

————— *Artículo original* —————

Estudio morfológico de la neurocarcinogénesis experimental inducida por nitroso-ureas

Recibido el 28 de enero de 2008

ZURITA, M.; VAQUERO, J. *; OYA, S.; BONILLA, C.
Y AGUAYO, C.

*Unidad de Investigación en Neurociencias
del Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid*

RESUMEN

En el presente trabajo se hace una revisión de la neurocarcinogénesis química, con especial referencia a los tumores del Sistema Nervioso inducidos por etil-nitrosourea en la rata Wistar. El estudio morfológico de los tumores del Sistema Nervioso Central y del Sistema Nervioso Periférico inducidos por exposición prenatal a este carcinógeno (50 mg/kg día 17 de gestación) muestra la aparición de tumores compatibles con un diagnóstico histológico de schwannoma maligno o de oligodendroglioma. Sin embargo, los estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales permiten clasificar a estos tumores, independientemente de su morfología, como tumores malignos, de tipo neuroectodérmico indiferenciado, con posibilidad de diferenciación hacia líneas neuronales y gliales. Sus características biológicas y su posible diagnóstico *in vivo*, por medio de Resonancia Magnética, hacen que este modelo de neurocarcinogénesis sea extraordinariamente útil para valorar el efecto de nuevos tratamientos farmacológicos, aplicables a tumores cerebrales malignos en el hombre.

Palabras clave: Etil-nitrosourea.—Tumores cerebrales experimentales.—Neurocarcinogénesis.

* Resumen del trabajo galardonado con el Premio «Consejo General de Colegios Farmacéuticos», 2007.

Correspondencia:

Doctor J. Vaquero. Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario Puerta de Hierro. San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid.

E-mail: jvaquero@telefonica.net.

SUMMARY

Morphological study of the experimental neurocarcinogenesis induced by nitrosoureas

This work shows a revision of the chemical neurocarcinogenesis, with special reference to the Nervous System tumors induced by ethyl-nitrosourea in the Wistar rat. Prenatal administration of this carcinogen (50 mg/kg, day 17 of pregnancy) induces Nervous System tumors with histological features of malignant schwannomas or oligodendrogliomas. However, and independently of their morphology, the immunohistochemical and ultrastructural studies allow to classify to these tumors as undifferentiated malignant tumors, with tumor cells showing possible differentiation toward neuronal and glial phenotypes. Their biologic properties and their possible diagnosis *in vivo*, by means of Magnetic Resonance, make this neurocarcinogenesis model to be extraordinarily useful to value the effect of new drug treatments, applicable to human malignant brain tumors.

Keywords: Ethyl-nitrosourea.—Experimental brain tumors.—Neurocarcinogenesis.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los carcinógenos químicos ha estimulado la investigación neuro-oncológica ya que, tras su aplicación sistémica, estos compuestos inducen un alto índice de tumores en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (1-23). Algunos de estos compuestos tan sólo de forma ocasional inducen tumores en el SNC de animales adultos, pero representan, sin embargo, poderosos agentes neuro-oncogénicos cuando se administran transplacentariamente o durante las primeras etapas del desarrollo de la vida postnatal. La capacidad de inducir tumores neurogénicos depende en muchos casos del modo de aplicación de carcinógeno, y así, compuestos como el 20-metilcolantreno, 1,2,5,6-dibenziantraceno y 3,4-benzopireno sólo producen tumores en el Sistema Nervioso después de su aplicación local (24). Por otra parte, algunos de los compuestos químicos que inducen tumores neurogénicos tras su administración sistémica pueden además producir tumores locales en el lugar de aplicación. Sin embargo, en las últimas décadas se ha señalado la superioridad de los compuestos nitrosos para desarrollar tumores cerebrales experimentales. La mayoría de los compuestos nitrosos actúan como potentes agentes neuro-oncogénicos que favorecen

la aparición de tumores selectivos en diferentes órganos, además de los propios del Sistema Nervioso, siendo eficaces en un amplio rango de animales experimentales. Entre ellos, destacan la N-metil-nitrosourea y la N-etil-nitrosourea.

La metilnitrosourea (MNU) fue el primer carcinógeno químico utilizado, que producía un alto índice de tumores en el Sistema Nervioso después de su administración sistémica (5). Su efecto neuro-oncogénico en ratas depende en gran medida del modo de aplicación. La administración en ratas adultas de una sola dosis de MNU (70-100 mg/kg) induce el desarrollo de tumores malignos en varios órganos y tejidos. Sin embargo, en este caso, los tumores cerebrales están prácticamente ausentes (25) o aparecen con una incidencia menor del 10% de los animales experimentales. Cuando la MNU es administrada en dosis repetidas de forma oral induce tumores cerebrales en un 65-80% de los animales experimentales, entre un 54-72% cuando se aplica intraperitonealmente y en un 38% cuando se inyecta de manera subcutánea. Este hecho parece ser debido a la gran inestabilidad que presenta la MNU *in vivo*, lo que resulta en una parcial degradación de la molécula en el lugar de aplicación y por lo tanto una disminución de la concentración de MNU que entra en la circulación sistémica. La administración intraperitoneal, oral o subcutánea de la MNU puede provocar también la aparición de tumores locales en el lugar de aplicación, además de los inducidos en el Sistema Nervioso.

La administración crónica de etilnitrosourea (ENU) en ratas BD adultas (10 mg/kg semanal, dosis total de 250 mg/kg) induce tumores neurogénicos en el 25% de los animales. Una simple inyección intravenosa de 60, 140 y 200 mg/kg induce tumores en el Sistema Nervioso en el 6, 45 y 60% de los animales, respectivamente. Por otra parte, una sola inyección intravenosa de 40-80 mg/kg en ratas en el día 15 de gestación, induce tumores malignos en el SNC y SNP en el 98-100% de la descendencia. Por otra parte, la incidencia, distribución, histología de los tumores y el tiempo de supervivencia de los animales se ven influenciados por la especie y la edad de los animales, además de por la dosis y el modo de aplicación del carcinógeno.

Los tumores inducidos por ENU en el Sistema Nervioso son morfológicamente similares a los oligodendrogliomas y «schwannomas» de la neuropatología humana y el estudio de las etapas precoces del

desarrollo de los tumores experimentales inducidos por nitrosureas sugieren que la mayoría de los gliomas se originan en la región de la placa subependimaria del tubo neural que deriva directamente de la capa germinal. Esta capa representa una zona activa de división y diferenciación celular, y es posiblemente la zona blanco para el carcinógeno.

La secuencia del desarrollo de los tumores cerebrales inducidos por la administración transplacentaria de ENU en ratas muestra un período de latencia que es el intervalo de tiempo transcurrido entre el nacimiento y las primeras manifestaciones neurológicas. Este período generalmente se ha estimado entre 5 ó 6 meses. Cuando se sacrifican los animales durante este período de tiempo, se pueden observar lesiones tumorales con distintos grados de desarrollo.

