

BID.T 4755

**UNIVERSITAT DE VALENCIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

**"TUMORES RENALES DEL HAMSTER DORADO SIRIO  
CONDICIONADOS POR N-ETIL-N-NITROSOUREA (ENU)  
Y DIETILESTILBESTROL (DES): SU HISTOGENIE Y  
CARACTERIZACION BIOLOGICA"**

Memoria presentada por el  
Licenciado en Medicina y Cirugía  
D. Antonio Cremades Mira para  
optar al grado de Doctor.

Valencia, Diciembre de 1994.



10001241974

Biblioteca Depòsit

UMI Number: U607485

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607485

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



T. 1230

BID. T 4755

ENTRADA	7/198
FACU...	
28...	



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA DE VALÈNCIA

En el día de hoy se ha procedido a la lectura de la tesis titulada:

TUMORES RENALES DEL HAMSTER DORADO SIRIO (CONOCI-  
CIONADOS POR N-etil-N-Nitrosourea (ENU) y dietil-  
estilbestrol (DES): SU HISTOGENIE Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA

de D. ANTONIO CREMADES MIRA

que ha obtenido la calificación de "APTO CUM LAUDE"

Firmado El Presidente del Tribunal, Dr. D. AMANDO PEYDRÓ OLAYA

El Secretario, Dr. D. AMANDO LUISA MORELL BUADRENO

El Vocal Dr. D. ANTONIO CARDESA GARCIA

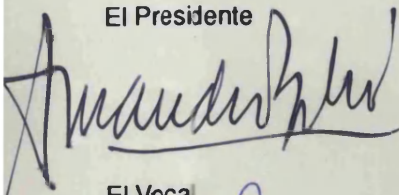
El Vocal Dr. D. FRANCISCO NOGALES FERNANDEZ

El Vocal Dr. D. FRANCISCO JAUER ROMERO

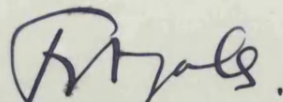
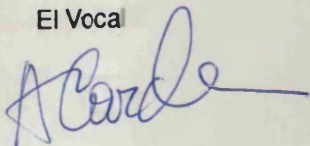
Valencia 23 de FEBRERO de 1995

El Secretario del Tribunal

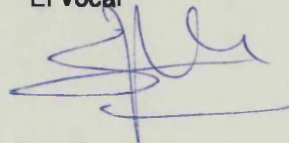
El Presidente



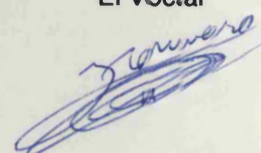
El Vocal



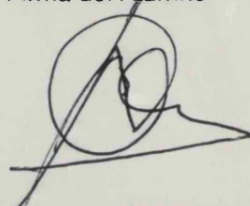
El Vocal



El Vocal



Firma del Alumno



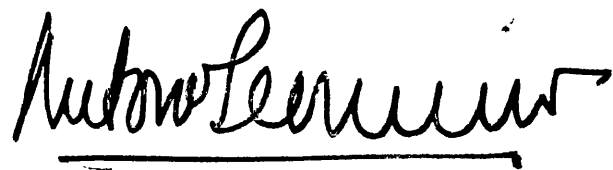
D. 1241935  
L. 1241974

R. 61030

**Don Antonio Llombart Bosch, catedrático de Anatomía Patológica, Histología y Embriología General y director del Departamento de Patología de la Universitat de Valencia,**

CERTIFICA: Que la presente tesis doctoral "Tumores renales del hámster dorado sirio condicionados por N-etil-N-nitrosourea (ENU) y dietilestilbestrol (DES): su histogenie y caracterización biológica" ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Patología por el Licenciado en Medicina y Cirugía D. Antonio Cremades Mira para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo la presente en Valencia, Diciembre de 1994.

