeños, y muy especialmente los microscópicos, están constituidos por un acúmulo de células pequeñas monomorfas, redondas, de núcleo pequeño, central y cromatina densa, con un citoplasma escaso y ópticamente vacío en forma de halo perinuclear. No se han observado mitosis. En la periferia, estas células se disponen de forma cada vez menos densa hasta confundirse insensiblemente con los elementos gliales normales del parénquima nervioso adyacente. Este patrón aplanado tan monótono, junto con una trama de pequeños vasos capilares anastomosados, se consideran característicos de los oligodendrogliomas. El aspecto de los tumores de mayor tamaño, generalmente superior a los 2 mm de diámetro máximo es siempre más heterogéneo. El componente celular del tumor es múltiple. Junto a áreas superponibles a las descritas como oligodendrogliomatosas, se observan otras en las que el componente oligo alterna con otros elementos celulares más grandes, de núcleo mayor, cromatina más laxa y citoplasma débilmente eosinófilo, mal definido, de aspecto astrocitario o incluso gemistocítico. En algunos casos, junto al componente oligodendroglial y claramente separado de él, se observan grupos de células más grandes, de núcleo central grande y citoplasma de

límites bien definidos y basófilo. Estas células pseudoepiteliales se organizan formando distintos patrones arquitecturales, generalmente en forma de cordones o trabéculas paralelas, separadas por material intersticial finamente fibrilar, o formando dibujos laberínticos o, incluso, en ocasiones, estructuras rosetoides, con un centro fibrilar. Ocasionalmente, pueden identificarse en la periferia del tumor, elementos de aspecto neuronal normal, muy probablemente englobados y todavía no destruidos por la neoplasia. En todas estas áreas se identifican numerosas figuras de mitosis. Ocasionalmente pueden demostrarse microcalcificaciones redondeadas de estructura laminada concéntrica en algunos tumores, más abundantes en los de mayor tamaño. La puesta de manifiesto de distintos tipos celulares en estos tumores conduce a diversas interpretaciones diagnósticas e histogenéticas que serán comentadas en la Discusión (Figs.31-47).

Además de las peculiaridades citológicas descritas, los tumores de mayor tamaño han mostrado la presencia de muy frecuentes focos de necrosis tumoral limitados por pseudoempalizadas de células tumorales, así como de una marcada proliferación vascular con formaciones glomeruloides y gran tumefacción endotelial. Estos vasos proliferados muestran una tendencia a disponerse alrededor de grandes espacios quísticos de la parte central de los tumores, dispersos en el seno de la neoplasia o bien en la interfase entre

el tumor y el parénquima nervioso circundante. En algunos casos es patente, también, la presencia de focos hemorrágicos (Figs.37-38).

Los tumores localizados en áreas periependimarias, cuando alcanzan un cierto tamaño, suelen romper la membrana ependimaria y se abren a un ventrículo, que queda parcial o totalmente repleto de tejido tumoral y facilita la diseminación meníngea de la neoplasia. Cuando el tumor se encuentra localizado en las proximidades del III o IV ventrículo, se acompaña de una hidrocefalia asociada, secundaria a la obstrucción. Los tumores más superficiales de las regiones subcorticales de los hemisferios, o cercanos a la base, en su crecimiento, alcanzan hasta las leptomeninges, infiltrando difusamente estas estructuras. En estos casos el aspecto de las células infiltrantes es, o bien linfocitoide, o bien fusiforme por adaptación a la reacción desmoplásica meníngea. Fenómenos idénticos pueden observarse en los tumores medulares en los que la invasión meníngea es mucho más frecuente y en relación con tumores de un tamaño mucho menor que los encefálicos, lo cual se explica fácilmente por las ya reducidas dimensiones de la médula espinal de la rata. Otro aspecto de interés es que estos tumores del SNC son con gran frecuencia multifocales, variando en tamaño desde lesiones microscópicas hasta tumores macroscópicamente visibles (Figs. 34,49-50).

Los tumores originados en las raices y nervios espinales y raiz del V par craneal muestran un aspecto histológico muy similar. Están constituidos por una proliferación monomorfa de células pequeñas, de citoplasma indetectable, núcleo redondo o en forma de "coma", pequeño y denso, separadas por un material intersticial amorfo mixoide que varía en proporción según las áreas. En los tumores grandes es casi constante la presencia de pequeñas áreas quísticas y áreas hemorrágicas, así como numerosos vasos sanguíneos de aspecto cavernoso. Las células cebadas han sido un elemento acompañante prácticamente constante en estos tumores. Se pueden contar numerosas figuras de mitosis, las cuales, junto con el carácter anaplásico de las células tumorales y la tendencia invasiva local, han sido los criterios sobre los que se ha fundamentado el diagnóstico de malignidad. No obstante, dada la ausencia de metástasis, estos tumores deben catalogarse como de bajo grado (Figs.53-64).

En las raices espinales, generalmente las dorsales, aunque el tumor dominante parece crecer a partir de una de ellas, ha sido relativamente frecuente la observación de cambios proliferativos de variable intensidad en varias raices adyacentes. En estas raices vecinas, las células proliferadas muestran un aspecto idéntico a las del tumor principal y se hallan intercaladas entre las fibras nerviosas mielínicas. En algunos casos pueden observarse cambios degenerativos incipientes en las vainas

mielínicas consistentes, en su mayor parte, en microvacuolización que evoluciona, en los casos más avanzados, a una franca quistificación. Las células neoplásicas infiltran casi constantemente los ganglios nerviosos sensitivos correspondientes, manteniéndose indemnes, en fases tempranas, las neuronas ganglionares y las fibras nerviosas. Muchos de estos tumores no permanecen limitados a la raíz sino que se propagan en sentido distal siguiendo el curso del nervio, a través de las estructuras óseas vertebrales, para infiltrar difusamente los músculos y tejidos blandos paravertebrales. En esta zona, suelen formar una voluminosa masa tumoral. Los tumores originados en las raíces de los nervios trigéminos también muestran una gran tendencia a propagarse en sentido distal, siguiendo el curso de una de las ramas de distribución periférica del nervio, hasta alcanzar los tejidos blandos orbitarios, con invasión de la grasa, músculos extrínsecos y glándula de Harderian, a excepción del globo ocular. También se ha observado con mucha frecuencia una infiltración meníngea difusa, especialmente de las meninges de la base, aunque, en ocasiones, la infiltración ha sido mucho más extensa, propagándose por las meninges de la convexidad (Figs.65-74).

La naturaleza de las células tumorales, por las características topográficas señaladas, debe estar relacionada con las células de Schwann, con las células endo y perineurales o bien con ambos

tipos celulares, sin que con las tinciones habituales pueda identificarse con exactitud el tipo celular proliferante.

Los tumores periféricos (subcutáneos, cavidades serosas, viscerales) están constituidos por una proliferación tumoral de células similares a las descritas anteriormente, que adoptan dos patrones básicos: en uno de ellos, las células se disponen de forma laxa, con abundante material intercelular amorfo mixoide entre las mismas y, en el otro, la disposición es más compacta y focalmente ondulante. Muy excepcionalmente se pueden identificar empalizadas rítmicas de células tumorales en las regiones más densamente celulares. Las mitosis son abundantes aunque existe una gran variabilidad en el índice mitótico según los casos. Se observan numerosas formaciones quísticas de grandes proporciones en la mayoría de tumores. Este aspecto, aunque no totalmente superponible, recuerda el de los tumores de células de schwann humanos, con sus típicas áreas densas tipo Antoni A y sus áreas laxas tipo Antoni B. En algunos casos se han observado nódulos intratumorales formados por células más anaplásicas y con un índice más elevado de mitosis (Fig. 75-81).

Es importante remarcar que varios tumores originados en diversas raíces y nervios (el 21,47%), han mostrado la existencia de unas

estructuras parecidas a troncos nerviosos, de aspecto aberrante, de tamaños y configuraciones variables, en el seno del tumor y más especialmente en la perifería del mismo. En algunos casos es evidente que dichas estructuras no son más que troncos nerviosos normales englobados, pero todavía no destruidos por el avance tumoral. Sin embargo, en otros casos, estas estructuras muestran una gran hiper celularidad a expensas de células con idénticas características morfológicas y figuras de mitosis que las de la población tumoral circundante. Este aspecto peculiar abre la posibilidad de que se trate de elementos neoformados por el tumor, aunque podría tratarse también de troncos nerviosos normales, infiltrados y deformados secundariamente por las células tumorales. Dado su gran parecido con estructuras similares observadas en algunos tumores nerviosos periféricos humanos, se las ha denominado **estructuras plexiformes**. Su distribución en los distintos grupos experimentales se expone en la tabla X, donde se aprecia que, en conjunto, estas formaciones son proporcionalmente más frecuentes en los animales del Grupo I, con un 29,68%, seguido del Grupo II con un 20,76%, y finalmente el Grupo III, con un 15,90% de los tumores nerviosos periféricos. De todas las localizaciones, la raíz y ramas del nervio trigémino ha sido la que ha mostrado mayor incidencia de estas estructuras, en todos los grupos pero especialmente en el Grupo I. Se ha observado una diferencia estadísticamente significativa ( $p <$

0,05) en la incidencia global de estructuras plexiformes entre los grupos I (animales tratados transplacentariamente el día 15 de la gestación) y III (animales tratados en el primer día tras el nacimiento). También ha resultado significativa ( $p < 0,01$ ) la diferencia en la incidencia de dichas estructuras entre los animales machos de los citados grupos (Tabla XV) (Figs. 82-89).

Los **tumores renales** están básicamente constituidos por una proliferación de células indiferenciadas similares a las del blastema renal, dispuestas en bandas o grupos, con tendencia a la formación de estructuras tubulares limitadas por células cuboideas, que remedan túbulos renales rudimentarios. Más ocasionalmente se observan estructuras glomeruloides. Las figuras de mitosis son muy abundantes. En los tumores de mayor tamaño, se observan extensas áreas de necrosis y focos de hemorragia. Uno de los 6 tumores, aparecido en un animal hembra, cuya madre fue inyectada en el día 21 de la gestación, ha mostrado la presencia de muy extensas áreas rhabdomyosarcomatosas. Todos los nefroblastomas, excepto un caso, se han desarrollado conjuntamente con uno o más tumores nerviosos, tanto de localización central como periférica. Otros detalles referentes a estos tumores se exponen en la Tabla XII (Figs. 90-93).

## DISTRIBUCION DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES EN LOS DISTINTOS GRUPOS

Los valores absolutos y porcentuales de la distribución de los distintos tumores nerviosos y no nerviosos en los grupos experimentales están recogidos en las Tablas VI, VII, VIII y IX.

El porcentaje más elevado de tumores del SNC, en su mayoría catalogables como gliomas, se ha observado en el Grupo I con el 63,88% de casos. Los grupos III y II, se sitúan a una distancia considerable (48,40% y 45,34%, respectivamente). Esta diferencia ha resultado estadísticamente muy significativa entre los grupos I y III ( $p < 0,005$ ) y entre los grupos I y II ( $p < 0,001$ ). Igualmente ha sido muy significativa la diferencia entre los animales macho de los Grupos I y II ( $p < 0,001$ ) y entre los animales macho de los Grupos I y III ( $p < 0,001$ ) (Tabla XV).

Por el contrario, los tumores originados en las raíces y nervios craneales, espinales y periféricos, tomados en conjunto, han sido más frecuentes en el Grupo II, con un 75,58%, a gran distancia de los otros dos Grupos (Grupo I con un 35,55% y Grupo III con un 56,05%). Estas diferencias han resultado todas ellas estadísticamente muy significativas ( $p < 0,001$ ). También son muy significati-

vas las diferencias entre la incidencia tumoral en los animales macho de los grupos I y II, I y III, y II y III y entre la de los animales hembra de los grupos I y II, I y III, y II y III (Tabla XV).

Entre los tumores nerviosos centrales, los de localización medular han sido más frecuentes en el Grupo III (12,73%) pero a corta distancia del Grupo II (9,88%). Los tumores intracerebrales, cerebelosos o del tronco son, por el contrario, claramente más frecuentes en el Grupo I (55,55%) que en los Grupos restantes. Existe diferencia significativa entre la incidencia total de tumores medulares en el Grupo I y en el Grupo II ( $p = 0,05$ ) y entre el Grupo I y el Grupo III ( $p = 0,005$ ). También es significativa la diferencia entre las incidencias de los tumores encefálicos del Grupo I y del Grupo II ( $p = 0,05$ ) y entre las del Grupo I y del Grupo III ( $p = 0,005$ ). Hay diferencia significativa entre la incidencia de tumores nerviosos centrales en animales macho de los Grupos I y II y entre los animales macho de los Grupos I y III ( $p = 0,001$ ) (Tabla XV).

Los tumores del V par craneal o sus ramas se han inducido con más frecuencia en el Grupo II (33,13%) que en los otros dos grupos (16% en Grupo I y 26% en Grupo III) pero esta diferencia ha resultado estadísticamente no significativa.

Una distribución semejante se ha visto en los tumores originados en raíces y nervios espinales, con unos porcentajes muy parecidos.

Los tumores periféricos se han desarrollado con mayor frecuencia en el Grupo II, frecuencia que ha resultado prácticamente el doble que la del Grupo I y a menos distancia del Grupo III. Esta relación se ha mantenido al desglosar los tumores nerviosos viscerales de los de tejidos blandos. La diferencia ha resultado estadísticamente no significativa en todos los casos.

Los tumores renales han aparecido en su mayor parte en el Grupo I (4/5) y solamente se ha observado un caso en el Grupo II.

En todos los Grupos han aparecido unos pocos tumores periféricos de aspecto sarcomatoso más indiferenciado, sin rasgos morfológicos suficientes que permitan reconocer la estirpe celular, que se han reunido en un apartado común como "sarcomas inclasificables" (Tabla VI).

Se han observado, además de los tumores de naturaleza nerviosa y de los nefroblastomas descritos, otros tipos histológicos de tumores cuya incidencia es del 9,43% y que deben considerarse

como espontáneos o no directamente relacionados con el experimento. Están detallados en la Tabla XIII. No se observan diferencias en la distribución por Grupos.

El Grupo control IV no ha desarrollado ningún tumor nervioso, ni central ni periférico.

El Grupo integrado por las madres también ha presentado tumores malignos cuya cifra total asciende a 11. El número más elevado de casos se ha observado en el Grupo formado por las madres que fueron inyectadas el día 21 de la gestación (Grupo II), con un total de 6 tumores malignos (30%), seguido del Grupo de madres inyectadas el día 15 de la gestación (Grupo I) con 3 tumores malignos (15%) y del Grupo formado por las madres no inyectadas (Grupo III) con 2 tumores malignos (10%).

De los 6 casos del Grupo II, 3 han resultado ser sarcomas indiferenciados originados respectivamente, en corazón, útero y vagina. De los 3 casos del Grupo I, 2 muestran un aspecto morfológico muy similar al de los tumores nerviosos periféricos observados en los descendientes. Ambos tumores se han desarrollado en un mismo animal, uno en el útero y otro en un ovario. Este último presenta, además, estructuras plexiformes, lo cual ratifica su naturaleza nerviosa.

De los 2 tumores malignos del Grupo III, 1 de ellos se ha

clasificado como sarcoma pleomórfico y se encontraba localizado en las paredes vaginales.

Otros tumores malignos y benignos observados en este Grupo de madres se exponen más detalladamente en la Tabla XIV.

#### ESTUDIO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES CON TECNICAS INMUNOHISTO- QUIMICAS.

##### -Proteína ácida fibrilar glial (PAFG)

Se ha determinado la presencia de PAFG en un número representativo de tumores del SNC (28 casos), obteniéndose los siguientes resultados:

-La tinción ha sido negativa en los tumores clasificados ópticamente como oligodendrogliomas puros así como en las áreas oligodendrogliales de los tumores con población heterogénea.

-La tinción ha resultado igualmente negativa en las áreas descritas como pseudoepiteliales de los tumores de constitución heterogénea.

-Se ha observado una positividad intensa en el componente astrocitario de los tumores gliales de población heterogénea, que ha puesto de manifiesto claramente el soma y las prolongaciones largas y ramificadas interpuestas entre las demás

células tumorales. No se ha podido determinar ninguna diferencia ni en el aspecto morfológico ni en la apetencia tintorial entre estas células y las peritumorales de naturaleza muy probablemente reactiva, en aquellos casos en los que dicha gliosis reactiva ha sido manifiesta.

-Se ha observado también una franca positividad en las áreas o espacios perivasculares de los vasos proliferados intratumorales, que han sido interpretadas como prolongaciones astrocitarias integrantes de la barrera hematoencefálica.

-De gran interés diagnóstico ha sido el hallazgo de células positivas de morfología astrocitaria entremezcladas con el componente oligodendroglial en las áreas de infiltración meníngea e intraventricular de tumores originados en el parénquima cerebral o medular subyacente. Estos hallazgos apoyarían la naturaleza tumoral y no reactiva de los astrocitos en los gliomas de mayor tamaño, por lo que se trataría, en base a este criterio, de verdaderos tumores mixtos oligoastrocitarios (Figs.95-101).

#### -Proteína S-100

Se han estudiado con esta técnica inmunohistoquímica un número representativo de tumores del SNC (28 casos) y del SNP (52) así como varios tumores del grupo "sarcomas inclasificables" (6 casos). Como controles se han usado cortes de encéfalo, médula

espinal, con sus raíces, y nervios periféricos. En dichos cortes control se han teñido muy positivamente los astrocitos y débilmente el núcleo de los oligodendrocitos del SNC, muy positivamente las células de Schwann y los mastocitos de los nervios craneales, espinales y periféricos, con una positividad moderada las células ependimarias, el borde luminal de las células superficiales de los plexos coroides, las células satélites de las neuronas ganglionares de los ganglios simpáticos y sensitivos y el tejido adiposo, y con una positividad débil, las neuronas ganglionares del ganglio de Gasser y ganglios sensitivos y vegetativos periféricos. Han resultado totalmente negativas las neuronas del SNC, las meninges, las paredes vasculares, el perineuro y el músculo esquelético.

Los tumores nerviosos centrales se han comportado, frente a la detección de esta proteína, de forma muy similar a la de la PAFG:

-Los oligodendrogliomas puros han sido repetidamente negativos, lo mismo que las células oligodendrogliales de los gliomas de celularidad heterogénea.

-Las células grandes e indiferenciadas han sido asimismo negativas en todos los casos estudiados.

-Las células astrocitarias intratumorales han resultado, por el contrario, francamente positivas, observándose imágenes muy similares a las obtenidas con la detección de PAFG (Figs. 102-105):

Los tumores del SNP, ya sean de localización espinal, del V par craneal o de nervios periféricos, han mostrado una positividad de grado variable entre leve y moderada según los casos y las áreas estudiadas:

-En la mayoría de tumores se han observado áreas débil o moderadamente positivas junto a áreas totalmente negativas. En general, los tumores con predominio de células pequeñas y redondas han presentado áreas negativas más extensas que aquellos constituídos principalmente por células fusiformes o en forma de "coma".