Teniendo en cuenta los escasos datos de que aún se dispone acerca de las características biológicas de los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar, además del gran número de dudas que existen sobre la correcta clasificación de los tumores inducidos por nitrosoureas en roedores y las recientes observaciones ultraestructurales acerca de que algunos de estos tumores incluyen células indiferenciadas, nos planteamos como hipótesis que el carcinógeno (ENU) podría actuar sobre un elemento celular indiferenciado capaz de diferenciarse en el desarrollo ontogénico de forma dual, hacia la línea glial o neuronal, en cuyo caso, las características de los tumores ENU-inducidos deberían ser propias de neoplasias neuroectodérmicas primitivas.

Basándonos en la hipótesis planteada, en el presente trabajo de investigación hemos realizado un diseño experimental sobre la acción de la ENU en la rata Wistar, tras una dosis establecida y administrada en el día 17 del desarrollo postnatal, planteándonos los siguientes objetivos: 1. Estudiar el número, tipo histológico y latencia de inducción de los tumores experimentales. 2. Estudiar la posible utilidad de la Resonancia Magnética convencional para el diagnóstico *in vivo* de tumores cerebrales experimentales en roedores. 3. Estudiar las características ultraestructurales de los tumores inducidos por este modelo experimental. 4. Estudiar los marcadores inmunohistoquímicos que expresan dichos tumores, al objeto de clarificar las dudas actualmente existentes en la literatura acerca de su correcta clasificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo hemos partido de seis ratas Wistar adultas, gestantes. Todos los procedimientos experimentales se hicieron de acuerdo con las directrices de la «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio» preparada por la National Academy of Sciences (USA) y el Comité de Ética para experimentación con animales de laboratorio del Hospital Puerta de Hierro aprobó el estudio.

El día 17 de gestación, cada una de las ratas recibió una dosis única por vía intraperitoneal de ENU (50 mg/kg) en suero fisiológico. Tras finalizar el período de gestación, de estos seis animales se obtuvieron un total de 48 crías. Cada camada fue mantenida con su madre respectiva hasta los 25 días de edad, momento en el que fueron mezcladas todas las crías, y se escogieron al azar 14 animales que sirvieron de base al presente estudio. Los 14 animales fueron mantenidos en las condiciones habituales del laboratorio, con una temperatura ambiente aproximada de 22° C y alimentación uniforme (dieta A.04 de Panlab, S. A. y agua a demanda), además éstos fueron evaluados diariamente hasta la aparición de síntomas neurológicos, momento en que fueron sometidos a estudios de Resonancia Magnética (RM) a fin de verificar la presencia de un tumor intracraneal. Dichos estudios se realizaron mediante un aparato convencional de uso para el diagnóstico clínico, con una intensidad de campo magnético de 0,5 Teslas. Los parámetros generalmente empleados fueron un área de estudio (FOV) de 15 cm, una matriz de 192 × 192, cortes con espesor de 2 ó 4 mm, y secuencias de spin-echo (SE) con potenciación T1 y T2, y de gradient-echo (GE) con potenciación en T1. En la mayor parte de las exploraciones se completó el estudio con la administración de contraste paramagnético (gadolinio-DPTA), a la dosis de 1 cc por vía intraperitoneal. Durante el tiempo de exploración (aproximadamente 30 minutos para cada caso), los animales permanecieron anestesiados (con 0,15 cc de clorhidrato de ketamina y 0,1 cc de valium por cada 100 gr de peso del animal) con respiración espontánea y en su posición anatómica habitual. Posteriormente estos animales fueron sacrificados mediante sobredosisificación anestésica, y sometidos de forma inmediata a estudio necrópsico completo. Tras dichos estudios, los tumores del Sistema Nervioso

obtenidos fueron doce tumores intracerebrales y seis tumores extraparenquimatosos en la base del cráneo, incluyendo un tumor que nació en una raíz cervical de la médula espinal. Estas neoplasias se aislaron y dividieron para su posterior estudio histológico, inmunohistoquímico y de microscopía electrónica.

RESULTADOS

Tumores inducidos y período de latencia

Los 14 animales que sirvieron de base para el presente estudio desarrollaron un total de 18 tumores macroscópicos del Sistema Nervioso, de los cuales doce se hallaban localizados intracerebralmente a nivel de la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, y seis de ellos eran tumores extraparenquimatosos originados en la base del cráneo a nivel del nervio trigémino o del ganglio de Gasser, excepto un caso que se desarrolló en la región cervical de la médula espinal. En ningún caso se encontró más de un tumor de iguales características y localización en el mismo animal, obteniéndose, sin embargo, cuatro animales que sí habían desarrollado simultáneamente un tumor cerebral intraparenquimatoso y un tumor extraparenquimatoso en la base del cráneo. Las neoplasias que primero se desarrollaron en los animales fueron los tumores de la región del ganglio de Gasser y del nervio trigémino. Estas neoplasias comenzaron a dar síntomas neurológicos tras un período de latencia que osciló entre los cuatro y siete meses después de la administración del carcinógeno, dándose el caso de un tumor que se extendió por la base del cráneo e invadió estructuras extracraneales. A partir de los ocho meses dejaron de aparecer estos tumores, desarrollándose entonces las neoplasias intracerebrales, que comenzaron a hacerse sintomáticas entre los ocho y diez meses de edad de los animales.

Estudios de resonancia magnética

En todos los animales con un tumor cerebral macroscópico, la RM fue positiva, delimitando claramente la localización y extensión de la lesión. En todos los casos, los tumores detectados con la téc-

nica de RM correspondían a neoplasias que tenían un diámetro superior a los 3 mm, siendo siempre visibles macroscópicamente en el estudio necrópsico de los animales.

A pesar de que, al menos en seis de los animales estudiados con RM, existían en el momento de la exploración, focos histológicos compatibles con los conceptos de «microtumor» o de «proliferación inicial neoplásica», estas lesiones no fueron detectadas con los parámetros de RM utilizados. Los tumores detectados por RM fueron, de forma característica, hipointensos en T1 e hiperintensos en T2, y también característicamente, mostraron un claro aumento de señal tras la administración de gadolinio (Figuras 1 y 2).

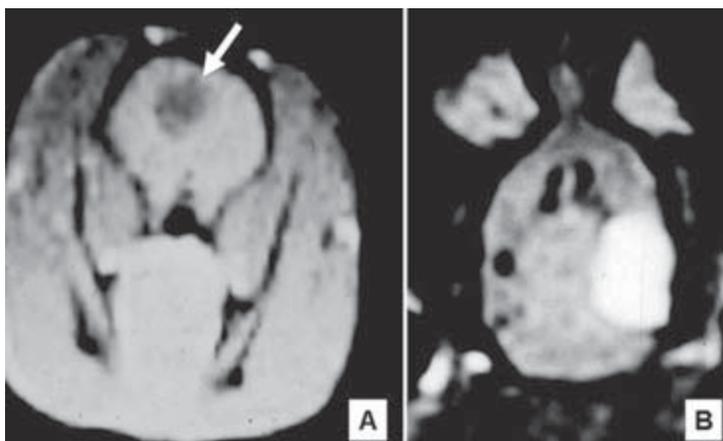


FIGURA 1. **A:** Resonancia Magnética (RM) en fase T1, corte coronal, en un tumor cerebral experimental inducido por exposición prenatal a ENU. La flecha señala el tumor, que se delimita por su hipointensidad. **B:** Tumor hemisférico en RM (fase T1, tras administración de contraste paramagnético, corte axial) que se delimita por su hiperintensidad.