A handwritten signature in black ink, reading "Antonio Llombart Bosch". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

Fdo. Prof. Dr. D. Antonio Llombart Bosch

<b>I-INTRODUCCION.</b> .....	<b>1</b>
<b>II- REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>4</b>
1-Tumores experimentales inducidos por N-etil-N-nitrosourea (ENU). .....	5
1.1. Perspectiva histórica. ....	5
1.2. Etilnitrosourea. Vías de administración, dosis, metabolismo y mecanismo de acción.....	7
1.2.1. Vías de administración. ....	7
1.2.2. Dosis. ....	9
1.2.3. Metabolismo. ....	9
1.3. Tumores inducidos en el hámster dorado sirio. ....	19
1.3.1.1. Hallazgos macroscópicos. ....	22
1.3.1.2. Hallazgos microscópicos. ....	23
1.3.1.3. Estudio inmunohistoquímico. ....	24
1.3.1.4. Estudio ultraestructural. ....	24
1.3.1.5. Cultivo de tejidos y citogenética. ....	25
1.3.1.6. Histogénesis. ....	26
1.3.2. Tumores renales. ....	27
1.3.3. Otros tumores. ....	28
2.1. Perspectiva histórica. ....	28
2.2. Estrógenos y tumores renales en el hámster. ....	30
2.2.1. Vías de administración. Inducción tumoral. ....	30
2.2.1.1. Factores que afectan a la inducción y crecimiento. ....	31
2.2.1.1.1. Sexo y edad. ....	31
2.2.1.1.2. Tipo de estrógeno, dosis y duración del tratamiento. ....	32
2.2.1.1.3. Combinación con otras hormonas y carcinógenos químicos. ....	33
2.2.1.1.4. Otros factores. ....	34
2.2.2. Metabolismo y mecanismo de acción. ....	36
2.2.2.1. Mecanismo epigenético (no-genotóxico). ....	37
2.2.2.2. Mecanismo genotóxico. ....	43
2.2.2.2.1. Estrógeno 2-/4-hidroxilasa. ....	45
2.2.2.2.2. Oxigenasas multisustrato dependientes del citocromo P-450. ....	46
2.2.2.2.3. Aril-hidrocarburohidroxilasa. ....	48
2.2.2.2.4. Sistema glutatión y otros enzimas antioxidantes. ....	48
2.2.2.2.5. Prostaglandín-H-sintetasa. ....	50
2.2.2.2.6. Unión de los metabolitos estrogénicos a DNA y otras macromoléculas celulares. ....	53
2.3. Tumores inducidos en el hámster dorado sirio. ....	62

2.3.1. Tumores renales.....	62
2.3.1.1. Hallazgos macroscópicos.....	62
2.3.1.2. Hallazgos microscópicos.....	64
2.3.1.2.1. Lesiones preneoplásicas.....	64
2.3.1.2.2. Lesiones neoplásicas.....	65
2.3.1.3. Histoquímica.....	68
2.3.1.4. Estudio inmunohistoquímico.....	69
2.3.1.5. Estudio ultraestructural.....	71
2.3.1.6. Cultivo de tejidos y citogenética.....	74
2.3.1.7. Trasplantes.....	78
2.3.1.7.1. Aspectos macroscópicos.....	79
2.3.1.7.2. Aspectos histológicos.....	80
2.3.1.7.3. Histoquímica.....	80
2.3.1.7.4. Ultraestructura.....	81
2.3.1.8. Histogénesis.....	82
<b>III- OBJETIVOS.....</b>	<b>86</b>
<b>IV- MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>89</b>
1- Animales y dieta.....	90
2- Carcinógenos y dosificación.....	90
3- Gonadectomía.....	91
4- Diseño experimental.....	92
5- Estudio morfológico.....	94
7- Estudio bioquímico y actividad de la DT-diaforasa.....	101
1- Obtención de muestras.....	101
2- Preparación de homogeneizados y obtención del citosol.....	101
3- Centrifugación.....	102
4- Determinación del contenido de proteínas.....	102
5- Determinación de la actividad DT-diaforasa.....	103
8- Trasplantes.....	104
9- Cultivos.....	105
1- Técnica de siembra por explantes.....	105
2- Técnica de digestión enzimática.....	106
3- Técnica para subcultivos.....	107
10- Citogenética.....	108
11- Evaluación estadística.....	110
<b>V- RESULTADOS.....</b>	<b>111</b>
1- frecuencia, tipos de tumores y periodos de latencia.....	112