-En los tumores nerviosos portadores de estructuras plexiformes se ha podido comprobar que la gran mayoría de estas formaciones guardan un gran parecido con verdaderos troncos nerviosos. La positividad de sus células constituyentes ha puesto de relieve la gran similitud morfológica de la estructura interna de estas formaciones con la de los nervios normales, utilizados como controles de esta técnica. Efectivamente, se ha observado una positividad lineal en forma de anillo alrededor de puntos centrales negativos, de forma superponible a la de las células de Schwann normales que envuelven a los axones en los nervios. Por el contrario, otras estructuras plexiformes de morfología mucho más aberrante y mayor celularidad interna, han resultado negativas, o muy débilmente positivas en algunos focos, para esta determinación, pudiéndose observar diversas formas intermedias entre ambos extremos de comportamiento (Figs.106-109).

Los tumores periféricos de aspecto sarcomatoso, inclasificables bajo el punto de vista óptico y con las técnicas de tinción habituales, han resultado todos ellos negativos para la detección de esta proteína. Ello puede ser indicativo de que, o bien se trata de sarcomas no neurogénicos, o bien de tumores nerviosos malignos lo bastante indiferenciados como para no expresar esta clase de proteína.

#### ESTUDIO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES CON MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Se ha realizado un estudio ultraestructural en 31 casos representativos, 16 de los cuales correspondían a gliomas centrales y 11 a tumores de vainas nerviosas periféricas. Cuatro de estos tumores nerviosos periféricos contenían estructuras plexiformes. También se han estudiado 4 casos correspondientes a sarcomas periféricos de difícil catalogación histológica con microscopía óptica.

#### Aspecto ultraestructural de los gliomas:

Los casos que ópticamente se habían clasificado como gliomas mixtos oligoastrocitarios, tanto de localización encefálica como medular, están constituidos por una proliferación densamente

celular con escaso espacio extracelular. El tipo celular más frecuente es de forma redondeada, núcleo central también redondo u ovoideo que ocupa del 50% al 75% del área celular. Los límites celulares son lisos y emiten algunas prolongaciones largas y estrechas que quedan flotando en el intersticio. La envoltura nuclear es lisa con escotaduras ocasionales y la cromatina está distribuida en gruesos grumos periféricos adosados a la membrana nuclear, con algunos gránulos intercromatínicos. Se observa un nucleolo central en un 30%, por término medio, de las células, pero esta proporción varía de un campo a otro en cada caso. Los citoplasmas son medianamente densos o muy claros. Los más densos contienen algunas mitocondrias, un retículo endoplásmico rugoso escaso, un aparato de Golgi medianamente desarrollado y abundantes polirribosomas libres. También son abundantes los lisosomas primarios y secundarios con un contenido electrondenso amorfo o con restos mielínicos. En algunas células se observan inclusiones densas y, esporádicamente, alguna inclusión en huella dactilar. No se identifican filamentos intracitoplásmicos. En algunas prolongaciones se observan escasos microtúbulos dispuestos longitudinalmente. No se han reconocido uniones intercelulares maduras en las áreas de contacto intercelular. Tampoco se ha observado lámina basal en ningún caso. En alguna célula aislada se aprecia la existencia de apilamientos intracitoplásmicos de membranas en conexión con la membrana celular por medio de un

pequeño tracto que recuerda un mesaxón, como intento frustrado de formar vainas de mielina. El espacio extracelular es escaso y está constituido por un material amorfo moderadamente denso de aspecto granular o flocular con tendencia a densificarse alrededor de las células, aunque sin constituir una verdadera lámina basal. Las células de citoplasmas muy claros, se han interpretado como artefactuales, dado que en muchos casos se han encontrado en las proximidades de focos de necrosis. En gran número de los tumores examinados se han observado, entre las células descritas, prolongaciones celulares muy largas y ramificadas, repletas de filamentos intermedios, junto a mitocondrias, que corresponden a prolongaciones astrocitarias. Solamente en dos casos se ha podido evidenciar el soma de las células astrocitarias, repleto de mitocondrias y cisternas de retículo endoplásmico liso dilatadas, con un núcleo excéntrico, relativamente pequeño para el volumen celular y sin nucleolo aparente.

En siete casos, además de este tipo celular mencionado, se han observado células con tendencia a la agrupación en forma de islotes de 4 ó 5 elementos, cordones o estructuras rosetoides, con las células en circunferencia alrededor de un espacio central ocupado por sus prolongaciones irregulares. Estas células son de tamaño mayor que el del tipo celular dominante y los núcleos ocupan una posición central o basal según los casos y según el ángulo de incidencia del corte en cada caso. Se observan escasos grumos de cromatina periféricos y el nucleolo es evidente en la

mayoría de núcleos. Los citoplasmas son más densos y más ricos en organelas que el tipo celular dominante anteriormente citado, especialmente mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso moderadamente desarrollado, aparato de Golgi prominente y abundantes polirribosomas. También existen abundantes lisosomas primarios y un retículo endoplásmico liso desarrollado. Esporádicamente se han observado algunas imágenes sugestivas de gránulos neurosecretorios constituidos por una vesícula con un centro denso rodeado por un halo claro, pero son muy escasas y podrían corresponder a lisosomas. También se ha podido observar en una célula una cisterna dilatada de retículo endoplásmico rugoso que contenía dos formaciones tubulares paralelas y dispuestas longitudinalmente, de naturaleza no identificada. Estas células son de límites irregulares y muestran algunas prolongaciones periféricas de grosor y longitud variables.

En las formaciones rosetoides, estas prolongaciones irregulares convergen en el centro de la luz, en donde terminan en forma de "filopodia". En la parte distal de los "filopodia" se observan frecuentemente pequeñas vesículas probablemente de carácter degenerativo. En las prolongaciones de mayor calibre, también pueden observarse polirribosomas, algunos filamentos y microtúbulos dispuestos longitudinalmente a lo largo de las mismas. En las membranas celulares pueden identificarse ocasionalmente uniones primitivas. No se han observado uniones densas maduras, lámina

basal, microvellosidades, cuerpos basales ni cilios en estas células.

En todos los tumores del sistema nervioso central examinados ultraestructuralmente ha destacado la presencia de múltiples vasos, en muchos de los cuales es llamativa una proliferación de las células endoteliales que da lugar a una luz vascular de apariencia compleja, una apertura completa o incompleta de las uniones interendoteliales, una reduplicación de la membrana basal, así como un incremento de vesículas pinocitóticas y una dilatación del espacio extracelular ocupado por un material amorfo finamente granular.

En resumen, el aspecto de la mayor parte de las células de este tipo de tumor concuerda, por la forma y tamaño de las mismas, la ausencia de filamentos y la ausencia de especializaciones de superficie de la membrana celular, con el de los oligodendrocitos en fase incompleta de maduración. Las células de mayor tamaño, formadoras de estructuras rosetoides, tienen un aspecto muy indiferenciado, con algún rasgo ultraestructural que las aproxima a la línea de diferenciación oligodendroglial. La ausencia de verdaderas uniones intercelulares, de microvellosidades intraluminales y de cilios induce a descartar un origen ependimario para estas células (Figs.110-121).

### Aspecto ultraestructural de los tumores nerviosos periféricos:

Los tumores nerviosos periféricos examinados son de localizaciones diversas, intracraneales, intraespinales y de tejidos blandos periféricos. El aspecto general de todos ellos es, no obstante, similar. La proliferación tumoral es moderadamente densa, con células fusiformes o irregulares cubiertas por una membrana celular con abundantes prolongaciones, especialmente en ambos polos. El espacio extracelular es amplio y está ocupado por un material amorfo granular o por abundantes fibras colágenas de tipo nativo según los casos. Los núcleos, generalmente de forma ovoidea y ocasionalmente redondeados, muestran abundantes escotaduras o, incluso, constricciones que dan lugar a lóbulos nucleares. La cromatina está dispuesta en gruesos grumos periféricos y el nucleolo se observa en un 70% de las células. Los citoplasmas son densos con un retículo endoplásmico notablemente desarrollado y dilatado, abundantes ribosomas libres, algunas mitocondrias, gran cantidad de lisosomas y muy frecuentes figuras de mielina. En algunos casos se observan células aisladas con una lámina basal discontinua. Otras células además muestran escasas vesículas de pinocitosis, en estrecha relación con la membrana citoplásmica. Muchas células están provistas de prolongaciones largas y aplanadas con clara tendencia a disponerse de forma apilada en capas superpuestas e interdigitadas con las de

células adyacentes. Entre dichas prolongaciones se pueden identificar uniones intercelulares de tipo "macula adherens" y "zonula occludens", aunque sólo esporádicamente. Algunas células de estos tumores muestran una forma más redondeada con un número escaso de prolongaciones y se encuentran rodeadas completamente por una lámina basal. En varios casos se han identificado restos de fibras nerviosas mielínicas en vías de degeneración entre las células tumorales, especialmente en los tumores nerviosos con estructuras plexiformes. La población celular tumoral en estos últimos no ha presentado diferencias cualitativas ni cuantitativas respecto a la de los tumores carentes de estas formaciones. En conclusión, los tumores nerviosos periféricos examinados están constituidos por una población celular heterogénea en la que se entremezclan células de hábito fibroblástico, células parecidas a fibroblastos con lámina basal discontinua y algunas vesículas de pinocitosis adosadas a la membrana citoplásmica y células con lámina basal continua y algunas vesículas pinocitóticas. Estos elementos celulares de aspecto híbrido o intermedio entre las células de Schwann de los nervios periféricos y los fibroblastos del tejido conectivo, mimetizan morfológicamente las variedades celulares características de los neurofibromas, es decir, células de Schwann, células perineurales y células endoneurales (Figs. 122-140).

Los sarcomas periféricos examinados, inclasificables ópticamente, de localización uterina, cardiaca, tejido subcutáneo axilar y vaginal, han mostrado las siguientes características: el tumor uterino está constituido por una población de células fusiformes, bipolares, con un núcleo alargado, con escotaduras frecuentes, indentaciones y pseudomultilobulaciones y nucleolo prominente. Los citoplasmas están rellenos de vesículas de RER dilatado con un contenido amorfo granular y abundantes polirribosomas. El espacio extracelular es amplio y en él se entrecruzan las múltiples prolongaciones de las células con una cierta tendencia a disponerse de forma apilada. No se observan lámina basal, filamentos intracitoplásmicos ni uniones intercelulares. Ocasionalmente se identifica alguna vesícula de pinocitosis. En un campo se ha observado una fibra nerviosa mielinizada entre las células del tumor. No se han observado, por tanto caracteres específicos de ninguna estirpe tumoral. El sarcoma cardiaco es un tumor densamente celular con escaso espacio extracelular. Las células son redondeadas, el citoplasma es amplio y contiene abundantes polirribosomas, cisternas dilatadas de RER y lisosomas. El núcleo es redondo, con abundante heterocromatina y nucleolo central en la mayoría de las células. Las células emiten abundantes prolongaciones periféricas de longitud y grosor muy variable. No se identifican otros detalles morfológicos de interés diagnóstico y, por tanto, el aspecto ultraestructural de este caso también debe considerarse inespecífico. El tumor

subcutáneo es densamente celular. Las células tumorales son pequeñas, con un núcleo relativamente grande, redondeado y con escotaduras, cromatina dispersa y un nucleolo que está presente en aproximadamente el 40% de las células. Los citoplasmas son ricos en vesículas de RER dilatado, polirribosomas y lisosomas. Se identifica una lámina basal discontinua en algunas células así como microvesículas pinocitóticas. Las células muestran algunas prolongaciones citoplásmicas largas y delgadas que se interdigitan entre sí, observándose uniones densas ocasionales del tipo "macula adherens". No se identifican filamentos intracitoplásmicos, cuerpos de Weibel-Palade, luces intracelulares, ni otros detalles ultraestructurales específicos. En definitiva, en este caso, las células tumorales presentan rasgos morfológicos que recuerdan a los tumores experimentales originados en nervios o raíces nerviosas. El vaginal es un tumor poco celular con un amplio intersticio ocupado por una matriz granular amorfa y fibras colágenas. Las células tumorales son muy polimorfas, entre redondeadas y alargadas, con pequeñas expansiones citoplásmicas largas y delgadas que forman "cintas" apiladas. Los núcleos son de contornos irregulares, con marcadas indentaciones, abundantes grumos heterocromáticos, más abundantes en la periferia, y un nucleolo paracentral en un 50% de las células. Los citoplasmas son moderadamente densos, muy ricos en RER y polirribosomas, algunas mitocondrias y filamentos intermedios. Ocasionalmente se

aprecia un aparato de Golgi. Existe una lámina basal continua muy evidente en la mayoría de células. También son relativamente fáciles de visualizar vesículas de pinocitosis. No se identifican uniones intercelulares ni zonas densas o bandas de anclaje. En este caso el tumor podría pertenecer también a la línea de diferenciación neurofibromatosa.

En resumen, de los cuatro sarcomas indiferenciados ópticamente, dos podrían pertenecer al grupo de tumores malignos de vainas nerviosas periféricas, aunque con un grado inferior de diferenciación que los originados en los nervios y raíces nerviosas, y los dos restantes tienen un aspecto totalmente indiferenciado.

D I S C U S I O N

En este estudio experimental, basado en la exposición pre y post-natal de ratas Wistar a la etilnitrosourea, se ha observado una elevada incidencia de gliomas en el sistema nervioso central y de tumores de las vainas nerviosas periféricas en pares craneales, nervios espinales y nervios periféricos, así como un pequeño número de nefroblastomas.

Como respuesta tumoral global, estos resultados no difieren básicamente de los obtenidos por otros autores, en otras cepas 141,164 o en la misma cepa Wistar <sup>44 b</sup>.

En nuestro estudio, cabe destacar básicamente dos hechos: Por una parte, que la mayoría de tumores originados en el sistema nervioso central presentan un componente oligodendroglial predominante y un componente astrocitario acompañante y, en diversos casos, un tercer componente de aspecto indiferenciado. No ha habido evidencia incontrovertible de células ependimarias como constituyentes de estos tumores. Por otra parte, en este estudio se han observado nuevamente las denominadas "estructuras plexiformes" en un número considerable de tumores nerviosos periféricos de diferentes localizaciones. Ello confirma las descripciones efectuadas anteriormente en este sentido <sup>46</sup> y resalta la posible trascendencia de las mismas puesto que, en la especie humana, dichas estructuras se consideran diagnósticas de la neurofibroma-

tosis o enfermedad de von Recklinghausen <sup>122</sup>.

### TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La mayor parte de tumores gliales del cerebro y de la médula espinal en este experimento, muestra un componente oligodendrogliomatoso incuestionable, ratificado por los estudios inmunohistoquímicos y, especialmente, por los resultados de la microscopía electrónica. En la mayoría de casos, estos oligodendrocitos están íntimamente relacionados con astrocitos, fácilmente reconocibles con las técnicas convencionales de tinción y demostrados con técnicas inmunohistoquímicas como la detección de Proteína S-100 o, más específicas, como la detección de PAFG y, en varios casos, también ultraestructuralmente. No obstante, la morfología de estas células astrocitarias, analizada aisladamente, no permite orientar su naturaleza reactiva o neoplásica. Se trata de células de amplio citoplasma eosinófilo, de contornos mal definidos, núcleo central, grande, con cromatina finamente dispersa, ocasionales figuras de mitosis y escasos rasgos de atipia. Células parecidas, morfológica e inmunohistoquímicamente, se pueden observar en algunos casos en la periferia del tumor, lo que sugeriría un posible origen reactivo. La existencia de gliomas mixtos en el campo experimental y en la especie humana, como entidad bien establecida, está sujeta a discusión <sup>125 b</sup>. Sin

embargo, en los tratados clásicos de Patología Animal como el de la O.M.S. <sup>213</sup>, se admite esta entidad como habitual en tumores inducidos experimentalmente en la rata.

En nuestro estudio hemos podido comprobar en varios casos, por una parte, la presencia de células astrocitarias en el seno de un tumor básicamente oligodendrogliomatoso y una ausencia de gliosis en el tejido nervioso normal circundante; por otra parte, la existencia de infiltración tumoral de las meninges, cerebrales y espinales, e intraventricular por células gliomatosas con un doble componente celular, oligodendrogliar y astrocitario, este último demostrado inmunohistoquímicamente. Esta observación de infiltración tumoral extraparenquimatosa por dos elementos celulares distintos, hace suponer que ambos tipos sean verdaderamente de naturaleza neoplásica y apoya resultados previos obtenidos por otros autores en un número muy escaso de animales estudiados inmunohistoquímicamente <sup>62</sup>. Estos hallazgos admiten varias interpretaciones. Un enfoque sería el considerar a ambos tipos celulares como células distintas aunque originadas a partir de un elemento precursor posiblemente común. La otra interpretación, basada en observaciones de otros autores <sup>186,23,307,378,-347,53,130</sup>, sería que se tratara de oligodendrogliomas, algunas de cuyas células, sometidas a determinados cambios metabólicos, serían capaces de sintetizar PAFG, posiblemente como una forma

precursora de la formación de fibrillas. Ello se ha demostrado que ocurre en cultivos antiguos de oligodendrogliomas, donde, además, las células oligodendrogliales experimentan una modulación fenotípica tan importante que llegan a resultar indistinguibles de los astrocitos <sup>186</sup>. Ninguna de estas dos orientaciones se contradice con la posible histogénesis de estos tumores a partir de las células procedentes de la capa subependimaria, alteradas por el carcinógeno. Si la célula alterada fuera una célula indiferenciada bipotencial, el resultado de la acción carcinogénica podría ser el desarrollo de una neoplasia mixta. En el caso de que la alteración carcinogénica se hubiera producido en una fase más avanzada de diferenciación del precursor o precursores gliales, las células involucradas podrían ser ya oligodendrocitos y astrocitos inmaduros. En el caso de que solamente fueran receptivos al insulto carcinogénico los precursores oligodendrogliales, el desarrollo posterior de tumores gliales mixtos podría explicarse por fenómenos de plasticidad neuroglial o por mecanismos de desrepresión genética de las células oligodendrogliales tumorales. Esta última hipótesis explicaría mejor el enigma de la aparición tardía de los astrocitos en estos tumores oligoastrocitarios.

En los tumores gliales centrales constituídos por un componente oligodendrogliol de base, con áreas focales de células más



grandes, pavimentosas, organizadas en trabéculas o estructuras rosetoides, consideradas por algunos autores como áreas endimarias <sup>164,386</sup>, nuestros resultados del estudio inmunohistoquímico y, especialmente, del ultraestructural, no apoyan esta interpretación. Ultraestructuralmente no se han podido identificar las estructuras diagnósticas de célula endimaria como son los espacios intra o extracelulares rellenos de microvellosidades ni las uniones densas tipo "zonula occludens" <sup>79 b</sup>. Tampoco se ha observado, en ninguno de los casos estudiados ultraestructuralmente, la presencia de cilios, dato este último considerado de menor valor diagnóstico <sup>236</sup>. Una experiencia similar es la aportada por Mandybur <sup>190</sup> que, en un estudio de inducción transplacentaria con E.N.U. a ratas Sprague-Dawley y Lewis, ha observado un 22% de tumores que ópticamente podían clasificarse como endimomas, cuyo estudio ultraestructural descartó esta posibilidad. Este autor considera que, en lugar de endimomas, se trata de tumores neuroepiteliales primitivos con una tendencia a la diferenciación oligodendroglial. Otros autores han resalta- do, por otra parte, la diferencia que existe entre la ultraes- tructura de los endimomas humanos y la de los tumores experimentales <sup>112</sup>, pero consideran que el aspecto de estos últimos sería compatible con un grado de diferenciación menor, reflejo de una biología más maligna que la de los, generalmente bien diferenciados, endimomas humanos.