Estudio morfológico de los tumores con aspecto de neurinoma

Estas neoplasias desarrolladas en la base del cráneo, a partir de los trayectos iniciales del V par craneal y el tumor localizado en la raíz espinal, se muestran macroscópicamente, como tumores bien definidos, que se identifican como masas de tejido tumoral de espec-

to fusiforme, consistencia firme y a veces quística, apareciendo generalmente bien encapsulados (Figura 3A).

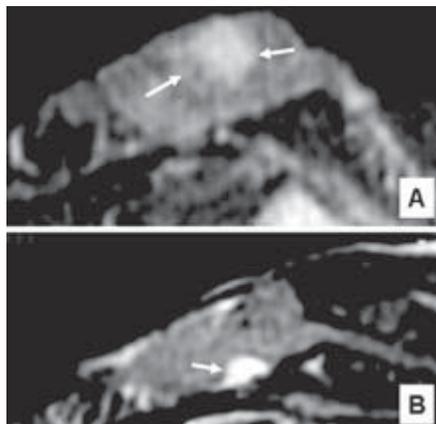


FIGURA 2. **RM de tumores cerebrales experimentales (flechas) inducidos por exposición prenatal a ENU.** **A:** Fase T1 tras administración de contraste, mostrando un tumor intraparenquimatoso. **B:** RM (T1 tras administración de contraste) mostrando un tumor basal, extraparenquimatoso, localizado a nivel del ganglio de Gasser. Cortes en proyección axial.

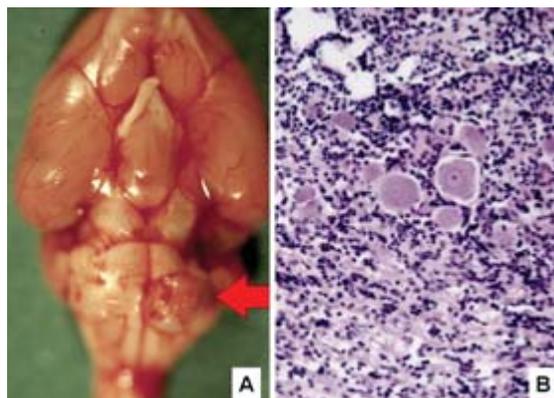


FIGURA 3. **Tumores basales, extraparenquimatosos, inducidos por exposición prenatal a ENU.** **A:** Aspecto macroscópico del tumor (flecha), localizado a nivel de la emergencia del nervio trigémino. **B:** Aspecto histológico del tumor. Se aprecian células de aspecto neuronal, atrapadas en el tumor, que pueden corresponder a neuronas del ganglio de Gasser. Entre ellas se aprecia una población de células con aspecto indiferenciado.

El estudio con microscopía óptica, utilizando la técnica convencional para microscopía óptica de Hematoxilina-Eosina, muestra que estas neoplasias presentan una serie de características histológicas análogas a las clásicamente admitidas en neurocarcinogénesis experimental para clasificar los «schwanomas malignos» o «neurinomas malignos». Se observa, por lo general, una población celular muy isomorfa, formada por células pequeñas, de núcleo oscuro y más o menos redondeado, generalmente en posición central, que tienen el aspecto típico de las células indiferenciadas. Además, estos neurinomas malignos presentan una gran celularidad y es posible observar en ellos un elevado número de figuras de mitosis. Entremezcladas con las células pequeñas de aspecto indiferenciado que constituyen el tumor, existen en menor proporción una población de células de mayor tamaño, que corresponden a neuronas atrapadas, posiblemente provenientes del ganglio de Gasser (Figura 3B).

Por otra parte, en estas neoplasias existe una gran vascularización, con hiperplasia de los vasos y es típico la formación de grandes espacios quísticos. En algunas ocasiones, aunque muy raramente, es posible encontrar zonas de necrosis.

Sin embargo, a pesar del gran isomorfismo celular que caracteriza a estas neoplasias, en algunas ocasiones, es posible observar pequeñas zonas tumorales, constituidas por una población celular que no posee el aspecto típico de las células indiferenciadas características de estos tumores, sino que se muestran como células de aspecto fusiforme y dispuestas en empalizada, predominando en algunos casos un tejido de aspecto compacto o, por el contrario, a veces se puede observar la existencia de un tejido más laxo de aspecto reticular.

El estudio de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos tanto de la línea glial como de la línea neuronal sobre estos aparentes neurinomas, nos reveló que en todos los casos existía una clara positividad a la proteína S-100 y a la sinaptofisina de forma muy marcada. Sin embargo, la proteína de NF mostró una positividad en menor grado, limitándose a determinados grupos celulares. La vimentina fue claramente positiva sólo en tres de los seis casos estudiados y dudosamente positiva en el resto. Por último la detección de la PGA fue negativa en todos los casos. Los marcadores neuro-

blásticos específicos, como el NB-84, fueron muy positivos en todos los casos (Figura 4A).

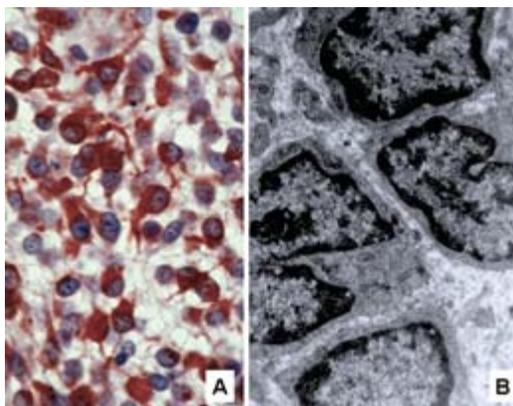


FIGURA 4. **A:** Positividad inmunohistoquímica al marcador neuroblástico NB-84 en las células de los tumores ENU-inducidos que se desarrollan a nivel de la base del cráneo. **B:** Estudio de microscopía electrónica que muestra el carácter indiferenciado de las células tumorales.

En el estudio ultraestructural de estas neoplasias se observó la existencia de al menos dos tipos celulares. Por un lado, existía un tipo celular que correspondía a las llamadas células de Schwann neoplásicas. Estas son células de núcleo oscuro, cuya cromatina se halla condensada formando un anillo en torno a la membrana nuclear y el citoplasma se presenta formando una serie de prolongaciones ondulantes. En el interior de estas células es posible observar, en algunas ocasiones, la presencia de figuras de mielina. El otro tipo celular encontrado estaba constituido por unas células pequeñas, de núcleo oscuro y redondeado generalmente dispuesto en posición central. La cromatina se hallaba condensada en la periferia nuclear. Estas células mostraban un citoplasma denso de escasa cuantía, que presentaba abundante RER, con ribosomas y polirribosomas libres, así como gran cantidad de mitocondrias de matriz densa, lisosomas primarios y ocasionales microtúbulos, mostrando un aspecto bastante indiferenciado, semejante al de los típicos neuroblastos (Figura 4B). Algunas de estas células además pueden mostrar prolongaciones citoplasmáticas, que indican su posible diferenciación neuronal.