1.1. Tumores de sistema nervioso periférico. ....	113
1.2. Tumores renales. ....	115
1.3. Otros tumores. ....	115
2. estudio morfológico. ....	117
2.1. Tumores de sistema nervioso periférico. ....	117
2.1.1. Hallazgos macroscópicos. ....	117
2.1.2. Hallazgos microscópicos. ....	118
2.2 Tumores renales. ....	122
2.2.1. Hallazgos macroscópicos. ....	122
2.2.2. Hallazgos microscópicos. ....	123
2.3. Otros tumores. ....	128
2.3.1. Glándula suprarrenal. ....	128
2.3.2. Cutáneos. ....	128
2.3.3. Intracraneales. ....	129
2.3.4. Aparato respiratorio. ....	129
2.3.5. Miscelánea. ....	129
3. estudio inmunohistoquímico. ....	130
3.1. Tumores de sistema nervioso periférico. ....	131
3.1.1. Benignos. ....	131
3.1.2. Malignos. ....	132
3.2. Tumores renales. ....	134
3.3. Otros tumores. ....	137
4. Estudio ultraestructural. ....	138
4.1. Tumores de sistema nervioso periférico. ....	139
4.2. Tumores renales. ....	140
5. Cultivos. ....	142
6. Citogenética. ....	144
1- Tumores renales. ....	156
1.1. Inmunohistoquímica. ....	159
1.2. Microscopía electrónica. ....	164
2- Tumores de sistema nervioso periférico (SNP). ....	166
2.1. Inmunohistoquímica. ....	170
2.2. Microscopía electrónica. ....	170
3. Citogenética. ....	171
4. Histogénesis del tumor renal del hds inducido por des. ....	174
<b>VIII- BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>182</b>



## **I- INTRODUCCION**

Podemos definir la carcinogénesis o cancerogénesis como un proceso de múltiples etapas o escalones impulsado por alteraciones genéticas o epigenéticas carcinógeno-inducidas en células sensibles que adquieren un crecimiento selectivo superior y experimentan una expansión clonal como resultado de la activación de protooncogenes y/o la inactivación de genes supresores tumorales (Harris, 1991).

Existen tres grandes grupos de factores etiológicos o causales extrínsecos en la carcinogénesis: virus oncogénicos, radiaciones y agentes químicos. Este último grupo ha sido reconocido como factor etiológico en la carcinogénesis humana desde el siglo XVIII y en el momento presente las sustancias químicas capaces de inducir neoplasias en animales de experimentación son muy numerosas, siendo consideradas como *presumibles* carcinógenos para los seres humanos.

Actualmente se calcula que entre el 60 y 90% de los cánceres humanos están provocados por agentes químicos, excluyendo el cáncer de piel producido por las radiaciones ultravioletas solares (Miller, 1978; Cardesa, 1990; Pardo Mindán, 1991). Dado el largo periodo de latencia en los cánceres humanos inducidos por sustancias químicas, en algunos casos de 20 años o más, se establecieron modelos experimentales animales para poder identificar y estudiar la actividad cancerogénica de sustancias químicas, definir sus mecanismos de acción, intentar reproducir tumores experimentales con marcadas semejanzas morfológicas a las neoplasias humanas y sentar criterios de tratamiento y prevención del cáncer.

La cancerogénesis química se convierte en una ciencia experimental en 1915 cuando Yamagiwa e Ichikawa reproducen tumores epiteliales malignos en las orejas del conejo tras aplicaciones tópicas repetidas de alquitrán mineral, que había sido previamente observado en trabajadores

con una intensa exposición al mismo (Haddow, 1959). Comprendiéndose como carcinogénesis o cancerogénesis química a un proceso en el cual, como consecuencia del efecto de factores de riesgo químico del cáncer, tiene lugar una irregular e incontrolada formación de novo de tejido (neoplasia). Las sustancias o combinación de sustancias que contribuyen al desarrollo del cáncer en el hombre y/o en modelos animales apropiados se denominan factores de riesgo químico del cáncer. Estos pueden subdividirse en dos grandes grupos básicamente: carcinógenos solitarios o completos y carcinógenos condicionales. Los carcinógenos completos pueden ser carcinógenos directos, que no requieren activación metabólica para ser efectivos (ej. N-nitrosometilurea y N-nitrosoetilurea), o carcinógenos indirectos (procarcinógenos), que requieren ser transformados a sus formas moleculares activas (carcinógenos últimos) en el metabolismo (ej. N-nitrosodietilamina, benzopireno y dietilestilbestrol) (Appel et al., 1990).