Otra interpretación más que se ha dado a estas células <sup>172</sup> es que, tomando como base estudios histológicos previos de la placa subependimaria <sup>24,143</sup>, se trata de neoplasias indiferenciadas de células de dicha estructura. Sin embargo, en contra de esta opinión está el hecho de que estos tumores se localizan con relativa frecuencia en áreas remotas de la región subependimaria, como la periferia de los hemisferios cerebrales o la médula espinal. Respecto a la presencia de vesículas, observadas ultraestructuralmente en los extremos distales de las prolongaciones de estas células en algunos de nuestros casos, que son sugestivas, para algunos autores <sup>173</sup>, de conos de crecimiento axonal, nuestro enfoque que coincide con el de Mandybur <sup>190</sup>, es que representan degeneraciones vesiculares, similares a las que se observan frecuentemente en los oligodendrogliomas humanos y experimentales inducidos por ENU. También pueden observarse en los oligodendrogliomas, haces de pequeño número de microtúbulos, recorriendo longitudinalmente las prolongaciones de estas células. Los verdaderos conos de crecimiento se caracterizan por su mayor riqueza en REL así como en microtúbulos y microfilamentos, que han sido cuantitativamente insuficientes en nuestros casos. Asimismo, la observación de gránulos neurosecretorios ocasionales se considera un hallazgo inespecífico <sup>190</sup>.

En conclusión, nuestros resultados en este aspecto apoyan opiniones previas <sup>44,190</sup> sobre la naturaleza de estas células más

grandes, generalmente dispuestas formando focos en el seno de un tumor típicamente oligodendrogliomatoso, en el sentido de que podrían representar una versión más indiferenciada o más anaplásica de la misma línea de diferenciación oligodendroglial.

Respecto a los resultados de la detección de Proteína S-100 en los tumores gliales, merecen destacarse los siguientes hechos: En primer lugar, la repetida negatividad de los oligodendrogliomas y áreas oligodendrogliales de los tumores mixtos de nuestro estudio así como la debilidad de la tinción positiva de los oligodendrocitos de los casos control, contrasta con la positividad de estas células en la especie humana descrita en la literatura <sup>333</sup>. En segundo lugar, las células pseudoepiteliales de los gliomas, consideradas por su aspecto ultraestructural como células primitivas o células oligodendrogliales poco diferenciadas, son también repetidamente negativas para esta determinación. En el primer caso, caben dos interpretaciones posibles: o bien que se trate de una estirpe celular distinta de la oligodendroglial, o acaso una forma poco diferenciada de oligodendroglioma en términos de expresión de proteína S-100, o bien que existan diferencias de especie en la positividad de estas células. No se han hallado publicaciones en la literatura sobre determinaciones de proteína S-100 en oligodendrogliomas inducidos por ENU y, por tanto, habrá que esperar a más estudios sobre el particular para

contrastar nuestros resultados. Respecto a la negatividad de las células seudoepiteliales de los gliomas de nuestro estudio, no hace más que reforzar nuestro enfoque de que dichas células carecen de los atributos morfológicos y funcionales de las verdaderas células endimarias ya que los endimomas y tumores de plexos coroideos suelen dar una tinción positiva con esta técnica, a excepción de casos aislados descritos como negativos 120,333.

Otro aspecto de los tumores gliales que merece resaltarse es la aparente progresión morfológica que experimentan desde su inicio como agregados microscópicos de células ópticamente indistinguibles de los oligodendrocitos, denominadas desde Koestner en 1971<sup>164</sup> con el término de "microtumores" (tumores entre 300 y 500 micras de diámetro), hasta su forma plenamente desarrollada en la que dominan las manifestaciones citológicas y arquitecturales de malignidad tumoral y la heterogeneidad de la población celular. Los cambios morfológicos precoces del desarrollo de los microtumores inducidos por ENU han sido descritos en el ratón<sup>170</sup> y en la rata<sup>174,149,293</sup>. El sistema nervioso del ratón es menos susceptible que el de rata al desarrollo de neoplasias gliales inducidas transplacentaria o postnatalmente por ENU<sup>355,169</sup>, mostrando, por el contrario, una mayor tendencia a producir focos de desmielinización. En el estudio mencionado, los autores

intentaron establecer una relación entre la lesión de la mielina y el estadio más precoz de la evolución de la neoplasia oligodendroglial y describieron la formación de grupos interfasciculares de células anómalas, de probable origen oligodendroglial. Estas células eran de tamaño mayor al normal y mostraban una gran riqueza en prolongaciones citoplásmicas largas e interdigitadas que constituían complicados patrones membranosos. Dichos acúmulos celulares interfasciculares podrían representar un tipo de alteración preneoplásica o reactiva frente a la lesión inducida por la ENU. En la rata BD-IX se observaron, tras inducción con ENU, grupos anómalos de células similares a las de la placa subependimaria en áreas alejadas de la misma, a partir de la 8ª semana postnatal. También se identificaron focos "hiperplásicos" en la misma placa subependimaria que fueron interpretados como los cambios más precoces, detectables morfológicamente, del desarrollo de estos gliomas experimentales <sup>174</sup>. En otro estudio realizado con ratas Fisher utilizando un total de 344 ratas madres <sup>293</sup>, los microtumores aparecieron a partir de los 2 meses y medio hasta los 4 meses y medio. Anteriormente a estas fechas, se observaron proliferaciones incipientes de menos de 300 micras a partir de los 2 meses y hasta los 3 meses y medio. En este mismo estudio, los tumores de más de 500 micras aparecieron a los 3 meses y medio. Los focos de necrosis y la proliferación vascular se observaron a partir de los 5 meses y medio.

Asimismo se han estudiado las fases de la transformación neoplásica de los gliomas inducidos por ENU en cultivo de tejidos de larga duración, desde las 20 - 90 horas tras la administración del carcinógeno y se ha observado que alrededor de los 200 días postinducción, las células en cultivo dan lugar a neoplasias <sup>171b</sup>.

Estas observaciones de las fases iniciales de la proliferación neoplásica de los gliomas inducidos con ENU nos llevan a cuestionar cuál o cuales son las células del sistema nervioso embrionario de la rata que pueden ser susceptibles a la acción carcinogénica de la ENU. Las células "target" deben ser células proliferantes en el momento en que se administra la sustancia puesto que su vulnerabilidad está muy probablemente relacionada con el hecho de encontrarse en actividad mitótica. Ello estaría en concordancia con la hipótesis etiopatogénica de la interferencia del carcinógeno con los fenómenos de síntesis y mecanismos de reparación del ADN. Las neuronas se encuentran en su mayoría en una fase avanzada de diferenciación poco antes del nacimiento <sup>103</sup> <sup>103 c, 298 b</sup>, por lo que estas células serían resistentes a los efectos oncogénicos de los compuestos nitrogenados administrados en época perinatal y ello explicaría la rareza de los tumores derivados de neuroblastos en estos modelos experimentales. Existen resultados contradictorios con respecto al momento en el

que empieza la proliferación de los futuros astrocitos. Según unos autores <sup>267 b, 324 b, 167 b</sup> estas células empiezan su periodo de proliferación ya durante la fase de máxima proliferación neuronal, antes del día embrionario 12. Según otros <sup>103 b, 103 c</sup>, su comienzo estaría situado en una etapa posterior continuando después del nacimiento a lo largo de toda la vida del animal. Respecto a los oligodendrocitos es probable que también empiecen a proliferar antes del nacimiento en algunas regiones pero no existen datos que permitan conocer el momento exacto inicial. Parece, sin embargo, que la mayoría de células gliales no empiezan a proliferar hasta poco después del nacimiento <sup>308 b, 190 b</sup>. Respecto a la placa subependimaria, puede ser identificada en las paredes de los ventrículos laterales, hacia el final del periodo embrionario, como una colección de células indiferenciadas en actividad mitótica entre la capa ventricular y la zona intermedia y también persiste después del nacimiento hasta edades avanzadas de la vida en los roedores <sup>100 b, 143 b</sup>.

En nuestro estudio hemos observado microtumores encefálicos desde los 6 meses tras el nacimiento de los animales hasta los 23 meses, es decir, prácticamente durante todo el tiempo que ha durado el experimento. No se han detectado en fechas anteriores a los 6 meses puesto que nuestro estudio estaba planificado de manera que se iban sacrificando los animales a medida que iban presentando síntomas o signos de enfermedad neoplásica y, por

tanto, estos microtumores solamente se han observado como hallazgos casuales en animales portadores de otro tumor clínicamente dominante. La mayor incidencia de gliomas cerebrales en los animales cuyas madres fueron tratadas en el día 15 de la gestación (Grupo I), comparada con las incidencias similares en los animales cuyas madres fueron tratadas en el día 21 de la gestación (Grupo II) y en los animales tratados postnatalmente (Grupo III), induce a considerar que los precursores gliales cerebrales fueron más susceptibles a la acción del carcinógeno en el día embrionario 15 que en fechas posteriores. El hecho de que los animales del sexo masculino del Grupo I desarrollaran un número significativamente mayor de tumores gliales cerebrales con respecto a los de los otros dos grupos, indicaría quizás la posible influencia del sexo en el desarrollo de las neoplasias inducidas en esta época prenatal. Por el contrario, la mayor incidencia de tumores nerviosos periféricos desarrollados en los animales que fueron tratados transplacentariamente en el día 21 de la gestación (Grupo II) llevaría a la consideración de que es en esta fecha cuando las células destinadas a constituir las vainas de los nervios y raíces nerviosas serían más vulnerables a la alteración carcinogénica.

En la especie humana se sabe que el tejido nervioso embrionario responde con una reacción distinta según el momento de la

gestación en que actúa el agente lesional (mutágeno, teratógeno o carcinógeno químico transplacentario, gen mutante hereditario, agente físico o infeccioso <sup>31</sup>). Así, por ejemplo, en una primera fase, el tejido nervioso responde con una reacción teratogénica, posteriormente la respuesta es en forma de proliferación celular que dará lugar a una neoplasia congénita, un hamartoma o un tumor benigno con tendencia a la regresión. Raramente (menos de 1 caso cada 30.000 nacidos vivos) se produce una neoplasia maligna que suele ser un neuroblastoma, una leucemia o un nefroblastoma. En la última fase, se produce una respuesta inflamatoria, generalmente por infección transplacentaria. Se conoce también que los síndromes teratológicos o defectos congénitos predisponen al desarrollo de ciertas neoplasias y que, además, los tumores pueden originarse directamente a partir de heterotopias, hamartomas, disgenesias gonadales, vestigios del desarrollo, etc. La explicación para estas asociaciones es todavía especulativa pero parece que la rápida división de las células sería un requisito tanto para la teratogénesis como para la oncogénesis puesto que, durante la mitosis, la célula es más vulnerable a los cambios estructurales del ADN, a la alteración de la transcripción al ARN y de la posterior síntesis proteica. También es posible que estas lesiones congénitas contengan un oncogen latente, expresado de forma atenuada como una anomalía en la vida intrauterina, que pueda ser activado o desreprimido por agentes

ambientales en la vida posterior, como la irradiación, traumatismos, infecciones, medicamentos, hormonas u otros agentes químicos<sup>31</sup>. La hipótesis de las dos mutaciones de la carcinogénesis de Knudson<sup>163</sup> encajaría en este esquema. Según este investigador, serían necesarias como mínimo, dos mutaciones secuenciales para transformar una célula normal en neoplásica. Una primera mutación prenatal podría expresarse en forma de malformación congénita, hiperplasia, hamartoma o anomalías cromosómicas.

El hallazgo, en nuestro estudio experimental, de varios casos de microtumores oligodendrogiales, o incluso agrupaciones de todavía menor tamaño, en el encéfalo de ratas adultas, que no habían tenido traducción clínica durante la vida del animal y que han sido observados de forma casual en el estudio sistemático de los cortes de los encéfalos, podrían considerarse como pequeños focos de hiperplasia hamartomatoide inducidos por el carcinógeno. Estos focos serían susceptibles de ser transformados en francas neoplasias en la vida adulta de los animales por acción de agentes desconocidos. Lo mismo podría decirse de los tumores originados en nervios periféricos o raíces cráneo-espinales en los que con relativa frecuencia se han observado cambios proliferativos incipientes en raíces o nervios de la vecindad. La constatación de diferencias sexuales en la incidencia de algunos de los tumores en determinados grupos experimentales, así como el

desarrollo clínico de los mismos en los animales adultos en nuestro estudio, podría apuntar hacia un posible papel de las hormonas sexuales como agentes promotores de estas neoplasias.

### TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO

En los tumores originados en las raíces y nervios craneales, espinales o periféricos, todos ellos con un aspecto morfológico similar, es preciso hacer varias consideraciones. En primer lugar, la célula proliferante de estos tumores, catalogada por varios autores como célula de Schwann<sup>66,164,386</sup> es, en nuestros casos, de difícil categorización. Desde el punto de vista óptico, se trata de una célula pequeña, fusiforme, de límites mal definidos que frecuentemente alterna con otra más redondeada y pequeña de hábito "linfocitoide". En los tumores incipientes, puede comprobarse que la proliferación se inicia en el interior de los fascículos nerviosos radiculares o de los troncos nerviosos, en forma de una mayor densidad de células interpuestas entre las fibras nerviosas mielínicas. Estas células proliferadas, por su localización, pueden corresponder a células de Schwann, a células perineurales o a fibroblastos endoneurales<sup>51,337</sup>.

Con la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de la Proteína S-100, se observa una variación focal de

la positividad. En general, los tumores constituidos predominantemente por células pequeñas y redondas son negativos mientras que los integrados por células más fusiformes suelen mostrar una clara positividad. Estos resultados conducen a dos consideraciones: o bien estos tumores están formados por más de un tipo celular, uno de ellos schwanniano, proteína S-100 positivo, o bien muestran distintos grados de diferenciación, siendo negativos para dicha determinación las áreas o tumores más indiferenciados. Desde el punto de vista ultraestructural, la población celular es fundamentalmente fusiforme con un amplio espacio extracelular. Además de las células fusiformes, se aprecian células pequeñas, redondeadas, entremezcladas, que confieren un aspecto heterogéneo al tumor. Por las características intracelulares y las especializaciones de superficie, descritas detalladamente en el apartado de Resultados, estos tumores parecen estar integrados por elementos celulares que recuerdan a los fibroblastos endoneurales, entremezclados con células con detalles morfológicos ultraestructurales de células de Schwann, así como con células de aspecto indiferenciado. Ocasionalmente pueden observarse células que muestran rasgos similares a las células perineurales. En resumen se trata de tumores con una celularidad heterogénea cuyos componentes recuerdan morfológicamente a los elementos normalmente presentes en los nervios. Este aspecto hamartomatoide, salvando las distancias del carácter más agresivo

de los casos experimentales, es comparable al de los neurofibromas humanos <sup>122</sup>.

Las denominadas "**estructuras plexiformes**" de los tumores de los troncos nerviosos integran un espectro de formaciones que va desde pequeños nervios mielínicos de aspecto morfológico normal, englobados pero respetados por la proliferación tumoral, hasta formaciones vermiformes muy aberrantes, de grosor considerable, intensamente infiltradas por una celularidad de densidad variable según los casos, indistinguible de la del tumor circundante. Las estructuras con aspecto de pequeños troncos nerviosos se comportan frente a la determinación de la proteína S-100 como nervios normales, con una clara positividad en las células de Schwann. Las estructuras más modificadas y con mayor densidad celular muestran una tinción negativa de la mayoría de células proliferantes, comportamiento que es similar al de las células tumorales "linfocitoides" de la neoplasia en la que se encuentran, con una muy débil positividad de fondo probablemente atribuible a los restos de las fibras nerviosas preexistentes. Una interpretación a estas observaciones sería considerar que estos tumores malignos de las vainas nerviosas se originan a partir de la proliferación conjunta de células de Schwann, fibroblastos endoneurales y células perineurales, en proporciones variables en cada caso, que producen un aumento del grosor del

nervio, en una primera fase, para crecer posteriormente, ya sea infiltrando a través del perineuro a los tejidos vecinos, o bien, propagándose por vía nerviosa hacia las ramificaciones distales del nervio afectado. De ahí que en los diversos cortes histológicos se observen imágenes, con frecuencia en el mismo tumor, de troncos nerviosos normales englobados, pero indemnes, junto a otros troncos más deformes e infiltrados por las células tumorales.

Estas "estructuras plexiformes" observadas en varios tumores de los nervios craneales, espinales y periféricos son morfológicamente superponibles a las que caracterizan a los neurofibromas plexiformes humanos, considerados diagnósticos de la enfermedad de von Recklinghausen <sup>122</sup>. En esta enfermedad se pueden desarrollar, amén de los citados neurofibromas plexiformes, una variedad de neoplasias que morfológicamente guardan un estrecho parecido con las observadas en este modelo experimental: gliomas cerebrales, ependimomas, neurinomas, oligodendrogliomas, schwannomas malignos, nefroblastomas, etc. <sup>276,122,151,69</sup>.

No se ha apreciado ninguna diferencia estructural ni citológica entre los tumores de las vainas nerviosas con y sin "estructuras plexiformes". Por ese motivo, y siguiendo con la interpretación anteriormente propuesta, el hecho de observar estas formaciones en un tumor experimental determinado podría depender, acaso, del número de cortes examinados y/o del ángulo de incidencia del

corte. Otra interpretación posible para estas estructuras es que podrían tener un cierto carácter malformativo, hamartomatoso, y que el aspecto citológicamente agresivo tan patente en los tumores experimentales, que contrasta con el francamente benigno de los neurofibromas humanos, no sería más que el reflejo de la potente acción carcinogénica de la sustancia administrada. Por otra parte, es bien conocida también la tendencia a la malignización de los neurofibromas humanos dando lugar a tumores malignos de vainas nerviosas, lo cual se ha estimado entre el 10% <sup>236</sup> y el 29% <sup>30</sup>. No se ha constatado ninguna diferencia en la incidencia de los tumores con "estructuras plexiformes" con respecto al sexo del animal en ninguno de los grupos.

La proximidad morfológica de los tumores observados en este estudio al espectro tumoral de la enfermedad de von Recklinghausen sugeriría la posibilidad de tomar este tipo de estudio como modelo experimental de la enfermedad humana. La neurofibromatosis es una enfermedad humana catalogada dentro del grupo de las facomatosis, del cual es una de las más frecuentes (un caso de cada 3000 nacidos vivos) <sup>267</sup>. Si bien está considerada como una enfermedad hereditaria, más de un 50% de los casos son esporádicos y representan, por tanto, nuevas mutaciones <sup>267</sup>. Se cree que es una de las mutaciones espontáneas más frecuentes de

la humanidad. Su incidencia se ha estimado en  $10^{-4}$  mutaciones por gameto y por generación. A pesar de ser común en la especie humana, no existe una mutación comparable conocida en otros mamíferos, aunque otras especies, perros, vacas y cierta variedad de peces, sufren la enfermedad no hereditaria.