Por último, entremezcladas con estos dos tipos de células, era posible observar la existencia de unas células pequeñas que mostraban un escaso citoplasma y una configuración nuclear mucho más irregular, conteniendo núcleos grandes con numerosas indentaciones y cuya cromatina se hallaba condensada en la periferia nuclear, que fueron interpretadas como células tumorales indiferenciadas con una morfología nuclear más irregular.

Estudio morfológico de los tumores con aspecto de oligodendroglioma

Estas neoplasias comienzan a desarrollarse aproximadamente a los 210 días de la vida del animal, localizándose siempre a nivel de la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales. Muestran un aspecto macroscópico de tumores bien definidos, que con frecuencia presentan características hemorrágicas y focos de necrosis (Figura 5). En algunas ocasiones estos tumores desarrollan, al igual que los neurinomas del trigémino, grandes cavidades quísticas.

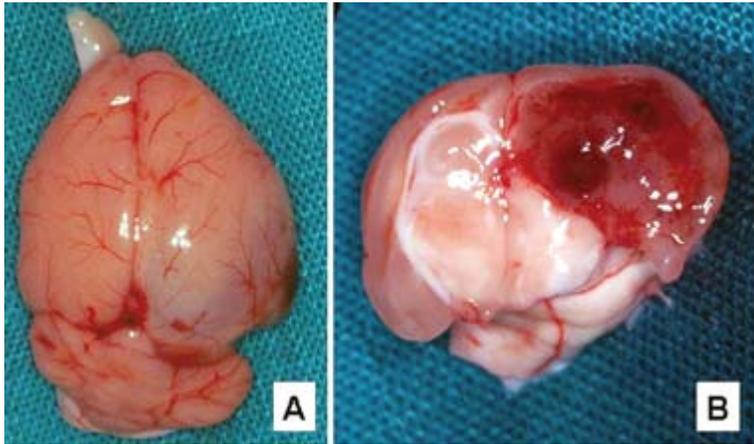


FIGURA 5. Aspecto macroscópico de un tumor cerebral experimental, inducido por exposición prenatal a ENU. A: El hemisferio cerebral derecho se encuentra hinchado por la presencia del tumor intraparenquimatoso.

B: Aspecto macroscópico del tumor.

Los estudios de microscopía óptica sobre estos tumores mostraron una serie de características histológicas, mediante las cuales estas neoplasias podrían ser clasificadas de acuerdo con las descripciones clásicamente admitidas en neurocarcinogénesis experimental, como «oligodendrogliomas-like». Los estudios histológicos revelan un patrón celular que muestra las características típicas de los oligodendrogliomas humanos, identificándose una población muy uniforme de células pequeñas de aspecto linfocitario, que muestran en posición central un núcleo pequeño y oscuro y un citoplasma claro y escaso. Estas células se hallan dispuestas en masas de elevada densidad celular. En estos tumores es frecuente encontrar un elevado número de figuras de mitosis. En estas neoplasias se pueden identificar un gran número de astrocitos fibrosos reactivos, que se encuentran atrapados entre las células tumorales y formando una barrera astrocitaria alrededor de la masa tumoral. Estos astrocitos, en ocasiones, pueden tener aspecto gemistocítico, con un citoplasma muy dilatado, eosinófilo.

En general son tumores muy vascularizados y es posible observar zonas de necrosis. Por otra parte, en estas neoplasias, es típico la formación de una barrera endotelial que delimita perfectamente la zona tumoral y en ocasiones se rompe dando lugar a pequeños focos de hemorragia.

En uno de estos «oligodendrogliomas-like» estudiados, existían zonas con una disposición celular que se correspondían con un patrón muy similar al ofrecido por los «ependimomas-like» descritos en la literatura, mostrando así una ordenación de las células en cordones o rosetas celulares en torno a una zona acelular, eosinófila de aspecto fibrilar, conformando unas estructuras análogas a las descritas por Borit en los pineocitomas humanos (rosetas de Borit), y a las estructuras acelulares observadas comúnmente en los neurocitomas centrales de la neuropatología humana. Es importante señalar el hecho de que en todos los animales en los cuales se desarrolló un tumor de este tipo, se podían encontrar además en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales formaciones neoplásicas que correspondían a los estadios de «proliferaciones iniciales neoplásicas» o «microtumores». Estos focos neoplásicos estaban constituidos por una población celular pequeña, isomorfa, de iguales características que las células tumorales indiferenciadas descritas anteriormente para los macrotumores

(Figura 6A). En estas formaciones también se pudo observar la existencia de astrocitos fibrosos reactivos alrededor de la formación tumoral y su evolución hacia auténticos tumores (Figura 6B) puede ser comprobada cuando se hace el estudio de animales sometidos a este modelo de neurocarcinogénesis en diferentes edades.

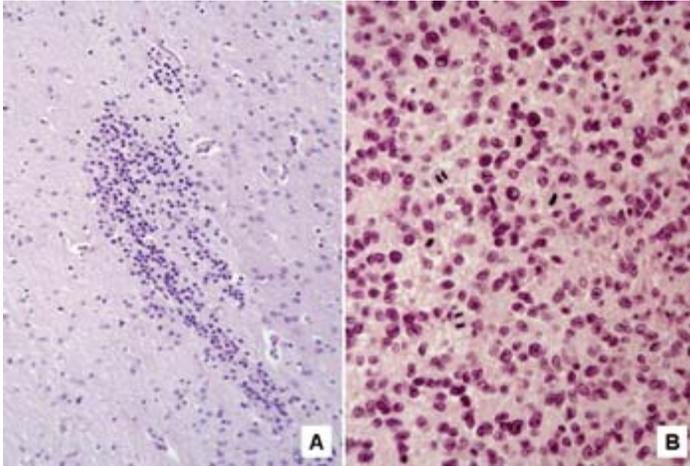


FIGURA 6. **A:** Aspecto histológico de un microtumor subcortical, fase inicial de estos tumores (H.E.). **B:** Estudio microscópico que muestra las células tumorales, de aspecto oligodendroglial, con figuras de mitosis (H.E.).

En los estudios ultraestructurales de estas neoplasias se puede identificar una población de células redondas, de aspecto indiferenciado, muy semejante a los neuroblastos. Estas células muestran un núcleo oscuro y redondeado, con un escaso citoplasma que contiene mucho RER y ribosomas libres. En algunas ocasiones las células tumorales se disponen en hilera.

Entre las células tumorales se pueden observar astrocitos atrapados maduros, que contienen en su citoplasma una gran cantidad de gliofilamentos. Los estudios ultraestructurales revelan que estas células no poseen las típicas características de los oligodendrocitos maduros, sino que muestran características típicas de células primitivas con escasos signos de diferenciación. Al igual que en los neuromas del trigémino, en algunas células se pueden observar pro-

longaciones celulares, lo que puede sugerir una posible diferenciación neuronal (Figura 7A).

Los estudios inmunohistoquímicos realizados sobre estos tumores ponen de manifiesto, al igual que los estudios de microscopía óptica y los estudios ultraestructurales, el carácter primitivo de las células que las componen.