En el presente trabajo experimental estudiamos los efectos de dos carcinógenos completos, N-etil-N-nitrosourea (carcinógeno directo) y dietilestilbestrol (estrógeno sintético y carcinógeno indirecto), sobre el hámster dorado sirio aplicados primero de forma individual y, a continuación, de manera combinada buscando los efectos promotores del dietilestilbestrol sobre la carcinogénesis iniciada por la etilnitrosourea.

## **II- REVISION BIBLIOGRAFICA**

## **1-TUMORES EXPERIMENTALES INDUCIDOS POR N-ETIL-N-NITROSOUREA (ENU).**

### **1.1. Perspectiva histórica.**

Fue en la década de 1950 cuando se demostró la actividad carcinogénica de una nueva clase de sustancias químicas que constituyen el grupo de las *nitrosaminas, compuestos N-nitroso o alquilnitrosoureas*.

Barnes y Magee, en 1954, llamaron la atención sobre una sustancia, la N-nitrosodimetilnitrosamina (DMN), por su toxicidad humana demostrada en el uso industrial, y por ser tóxica en animales de laboratorio provocando especialmente necrosis hepática (Haddow, 1959). Fueron estos mismos autores quienes en 1956 describieron la producción de tumores hepáticos, y más tarde, en 1959, la inducción de tumores renales en ratas por este mismo agente químico (Wechsler et al, 1969; Hamilton, 1975).

Los compuestos N-nitroso forman un amplio grupo de sustancias carcinogénicas directas, extensamente empleadas en la inducción de tumores experimentales, entre las que destacan la dimetilnitrosamina (DMN), dietilnitrosamina (DEN), nitrosometilurea (NMU) y etilnitrosourea (ENU). El tipo de tumor inducido y la regularidad con la que son obtenidos va a depender de la especie animal y raza, de la sustancia seleccionada, la concentración de la misma y la vía de administración.

La etilnitrosourea ha sido y es uno de los carcinógenos más utilizado en modelos animales para la producción de tumores del sistema nervioso central y periférico. Los primeros estudios experimentales realizados con etilnitrosourea corresponden a Druckrey, Ivankovic y Preussmann (1966), quienes inyectaron una dosis única intravenosa de 80 mg/kg de peso corporal en el día 15 de gestación a ratas BD-IX. Todos los animales de las camadas

obtenidas presentaron malformaciones en las patas. En el 100% de la prole superviviente, después de un periodo de latencia de 160 días, aparecieron tumores de sistema nervioso central y periférico. En las madres no se encontraron tumores después de 360 días de observación. Tras estos hallazgos establecieron que: 1) una dosis única de un carcinógeno potente administrado a animales gestantes puede provocar efectos teratogénicos así como carcinogénicos en la prole, 2) el organotropismo del carcinógeno es inalterable, y 3) los embriones son más sensibles que los animales adultos.

Wechsler et al. (1969) indujeron leucemias y tumores de sistema nervioso central y de otros órganos en ratas adultas, requiriendo para ello dosis más altas (140-200 mg/kg de peso corporal) que para la inducción transplacentaria (5-80 mg/kg). Cuando administraron el ENU a ratas gestantes, obtuvieron un alto porcentaje de tumores neurogénicos malignos (superior al 90%) en la prole. Estos resultados fueron independientes del modo de aplicación (única o múltiple), de la vía utilizada (intravenosa u oral) y de la dosis administrada, no observándose cambios significativos en el tipo de neoplasias y su localización. Los tumores aparecieron solamente cuando el carcinógeno se aplicó después del día 12 de gestación, determinando que la susceptibilidad del sistema nervioso inmaduro a la inducción tumoral es al menos 50 veces mayor que en el animal adulto.