La patogenia de la neurofibromatosis es desconocida pero se tiende a considerarla como una neurocristopatía. La cresta neural es una estructura embrionaria transitoria, las células de la cual emigran a diferentes regiones del organismo para formar neuronas, células de Schwann, células pigmentarias, células endocrinas, etc. Se sabe que la migración y citodiferenciación de las células de la cresta neural es un proceso que, además de ocurrir en su mayor parte durante la vida intrauterina, continúa en la especie humana durante algún tiempo después del nacimiento <sup>28</sup>. Las células de esta estructura embrionaria son particularmente lábiles hasta su destino final y su total diferenciación, por lo que pueden ser susceptibles de sufrir diversas influencias teratogénicas, mutagénicas y/o oncogénicas <sup>28</sup> durante su migración desde la primitiva cresta neural hasta sus localizaciones definitivas. El hecho de que se haya observado una incidencia más elevada en la aparición de "estructuras plexiformes" en los tumores nerviosos periféricos de los animales expuestos a la ENU en la época prenatal, principalmente en los animales tratados transplacentariamente el día 15 de la gestación con respecto a

los observados en el grupo de animales tratados postnatalmente, con un nivel de significación de 0,05, apoya la influencia que factores prenatales puedan tener en la facilitación de la aparición de mutaciones genéticas en la neurofibromatosis. Para confirmar estos datos, no obstante, creemos que serán necesarios nuevos estudios, con una población todavía más amplia que la de este estudio, con el fin de conocer con mayor exactitud todas las posibilidades que ofrece este modelo experimental.

#### CONSIDERACIONES FINALES

Como consideraciones finales puede argumentarse sobre el peligro potencial que puedan tener, para la especie humana, carcinógenos del tipo usado en este experimento, así como la vía transplacentaria, en la etiología del cáncer del sistema nervioso. Existen, en la especie humana, situaciones en las que se ha podido demostrar la asociación entre la exposición a un determinado carcinógeno y la ocurrencia de neoplasias. A este respecto se pueden señalar el desarrollo de carcinomas vaginales en jóvenes de 10 a 20 años cuyas madres recibieron durante el embarazo dietil-estil-bestrol como tratamiento preventivo de un aborto inminente, el desarrollo de carcinomas vesicales en relación con la ingestión de aminas aromáticas, la aparición de mesoteliomas y tumores pulmonares en personas expuestas a las fibras de asbesto,

el desarrollo de angiosarcomas hepáticos en personas en contacto con cloruro de vinilo monomérico, etc... Con respecto a los tumores cerebrales, existen indicios de incidencias sorprendentemente altas entre trabajadores de ciertas industrias o en residentes de comunidades vecinas a éstas, donde la exposición química ocurre de una forma inevitable y frecuente <sup>136</sup>,. Sin embargo, una relación causal convincente entre la exposición química y un tumor cerebral, como existe en los otros casos mencionados, no ha podido ser todavía demostrada.

Recientemente, se han descrito casos de segundas neoplasias en pacientes tratados con BCNU, CCNU y otros agentes del grupo de las nitrosoureas, en combinación con otras drogas, particularmente de linfomas <sup>356 b, 61 b</sup>. Estas observaciones guardan un paralelismo con los estudios experimentales en ratones en los que se han provocado, mediante aplicaciones crónicas de BCNU y CCNU, neoplasias del tejido linfoide <sup>116 b, 253 b, 346 b</sup> y en ratas BD IX en las que se observó la aparición de tumores secundarios, entre ellos cerebrales y nerviosos periféricos, en un 12% de los animales que curaron de una leucemia transplantada mediante dosis únicas de BCNU o hidroxietil-CNU <sup>378 b</sup>. Por tanto, es lógico pensar que los factores considerados como significativos en la acción sistémica de los carcinógenos químicos en el ratón y en la rata (alquilación y reparación del ADN, acción citotóxica y

mutagénica, inducción de provirus, control inmunológico) puedan ser también importantes en el hombre.

Otro hecho común al cáncer humano y al experimental es la existencia de un tiempo de latencia entre la exposición a la sustancia química y el desarrollo del tumor. Este tiempo puede dilatarse a más de la mitad de la expectativa de vida para cada especie. Este factor reduce considerablemente el rendimiento en la producción experimental de tumores, siendo más marcado cuanto más baja es la dosis de carcinógeno administrada, la cual da lugar a falsos negativos debidos al tiempo de vida limitado del animal.

Las nitrosoureas, como las nitrosaminas, son como se ha dicho, carcinógenos de potente acción. El interés de su aplicación en este estudio experimental no es sólo teórico puesto que se sabe que cuando reaccionan aminas secundarias o terciarias o ureas con nitritos en presencia de ácido clorhídrico gástrico se forman nitrosaminas en el primer caso y nitrosoureas en el segundo. Estas substancias, después de reabsorbidas, pueden atravesar la barrera placentaria e inducir tumores en la descendencia de animales experimentales. Los nitritos se usan ampliamente en la industria conservera de carnes y pescados y también se encuentran en la naturaleza como contaminantes de las aguas y de los vegetales comestibles, dado el extendido uso de nitratos como fertilizantes. Los nitratos son convertidos en nitritos por

microorganismos <sup>372</sup>. Las ureas forman parte de la molécula de varios productos farmacéuticos <sup>116,44</sup>, que pueden ser consumidos por mujeres embarazadas, tales como diversos analgésicos, vitaminas, barbitúricos, diuréticos, antieméticos, antibióticos, sulfamidas, expectorantes, antihistamínicos, tranquilizantes, broncodilatadores, hipnóticos, anorexiantes, etc...<sup>194</sup>. En el caso de que estas sustancias lleguen a reaccionar con nitritos en medio ácido, pueden dar lugar a la síntesis de nitrosoureas o nitrosaminas, representando un serio peligro para el feto. Una posibilidad preventiva de este eventual riesgo carcinogénico se desprende del trabajo de Mirvish <sup>218</sup> según el cual el ácido ascórbico (vitamina C), oxidándose a dehidroascórbico, reduce a los nitritos y, así, inhibe la formación de nitrosoureas en el tubo de ensayo. Cardesa y col. <sup>43</sup> ha demostrado también la inhibición de la formación de dimetilnitrosamina "in vivo" con vitamina C en un experimento de toxicidad aguda hepática en ratas.

Como conclusión a extraer de todos estos hechos conocidos en el campo experimental y correlacionables en parte con el humano, y teniendo en cuenta que los experimentos animales, tales como el presente, han demostrado que el tejido nervioso en la época perinatal de desarrollo es considerablemente más vulnerable a la acción carcinogénica de ciertos productos químicos neurotrópicos

que el de los animales adultos, y que, por otra parte, la manifestación clínica de los tumores experimentales inducidos en la época perinatal se produce habitualmente durante la vida adulta de estos animales, la investigación de la etiología de los tumores cerebrales humanos no debería excluir una posible exposición perinatal del hombre a determinados compuestos neurotrópicamente activos.

CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- 1ª) En este experimento basado en 509 ratas Wistar, excluidos controles y madres, se ha confirmado, una vez más, la gran potencia neurocarcinogénica de la etil-nitrosourea (E.N.U.) cuando es administrada prenatalmente o en el período postnatal inmediato.
  
- 2ª) La administración de E.N.U. a ratas Wistar, tanto prenatalmente como en las primeras 24 horas postnatales, ha tenido como resultado la inducción de tumores del sistema nervioso central en 269 animales y del sistema nervioso periférico en 282 animales. También se han inducido nefroblastomas en seis animales. Otros tumores han aparecido en números no significativos.
  
- 3ª) Los tumores del sistema nervioso central han mostrado su mayor incidencia en los animales fallecidos entre las 36 y 39 semanas de vida extrauterina en el grupo tratado en el día 15 de la gestación. Estos mismos tumores han mostrado su mayor incidencia entre las 56 y 59 semanas en los animales cuyas madres fueron inyectadas en el día 21 de la gestación y en los animales que recibieron el tratamiento el día 1 postnatal.
  
- 4ª) Los tumores del sistema nervioso central se han observado con

mayor frecuencia (64%) en el grupo experimental que recibió la E.N.U. transplacentariamente el día 15 de la gestación, mientras que, en el grupo tratado en el día 21 de la gestación, se han observado en el 45% y en el grupo tratado dentro de las primeras 24 horas postnatales, en el 48%. Estas diferencias han resultado estadísticamente significativas con un  $p < 0,001$  al comparar el grupo que recibió el tratamiento transplacentariamente el día 15 de la gestación con el grupo que lo recibió en el día 21, y con una  $p < 0,005$  al comparar el grupo tratado en el día 15 con el grupo tratado postnatalmente en las primeras 24 horas de vida extrauterina.

- 5ª) La localización de los tumores del sistema nervioso central ha sido más frecuente en el encéfalo (41%) que en la médula espinal (10%). La mayor incidencia de tumores encefálicos se ha observado en los animales cuyas madres fueron tratadas el día 15 de la gestación, mientras que la localización medular ha sido más frecuente en los animales tratados postnatalmente. Ambas diferencias han resultado ser estadísticamente significativas ( $p < 0,005$  entre el Grupo I y el Grupo III y  $p < 0,05$  entre el Grupo I y el Grupo II, para los tumores encefálicos y medulares).
- 6ª) Un 24% de los animales con tumores nerviosos, tanto centrales como periféricos, han sido portadores de más de un tumor. La multiplicidad tumoral ha sido más acusada en el grupo de animales cuyas madres fueron tratadas en el día 21

de la gestación ( $p < 0,001$ , al comparar los animales tratados transplacentariamente el día 21 de la gestación con los tratados el día 15 de la gestación y  $p < 0,05$ , al comparar los primeros con los animales tratados postnatalmente).

7ª) Los tumores del sistema nervioso central que se han observado en este estudio son, en su mayoría, gliomas constituidos principalmente por oligodendrocitos y por una cantidad menor de astrocitos. También, en un número limitado de casos, se han observado células indiferenciadas. No se han logrado observar células ependimarias en la composición de estas neoplasias.

8ª) Los tumores del sistema nervioso central de diámetro máximo inferior a 2 mm son en su casi totalidad oligodendrogliomas. Por el contrario, los tumores de tamaño superior a esta cifra son gliomas mixtos compuestos por oligodendrocitos y astrocitos neoplásicos.

9ª) Se ha podido comprobar inmunohistoquímicamente que, en estos tumores, los astrocitos son neoplásicos y no reactivos ya que se han detectado, mediante positividad para la proteína ácida glial fibrilar (PAGF) y proteína S-100, en zonas de invasión tumoral meníngea e intraventricular, territorios exentos, en circunstancias normales, de estas células.

10ª) Las células indiferenciadas observadas en algunos de los

tumores del sistema nervioso central aparecen únicamente en tumores de tamaño superior a 2 mm de diámetro, y se han considerado como oligodendrocitos indiferenciados. Ello viene apoyado por observaciones con microscopía electrónica.

11ª) El estudio con microscopía electrónica demuestra que estas células indiferenciadas no son neuroblastos, astrocitos, células de la microglia ni células ependimarias. Por el contrario, muestran algunos detalles morfológicos más propios de la línea de diferenciación oligodendroglial.

12ª) Los tumores del sistema nervioso periférico han mostrado su mayor incidencia en los animales fallecidos entre las 24 y 31 semanas postnatales.

13ª) Los tumores del sistema nervioso periférico se han observado con mayor frecuencia en los animales cuyas madres fueron tratadas en el día 21 de la gestación (75%). Por el contrario, en los animales tratados transplacentariamente el día 15 de la gestación, la frecuencia resultó ser del 35,5%, y en los tratados en el día 1 postnatal, del 56%. Estas diferencias han resultado todas ellas estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  al comparar los Grupos I y II, II y III y el Grupo I con el Grupo III).

14ª) El mayor número de tumores del sistema nervioso periférico se ha observado en los nervios espinales con 130 casos (25,5%) y en la raíz y/o ramas del nervio trigémino con 127

casos (25%). Otras localizaciones menos frecuentes han sido los tejidos blandos periféricos (5%) y diversas vísceras (2%).

15ª) La microscopía óptica ha mostrado que estos tumores tienen una estructura de aspecto schwannoide, con formaciones tipo Antoni B en la práctica totalidad de los casos. Estructuras tipo Antoni A y cuerpos de Verocay solamente se han observado en un caso.

16) La gran mayoría de los tumores nerviosos periféricos, independientemente de su localización, han mostrado una celularidad constituida por elementos fusiformes, a veces incurvados en forma de "coma", frecuentemente entremezclados con células redondas y pequeñas.

17ª) Desde el punto de vista histológico, los tumores del sistema nervioso periférico manifiestan signos de malignidad en la práctica totalidad de los casos. Estos vienen caracterizados por focos de gran celularidad, elevado índice de mitosis, atipias nucleares e infiltración difusa de estructuras vecinas. No se han observado metástasis en ningún caso. Por ello, los hemos considerado como tumores de bajo grado de malignidad biológica.

18ª) Ultraestructuralmente, estos tumores del sistema nervioso

periférico están constituidos por una población heterogénea y muy entremezclada de elementos que se corresponden con células de Schwann, células de la línea fibroblástica y células de apariencia perineural.

19ª) La proteína S-100, marcador inmunohistoquímico de las células de Schwann, resulta positiva focalmente y sólo en algunos de los elementos celulares tumorales, hecho que apoya el que nos encontremos ante una población celular mixta. Los tumores más desdiferenciados se tiñen siempre negativamente.

20ª) Entre 284 tumores del sistema nervioso periférico, se han observado 61 casos (21%) con estructuras plexiformes, las cuales se consideran como marcadores morfológicos de la neurofibromatosis o enfermedad de von Recklinghausen en la especie humana.

21ª) Las estructuras plexiformes se han observado con una incidencia mayor en el grupo de animales cuyas madres recibieron la E.N.U. en el día 15 de la gestación (30%) que en los animales cuyas madres recibieron el tratamiento en el día 21 de la gestación (21%) y que en el grupo que fué tratado el día 1 postnatal (16%). La diferencia entre las incidencias del primer (madres tratadas en el día 15 de la gestación) y el tercer grupo (animales tratados en el día 1

postnatal) ha resultado estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Ello es indicativo de que factores prenatales desempeñan una función relevante en el desarrollo de estas estructuras plexiformes.

22<sup>a</sup>) Estos tumores nerviosos con estructuras plexiformes se han observado principalmente en las raíces y ramas de los nervios trigéminos, representando el 57% de los tumores periféricos de esta localización.

23<sup>a</sup>) Con microscopio de luz, en estos tumores del sistema nervioso periférico con estructuras plexiformes, se observa la infiltración y distorsión de los troncos nerviosos por las células neoplásicas, lo cual permite considerar, por tanto, a los tumores con estas estructuras, como la contrapartida con bajo grado de malignidad de los neurofibromas plexiformes.

24<sup>a</sup>) Inmunohistoquímicamente, la positividad para la proteína S-100 se observa únicamente en la vaina de Schwann de las fibras de los troncos nerviosos infiltrados. Por el contrario, las células neoplásicas que infiltran son o bien negativas o bien focalmente positivas para la proteína S-100, al igual que la celularidad del tumor circundante.

25<sup>a</sup>) Con microscopía electrónica, las células neoplásicas que

infiltran los troncos nerviosos son de la misma naturaleza que las que componen la masa tumoral principal. Algunas de ellas muestran características de células perineurales.

- 26<sup>a</sup>) En esta serie de experimentos se han observado 6 nefroblastomas, todos ellos en animales tratados con E.N.U. en el periodo prenatal. De ellos, 5 aparecieron cuando la E.N.U. se administró en el día 15 de la gestación y 1 cuando se administró en el día 21.
- 27<sup>a</sup>) Todos los nefroblastomas, a excepción de un caso, se han presentado en animales que eran portadores además de otros tumores nerviosos, centrales y/o periféricos.
- 28<sup>a</sup>) Histológicamente, todos ellos están constituidos por una población de células fusiformes malignas entre las cuales se observan formaciones tubulares y glomeruloides notablemente bien reproducidas. Uno de los casos muestra además extensas áreas rabdomiosarcomatosas.
- 29<sup>a</sup>) Otros tumores no nerviosos y no renales se han observado en números inferiores sin que se hayan podido inferir conclusiones sobre su significado.
- 30<sup>a</sup>) No se ha visto una diferencia estadísticamente significativa en la incidencia general por sexos de los tumores nerviosos.

Tan sólo en los tumores del sistema nervioso periférico se ha observado una mayor incidencia de los mismos en los animales del sexo masculino, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

31ª) La observación conjunta en esta serie de experimentos de gliomas, tumores de las vainas nerviosas periféricas, con 1/5 de ellos mostrando estructuras plexiformes, y de nefroblastomas, nos confirma el que nos encontramos ante un modelo experimental que reproduce toda una serie de lesiones que se dan en la neurofibromatosis humana o enfermedad de von Recklinghausen. La ausencia de manchas "café au lait" se podría justificar por el albinismo de las ratas Wistar.

32ª) El hecho de que la mayoría de los tumores nerviosos periféricos con estructuras plexiformes se hayan observado en los animales expuestos a la E.N.U. en el periodo prenatal, principalmente en los animales tratados transplacentariamente el día 15 de la gestación ( $p < 0,05$ ), apoya la influencia que factores prenatales puedan tener en la producción o facilitación de la aparición de mutaciones genéticas en la neurofibromatosis, enfermedad que en la especie humana se considera de herencia autosómica dominante aproximadamente en el 50% de los casos.

33ª) Nuevos estudios serán necesarios para un mayor conocimiento de las posibilidades que puede llegar a ofrecer este modelo experimental.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Adelman, H.B.: The development of the neural folds and cranial ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.* 39:19-171, 1925.
- 2.- Alexandrov, V.A.: Blastomogenic effects of dimethylnitrosamine on pregnant rats and their offspring. *Nature (Lond.)* 218:280-281, 1968.
- 3.- Althoff, J., Cardesa, A., Pour, P. y Mohr, U.: Carcinogenic effect of N-nitrosohexamethylenimine in Syrian golden hamsters. *J. natl. Cancer Inst.* 50:323-329, 1973.
- 4.- Alvira, M.M., Mandybur, T.I. y Menefee, M.G.: Light microscopy and ultrastructural observations of a metastasizing malignant epithelioid schwannoma. *Cancer* 38:1977, 1976.
- 5.- Anderson, J.R. y Treip, C.S.: Radiation-induced intracranial neoplasms. A report of three possible cases. *Cancer* 53:426-429, 1984.
- 6.- Andervont, H.B., Dunn, T.B. y Canter, H.Y.: Susceptibility of agent free inbred mice and their F<sub>1</sub> hybrids to estrogen-induced mammary tumors. *J. nat. Cancer Inst.* 21:783-811, 1958.

- 7.- Antoni,N.R.E.: Veber ruckenmarkstumoren und neurofibrome.  
J.F.Bergmann, Munchen, 1920.
- 8.- Antoni,N.R.E.: Tumoren des Rückenmarks, seinen wurzeln und Häute. En "Handbuch der Neurologie". Editado por Bumke-Förster. Springer. Berlín. 1936.
- 9.- Bailey,P. y Cushing,H.: A classification of the tumors of the glioma group and a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Editado por Lipincott. Philadelphia. 1926.
- 10.- Bailey,P.: A review of modern conceptions of the structure and classification of tumors derived from the medullary epithelium. J. belge Neur. 38:759, 1938.
- 11.- Bard: Citado por Bullón.
- 12.- Barry,D., Chassead,L.,Hunter,B. y Robinson,W.E.: Tumors of the nervous system in mice treated neonatally with N-ethyl-N-nitrosourea. Nature (Lond) 240:559-561,1972.
- 13.- Beaudoin,A.R.: Embriology and Teratology. En "The laboratory rat" Vol.II, Academic Press,Inc. pp.75-101, 1980.