Tanto las «proliferaciones neoplásicas iniciales» como los «microtumores», que existían simultáneamente a los tumores cerebrales, fueron negativos a todo tipo de marcadores inmunohistoquímicos, tanto de la línea glial como de la línea neuronal. Solamente en alguna ocasión dio positividad a la PGA los astrocitos reactivos que circundaban al tumor.

Sin embargo, las neoplasias ya desarrolladas mostraron positividad a marcadores tanto de la línea glial como de la línea neuronal. La vimentina fue positiva de forma clara en el 50% de los tumores. Además este marcador mostraba positividad en todos los astrocitos que circundaban al tumor. Existieron tres casos donde se dio una clara coexpresión en las células tumorales, para la PGA y la vimentina, hecho que apoya los datos obtenidos en los estudios ultraestructurales acerca del carácter primitivo de estas neoplasias. La proteína S-100 fue positiva, por lo general, en los astrocitos reactivos del tumor. Con respecto a los marcadores de la línea neuronal, la proteína de NF y la sinaptofisina mostraron también positividad en todos los casos, siendo de mayor grado la expresión de la sinaptofisina (Figura 7B).

En lo referente a los tumores que mostraban áreas con un patrón similar a los «ependimomas-like» de la literatura, se pudo demostrar que en estas áreas el patrón inmunohistoquímico fue similar al descrito previamente en las zonas que mostraban una típica apariencia de oligodendrogliomas, aunque ocasionalmente pudo apreciarse un patrón de positividad difuso, en el neuropilo tumoral, para la sinaptofisina (Figura 7C). En cuanto a los marcadores típicos de células astrogiales, la PGA se mostró positiva en los astrocitos hipertróficos reactivos que se encontraban en la sustancia blanca adyacente al tumor, y sólo en algunas ocasiones se halló positividad en pequeños grupos de células tumorales (Figura 7D).

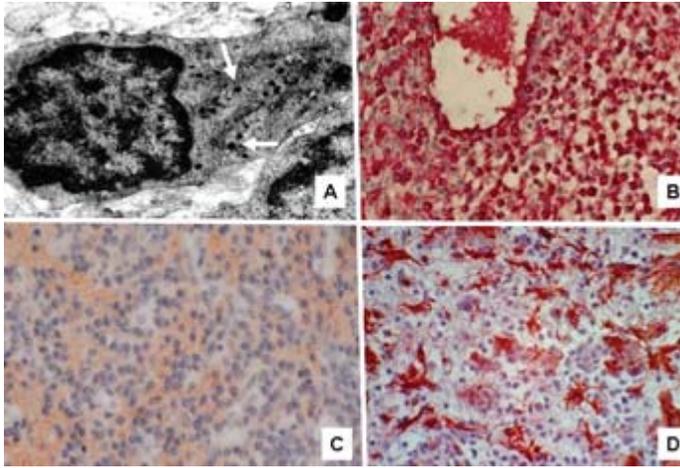


FIGURA 7. **A:** Aspecto de las células tumorales, al microscopio electrónico, mostrando gránulos densos intracitoplasmáticos (flechas) lo que sugiere diferenciación neuroblástica. **B:** Marcada positividad a la sinaptofisina en las células tumorales (tinción inmunohistoquímica). **C:** Positividad inmunohistoquímica a sinaptofisina en el neuropilo, con tendencia a la formación de estructuras rosetoides, análogas a las de los neurocitomas de la neuropatología humana. **D:** Positividad inmunohistoquímica a PGA en los astrocitos atrapados entre las células tumorales.

DISCUSIÓN

Tumores inducidos y período de latencia

Los estudios pioneros de Druckrey y colaboradores sobre el modelo de neurocarcinogénesis por ENU han sido confirmados posteriormente por otros autores (3, 11, 14).

En el presente trabajo hemos obtenido una serie de datos acerca del tiempo de latencia y de la naturaleza histológica de los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar. Así, con las condiciones experimentales utilizadas (inyección de 50 mg/kg de ENU intraperitoneal, en el día 17 de gestación), los tumores que primero se desarrollan son los llamados «Schwannomas malignos», generalmente localizados en la región del Ganglio de Gasser y del nervio trigémino. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cravioto y cols. (3). Estas neoplas-

sias suelen hacerse sintomáticas tras un período de latencia que oscila entre cuatro y siete meses, tras la exposición al carcinógeno y pueden extenderse por la base del cráneo e invadir ocasionalmente estructuras extracraneales. A partir de los ocho meses de edad del animal, por lo general, dejan de aparecer estos tumores, apareciendo entonces las neoplasias intracerebrales con características morfológicas de oligodendrogliomas. En la presente serie, la mayor parte de los tumores intracerebrales se hicieron sintomáticos entre los ocho y diez meses de edad de los animales.

En algunas ocasiones, al igual que otros autores (8, 9) hemos encontrado focos de «proliferaciones neoplásicas iniciales» localizadas en la sustancia blanca paraventricular, que coexistían con los macrotumores cerebrales. Estas lesiones tumorales estaban compuestas por células muy indiferenciadas e inclasificables histológicamente. Schiffer y cols. (20) afirman que estos focos de «proliferación neoplásica inicial» comienzan a aparecer en la sustancia blanca, aproximadamente a los treinta días de la vida del animal como simples focos de células hiperplásicas y representan solamente una etapa inicial del desarrollo de los tumores cerebrales.

Los tumores que se desarrollan a partir de estas «proliferaciones neoplásicas iniciales» pueden continuar por dos líneas diferentes de desarrollo, una línea astrogliar y una línea oligodendrogliar. Este doble curso de desarrollo corresponde con las observaciones de Lantos (17). Este autor señala que las zonas blanco para el ENU en el cerebro son las células primitivas de la región de la placa subependimaria y los oligodendrocitos.

Parece poco probable que el ENU tenga un efecto preferente sobre elementos neuroectodérmicos del Sistema Nervioso, del tipo de las células gliales y las células de Schwann, lo que estaría de acuerdo con las observaciones recogidas en la literatura acerca de que son estos elementos (células de Schwann y células gliales) los que van a encontrarse como constituyentes de los tumores inducidos por ENU.

En comparación con los datos ofrecidos en la literatura, nuestros resultados parecen mostrar una menor incidencia de tumores múltiples, hallazgo que se acepta como característico en el modelo experimental de neurocarcinogénesis por ENU (12). Por ejemplo, en los estudios realizados sobre ratas de la cepa Long-Evans, más del

30% de los animales desarrollan tumores múltiples tras la administración de una dosis única de ENU, cinco veces inferior a la utilizada por nosotros, administrada también en el día 17 de gestación (8, 9).