Jerry M. Rice (1969) estudió en diversos tipos de ratones la carcinogénesis transplacentaria por ENU, obteniendo adenomas y adenocarcinomas pulmonares, leucemias linfocíticas y hepatomas, no observando tumores neurogénicos ni renales. Indicó que la oncogénesis es máxima cuando se administra el carcinógeno en el último estadio de la gestación, cuando la organogénesis se ha completado (después del día 12 de gestación). Si los animales eran intoxicados antes de esta fecha, prevalecía la

teratogénesis sobre la carcinogénesis. Por otra parte, Druckrey et al. (1970a) administraron una dosis única de 5-80 mg/kg de ENU a ratas BD-IX a los 1, 10 y 30 días de vida, observando que la sensibilidad del sistema nervioso al ENU descendía cuando aumentaba la edad, mientras que la incidencia de tumores renales (nefroblastomas) se incrementaba con la edad al tratamiento y la dosis.

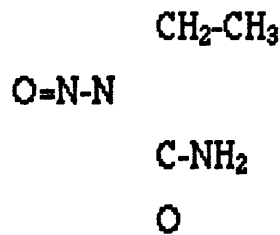
Givelber y Di Paolo (1969) administraron ENU a hámsters gestantes en el día 8 de embarazo no obteniendo efectos carcinogénicos, y apareciendo malformaciones severas de la región cefálica, ojos y tórax, junto con una alta incidencia de muerte y reabsorción fetal. Posteriormente, Mennel y Zülch (1972) y Rustia y Shubik (1974), indujeron en hámsters tumores de sistema nervioso periférico y nefroblastomas tras la administración prenatal de etilnitrosourea o sus precursores (etilurea y nitrito sódico).

La naturaleza múltiple de estos tumores, su distribución y la estrecha similitud morfológica con aquellos que ocurren en el ser humano recuerdan la enfermedad de von Recklinghausen (Bolande, 1977), siendo propuestos recientemente varios modelos experimentales para el estudio de esta enfermedad y de otras neurocristopatías humanas, destacando especialmente el hámster dorado sirio (Cardesa et al., 1982 y 1989; Nakamura et al., 1989; Muntané et al. 1991 y 1992).

## **1.2. Etilnitrosourea. Vías de administración, dosis, metabolismo y mecanismo de acción.**

### **1.2.1. Vías de administración.**

La etilnitrosourea es una alquilnitrosamida, clasificada en el grupo de las alquilnitrosoureas, con acción carcinogénica directa y la siguiente fórmula química:



Atraviesa con facilidad las barreras hematoencefálica y placentaria e induce una amplia variedad de tumoraciones en distintas especies de animales de laboratorio, destacando su neurotropismo cuando es utilizada por vía transplacentaria en ratas y hámsters. Este neurotropismo se conserva si el ENU es administrado por vía subcutánea (Druckrey et al., 1970a; Searle y Jones, 1972), intramuscular (Russell y Rubinstein, 1989), intravenosa (Koestner et al., 1971; Swenberg et al., 1972), intraperitoneal (Roscoe y Claisse, 1976), intracerebral o por absorción gástrica de sus precursores (etilurea y nitrito sódico) (Rustia y Shubik, 1974). También han sido estudiados los efectos carcinogénicos transgóticos del ENU en ratas hembras tratadas los últimos días de gestación por Turusov et al. (1988), comprobando que en las generaciones F2, F3, F4 y F5, que no tuvieron contacto directo con el ENU, desarrollaron una incidencia de tumores más alta estadísticamente que los ocurridos espontáneamente (los de mama, hipófisis y hematopoyéticos). Sin embargo, la incidencia de tumores del sistema nervioso fue similar al de los controles. Cuando fueron las ratas machos las tratadas, la incidencia de los tumores del sistema nervioso fue algo más alta que en los testigos. Posteriormente, Tomatis et al. (1990), observaron en la descendencia de ratas machos expuestas a ENU un leve aumento de tumores cerebrales no significativo comparado con los controles.

Se han apreciado algunas diferencias de especie en cuanto al tipo de tumores inducidos, así, por ejemplo, los conejos (Schreiber, 1990) y los



ratones (Rice, 1969) no desarrollan tumores del sistema nervioso periférico, y en el *Macacus rhesus* no se inducen tumores por el ENU (Schreiber, 1990).