- 14.- Bender,B.L. y Yunis,E.J.: The pathology of Tuberos Sclerosis. En "Pathology Annual" Part 1, Vol. 17. Editado por S.C. Sommers y P.P. Rosen. A.C.C., 1982.
- 15.- Bergstrand,H.: Uber das sog. Astrocytom im Kleinhirn. Virchows Arch. 287:538, 1920.
- 16.- Berman,L.D.: Comparative morphologic study of the virus induced solid tumors of Syrian hamster. J.natl.Cancer Inst. 39:847-901,1967.
- 17.- Bignami,A., Eng,L.F., Dahl,D. y Uyeda,C.T.: Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. Brain Res. 43:429-435, 1972.
- 18.- Bignami,A. y Dahl,D.: Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. Brain Res. 49:393-402, 1973.
- 19.- Bignami,A. y Dahl,D.: Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of the newborn rat. Nature 252: 55-56, 1974.

- 20.- Bignami, A. y Dahl, D.: The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropath. Appl. Neurobiology* 2:99-110, 1976.
- 21.- Bischoff, A. y Thomas, P.K.: Microscopic anatomy of myelinated nerve fibers. En "Peripheral neuropathy" Vol.I. Editado por P.J. Dyck, P.K.Thomas y E.H.Lambert. W.B.Saunders Co. Philadelphia, p.104, 1975.
- 22.- Bischoff, A.: The peripheral nerves. En "Electron microscopy in human medicine" Vol. 6. Editado por J.V.Johannesen. McGraw-Hill, New York, p.137, 1979.
- 23.- Bissell, M.G., Rubinstein, L.J., Bignami, A. y Herman, M.M. : Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis. *Brain Res.* 82:77-89, 1974.
- 24.- Blakemore, W.F.: The ultrastructure of the subependymal plate in the rat. *J. Anat.* 104:423-433, 1963.

- 25.- Bodian,M. y Lawson,D.: The intracranial neoplastic diseases of childhood. A description of their natural history based on a clinico-pathological study of 129 cases. Brit. J. Surg. 40:368-392,1953.
- 26.- Boesel,C.P., Suhan,J.P. y Bradel, E.J.: Ultrastructure of primitive neuroectodermal neoplasms of the central nervous system. Cancer 42:194-201, 1978.
- 27.- Bolande,R.P.: Relationships between teratogenesis and oncogenesis. Am.J.Pathol. 66:86a, 1972.
- 28.- Bolande,R.P.: The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. Human Path. 5:409-429, 1974.
- 29.- Bolande,R.P.: Developmental pathology. Human Path. 94:1-8, 1979.
- 30.- Bolande,R.P.: Neurofibromatosis, the quintessential neurocristopathy: pathogenic concepts and relationships. Adv.Neurol.29:67-75, 1981.
- 31.- Bolande,R.P.: Models and concepts derived from human teratogenesis and oncogenesis in early life. The J. Histochem. Cytochem. 32:878-884, 1984.

- 32.- Bosch,D.A.: Chemical neuro-oncogenesis. An experimental study on some effects of N-methyl and N-ethyl-N-nitrosourea on the developing nervous system of the rat. Acta Neurochir. 50:43-47,1979.
- 33.- Boots,G.T.,Kroes,R.y Feron,V.J.: Spontaneous tumors of the brain in rats. A report of three cases. Path. Vet. 5:290-296, 1968.
- 34.- Brockes,J.P., Fields,K.L. y Raff,M.C.: Studies on cultured rat schwann cells. I.Establishement of purified populations from cultures of peripheral nerve. Brain Research 165:105-118, 1979.
- 35.- Bulay,O.M. y Wattenberg,L.W.: Carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbon carcinogen administration to mice during pregnancy on the progeny. J.Natl.Cancer Inst. 46:397-402, 1971.
- 36.- Bullock,F.D. y Curtis,M.R.: Spontaneous tumors of the rat. J.Cancer Res. 14:1-115,1930.

- 37.- Bullon Ramirez,A.: Anatomia Patológica de los tumores del sistema nervioso. Editorial Paz Montalvo, Madrid, 1962.
- 38.- Burger,P.C. y Vogel,F.S.: Surgical pathologie of the nervous system and its coverings. 2nd.ed. Editorial J.Willey and sons New York, 1982.
- 39.- Burkel,W.E.: The histological fine structure of perineurium. Anat.Rec. 158:177, 1967.
- 40.- Cajal,S.R.: Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Editorial Nicolas Moya,Madrid. 1899.
- 41.- Cancer incidence in five continents. Vol.IV. Editado por J.Waterhouse, C.Muir, K.Shanmugaratnam and J.Powell.IARC Scientific Publications,n.42.International Agency for Research on Cancer. WHO.Lyon. 1982.
- 42.- Caputo,A. y Giovanella,B.: Produzione sperimentale di tumori cerebrali nel ratto. Arch. Ital.Anat.Istol.Pat. 29:467-497, 1955.

- 43.- Cardesa,A., Mirvish,S.S., Haven,B.T. y Shubik,P.: Inhibitory effect of ascorbic acid on the acute toxicity of dimethylamine plus nitrite in the rat. Proc.Soc.Exp.Biol. Med.145:124-128, 1974.
- 44.- Cardesa,A.: Carcinogenesis perinatal. Su probable significado en patología tumoral infantil. Memoria galardonada con el premio sobre "Carcinogénesis infantil", de la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid. 1977.
- 44.- Cardesa,A., Merchan,J. y Bullón Ramirez,A.: Morphological (b) and biological comparison of tumours prenatally induced in Wistar rats by ethylnitrosourea with their counterpart in man. En "Tumours of early life in man and animals". Editado por L.Severi. Perugia Quadrennial International Conferences on Cancer, Perugia,Italy. 1978.
- 45.- Cardesa,A., Rustia,M. y Mohr,U.: Tumors of the nervous system in hamsters. En "Pathology of tumors in laboratory animals.Vol.III. Editado por V.S.Turusov.IARC scientific publications n.34. International Agency for Research on Cancer. WHO.Lyon, pp.413-436, 1982.

- 46.- Cardesa,A., Llanes,F., Merchan,J., Alvarez,T., Ludeña,M. y Mohr,U.: Plexiform structures in malignant schwannomas after prenatal exposure to ethylnitrosourea. *Exp.Path.*24: 103-115, 1983.
- 47.- Case 40-1983 of Case Records of the Massachusetts General Hospital. *The New Eng. J. Med.*309:843-850, 1983.
- 48.- Carstens,P.H.B. y Schrodt,G.R.: Malignant transformation of a benign encapsulated neurilemmoma. *Am. J. Clin. Path.* 51:144-149,1969.
- 49.- Castaigne,P., Rondot,P., Escourulle,R., Ribadeau-Dumas,J.L. Cathala,F. y Hauw,J.J.: Leucoencéphalopathie multifocale progressive et "gliomes" multiples. *Rev.Neurol.(Paris)*130: 379,1974.
- 50.- Castro,F. de: Algunas observaciones sobre la histogénesis de la neuroglia en el bulbo olfatorio. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 18:83, 1920.
- 51.- Causey,G. y Barton,A.A.: The cellular content of the endoneurium of peripheral nerve. *Brain* 82:594, 1959.

- 52.- Cavanagh,D.B.: On certain small tumours encountered in the temporal lobe. Brain 81:389-405,1958.
- 53.- Cavanagh,J.B.,Blakemore,W.F. y Kyu,M.H.: Fibrillary accumulations in oligodendroglial processes of rats subjected to portocaval anastomosis. J.Neurol.Sci.14:143-152, 1971.
- 54.- Chason,J.L.: Pathology of nervous system and skeletal muscle. En "Pathology". Editado por W.A.D.Anderson. C.V.Mosby,St. Louis. pp.1781-1862,1971.
- 55.- Churg,R.L., Tauser,M.L. y Pfeiffer,J.E.: Collagen and pro collagen production by a clonal line of schwann cells. Proc.Nat.Acad.Sci.70:1943, 1973.
- 56.- Cicero,T.J., Cowan,V.M., Moore,B.W. y Sunutzeff,V.: The cellular localization of the two brain specific proteins S-100 and 14-3-2. Brain Res.18:25-34, 1970.
- 57.- Cividalli,G., Mirvish,S.S. y Berenblum,I.: The catabolism of urethan in young mice of varying age and strain, and X-irradiated mice in relation to urethan carcinogenesis. Cancer Res.25:855-858, 1965.

- 58.- Claisse,P.J., Roscoe,J.P. y Lantos,P.L.: Cellular heterogeneity in an ethylnitrosourea-induced glioma: malignancy, karyology and other properties of tumor cell types. Br.J. Exp.Path. 60: 209-224, 1979.
- 59.- Clifton,M.D., Amromin,G.D., Perry,M.C., Abadir,R., Watts, C. y Levy,N.: Spinal cord glioma following irradiation for Hodgkin's disease. Cancer 45:2051-2055,1980.
- 60.- Cloudman,A.M.: Spontaneous neoplasms in mice. En "Biology of the laboratory mouse". Editado por G.D.Snell.Blakiston,Philadelphia. pp.228-229,1941.
- 61.- Coggeshall.R.E.: A study of diencephalic development in the albino rat. J.Comp.Neurol.122:241-269, 1964.
- 61.- Cohen,R.J., Wiernik,P.H. y Walker,M.D.: Acute non-lymphocytic (b) leukemia associated with nitrosourea chemotherapy: Report of two cases. Cancer Treat. Rep.60: 1257-1261, 1976.
- 62.- Conley,F.K.: The immunocytochemical localization of GFA protein in experimental murine CNS tumors. Acta Neuropathol (Berl)45:9-16, 1979.

- 63.- Copeland,D.D., Nogel,F.S. y Bigner,D.D.: The induction of intracranial neoplasms by the inoculation of avian sarcoma virus in perinatal and adult rats. *J.Neuropath.Exp.Neurol.* 34:340-358,1975.
- 64.- Cottier,H. y Luginbühl,H.:Oligodendrogliom des Grosshirns bei einer weissen Maus. *Acta Neuropath.(Berl)* 1: 198-200,1961.
- 65.- Cramer,W. y Stowell,R.: Skin carcinogenesis by a single application of 20-methyl-cholantrene. *Cancer Res.*3:36-42, 1943.
- 66.- Cravioto,H., Weiss,J.F., Weiss,E.de C., Goebel,H.H. y Ransohoff,J.: Biological characteristics of peripheral nerve tumors induced with ethylnitrosourea. *Acta Neuropath.(Berl)*23: 265-280, 1973.
- 67.- Crowe,F.W., Schull,J. y Neel,J.V.: A clinical, pathological and genetic study of multiple neurofibromatosis. Editado por Ch.C. Thomas. Springfield, Illinois. 1956.
- 68.- Cushing,H. y Eisenhardt,L.: Meningiomas: their classification, regional behaviour, life history and surgical end result. Editorial Thomas, Baltimore. 1938.

- 69.- D'Agostino,A.N., Soule,E.H. y Miller,R.H.: Primary malignant neoplasms of nerves (malignant neurilemmomas) in patients without manifestations of multiple fibromatosis (von Recklinghausen disease). *Cancer* 16:1003-1014,1963.
- 70.- D'Agostino,A.N., Soule,E.H. y Miller,R.H.: Sarcomas of the peripheral nerves and somatic soft tissues associated with multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease). *Cancer* 16:1015-1027, 1963.
- 71.- Dahl,D. y Bignami,A.: Glial fibrillary acidic protein from normal human brain.Purification and properties. *Brain Res.* 57:343-360, 1973.
- 72.- Dahl,D. y Bignami,A.: Glial fibrillary acidic protein from normal and gliosed human brain. Demonstration of multiple related polypeptides. *Biochem. Biophys. Acta* 386:41-51,1975.
- 72.- Das,G.D.: Gliogenesis during embryonic development in the (b) rat. *Experientia* 33: 1648-1649, 1977.
- 73.- De Estable,R.F., Rabson,A.S. y Kirschstein,R.L.: Viral growth and viral oncogenesis in brains of newborn hamsters inoculated with polyoma virus. *J.natl.Cancer Inst.*34: 673-677, 1965.

- 74.- Deck, J.H.H., Eng, L.F. y Bigbee, J.: A preliminary study of glioma morphology using the peroxidase-antiperoxidase immunohistological method for glial fibrillary acidic protein. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 35:362, 1976.
- 75.- Della Porta, G.: Induction of intestinal mammary and ovarian tumors in hamsters with oral administration of 20-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 21:575-579, 1961.
- 76.- Della Porta, G., Capitano, J., Montipo, W. y Parmi, L.: Studio sull'azione cancerogena dell'uretano nel topo. *Tumori* 49:413-427, 1963.
- 77.- Dencker, L.: Tissue localization of some teratogens at early and late gestation related to fetal effects. *Acta Pharmacol.Toxicol.* 39(1):1-131, 1976.
- 78.- Dimant, I.N.: Experimental tumors of the central nervous system. Tashkent, 1966.

- 79.- Dittman,L., Axelsen,N.H., Norgaard-Pedersen,B. y Bock,E.:  
Antigens in human glioblastomas and meningiomas. Search  
for tumour and oncofoetal antigens. Estimation of S-100  
and GFA protein. Br.J.Cancer 35:135-141, 1977.
- 79 .- Dolman,C.L.: Ultrastructure of brain tumors and biopsies. A  
(b)  
diagnostic Atlas. Praeger special studies,New York.pp.31-41,  
1984.
- 80.- Dosky,I.I., Lijinsky,W., Spencer,K. y Shubik,P.: Rate of  
metabolism of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in newborn  
and adult mice. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 113:110-112,1963.
- 81.- Druckrey,H., Ivankovic,S., Menzel,H.D. y Preusmann,R.: Selektive Erzeugung von Carcinomen der Nasenhöhle bei Ratten durch N,N'-Di-Nitrosopiperazin, Nitrosopiperidin, Nitrosomorpholin, Methyl-allyl-, Dimethyl- und Methyl-vinyl-nitrosamin. Z.Krebsforsch.66:138-150,1964.
- 82.- Druckrey,H., Ivankovic,S. y Preusmann,R.: Selective induction of malignant tumors in the brain and spinal cord of rats with MNU. Z.Krebsforsch.66:389-408, 1965.

- 83.- Druckrey,H., Ivankovic,S. y Preussmann,R.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosoarea to pregnant rat. Nature (Lond.) 210:1378-1379, 1966.
- 84.- Druckrey,H., Preussmann,R., Ivankovic,S. y Schmäh1,D.: Organotropic carcinogenic effects of 65 different N-nitroso compounds in BD rats. Z.Krebsforsch 69:103-201,1967.
- 85.- Druckrey,H., Ivankovic,S., Preussmann,R., Landschuetz,C., Stekar,J., Brunner,U. y Schagen,B.: Transplacentar induction of neurogenic malignomas by 1,2-diethyl-hydrazine, azo-, and azoxy-ethane in rats. Experientia (Basel)24:561-562, 1968.
- 86.- Druckrey,H., Landschuetz,C. e Ivankovic,S.: Transplacentare erzeugung maligner tumoren des nervensystems. II.Aethyl nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstaemen. Z.Krebsforsch. 73:371-386, 1970.
- 87.- Druckrey,H., Druse,H., Preussmann,R., Ivankovic,S., Landschuetz,C. y Gimmy,J.: Cancerogene alkylierende substanzen. IV. 1,3-propansulton und 1,4-butansulton. Z.Krebsforsch.75: 69-84, 1970.

- 88.- Duffell,D., Hinz,R. y Nelson,E.: Neoplasms in hamsters induced by simian virus 40: Light and electron microscopic observation. Am.J.Path.45:59-73, 1964.
- 89.- Duffy,P.E.: Virus induced cerebral sarcoma. J.Neuropath.Exp. Neurol. 29: 370-391,1970.
- 90.- Duffy,P.E., Graf,L. y Rappaport,M.M.: Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors. J.Neuropathol. Exp. Neurol. 36:645-652, 1977.
- 90.- Eddy,B.E.: Tumors produced in hamsters by SV-40. Fed.Proc. 21:930-935, 1962.
- 91.- Eng,L.F. y DeArmond,S.J.: Immunochemistry of the glial fibrillary acidic protein.En "Progress in Neuropathology" Vol.5. Editado por H.M. Zimmerman. Raven Press,New York. pp.19-39, 1983.
- 92.- Eng,L.F., Vanderhaegen,J., Bignami,A. y Gerstl,B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res. 28:351-354, 1971.

- 93.- Eng,L.F., Kosek,J.C., Forno,L., Deck,J. y Bigbee,J.: Immu-  
nohistochemistry of brain protein in fixed, paraffin em-  
bedded tissue. Transactions of the Amer.Soc.of Neuroch.7:  
211, 1976.
- 94.- Enzinger,F.M. y Weiss,S.W.: Soft tissue tumors.The C.V.Mosby  
(b)  
Co.pp.580-675,1983.
- 95.- Erlandson,R.A.: Peripheral nerve sheat tumors: An electron  
microscopic study of 43 cases. Cancer 49:273-287, 1982.
- 95.- Erlandson, R.A.: Diagnostic transmission electron microscopy  
(b)  
of human tumors. The interpretation of submicroscopic struc-  
tures in human neoplastic cells. Editado por S.S.Sternberg,  
Masson Pub. USA,Inc.,1981.
- 96.- Everett,J.W.: Morphological and physiological studies of  
the placenta in the albino rat. J.Exp.Zool.70:243-285,  
1935.

- 97.- Ferrer,I.,Fabregues,I.y Palacios,G.: An autoradiographic study of methyl-azoxy-methanol-acetate-induced cortical malformation. Acta Neuropathol.57: 313-315, 1982.
- 98 .- Fialkow,P.J., Sagebiel,R.W=, Gartler,S.M. y Rimoin,D.I.: Multiple cell origin of hereditary neurofibromas. N.E.J.M. 284:298-300, 1971.
- 99 .- Fiore-Donati,L., De Benedictis,G., Chieco-Bianchi,L. y Maiorano,G.: Leukaemogenic activity of urethan in Swiss and AKR mice. Acta Unio Intern. Contra Cancrum 18:134-139, 1962.
- 100.- Flaks,A.: Test for carcinogenesis of cigarette tobacco smoke condensate using young strong A and C 57 BL mice. Brit.J.Cancer 20:145-147, 1966.
- 100.- Fleischhauer,K.: Ependyma and subependymal layer. En "The (b) structure and function of nervous tissue".Vol.6. Editado por C.H.Bourne. Academic Press, New York ,London. pp.1-46,1972.

- 101.- Fokes,E.C. y Earle,K.M.: Ependymomas: Clinical and pathological aspects. J.Neurosurg. 30: 585-594, 1969.
- 102.- Fortner,J.G.: Etiologic implications for spontaneous carcinogenesis in the Syrian hamster. En "Proceedings of the 7th. International Cancer Congress.pp.254-255, 1958.
- 103.- Fraser,H.: Astrocytomas in an inbred mouse strain. J.Path. 103: 266-270,1971.
- 103.- Fujita,S.: The matrix cell and histogenesis of the nervous (b) system. Laval Med. 36: 125-130, 1965.
- 103.- Fujita,S.: Application of light and electron microscopic autoradiography to the study of cytogenesis of the forebrain. (c) En "Evolution of the forebrain.Phylogenesis and ontogenesis of the forebrain". Editado por R.Hasler y H.Stephan. Thieme, Stuttgart.pp.180-196,1966.