En cuanto al período de latencia de aparición de los tumores, parecen ser también ligeramente diferentes a los referidos en la literatura utilizando otros tipos de ratas, que pueden mostrar un tiempo mayor de inducción, aún utilizando dosis inferiores de ENU. Estas diferencias en cuanto al tanto por ciento de tumores desarrollados y su período de latencia entre las diferentes cepas de animales, e incluso dentro de una misma cepa, dependiendo de la edad, dificulta la comparación de resultados entre los diferentes laboratorios, acerca de la distribución y naturaleza de los tumores desarrollados después de la administración trasplacentaria de ENU. A pesar de ello, parece existir más o menos un acuerdo en cuanto a la secuencia de aparición de las diferentes transformaciones neoplásicas y de su período de latencia. Sin embargo no existe un acuerdo entre los diferentes autores con respecto a la naturaleza histológica de estas neoplasias, ni en cuanto a los criterios de clasificación. De hecho, parece ser aceptado que el modelo de neurocarcinogénesis por ENU desarrolla, en primer lugar, tumores del tipo schwannoma, y en segundo término, tumores clasificables como «gliomas-mixtos», en los cuales se señala un claro componente astrocitario. Le seguirían en frecuencia los tumores clasificables como «oligodendrogliomas». En comparación con las descripciones que existen en la literatura, llama la atención en nuestra serie, la ausencia de tumores con apariencia astrocitaria o ependimaria, e incluso la no existencia de tumores clasificables como glioblastomas (10, 13). Creemos, no obstante, que estas diferencias pueden ser debidas a las discrepancias en los criterios de clasificación (11, 14, 22). Nosotros hemos renunciado a clasificar como ependimomas, o como tumores mixtos, a algunos tumores con patrón rosetoide, en los que se reconocían áreas de aspecto oligodendroglioma como patrón predominante. Además, apoyamos las observaciones que clasifican los tumores inducidos por ENU, con patrón mixto de oligodendroglioma-ependimoma, como tumores primitivos muy indiferenciados, a pesar de su apariencia morfológica, ya que en nuestro único caso en que se reconoció un claro patrón ependimario, la microscopía electrónica no mostró estructuras propias de los ependimomas, mostrando sin

embargo, una expresión inmunohistoquímica análoga a la de otros tumores con un patrón puro de oligodendroglioma.

Posibilidad de diagnóstico *in vivo* de los tumores inducidos

En nuestra presente serie hemos obtenido claras evidencias de que los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar pueden ser detectados *in vivo* utilizando un aparato convencional de Resonancia Magnética. Con dicha técnica, y de forma característica, los tumores experimentales se muestran hipointensos en fase T1, hiperintensos en fase T2 y captan contraste paramagnético (gadolinio) de forma intensa y homogénea.

Aunque en nuestro material sólo se han detectado tumores con un tamaño suficiente para su observación macroscópica, es obvio que el diagnóstico *in vivo* que puede proporcionar la RM, va a permitirnos en el futuro aplicar a este modelo experimental diversos protocolos terapéuticos y constatar su posible eficacia sin tener que renunciar a líneas tumorales transplantables sobre animales singénicos.

Características morfológicas de los tumores tipo «neurinomas»

El término usado para describir este tipo de tumores ha sido el de «neurinoma» o «schwannoma maligno». Los estudios histológicos sobre los tumores, que se originan en el SNP, concretamente a nivel del nervio trigémino, parecen señalar que el principal tipo celular que componen estas neoplasias son las células de Schwann (7). Así, según afirman los estudios realizados por Cravioto y cols. (3), los tumores experimentales del SNP son histológica y ultraestructuralmente tumores de células de Schwann. En cuanto a los resultados histológicos obtenidos por nosotros en el estudio de los Schwannomas, tenemos que decir que nuestros datos coinciden con las descripciones histológicas que se han hecho hasta el momento (3, 18). Sin embargo, nuestros resultados ultraestructurales discrepan en parte de los obtenidos por otros autores, ya que nosotros hemos podido observar además de las descritas células de Schwann neoplá-

sicas, otro tipo celular, compuesto por elementos celulares con un aspecto bastante indiferenciado, muy semejante al de los típicos neuroblastos, incluso en algunas ocasiones se observan prolongaciones citoplasmáticas, que indican su posible diferenciación neuronal. Los estudios inmunohistoquímicos de la expresión de los diferentes marcadores (gliales y neuronales), en los schwannomas malignos, nos ha servido para apoyar los datos obtenidos mediante los estudios ultraestructurales, acerca del carácter neuroectodérmico primitivo de la mayor parte de las células que integran estas neoplasias.

Según Cravioto y cols. (3), los tumores inducidos por ENU, en el SNP, muestran una importante positividad a la proteína S-100, que es considerada como un marcador específico del Sistema Nervioso. La sinaptofisina fue aislada y caracterizada a partir de vesículas presinápticas en neuronas de cerebro bovino, y su presencia se utiliza para demostrar inmunohistoquímicamente, la diferenciación neuroendocrina de algunos tumores y para tumores neuroectodérmicos primitivos. La inmunorreactividad para la sinaptofisina de una importante población de células tumorales, en los tumores ENU-inducidos, permite interpretar estos supuestos schwannomas, como tumores neuroectodérmicos primitivos que muestran signos inmunohistoquímicos de diferenciación neuronal, y apoyar la hipótesis de Jones y cols. (11) acerca del carácter neuroblástico de estas neoplasias. El patrón de distribución de la PGA hallado por nosotros es muy similar al aportado por otros autores, no existiendo por lo general positividad para este marcador y sólo de un 50% en el caso de la vimentina.

Características morfológicas de los tumores tipo oligodendroglial

Las neoplasias con aspecto morfológico de oligodendrogliomas, desarrolladas en la sustancia blanca paraventricular, han sido los únicos tumores cerebrales obtenidos en nuestra serie. Estos datos no coinciden con los obtenidos por otros autores. Así, Lantos (17) distingue dos líneas de tumores diferentes que se pueden desarrollar en los hemisferios cerebrales: una línea astrogliar y una línea oligodendroglial. Nosotros hemos clasificado todas estas neoplasias como oligodendrogliomas, aunque ocasionalmente hallamos observado

áreas que según descripciones de la literatura, podrían haber justificado la clasificación de alguno de estos tumores comoependimomas. Estas neoplasias también se pueden desarrollar a nivel de la sustancia blanca de la médula espinal, generalmente a nivel dorsal y lumbar.

Algunos autores, basándose en estudios de microscopía electrónica, defienden el carácter indiferenciado de tumores supuestamenteependimarios y los definen como tumores neuroepiteliales primitivos con algunas características oligodendrogiales.

Al igual que ocurre con los schwannomas malignos, en el caso de los oligodendrogliomas, el carácter neuroectodérmico primitivo, sugerido por los estudios ultraestructurales, se ve apoyado por los estudios inmunohistoquímicos. La observación de que, desde el punto de vista inmunohistoquímico, las diferentes áreas de estos aparentes tumores mixtos expresan los mismos marcadores, apoya nuestro criterio de que están compuestos por una misma población de células tumorales, aún cuando dichas células pueden mostrar, en determinadas áreas, un patrón morfológico diferente del que es habitual en la mayor parte de los tumores clásicamente catalogados como de aspecto oligodendrogial. En cuanto a la interpretación de los hallazgos inmunohistoquímicos, existe una concordancia entre nuestros resultados y los de otros autores, con respecto a la expresión de la proteína S-100, PGA y vimentina. En todas las fases de crecimiento de las neoplasias por ENU existe un gran número de astrocitos que expresan positividad a la PGA. Estos astrocitos se encuentran en la periferia del tumor y en la región peritumoral. Nosotros creemos que la mayoría de los astrocitos que expresan positividad a la PGA, situados en los alrededores y en el interior del tumor, corresponden con astrocitos hipertróficos reactivos, pero sin embargo hemos podido observar grupos de células tumorales, que muestran positividad a la PGA, y curiosamente en muchas ocasiones esta positividad coincide con la positividad a la vimentina, es decir, existe una expresión de ambos marcadores, hecho que apoya el carácter indiferenciado de estas células, pues la coexpresión de la PGA y de la vimentina es un marcador del fenotipo astroglial inmaduro. Esta interpretación está en línea con el presente concepto que representa que la vimentina es el tipo más numeroso de filamentos intermedios de la astroglia inmadura, y es seguido por la PGA más tarde en el desarrollo. Sin embargo, otros autores afirman

que la positividad a la PGA sólo existe en los astrocitos hipertróficos reactivos que existen en los alrededores del tumor y nunca en las propias células tumorales.