- 104.- Garcia,H., Baroni,C. y Rappaport,H.: Transplantable tumors of the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J.Nat. Cancer Inst.*27:1323-1329, 1961.
- 105.- Garfinkel,L. y Sarokhan,B.: Trends in brain cancer tumor mortality in the United States. En "Brain tumors in the chemical industry". *Annals of the New York Academy of Sciences*.Vol.381. Editado por I.J. Selikoff y E.C. Hammond. New York. 1982.
- 106.- Garner,F.M., Innes,J.R.M. y Nelson, D.H.: Murine neuropathology. En "Pathology of laboratory rats and mice", Editado por E.Cotchin y F.J.C. Roe. Blackwell Scientific Publications.Oxford.pp.295-347, 1967.
- 107.- Gaynor,R., Irie,R., Morton,D. y Herschman,H.R.: S-100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 286:400-401, 1980.
- 108.- Gichner,T. y Veleminsky,J.: The mutagenic activity of I-alkyl-I-nitrosoguanidines. *Mutation Research* 4:207-212,1967.

- 109.- Gilbert,C. y Gillman,J.: Spontaneous neoplasms in the albino rat. S. Afr. J. Med. Sci. 23:257-272,1958.
- 110.- Gilden,D.H., Wroblewska,Z., Eng,L.F. y Rorke,L.B.: Human brain in tissue culture. Part 5. Identification of glial cells by immunofluorescence. J.Neurol.Sci.29:177-184, 1976.
- 111.- Girardi,A.J., Sweet,B.H., Slotnick,V.B. y Hilleman,M.R.: Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vacuolating virus SV-40. Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.)109:649-660,1962.
- 112.- Goebel,H.H. y Cravioto,H.: Ultrastructure of human and experimental ependymomas. J.Neuropathol.Exp.Neurol.31:54-71, 1972.
- 113.- Goth,R. y Rajewsky,M.: Persistence of  $O^6$ -ethylguanine in rat brain DNA: Correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)71:639-643, 1974.
- 114.- Graham,D.I., Thomas,D.G.T. y Brown,I.: Nervous system antigens. Histopathology 7: 1-21, 1983.

- 115.- Greenberg,J.H.: Cranial neural crest cells: Inhibition of differentiation in culture. *Advances in Neurology*.Vol.29: Neurofibromatosis (von Recklinghausen disease). Editado por V.M. Riccardi y J.J. Mulvihill. Raven Press, New York, 1981.
- 116.- Greenblatt,M., Kommineni,V., Conrad,E., Wallcave,L. y Lijinsky,W.: In vivo conversion of phenmetrazine into its N-nitroso derivative. *Nature New Biology* 236:25-26, 1972.
- 116.- Griswold,D.P.,Prejean,J.D., Casey,A.E.,Weisburger,J.H.,Weisburger,E.K., Wood,H.B.Jr.y Falk,H.L.: Carcinogenicity studies of clinically used anticancer agents. *Proc.Am.Assoc. Cancer Res.* 12: 65-71,1971.
- 117.- Gross,L.: *Oncogenic viruses*. Pergamon Press,Oxford. 1970
- 118.- Guerin,M.: *Tumeurs spontanées des animaux de laboratoire (souris, rat, poule)*. Legrand, Paris.1954.
- 119.- Güthert,von H. y Warzok,R.: On the carcinogenic action of methyl- and ethyl-nitrosourea in rats after transplacental and postnatal application. *Zbl.allg.Path.Bd.*118:115-123 , 1974.

- 120.- Haglid,K., Hamberger,A., Hansson,H.A. y Stavrou,D.: An immunohistochemical study of human brain tumors concerning the brain specific proteins S-100 and 14-3-2. Acta Neuropathol.(Berl.)24:187-196,1978.
- 121.- Hajdu,S.I.: Pathology of soft tissue tumors. Editorial Lea and Febiger, Philadelphia. 1979.
- 122.- Harkin,J.C. y Reed,R.J.: Tumours of the peripheral nervous system. Armed Forces Institute of Pathology (AFIP).Washington, D.C., 1969.
- 123.- Harrison,R.G.: Embryonic transplantation and development of the nervous system. Anat.Rec.2:385, 1908.
- 124.- Harrison,R.G.: Neuroblasts versus sheath cell in the development of the peripheral nerves. J.Comp.Neurol.37:123, 1924.
- 125.- Harrison,R.G.: The Croonian Lecture. On the origin and development of the nervous system studied by the methods of experimental embryology. Proc.Roy.Soc.Biol.118:155, 1935.
- 125.- Hart,M.N., Petito,C.K. y Earle,K.M.: Mixed gliomas. Cancer (b) 33:134-140, 1974.

- 126.- Harvey,J.J. y East,J.: The murine sarcoma virus (MSV).Int. Rev.Exp.Path.10:265-360,1971.
- 127.- Herbst,A.L., Ulfelder,H. y Poskanzer,D.C.: Adenocarcinome of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. N.Engl.J.Med.284:877-881, 1971.
- 128.- Herrold,K.M.: Induction of olfactory neuroepithelial tumors in Syrian hamsters by diethylnitrosamine. Cancer 17:114-121, 1964.
- 129.- Herrold,K.M.: Histogenesis of malignant liver tumors induced by dimethylnitrosamine. An experimental study in Syrian hamsters. J.natl.Cancer Inst. 39:1099-1111,1967.
- 130.- Hirano,A. y Zimmerman,H.M.: Glial filaments in the myelin sheat after vinblastine implantation. J.Neuropathol.Exp. Neurol.30:63-67,1971.

- 131.- Hoch-Ligeti,C. y Russell,D.S.: Primary tumors of the brain and meninges in rats fed 2-acetylaminofluorene. *Acata Unio Int.Cancr.* 7:126-130, 1950.
- 132.- Hosobuchi,Y.y Ishii,S.: A new approach to hydrocarbon-induced brain tumors. *Arch.Neurol.(Chic)* 16:664-675, 1967.
- 133.- Hosoi,K.: Multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease) with special reference to malignant transformation. *Arch.Surg.*22:258, 1931.
- 134.- Hyden,H. y McEden,B.: A glial protein specific for the nervous system. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 55:354-358, 1966.
- 135.- Hyden,H. y Lange,P.W.: S-100 brain protein: correlation with behaviour. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 67:1959-1966,1970.
- 136.- Infante,P.F. y Newton,W.A.,Jr.: Prenatal chlordane exposure and neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.*293:308, 1975.
- 136.- Innes,J.R.M. y Borner,G.: Tumors of the central nervous system of rats: With report of two tumors of the spinal cord and comments on posterior paralysis. *J.natl.Cancer Inst.*26: 719-735,1961.

- 137.- Ishida,Y.,Kawai,S., Sato,K. y Niibe,H.:Experimental induction of gliogenous tumors in rats. A histopathologic and electron microscope study. Gunna J.Med.Sci.12: 36-73, 1963.
- 138.- Isobe,T. y Okuyama,T.: The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP 1-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. Eur.J.Biochem 89:379-388, 1978.
- 139.- Ivankovic,S.,Druckrey,H. y Preussmann,R.: Erzeugung von Tumoren im peripheren und zentralen Nervensystem durch Trimethylnitrosoharnstoff an Ratten. Z.Krebsforsch. 66:541-548,1965.
- 140.- Ivankovic,S., Druckrey,H. y Preussmann,R.: Erzeugung neurogener Tumoren bei den Nachkommen nach einmaliger Injektion von Aethylnitrosoharnstoff an schwangere Ratten. Naturwissenschaften 53: 416, 1966.
- 141.- Ivankovic,S. y Druckrey,H.: Transplacentare erzeugung maligner Tumoren des nervensystems. I.Aethyl-nitroso-harnstoff (AHN) au BD IX-Ratten. Z. Krebsforsch. 71:320-360,1968.

- 142.- Ivankovic,S.: Praenatale carcinogenese. En "Handbuch der all  
gemeinen Pathologie. Sechster Band. Geschwülste. Tumors III.  
Siebenter Teie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1975.
- 143.- Jacobson,M.: Developmental neurobiology. En: "Developmental  
biology series". Editado por J.D.Ebert. New York. pp. 1-74,  
1970.
- 143.- Jacobson,M.: Developmental neurobiology. 2nd ed. Plenum  
(b)  
Press, New York, London, 1978.
- 144.- Jacque,C.M., Vinner,C., Kujas,M., Raoul,M., Racadot,J. y  
Baumann,N.A.: Determination of glial fibrillary acidic pro-  
tein (GFAP) in human brain tumors. J.Neurol. Sci. 35:147-  
155, 1978.
- 145.- Jacque,C.M., Kujas,M., Poreau,A., Raoul,M., Collier,P., Ra-  
cadot,J. y Baumann,N.J.: GFA and S-100 protein levels as an  
index for malignancy in human gliomas and neurinomas. J.Natl.  
Cancer Inst. 62:479-483, 1979.
- 146.- Jänisch,W.: Die Induktion von experimentelle Hirngeschwüls-  
ten mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen. Z.Krebsforsch.68:  
224-233, 1966.

- 146.- Jänisch,W.y Schreiber,D.: Experimentelle Hirngeschwülste (b)  
bei Kaninchen nach Injektion von Methylnitrosoharnstoff.
- 147.- Jänisch,W. y Schreiber,D.: Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystem. Jena, 1969.
- 148.- Jänisch,W. y Schreiber,D.: Experimental tumors of the central nervous system. Editado por D.D. Bigner y J.A. Swenberg Upjohn Company, Kalamazoo. 1977.
- 149.- Jänisch,W. y Rath,W.: Early stages of brain tumors development in experimental chemical carcinogenesis. En "Progress in Neuropathology, vol.4. Editado por H.M. Zimmerman. Raven Press,New York. 1979.
- 150.- Jessen,K.R. y Mirsky,R.: Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. Nature (Lon) 286:736-737, 1980.
- 151.- Jones,P.G. y Campbell,P.E.: Tumours of infancy and childhood. Editorial Blackwell Sci.,Oxford.U.K. p.829. 1976.

- 152.- Jones,E.L., Searle,C.E. y Thomas Smith,W.: Medulloblastomas and other neural tumours in mice treated neonatally with N-ethyl-N-nitrosourea. Acta Neuropath.(Berl.) 36:57-70, 1976.
- 153.- Jones,T.R., Bigner,S.H., Clifford Schold,S.,Eng,L.F. y Bigner,D.D.: Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expresion. Am.J.Pathol. 105:316-327,1981.
- 154.- Kawai,S., Ishida,Y., Nagashima,I., Sato,K. y Niibe,H.: Experimental studies on brain tumours. Acta path.jap.14: 311-344, 1964.
- 155.- Kaye,A.M.: A study of the relationship between the rate of ethylcarbamate (urethan) catabolism and urethan carcinogenesis. Cancer Res. 20:237-241, 1960.
- 156.- Kernis, M.M.: Abnormal yolk sac function induced by chlorambucil. Experientia 27: 1329-1331, 1971.

- 157.- Kernohan, J.W., Mabon, R.F., Svien, H.J. y Adson, A.V.: Symposium on new and simplified concept of gliomas. Proc. Staff. Meet. Mayo Cl. 24:71, 1949.
- 158.- Kernohan, J.W. y Sayre, G.P.: Tumors of the central nervous system. The Armed Forces Inst. Path., Washington. 1952.
- 158.- Kida, Y., Cravioto, H., Hochwald, G.M., Hochgeschwender, V. y Ransohoff, J.: Immunity to transplantable nitrosourea-induced neurogenic tumors. II. Immunoprophylaxis of tumors of the brain. J. of Neuropath. and Exp. Neurol. 42:122-135, 1983.
- 160.- Kirkman, H.: A preliminary report concerning tumors observed in Syrian hamsters. Stanford med. Bull. 20:163-166, 1962.
- 161.- Kleihues, P.: DNA damage and repair in experimental neuro-oncogenesis. En "Recent advances in Neuropathology" n.1. Editado por W.J. Smith y J.B. Cavanagh. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 161-178. 1979.

- 162.- Klein,M.: The transplacental effect of urethan on lung tumorigenesis in mice. *J.Natl.Cancer Inst.*19:1003-1017,1952.
- 163.- Knudson,A.G.: Mutation and cancer: a statistical study. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 60:820, 1971.
- 164.- Koestner,A., Swenberg,J.A. y Wechsler,W.: Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Amer.J.Path.*63:37-56, 1971.
- 165.- Kohler,G. y Milstein,C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.
- 166.- Kommineni,V.C.R., Greenblatt,M., Vesselinovitch,S.D. y Mihailovich,N.: Urethan carcinogenesis in rats:Importance of age and dose. *J.Natl.Cancer Inst.* 45:687-696, 1970.
- 167.- Kores,R., Weiss,J. y Weisburger,J.: Immune suppression and chemical carcinogenesis. *Recent Results Cancer Res.* 52: 65-75,1975.
- 167.- Korr,H.: Combination of methalic impregnation and autoradiography of brain sections. A method for differentiation of proliferating glial cells in the brain of adult rats and mice. *Histochemistry* 59: 111-116,1978.

- 168.- Korr,H.: Proliferation of different cell types in the brain.  
En "Advances in Anatomy, Embriology and cell biology"n.61.  
Editado por A.Brodal, J.van Limborgh, R.Ortmann y G.Tön-  
dury. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York,1980.
- 169.- Kroh,H.: Multiple demyelinating foci induced with ethyl-  
nitrosourea in mouse. En "Brain tumors and chemical in-  
juries to the central nervous system". Editado por M.J.  
Mossakowski. Proc.Int.Neuropath.Symp.Polish Medical Pub.,  
Warsaw. pp.30-36, 1978.
- 170.- Kroh,H. y Cervós-Navarro,J.: Transformation of oligoden-  
droglia: A para- or preneoplastic effect of ethylnitroso  
urea on mouse brain. Acta Neuropathol.(Berl.)59:309-315,  
1983.
- 171.- Kumanishi,T.: Brain tumors induced with Rous sarcoma virus,  
Schmidt-Ruppín strain.I.Induction of brain tumors in adult  
mice with Rous chicken sarcoma cells. Jap.J.exp.Med.37:  
461-474,1967.
- 171.- Laerum,O.D. y Rajewsky,M.F.: Neoplastic transformation of  
(b)  
fetal rat brain cells in culture after exposure to ethyl-  
nitrosourea in vivo. J.Natl. Cancer Inst.55: 1177-1184,  
1975.

- 172.- Lantos,P.L.: The fine structure of periventricular pleomorphic gliomas induced transplacentally by N-ethyl-N-nitrosourea in BD IX rats. *J.Neurol.Sci.* 17:443-460, 1972.
- 173.- Lantos,P.L. y Pilkington,G.J.: Neuroblasts in cerebral tumors induced by ethylnitrosourea in rats. *Virchows Arch.B (Cell Pathol.)* 25:243-259, 1977.
- 174.- Lantos,P.L. y Pilkington,G.J.: The development of experimental brain tumors. A sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. I.Early lesions (abnormal cell clusters). *Acta Neuropath.(Berl.)* 45:167-175,1979.
- 175.- Larsen,C.D.: Pulmonary-tumor induction by transplacental exposure to urethane. *J.Natl.Cancer Ins.*8:63-69,1947.
- 176.- Lawley,P.D.: DNA as a target of alkylating carcinogens. *Brit Medical Bull.* 36:19-24, 1980.
- 177.- Levenbook,I.S., Chigirinsky,A.E., Tsetlin,E.M., Dodonova, N.N. y Altstein,A.D.: Morphology of tumors induced in hamsters by simian adenoviruses. *Int.J.Cancer* 3:712-719, 1968.
- 178.- Levenbook,I.S. y Strizhachenko,N.M.: Morphology of tumors induced in hamster soft tissues by bovine adenovirus type 3. *Int.J.Cancer* 8:531-540, 1971.

- 179.- Liebelt,R.A., Yoshida,R. y Gray,G.F.: Enhancement of liver tumorigenesis in Zb mice injected with urethan at newborn age. Proc.Am.Assoc.Cancer Res.3:245-253,1961.
- 180.- Lijinsky,W.,Keefer,L.,Conrad,E. y otros: Nitrosation of tertiary amines and some biologic implications. J.Natl. Cancer Ins. 49:1239-1249, 1972.
- 181.- Lindau,A.: Discussion on vascular tumors of the brain and spinal cord. Proc.R.Soc.Med.24:363, 1931.
- 182.- Loveless,A.: Possible relevance of O<sup>6</sup>-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. Nature 223:206-207, 1969.
- 183.- Luft,J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J.Biophys.Biochem.Cytol.9:409,1961.
- 184.- Luginbühl,H.: Comparative aspects of tumors of the nervous system. Ann.N.Y.Acad.Sci.108:702-721,1963.
- 185.- Luginbühl,H., Frankhauser,R. y McGrath,J.T.: Spontaneous neoplasms of the nervous system in animals. Progr.Neurol. Surg.2: 85-184, 1968.

- 186.- Lumsden,C.E.: The study by tissue culture of tumours of the nervous system. En "Pathology of tumors of the nervous system" Third ed. Editado por D.S.Russell y L.J. Rubinstein. Arnold,London. pp.334-420, 1971.
- 187.- Magee,P.N. y Barnes,J.M.: Carcinogenic nitroso compounds. Avd.Cancer Res.10:163-246, 1967.
- 188.- Mallory,F.B.: The principles of pathologic histology. W.B. Saunders,Philadelphia, 1914.
- 189.- Mancini,L.O., Jates,V.J., Jasty,V. y Anderson,J.: Ependymomas induced in hamsters inoculated with an avian adenovirus (CELO). Nature (Lond.) 222:190-191, 1969.
- 190.- Mandybur,T.I. y Alvira,M.M.: Ultrastructural findings in so called ependymal rat tumors induced by transplacental administration of ethylnitrosourea (ENU). Acta Neuropath.(Berl.) 57:51-58, 1982.
- 190.- Mares,V. y Brückner,G.: Postnatal formation of non-neuronal (b) cells in the rat occipital cerebrum: an autoradiographic study of the time and space pattern of cell division. J.Comp. Neurol. 177:519-528, 1978.

- 191.- Margison,G.P. y Kleihues,P.: Chemical carcinogens in the ner  
vous system. Preferential accumulation of  $O^6$ -methylguanine  
in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive admi-  
nistration of N-methyl-N-nitrosoourea. Biochem.J. 148:521,1975.
- 192.- Marsh,R.F., Burger,D., Eckroade,R., ZuRhein,G.M. y Hanson,  
R.F.: A preliminary report on the experimental host range of  
the transmissible encephalopathy agent. J.Infect.Dis.120:  
713-719,1969.
- 193.- Martinez,A., Merchan,J., Sala,M.L., Renedo,G., Fernandez-  
Pascual,J. y Bullón,A.: Carcinogenesis y nitrosamidas (I).  
Patología 7: 225-230, 1974.
- 194.- Marx,J.L.: Drugs during pregnancy: Do they affect the unborn  
child ?. Science 180: 174-175, 1973.
- 195.- Masson,P.: Experimental and spontaneous schwannomas (peri-  
pheral gliomas). Part I. The Am.J.Path.8: 367-388, 1932.
- 196.- Masson,P.: Experimental and spontaneous schwannomas (peri-  
pheral gliomas). Part II. The Am.J.Path. 8:389-417,1932.
- 197.- Masson,P.: Tumeurs humaines: Histologie, diagnostics et  
techniques. Deuxième ed. Librairie Maloine,Paris. 1956.

- 198.- Matsuyama, M. y Suzuki, H.: Induction of neurosarcoma by injections of N-nitrosobutylurea in suckling Syrian hamsters. *Experientia* 27: 1459-1460, 1971.
- 199.- Matus, A. y Mughal, S.: Immunohistochemical localization of S-100 protein in brain. *Nature* 258:746-748, 1975.
- 200.- Maunoury, R., Delpech, A., Delpech, B., Vidard, M.N., Vedrenne, C., Constans, J.P. y Hillereau, J.: Localisation de la protéin gliofibrillaire (GFAP) par immunocytochimie dans les tumeurs cérébrales humaines. *Neurochirurgie* 23: 173-185, 1977.
- 211.- Menzel, H.D. : Selektive Erzeugung von Carcinomen und Estheseuroepitheliomen in der Nasenhöhle von Ratten durch N-Nitrosopiperidin und N-N'-dinitrosopiperazin bei subcutaner Injektion. Dissertation Freiburg, 1966. Citado por Menzel (213).
- 212.- Menzel, H.D. y Zülch, K.J.: Zur Morphologie transplacentar erzeugter neurogener Tumoren beim Goldhamster. *Acta Neurop. (Berl.)* 21:194-203, 1972.

- 213.- Mennel,H.D. y Zülch,K.J.: Tumours of the central and peripheral nervous systems. En "Pathology of tumours in laboratory animals" Vol.I.-Tumours of the rat. W.H.O. pp.295-311,1973.
- 213.- Merkow,L., Slifkin,M., Pardo,M. y Rapoza,N.P.: Studies on (b) the pathogenesis of simian adenovirus-induced tumors. III.- The histopathology and ultrastructure of intracranial neoplasms induced by SV20. J.nat. Cancer Ins. 41:1051-1070,
- 214.- Metcalf,D.: Adrenal cortical function in high and low leukemia strains of mice. Cancer Res.20: 1347-1353, 1960.
- 215.- Michael,R.O. y Sarma,D.S.: Measurement of in vivo damage and repair of rat liver DNA induced by chemical carcinogens. Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 14: 5,1973.
- 216.- Miller,R.W.: Transplacental chemical carcinogenesis in man. J.natl.Cancer Ins. 47: 1169-1171, 1971.
- 217.- Mirvish,S., Cividalli,G. y Berenblum,I.: Slow elimination of urethan in relation to its high carcinogenicity in newborn mice. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.116: 265-268, 1964.
- 218.- Mirvish,S.S., Wallcave,L., Eagen,M. y Shubik,P.: Ascorbate Nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. Science 177: 65-68,1972

- 219.- Mirvish,S., Cardesa,A., Wallcave,L. y Shubik,P.: Effect of sodium ascorbate on lung adenoma induction by amines plus nitrite. Am. Cancer Res.Proc. 14:405, 1973.
- 220.- Mirvish,S.S., Cardesa,A., Wallcave,L. y Shubik,P.: Kinetics of N-nitroso compound formation and effect of ascorbate on mouse lung adenoma induction by amines plus nitrite and by nitrosamines. Resúmenes del XI International Cancer Congress, Florence, Italy. 1974.
- 221.- Mirvish,S.S., Cardesa,A., Wallcave,L. y Shubik,P.: Induction of mouse lung adenomas by amines or ureas plus nitrite and by nitroso compounds: Effect of ascorbate, gallic acid, thiocyanate and caffeine. J.natl.Cancer Inst.55: 633-636, 1975.
- 222.- Mohr,U. y Althoff,J.: Moegliche diaplacentar-carcinogene wirkung von Diaethylnitrosamin beim Goldhamster. Naturwissensschaffen 16:515, 1964.
- 223.- Mohr,U. y Althoff,J.: Diaplacentare wirkung des Cancerogens Diaethylnitrosamin bei der Maus. Z.Krebsforsch 67: 152-155, 1965.

- 224.- Mohr,U., Authaler,A. y Althoff,J.: Der Nachweis von Diaethylnitrosamin in Goldhamsterembryonen nach Behandlung des Muttertieres. Naturwissenschaften 52: 188-189, 1965.
- 225.- Montesano, R. y Saffioti,U.: Carcinogenic response of the respiratory tract of Syrian golden hamsters to different doses of diethylnitrosamine. Cancer Res. 28:2197-2210, 1968.
- 226.- Moore,B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem.Biophys. Res. Commun.19:739-744, 1965.
- 227.- Moore,B.W.: Chemistry and biology of two proteins, S-100 and 14-3-2, specific to the nervous system. En "International Review of Neurobiology". Editado por C.C.Pfeiffer y J.R. Smythies. Academic Press, New York and London. pp.215-225. 1972.
- 228.- Moriya,M., Mitsumori,K., Kato,K., Miyazawa,T. y Shirasu,Y.: Carcinogenicity of N-nitroso-ethylenethiourea in female mice. Cancer Letters 7: 339-342, 1979.
- 229.- Mukai,M. y Kobayashi,S.: Primary brain and spinal cord tumors induced by adenovirus type 12 in hamsters. J.Neuropath. exp. Neurol. 32:523-531,1973.

- 230.- Mukai,M., Kobayashi,S. y Oguri,M.: Ultrastructural studies of human adenovirus-produced retinoblastoma-like neoplasms in Sprague-Dawley rats. *Invest.Ophthalmol.*13: 593-602, 1974.
- 231.- Murray,M.R. y Stout,A.P.: Schwann cells versus fibroblasts as the origin of the specific nerve sheath tumor. Observations on normal nerve sheath and neurilemmoma in vitro. *Am.J. Path.*16:41, 1940.
- 232.- Nageotte,J.: L'organisation de la matiere dans ses rapports avec la vie. Etudes d'anatomie generale et de morphologie experimentale sur le tissu conjonctive et le nerf. F.Alean Paris. 1922.
- 233.- Nakajima,T., Watanabe,S., Sato,Y., Kameya,T., Hirota,T. y Shimosato,Y.: An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am.J.Surg. Pathol.* 6:715-727, 1982.
- 234.- Nakane,P.K. y Pierce,G.B.,Jr.: Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J.Histochem.Cytochem.* 14:929-931, 1967.

- 235.- Navas Palacios,J.J.: Ultraestructura de los tumores de las vainas nerviosas periféricas. *Patología* 11: 33, 1978.
- 236.- Navas Palacios,J.J.: Ultraestructura de los tumores de partes blandas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1981.
- 237.- Ngowyang,G.: Une tumeur dans la corne d'Ammon chez la souris blanche. *Rev.Neurol.* 2: 584-585, 1930.
- 238.- Nicholson,W.J.: Management of assessed risk for carcinogens. *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol.363. Editado por W.J. Nicholson. New York. 1981.
- 239.- Noden,D.M.: Interactions directing the migration and cytodifferentiation of avian neural crest cells. En "Specificity of embryological interactions". Editado por D.R.Garrod. Chapman and Hall, London. pp.5-49, 1978.
- 240.- Noer,H.R. y Mossman,H.W.: Surgical investigation of the function of the inverted yolk sac placenta in the rat. *Anat. Rec.* 98: 31-37, 1947.

- 241.- Norton,W.T. y Goldman,J.E.: Neurofilaments. En " Proteins of the nervous system".2nd. ed. Editado por R.A.Bradshaw and D. M.Schneider. Raven Press,New York. pp.301-329, 1980.
- 242.- O'Gara,R.W. y Kelly,M.G.: Comparative susceptibility of new born,weanling, and adult mice to tumor induction by 3-methylcholantrene (3MC) and dibenzanthracene (DBA). Proc.Am.Assoc. Cancer Res.4:49, 1963.
- 243.- Ogawa,K., Hamayo,K.,Jujii,Y., Matsuura,K. y Endo,T.: Tumor induction by adenovirus type 12 and its target cell in the central nervous system. Gann 60:383-392, 1969.
- 244.- Oyasu,R., Battifora,H.A., Clasen,R.A., McDonald,J.H. y Hass,G.M.: Induction of cerebral gliomas in rats with dietary lead subacetate and 2-acetylaminofluorene. Cancer Res. 30: 1248-1255, 1970.
- 245.- Paterson,J.A.: Postnatal development of oligodendrocytes. XI International Congress of Anatomy: Glial and neuronal cell biology.pp.83-92. Alan R. Liss,Inc., 150Fifth Av., New York, 1981.

- 246.- Penfield,W.: The classification of gliomas and neuroglia cell types. Arch.of Neurol.26:745, 1931.
- 247.- Penfield,W.: Tumors of the sheaths of the nervous system. Arch. Neurol. Psychiat. 27: 1298, 1932.
- 248.- Pfaffenroth,M.J. y Das,G.D.: N-ethyl-N-nitrosourea-induced spinal tumors in an inbred strain of W Albino rats. J.natl. Cancer Inst. 63: 647-650, 1979.
- 249.- Pietra,G., Rappaport,H. y Shubik,P.: The effects of carcinogenic chemicals in newborn mice. Cancer 14: 308-317, 1961.
- 250.- Pilkington,G.J. y Lantos,P.L.: The development of experimental brain tumors. A sequential light and electron microscope study of the subependymal plate. II.Microtumors. Acta Neuropathol. 45: 177-185, 1979.
- 251.- Pineda,A.: Collagen formation by principal cells of acoustic tumors. Neurology 15: 536, 1965.
- 252.- Portlock,C.S. y Goffinet,D.R.: Manual of clinical problems in oncology. Little, Brown and Company, Boston.pp.247-248, 1980.

- 253.- Pour,P., Althoff,J. y Cardesa,A.: Granular cells in tumors and in nontumorous tissue. Arch.Path. 95:135-138, 1973.
- 253.- Prejean,J.D., Griswold,D.P., Casey,A.E., Peckham,J.C., (b) Weisburger,J.H., Weisburger,E.K. y Wood,H.B.: Carcinogenicity studies of clinically used anticancer agents. Proc.Am. Assoc.Cancer Res. 13:112, 1972.
- 254.- Preussmann ,R.,Druckrey,H.,Ivankovic,S. y Hodenberg,A.: Chemical structure and carcinogenicity of aliphatic hidrazoazo- and azoxycompounds and of triazenes, potencial in vivo alkylating agents. Ann.N.Y.Acad.Sci. 163:697-714, 1969.
- 255.- Quick,D. y Cutler,M.: Neurogenic sarcoma: Clinical and pathologic study. Ann.Surg. 86:810, 1927.
- 256.- Rabotti,G.F. y Raine,W.A.: Brain tumors induced in hamsters inoculated intracerebrally at birth with Rous sarcoma virus Nature (Lond.)204: 898-899, 1964.
- 257.- Rabotti,G.F., Raine,W.A. y Sellers,R.L.: Brain tumors (gliomas) induced in hamsters by Bryan's strain of Rous sarcoma virus. Science 147: 504-506, 1965.

- 258.- Rabson, A.S. y Kirschstein,R.L.: Intracranial sarcomas produced by polyoma virus in Syrian hamsters. Arch. Path. 69: 633-671, 1960.
- 259.- Rabson,A.S., Kirschtein,R.L. y Paul,F.J.: Tumors produced by adenovirus 12 in mastomys and mice. J.natl. Cancer Ins. 32: 77-87, 1964.
- 260.- Raimondi,A.J. y Beckman,F.: Perineural fibroblastomas:Their fine structure and biology. Acta Neuropath. 8: 1, 1967.
- 261.- Ramon y Cajal,S.: Histologie du système nerveux de l'homme et les vertébrés. Vol.I y II. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 1952.
- 262.- Ranvier,M.L.: Leçons sur l'histologie du système nerveux. Librairie F. Savy, Paris. p.179, 1878.
- 263.- Rapp,F., Pauluzzi,S., Waltz,T.A., Burdine,J.A., Matsen,F.A. y Levy,B.: Induction of brain tumors in newborn hamsters by simian adenovirus SA7. Cancer Res.29: 1173-1178, 1969.
- 264.- Reynolds,E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J.Cell Biol. 17:208, 1963.

- 265.- Ribacchi,R. y Giraldo,C.: Intracranial tumors in rats injected intracerebrally with murine sarcoma virus (MSV), Moloney's strain. Preliminary report. Lab. Ist.Anat.Univ.Perugia 26:141-148, 1966.
- 266.- Ribbert,H.: Uber das spongioblastom und das Gliom. Virchows Arch.255: 195,1918.
- 267.- Riccardi,V.M.: Von Recklinghausen neurofibromatosis. New England J.Med. 305: 1617-1626, 1981.
- 267.- Rickmann,M. y Wolff,J.R.: On the earliest stages of glial (b) differentiation in the neocortex of rat. Exp.Brain Res.(sup) 1:239-243, 1976.
- 268.- Rigdon,R.H.: Neurogenic tumors produced by methylcholantrene in the white pekin duck.
- 268.- Rio-Hortega,P. del: La glia de escasas radiaciones (oligodendroglia). Bol.de la R.Soc.Esp. de Hist.Nat. 21:65-85,1921.
- 268.- Rio-Hortega,P. del: Histogénesis y evolución normal; éxodo (c) y distribución regional de la microglía. Mem.Real Soc.Esp. Hist.Nat. 11:213-268, 1921.

- 269.- Rio-Hortega, P. del: Estructura y sistematización de los gliomas y paragliomas. Arch.Esp.Onc. 2:411, 1932.
- 270.- Rio-Hortega,P. del: Anatomía microscópica de los tumores del sistema nervioso central y periférico. Trab.Lab.Histopat.6: 149, 1934.
- 271.- Rio-Hortega,P. del: Contribución al conocimiento citológico de los oligodendrogliomas. Arch.Histol., Buenos Aires 2:266, 1944.
- 272.- Rio-Hortega, P. del: Nomenclatura y clasificación de los tu mores del sistema nervioso. López y Etchegoyen. Buenos Aires 1945.
- 273.- Robb-Smith,A.H.T. y Pennybacker,J.: Von Recklinghausen's neurofibromatosis. En "British Encyclopedia of Medical Practice" 2nd.ed. Butterworths,London,Vol.10. p.549, 1952.
- 274.- Roberts,J.D.: Cellular responses to carcinogen-induced DNA damage and the role of DNA repair. British Medical Bulletin 36:25-31, 1980.

- 275.- Robl,M.G., Gordon,D.E., Lee,K.P. y Olson,C.: Intracranial fibroblastic neoplasms in the hamster from bovine papilloma virus. *Cancer Res.*32: 2221-2225, 1972.
- 276.- Rodriguez,H.A. y Berthrong,M.: Multiple primary intracranial tumors in von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Arch. Neurol.* 14:467-475, 1966.
- 277.- Romanul,F.C.A., Roizman,B. y Luttrell,C.N.: Studies of polyoma virus. Pathology and distribution of tumors produced in Syrian golden hamsters following intracranial or subcutaneous inoculation. *Bull. Johns Hopk.Hosp.* 108:1-15,1961.
- 278.- Roussy,G. y Oberling,Ch.: *Etude anatomique des tumeurs des centres nerveux.* *Bull. Acad. de Med. Paris*, 106, 1931.
- 279.- Rubinstein,L.J., Klatzo,I. y Miquel,J.: Histochemical observations on oxidative enzyme activity of glial cells in a local brain injury. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 21:116-136, 1962.
- 280.- Rubinstein,L.J.: *Tumors of the central nervous system.* Armed Forces Institute of Pathology,Washington,1972.

- 281.- Rubinstein,L.J.: Tumors of the central nervous system. Supp. Fasc.6, second series. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1982.
- 282.- Russell,D.S. y Rubinstein,L.J.: Pathology of tumors of the nervous system. Third ed. Edward Arnold, London, 1971.
- 283.- Russell,D.S. y Rubinstein,L.: Pathology of tumors of the nervous system. Edward Arnold,London, Fourth ed., 1977.
- 284.- Rustia,M. y Shubik,P.: Transplacental carcinogenesis in hamsters. Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 14:81,1973.
- 285.- Rustia,M. y Shubik,P.: Prenatal induction of neurogenic tumors in hamsters by precursors ethylurea and sodium nitrite. J.natl.Cancer Inst. 52:605-608,1974.
- 286.- Sanders,J.: Untersuchungen ueber die Entstehung cancerogener Nitrosoverbindungen im Magen von Versuchstieren und ihre Bedeutung fuer den Menschen. Arzneim. Forsch. 21:1572-1580, 1707-1713, 2034-2039, 1971.
- 287.- Santamaría,J.: Malformacions cerebrals i radiació. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.1984.

- 288.- Santoli,D., Wroblewska,Z., Gilden,D. y Kropowski,H.: Establishment of continuous multiple sclerosis brain cultures after transformation with PML-SV40 virus. *J.Neurol.Sci.*24: 385,1975.
- 289.- Saxen,E.A. y Stewart,H.L.: Histogenetic classification of induced gastric sarcomas in mice. *J.natl.Cancer Inst.*13: 657-679, 1952.
- 290.- Saxton,J.A., Sperling,G.A.,Jr., Barnes,L.L. y McCay,C.M.: The influence of nutrition upon the incidence of spontaneous tumors of the albino rat. *Acta Un.int.Cancr.* 6:423-431, 1948.
- 291.- Scherer,H.J.: *Vergleichende Pathologie des Nervensystems der Säugetiere.* Leipzig,Thieme, 1944.
- 292.- Schiffer,D. y Giordana,M.T.: Chemotherapeutic effects of some alkylating derivatives of nitrosourea on the development of tumors transplacentally induced in rats by ENU. *Acta Neuropath.(Berl.)*34:21-31, 1976.
- 293.- Schiffer,D., Giordana,M.T., Pezzotta,S., Lechner,C. y Paolotti,P.: Cerebral tumors induced by transplacental ENU: Stu-

- dy of the different tumoral stages, particularly of early proliferations. Acta Neuropath.(Berl.) 41:27-31,1978.
- 294.- Schisano,G. y Olivecrona,H.: Neurinomas of the gasserian ganglion and trigeminal root. J.Neurosurg.17: 306-322, 1960.
- 295.- Schmähl,D., Mündt,D. y Schmidt,K.G.: Experimental investigations on the influence upon the chemical carcinogenesis.1st. communication: Studies with ethylnitrosourea. Z.Krebsforsch 82: 91-100, 1974.
- 296.- Schmale,M.C., Hensley,G. y Udey,L.R.: Multiples schwannomas in the bicolor damselfish, Pomacentrus partitus (Pisces,Pomacentridae). Am. J. Path.112: 238-241, 1983.
- 297.- Schneck,S.A. y Penn,I.: De novo brain tumors in renal transplant recipients. Lancet 1:983, 1971.
- 298.- Schultz,R.L.: Biochemical studies on the metabolism and transport of the rat placenta at early stages of pregnancy; influence of drugs. En "Metabolic pathways in mammalian embryos during organogenesis and its modification by drugs. Freie Universität, Berlin.pp.609-629, 1970.