Es importante destacar en nuestro estudio, la fuerte positividad que hemos obtenido en la mayor parte de los tumores para la sinaptofisina. Teniendo en cuenta que en la patología humana este marcador es útil para el reconocimiento de tumores neuroectodérmicos primitivos como el meduloblastoma e igualmente para el reconocimiento de tumores de carácter neuronal, es lógico admitir que la mayor parte de los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar pueden ser considerados como tumores neuroectodérmicos primitivos con posible diferenciación neuronal, independientemente de su apariencia morfológica. Esta conclusión concuerda con algunas de las clasificaciones previas de dichas neoplasias, tales como la de Jones y cols. (11), quienes clasifican como neuroblastomas a los tumores experimentales inducidos por ENU.

Similitudes de los tumores experimentales con los tumores humanos

Hoy en día se acepta en neuropatología humana que determinados tumores de naturaleza neuronal, tales como los llamados «neurocitos centrales», pueden presentar una falsa apariencia de oligodendrogliomas, siendo los estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales, los que ofrecen la posibilidad, la mayoría de las veces, de su correcta clasificación, ya que generalmente suelen ser mal diagnosticados como oligodendrogliomas en base a su aspecto histológico. Este caso es muy similar al ofrecido por los oligodendrogliomas intracerebrales desarrollados en la rata después de la administración de ENU, donde aún no existe un acuerdo entre los diferentes autores acerca de su clasificación. Se observa, por tanto, que una apariencia histológica oligodendrogliar no debe prejuzgar la naturaleza neuronal o glial de una determinada neoplasia, siendo esta consideración válida tanto para tumores humanos como para los tumores experimentales de nuestra serie, donde el patrón de marcaje inmunohistoquímico y las características ultraestructurales sugieren que, independientemente del aspecto histológico con la tinción convencional de H.E.,

dichas neoplasias pueden ser consideradas como tumores neuroectodérmicos primitivos con una clara tendencia a la diferenciación neuronal. También merece ser discutida la posible relación etiológica entre los tumores inducidos por ENU y los tumores cerebrales que acontecen en la clínica humana. Aunque no existen datos fiables acerca de los factores etiológicos que determinan el inicio de un tumor cerebral humano, considerándose la posibilidad de un mecanismo multifactorial, resulta interesante la apreciación de que el contacto con un carcinógeno, en la época intrauterina de la rata pueda dar lugar, varios meses después del nacimiento, al desarrollo neoplásico. Es más, si consideramos el ciclo biológico de los roedores, en el momento en que las neoplasias experimentales se hacen manifiestas (edad media de la vida de la rata) sería superponible a la edad de máxima incidencia de tumores cerebrales en el ser humano (edad adulta). Si algunos tipos de tumor cerebral humano podrían estar genéticamente determinados como consecuencia de alteraciones cromosómicas resultantes de una exposición a carcinógenos en el período prenatal, es una cuestión abierta, cuyo planteamiento puede ser válido ante las similitudes cronobiológicas y morfológicas entre los tumores cerebrales humanos y los tumores experimentales inducidos por nitrosoureas.

Caracterización e histogénesis de los tumores obtenidos

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro presente estudio, cabe plantearse la exacta caracterización de los tumores experimentales inducidos por ENU, con los parámetros utilizados, y además, tratar de establecer su histogénesis. Resulta obvio que, al menos en nuestra serie, los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar presentan características inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica comunes, independientemente de su variable aspecto morfológico cuando se estudian con tinciones convencionales, como es la hematoxilina-eosina. Dichas características comunes nos llevan a interpretar estas neoplasias como tumores neuroectodérmicos primitivos, con capacidad para una diferenciación dual, aunque es obvio que la constante positividad a los marcadores neurales sugiere una mayor tendencia a la diferenciación neuronal. Esta interpretación es contraria a los supuestos previamente establecidos, ya que numero-

Los autores señalan la naturaleza glial de estos tumores y la excepcional rareza de tumores ENU-inducidos con características neurales. Es también en base a esta interpretación morfológica, que estos mismos autores emiten la hipótesis de que la célula diana para el desarrollo neoplásico sería un elemento glial indiferenciado, generalmente de la matriz subependimaria, lo que parecer también ser aceptado en base a las interpretaciones de Lantos (18) y de otros investigadores. Teniendo en cuenta nuestros presentes resultados, que muestran una doble diferenciación inmunohistoquímica de las células de los tumores cerebrales ENU-inducidos (expresión de marcadores gliales y neurales) podemos buscar, como elemento diana, un precursor común en la embriogénesis del Sistema Nervioso de los mamíferos, capaz de diferenciarse en elementos gliales y neurales. Esta célula precursora corresponde lógicamente al concepto de la célula indiferenciada de Schaper, elemento muy discutido en la literatura y que puede identificarse con el concepto de meduloblasto, defendido por la escuela americana de neuropatología y negado por la escuela española. En cualquier caso, creemos que la consideración de una célula precursora indiferenciada, como constituyente de los tumores neuroectodérmicos primitivos cobra mayor trascendencia si se tienen en cuenta en neuropatología humana, las ocasionales descripciones de tumores infantiles indiferenciados cuyas células pueden expresar igualmente marcadores gliales y neurales. Por otra parte, el hecho de que hayamos encontrado marcadas similitudes inmunohistoquímicas y ultraestructurales entre nuestros tumores experimentales tanto del Sistema Nervioso Central como del Sistema Nervioso Periférico, nos lleva a considerar una célula precursora común, para ambos tipos de neoplasias, lo que se ha visto apoyado en la literatura por las ocasionales descripciones de schwannomas experimentales con áreas de oligodendroglioma o la interpretación como neuroblastomas de gran parte de dichos schwannomas (11). Si aceptamos esta interpretación citogenética, deberíamos admitir igualmente que la célula indiferenciada de Schaper puede ser alterada en un momento determinado de la embriogénesis no sólo a nivel de la capa germinal subependimaria, sino igualmente a nivel de la cresta neural en formación, puesto que sólo de esta forma sería explicable la preferente aparición de tumores experimentales a nivel de los ganglios del Sistema Nervioso Periférico, constituidos a partir de células nerviosas de la cresta neural.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación, creemos oportuno hacer las siguientes consideraciones: 1. La RM es una técnica útil para el diagnóstico *in vivo* de los tumores cerebrales experimentales inducidos en roedores por ENU. 2. En la rata Wistar, con la técnica de H.E. y con los parámetros experimentales utilizados, la mayor parte de los tumores inducidos tienen aspectos histológicos de «schwannomas malignos» y «oligodendrogliomas». En ambos casos se puede encontrar una gran población de células que presentan características muy indiferenciadas. 3. Desde el punto de vista ultraestructural hemos constatado la presencia de células con aspecto neuroepitelial primitivo y este hecho, conjuntamente con la expresión antigénica de marcadores tanto de células gliales como de células neuronales sugiere el carácter primitivo de estas neoplasias y su capacidad de diferenciación dual. 4. La positividad a marcadores tales como la sinaptofisina y la proteína de los NF, tanto en los «tumores schwannianos» como en los oligodendrogliomas-like, sugiere una tendencia a la diferenciación neuronal de estas neoplasias, lo que se confirma además por las similitudes entre algunos tumores de apariencia oligodendrogliar y los neurocitomas centrales de la neuropatología humana. 5. Por último creemos que este tipo de tumores, clasificados en base a los datos obtenidos en nuestro estudio como «neoplasias neuroectodérmicas indiferenciadas» pueden ser útiles para la realización de diversos ensayos terapéuticos que tengan como finalidad un mejor conocimiento de la biología y posibilidades de control de los tumores neuroectodérmicos primitivos humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) TOMATIS, L. y MOHR, E. (1973): Transplacental Carcinogenesis. *IARC Sci.* 4: 112-126, Lyon.
- (2) CRAVIOTO, H.; WEISS, J. F.; WEISS, E. DE C.; PALEKAR, L. y RANSOHOFF, J. (1972): Experimental neurinomas induced with nitrourea derivatives. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 31: 204-205.
- (3) CRAVIOTO, H.; WEISS, J. F.; WEISS, E. DE C.; GOEBEL, H. H. y RANSOHOFF, J. (1973): Biological characteristics of peripheral nerve tumors induced with ethylnitrosourea. *Acta Neuropathol.* 23: 265-280.