- 298.- Schultze,B., Nowak,B. y Maurer,W.: Cycle times of the neural (b) epithelial cells of various types of neuron in the rat. An autoradiographic study. *J.Comp.Neurol.*158: 207-218, 1974.
- 299.- Seiler,J.P.: Nitrosation in vitro and in vivo by sodium nitrite and mutagenicity of nitrogenous pesticides. *Mutat.Res.* 48:225-236, 1977.
- 300.- Selikoff,I.J.: Brain tumors in the chemical industry. *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol.381. I.J.Selikoff y E.Cuyler Hammond, editores. New York, 1982.
- 301.- Sergejev,A.S.: On the mutation rate of neurofibromatosis. *Hum.Genet.*28:129-138,1975.
- 302.- Shantaveerappa,T.R. y Bourne,G.H.: A perineural epithelium. *J.Cell Biol.*14:343, 1962.
- 303.- Shein,H.M.: Neoplastic transformation of hamster astrocytes in vitro by simian virus 40 and polyoma virus. *Science* 159: 1476-1477, 1968.
- 304.- Shein,H.M.: Neoplastic transformation of hamster astrocytes and choroid plexus cells in culture by polyoma virus. *J.Neuropath.exp.Neurol.*29:70-88,1970.

- 305.- Shein,H.M.: Neoplastic transformation of hamster astrocytes and choroid plexus cells in culture by polyoma virus. J.Neuropath. exp. Neurol.29:70-88, 1970.
- 306.- Sidman,R.L. y O'Gorman,S.V.: Cellular interactions in schwann cell development. Adv.Neurol.29:213-235, 1981.
- 307.- Silbert,S.W. y Goldstein,M.N.: Drug induced differentiation of a rat glioma in vitro. Cancer Res.32:1422-1427, 1972.
- 308.- Sima,A.A.F., Finkelstein,S.D. y McLachlan,D.R.: Multiple malignant astrocytomas in a patient with spontaneous progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann.Neurol.14: 183-188, 1983.
- 308.- Skoff,R.P., Price,D.L. y Stocks,A.: Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. I. Cell proliferation. II. Times of origin. J.Comp.Neurol.169: 291-334, 1976.
- 309.- Sloof,J.L., Kernohan,J.W. y McCarty,C.S.: Primary intramedullary tumors of the spinal cord and filum terminale. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1964.

- 310.- Slye, M., Holmes, H.F. y Wells, H.G.: Intracranial neoplasms in lower animals. Studies on the incidence and inherability of spontaneous tumors in mice. *Amer.J.Cancer* 15: 1387-1400, 1931.
- 311.- Smith, W.E. y Rous, P.: The neoplastic potencialitys of mouse embryo tissues. II. Contributory experiments; Results with skin of C3H and Webster-Swiss embryos; General considerations. *J.Exptl.Med.* 81: 621-646, 1945.
- 312.- Smith, W.E. y Rous, P.: The neoplastic potentialities of mouse embryo tissues. *J.Exp. Med.* 88: 529-554, 1948.
- 313.- Snell, K.C., Stewart, H.L., Morris, H.P., Wagner, B.P. y Ray, F.E.: Intracranial neurilemmoma and medulloblastoma induced in rats by the dietary administration of N,N'-2,7-fluorenylenebisacetamide. Carcinogenicity of N,N'-2,7-Fluorenylenebisacetamide. *Natl.Cancer Inst. Monogr.* 5: 85-103, 1961.
- 314.- Soggs, R.L., Donaldson, S.S. y York, C.H.: Malignant astrocytoma following radiotherapy for a craniopharyngioma. *J.Neurosurg.* 48: 622-627, 1978.

- 315.- Solitare,G.B. y Krgman,M.R.: Congenital intracranial neoplasms. A case report and review of the literature. J.Neuropath.Exp.Neurol. 23: 280-292, 1964.
- 316.- Spatz,M. y Laqueur,G.L.: Transplacental induction of tumors in Sprague-Dawley rats with crude cycad material. J.natl. Cancer Inst.38: 233-245, 1967.
- 316.- Squire,R.A. y cols.: Nervous system and eye tumors. En "(b) Pathology of laboratory animals".Vol II. Editado por K.Benirschke, F.M.Garner y T.C.Jones. Editorial Springer-Verlag,New York. pp.1242, 1978.
- 317.- Stavrou,D., Zänker,K. y Anzil,A.P.: Morphological, immunocytochemical and biological characteristics of experimental rabbit brain tumors in tissue culture. Journal of the Neurological Sciences 42:365-379, 1979.
- 318.- Stenback,F.: Glandular tumors of the nasal cavity induced by diethylnitrosamine in Syrian golden hamsters. J.natl. Cancer Ins.50: 895-901, 1973.
- 319.- Sternberger,L.A.: Immunocytochemistry. Wiley, New York,1979.
- 320.- Stewart,F.W. y Copeland,M.M.: Neurogenic sarcoma. Am.J.Cancer 15:1235, 1931.

- 321.- Stewart,H.L., Kaplan,H.S. y Bennett,J.G.: Report of two cases of identical primary tumors involving spinal nerve roots and meninges in strain NHO mice. J.natl.Cancer Inst.11: 177-197,1950.
- 322.- Stout,A.P.: The peripheral manifestations of the specific nerve sheath tumor (neurilemmoma). Am. J. Cancer 24: 751, 1935.
- 323.- Ströer,W.E.H.: Studies on the diencephalon.I.The embryology of the diencephalon of the rat. J.Comp.Neurol.105:1-24,1956.
- 324.- Stroobandt,G. y Brucher,J.M.: Etude de tumeurs nerveuses obtenues par l'administration de méthylnitrosourée au rat. Neuro-chirurgie 14: 515-535, 1968.
- 324.- Sturrock,R.R.: Histogenesis of the anterior limb of the anterior commissure of the mouse brain. I.A quantitative study of changes in the glial population with age. J.Anat. 117:17-53,1974.
- 325.- Suntzeff,V., Carruthers,C. y Cowdry,E.U.: The role of sebaceous glands and hair follicles in epidermal carcinogenesis.

- Cancer Res.7:439-443,1947.
- 326.- Swann,P.F. y Magee,P.N.: Induction of rat kidney tumors by ethylmethanesulphonate and nervous tissue tumors by methylmethanesulphonate and ethylmethanesulphonate. Nature 223: 947-949, 1969.
- 327.- Swann,P.F. y McLean,A.E.: Cellular injury and carcinogenesis  
The effect of a protein-free high-carbohydrate diet on the metabolism of dimethylnitrosamine in the rat. Biochem.J. 124: 283-288,1971.
- 328.- Sweet,W.H. y Bailey,P.: Experimental production of intracranial tumors in the white rat. Arch.Neurol. Psychiat.(Chic) 45:1047-1048, 1941.
- 329.- Swenberg,J.A., Koestner,A., Wechsler,W. y Denlinger,R.H.:  
Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats. Cancer Res.32:2656-2660,1972.
- 330.- Swenberg,J.A., Koestner,A., Wechsler,W., Brunden,M.N. y Abe,H.: Differential oncogenic effects of methylnitrosourea. J.natl.Cancer Inst.54:89-96, 1975.
- 331.- Swenberg,J.A., Clendenon,N., Denlinger,R. y Gordon,W.A.:

- Sequential development of ethylnitrosourea-induced neurinomas: Morphology, biochemistry, and transplantability. *J.nat. Cancer Inst.*55:147-152, 1975.
- 332.- Swenberg, J.A.: Current approaches to the experimental investigation of chemicals in relation to cancer of the brain. En "Brain tumors in the chemical industry" *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol.381. Editado por I.V.Selikoff y E.Cuyler Hammond, New York. 1982.
- 333.- Tabuchi, K., Moriya, Y., Furuta, T., Ohnishi, R. y Nishimoto, A.: S-100 protein in human glial tumours. Qualitative and quantitative studies. *Acta Neurochirurgica* 65:239-251, 1982.
- 334.- Takayama, S., Kuwabara, N., Nemoto, N. y Azana, Y.: Carcinogenesis in newborn and suckling rats induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. En "Topics in chemical carcinogenesis". University Park Press, 1972.
- 335.- Taylor, C.R. y Burns, J.: The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed paraffin embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J.Clin.Pathol.*27:14-20, 1974.

- 336.- Terracini,B. y Magee,P.N.: Renal tumors in rats following injection of dimethylnitrosamine at birth. Nature 202: 502-503, 1964.
- 337.- Thomas,P.K.: The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. J.Anat.97:35, 1963.
- 338.- Thomas,L.B.: Pathology of leukemia in the brain and meninges post-mortem studies of patients with acute leukemia and of mice given inoculations of L1210 leukemia. Cancer Res.25: 1555-1571, 1965.
- 339.- Thomas,P.K. y Olsson,Y.: Microscopic anatomy and function of the connective tissue components of peripheral nerve. En "Peripheral neuropathy".Vol.I. Editado por P.J.Dyck, P.K. Thomas y E.H. Lambert. W.B.Saunders Co.,Philadelphia.p.168 1975.
- 340.- Thomson. Citado por Bullón.
- 341.- Thompson,S.W. y Hunt,R.O.: Spontaneous tumors in the Sprague-Dawley rat. J.natl. Cancer Inst.27:1037-1057, 1963.

- 342.- Tomatis,L., Turusov,V. y Guibbert,D.: Prenatal exposure to chemical carcinogens. En "Topics in chemical carcinogenesis" University Park Press, 1972.
- 343.- Toth,B., Rappaport,H. y Shubik,P.: The influence of dose and age on the induction of malignant lymphomas and other tumors by 7,12-dimethylbenzanthracene in Swiss mice. J.natl.Cancer Inst.30:723-741, 1963.
- 344.- Toth,B., Magee,P.N. y Shubik,P.: Carcinogenesis study with dimethylnitrosamine administered orally to adult and subcutaneously to newborn BALB/C mice. Cancer Res.24: 1712-1721, 1964.
- 345.- Tsuneyoshi,M. y Enjoji,M.: Primary malignant peripheral nerve tumors(malignant schwannomas). A clinicopathologic and electron microscopic study. Acta Path.Jap.29: 363, 1979.
- 346.- Tuchmann-Duplessis,H.: Drug effects on the fetus. A survey of the mechanisms and effects of drugs on embryogenesis and fetogenesis. Editado por G.S.Avery. Adis Press,Hong-Kong, 1977.

- 347.- Van der Meulen, J.D.M., Houthoff, H.J. y Ebels, E.J.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4: 177-190, 1978.
- 348.- Vandeputte, M.: Lésions cérébrales chez le rat induites par le virus polyoma. *Rev. belge. Path.* 28: 178-183, 1961.
- 349.- Vandeputte, M. y Brucher, M.: Sarcomatose meningée expérimentale provoquée chez le raton par le virus polyome. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1: 397-405, 1962.
- 350.- Vazquez-López, E.: Glioma in a rat fed with 2-acetylaminofluorene. *Nature, Lond.* 156: 296-300, 1945.
- 351.- Verocay, J.: Zur Kenntnis der "Neurofibrome". *Beitr. path. Anat. Allg. Path.* 48: 1, 1910.
- 352.- Vesselinovitch, S.D., Mihailovich, N. y Pietra, C.: The prenatal exposure of mice to urethan and the consequent development of tumors in various tissues. *Cancer Res.* 27: 2333-2337, 1967.

- 353.- Vesselinovitch,S.D. y Mihailovich,N.: The role of periodic and interrupted treatment of newborn and infant mice with urethan on leukemogenesis. *Cancer Res.*27:350-352,1967.
- 354.- Vesselinovitch,S.D.: The strain difference in the induction of leukemia by urethan. *Cancer Res.* 28:1674-1676, 1968.
- 355.- Vesselinovitch,S.D., Rao K., Mihailovich,N., Rice,J.M. y Lombard,L.S.: Development of broad spectrum of tumors by ethylnitrosourea in mice and the modifying role of age, sex and strain. *Cancer Res.*34: 2530-2538,1974.
- 356.- Virchow,R.: *Pathologie des tumeurs.*G.Beilliere, Paris, 1871.
- 356.- Vogel,S.E.: Acute leukemia complicating treatment of glioblastoma multiforme. *Cancer* 41: 333-336, 1978.
- 357.- Von Recklinghausen (1882): Citado por Bullón.
- 358.- Walker, D.L., Padgett,B.L., ZuRhein,G.M.,Albert,A.E. y Marsh,R.F.: Human papovavirus (JC): Induction of brain tumors in hamsters. *Science* 181: 674,1973.
- 359.- Waltz,T.A. y Brownell,B.: Sarcoma: A possible late result of effective radiation therapy for pituitary adenoma. Report of two cases. *J. Neurosurg.*24: 901-907,1966.

- 360.- Webster,H.D.F.: Development of peripheral myelinated and unmyelinated nerve fibers. En "Peripheral neuropathy" Vol.I Editado por P.I.Dyck, P.K.Thomas y E.H.Lambert. W.B. Saunders Co. Philadelphia. p.37, 1975.
- 361.- Wechsler,W., Kleihues,P., Matsumoto,S.,Zülch,K.J., Ivankovic S.,Preussmann,R. y Druckrey,H.:Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. Ann.N.Y.Acad. Sci. 159:360-408, 1969.
- 362.- Wechsler,W.: Oncogenic, teratogenic and mutagenic effects of methyl- and ethyl-nitrosourea. Proc. VI Int. Congr. Neuropat. Paris. Masson et Cie.,pp.128-129,1970.
- 363.- Weil,A.: Textbook of Neuropathology, 2nd. ed.,Editorial Hej<sup>u</sup>nemann, London, 1946.
- 364.- Weiner,L.P. y Narayan,O.: Biologic studies of progressive multifocal leukoencephalopathy. Prog. Med. Virol.18:229,1974.
- 364.- Weisburger,E.K.: Bioassay program for carcinogenic hazards (b) of cancer chemotherapeutic agents. Cancer 40:1935-1949,1977.
- 365.- Weiss,A.F.,Portmann,R., Fischer,H, Simon,J. y Zang,K.D.: Simian virus 40-related antigens in three human meningiomas

- with defined chromosome loss. Proc.nat.Acad.Sci.USA 72:  
609-611,1975.
- 366.- Weiss,A.F., Zang,K.D., Birkmayer,G.D. y Miller,F.: SV-  
40 related papova-virus in human meningiomas. Acta Neuro-  
path (berl.) 34:171-175, 1976.
- 367.- Weiss,S.W., Langloss, J.M. y Enzinger,F.M.: Value of  
S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors  
with particular reference to benign and malignant schwann  
cell tumors. Lab.Inv. 49:299-308,1983.
- 368.- Weller,R.O., Swash,M., McLellan,D.L. y Scholtz,C.L.: Cli-  
nical neuropathology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg,  
New York.p. 105, 1983.
- 369.- Wessel,H., Gerlach,H., Schreiber,D.,Rath,F.W. y Peschel,B.:  
Early stages of experimental brain tumors in rats. Investi-  
gation of serial sections. Zbl. Allg. Pathol. U. pathol.  
Anat.Bd.122:204-213, 1978.
- 370.- Weston,J.A.: The regulation of normal and abnormal neural  
crest cell development. Adv.Neurol.29:77-95, 1981.

- 371.- Wilfong,R.F.,Bigner,D.D.,Self,D.J. y Wechsler,W.: Brain tumor types induced by the Schmidt-Ruppin strain of Rous sarcoma virus in an inbred Fisher rats. Acta Neuropath. (Berl.)25:196-202,1973.
- 372.- Wolff,L.A. y Wasserman,A.E.: Nitrates, nitrites and nitrosamines. Science 177: 15-19, 1972.
- 373.- Wrba,H., Pielsticker,K. y Mohr,U.: Die diaplacentare carcinogene wirkung von Diaethylnitrosamin bei Ratten. Naturwissenschaften 54: 47-60, 1967.
- 374.- Yablonovskaya,L.Y.: Experimental brain tumors obtained by means of heterografting and induction. Leningrad, 1967.
- 375.- Yen, S.H., Dahl,D., Schachner,M. y Shelanski,M.L.: Biochemistry of the filaments of brain. Proc.natl.Acad.Sci.USA 73: 529-533,1976.
- 375.- Yen,S.H. y Fields,K.L.: Antibodies to neurofilament, glial (b) filament and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. J.Cell Biol.88:115-119,1981.
- 376.- Yohn,D.S.: Oncogenic viruses: Expectations and applications



- in Neuropathology. Prog.Exp.Tumor Res.(Basel) 17:74-92,1972.
- 377.- Yung,W.K.,Blank,N.K. y Vick,N.A.: "Glioblastoma".Induction of a reproducible autochthonous tumor in rats with murine sarcoma virus. Neurology 26:76-83,1976.
- 378.- Zanetta,J.P., Benda,P.,Gombos,G., Morgan,G.: The presence of 2',3'-cyclic AMP 3'-phosphohydrolase in glial cells in tissue culture. J.Neuroch. 19:881-883,1972.
- 378.- Zeller,W.J. y Schmähl,D.: Development of second malignancies (b) in rats after cure of acute leukemia L5222 by single doses of 2-Chloroethylnitrosoureas. J.Cancer Res.Clin.Onc.95:83-86,1979.
- 379.- Zimmerman,H.M. y Arnold,H.: Brain tumors produced with benzopyrene. J.Neuropathol.Exp.Neurol.1: 128-134,1942.
- 380.- Zimmerman,H.M. y Arnold,H.: Chemical carcinogens and animal species as factors in experimental brain tumors. J.Neuropathol. Exp. Neurol.2: 416-417, 1943.
- 381.- Zimmerman,H.M.: Brain tumors: Their incidence and classification in man and their experimental production. Ann.N.Y.

- Acad.Sci. 159: 337-359, 1969.
- 382.- Zimmerman,H.M.: Introduction to tumors of the nervous system. En "Pathology of the nervous system". Editado por J. Minckler. McGraw Hill, New York.Vol.2. pp.147-151, 1971.
- 383.- Zimmerman,H.M.: Brain tumors. Meth.Cancer Res.10:105-126, 1973.
- 384.- Zimmerman,H.M.:Tumors of the central and peripheral nervous system. En "Pathology of tumors in laboratory animals".Vol. II.Tumors of the mouse.W.H.O.pp.629-652, 1979.
- 385.- Zülch,K.J.: Handbuch der Neurochirurgie. Biologie und Pathologie der Hirngeschwulste. Vol.III. Springer Verlag, Berlin pp.1-702,1956.
- 386.- Zülch,K.J. y Mennel, H.D.: Recent results in new models of transplacental carcinogenesis in rats. En "Transplacental carcinogenesis". Editado por L.Tomatis y U.Mohr. W.H.O. IARC Sci.Pub. 4, Lyon. pp.29-44,1973.
- 387.- Zülch,K.J. y Mennel,H.D.: The biology of brain tumors. En "Handbook of clinical Neurology".Editado por P.J. Vinken y G.W. Bruyn. North Holland Pub.Co., Amsterdam. Vol.16 pp.1-78, 1974.

388.- ZuRhein,G.M.: Association of papova-virions with a human de  
myelinating disease (Progressive multifocal leukoencephalo-  
paty). Prog.Med.Virol. 11:185-189, 1969.