- (4) DELINGER, R. H; KOESTNER, A. y SWENBERG, J. A. (1973): An experimental model for selective production of neoplasms of the peripheral nervous system. *Acta Neuropathol.* 23: 219-228.
- (5) DRUCKREY, H.; IVANKOVIC, S. y PREUSSMANN, R. (1965): Selective induction of malignant tumors in the brain and spinal cord of rats with MNU. *Z. Krebsforsch* 66: 389-408.
- (6) DRUCKREY, H.; IVANKOVIC, S. y PREUSSMANN, R. (1966): Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after a single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature* 210: 1378-1379.
- (7) DRUCKREY, H.; LANDSCHÜTZ, C.; PREUSSMANN, R. e IVANKOVIC, S. (1970): The transplacental induction of malignant tumors of the nervous system. II. ENU in 10 genetically defines strains of rats. *Z. Krebsforsch* 73: 371-386.
- (8) GROSSI-PAOLETTI, E.; PAOLETTI, P.; PEZZOTTA, S.; SCHIFFER, D. y FABIANI, A. (1972): Tumors of the nervous system induced by ethylnitrosourea administered either intracerebrally or subcutaneously to newborn rats. Morphological and biochemical characteristics. *J. Neurosurg.* 37: 580-590.
- (9) GROSSI-PAOLETTI, E.; PAOLETTI, P.; PEZZOTTA, S.; SCHIFFER, D. y FABIANI, A. (1970): Experimental brain tumours induced in rats by nitrosourea derivatives. Part 2. Morphological aspects of nitrosoethylurea tumours obtained by transplacental induction. *J. Neurol.Sci.* 11: 573-581.
- (10) JÄNISCH, W. y SCHREIBER, D. (1977): Experimental tumors of the Central Nervous Ssystem. Bigner D. D. and Swenberg J. A. (Eds). Upjohn Co. Michigan.
- (11) JONES, E. L.; SEARLE, C. E. y SMITH, W. T. (1973): Tumours of the nervous system induced in rats by the neonatal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *J. Pathol.* 109: 123-139.
- (12) KLEIHUES, P.; ZÜLCH, K. J.; MATSUMOTO, S. y RADKE, U. (1970): Morphology of malignant gliomas induced in rabbits by systemic application of N-methyl-N-nitrosourea. *Z. Neurol.* 198: 65-78.
- (13) KLEIHUES, P.; LANTOS, P. L. y MAGEE, P. N. (1976): Chemical carcinogenesis in the nervous system. *Int. Rev. Exp. Path.* 15: 153-157.
- (14) KOESTNER, A.; SWENBERG, J. A. y WECHSLER, W. (1971): Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Pathol.* 63: 37-56.
- (15) KOESTNER, A.; SWENBERG, J. A. y WECHSLER, W. (1972): Experimental tumors of the nervous system induced by resorptive N-nitrosourea compounds. *Prog. Exp. Tumor Res.* 17: 9-30.
- (16) LANTOS, P. L. (1971): The effect of a single dose of N-ethyl-N-nitrosourea on the fine structure of the brain of the rat. *Experientia* 27: 1322-1323.
- (17) LANTOS, P. L. (1972): The fine structure of periventricular pleomorphic gliomas induced transplacentally by N-ethyl-N-nitrosoureas in BD-IX rats. With a note on their origin. *J. Neurol. Sci.* 17: 443-460.
- (18) LANTOS, P. L. (1980): Chemical induction of tumours in the nervous system. In: Brain Tumours. Scientific basis, clinical investigation and current therapy. Thomas D.G.T. and Graham D.I. Eds. Butterworth, London, pp. 85-108.

- (19) SCHIFFER, D.; FABIANI, A. y GROSSI-PAOLETTI, P. (1970): Experimental brain tumours induced in rats by nitrosourea derivatives. Part 1. Morphological aspects of methylnitrosourea tumours. *J. Neurol. Sci.* 11: 559-572.
- (20) SCHIFFER, D.; GIORDANA, M. T.; MAURO, A.; RACAGNI, G.; BRUNO, F.; PEZZOTTA, S. y PAOLETTI, P. (1980): Experimental brain tumors by transplacental ENU. *Acta Neuropathol.* 49: 117-122.
- (21) SCHIFFER, D.; GIORDANA, M. T.; PEZZOTTA, S.; LECHNER, C. y PAOLETTI, P. (1978): Cerebral tumors induced by transplacental ENU: Study of the different tumoral stages, particularly of early proliferations. *Acta Neuropathol.* 41: 27-31.
- (22) SWENBERG, J. A.; WECHSLER, W. y KOESTNER, A. (1972): The sequential development of transplacentally induced neuroectodermal tumors. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 31: 202-210.
- (23) WECHSLER, W. (1973): Transplacental Carcinogenesis. Tomatis, L. and Mohr, U. (eds.), p. 127. *IARC Sci. Publ. No. 4*, Lyon.
- (24) ZIMMERMAN, H. M. (1969): Brain tumors: their incidence and clasification in man and their experimental production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 159: 337-359.
- (25) LEAVER, D.; SWANN, P. F. y MAGEE, P. N. (1969): The induction of tumours in the rat by a single oral dose of N-nitrosomethylurea. *Br. J. Cancer* 23: 177-187.