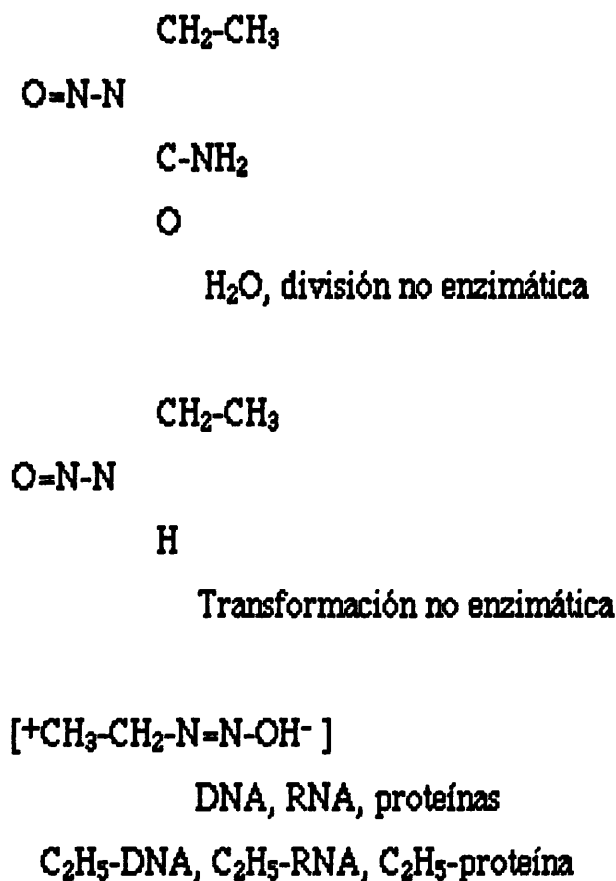
### **1.2.2. Dosis.**

La dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del ENU por vía intravenosa es de 240 mg/kg de peso corporal (Druckrey et al., 1966). Las dosis empleadas en la inducción tumoral por vía transplacentaria, sin observar alteraciones en las madres intoxicadas, oscila en general entre 1 y 100 mg/kg de peso corporal, siendo las dosis más frecuentemente usadas en la literatura las de 50 y 80 mg/kg. La incidencia de neoplasias, y el espectro tumoral, inducidas experimentalmente en las camadas es directamente proporcional a la cantidad de carcinógeno administrado, siendo su periodo de latencia y la supervivencia inversamente proporcional a la dosis. También, la localización de los tumores sufrirá cambios dependiendo de la dosis y tipo y raza de animal (Svenberg et al., 1972; Stoica y Koestner, 1984). Esta sustancia posee efectos teratogénicos si se administra en un periodo precoz del desarrollo embrionario, obteniéndose sus efectos oncogénicos en las camadas cuando se intoxica a las madres grávidas en la fase de organogénesis tardía, al final del embarazo, generalmente a partir del día 12 en ratas y ratones (Druckrey et al., 1966; Rice, 1969) o del día 8 en hámsters (Givelber y DiPaolo, 1969), dando lugar a un acusado incremento en el número de tumores inducidos cuando el ENU es administrado 24-48 horas antes del parto (Bolande, 1977; Wiggenhauser y Schmahl, 1987; Branstetter y Mosely, 1990). La intoxicación en animales recién nacidos, entre el primer y el décimo día, sigue manteniendo la susceptibilidad en la aparición de tumores (Druckrey et al., 1970a). Para la inducción de neoplasias en animales adultos es necesario el empleo de dosis mucho más altas (entre 140-200 mg/kg) (Wechsler et al., 1969).

### **1.2.3. Metabolismo.**

La etilnitrosourea es un agente alquilante con propiedades mutagénicas, teratogénicas y oncogénicas, que no requiere activación enzimática para desarrollar su toxicidad, puesto que puede reaccionar con agua o con grupos sulfhidrilo o amino u otros nucleófilos celulares, conduciendo a la formación de sustancias intermediarias alquilantes en numerosos lugares nucleofílicos en las células diana (Miller, 1978; Miller y Miller, 1981).

### N-ETIL-N-NITROSOUREA



**Esquema 1.-** Transformación in vivo de la N-etil-N-nitrosourea a un reactivo electrofílico (conversión espontánea a iones monoalquildiazonio) y su reacción con macromoléculas celulares (Modificado de Ruddon, 1987).

#### **1.2.4. Mecanismo de acción.**

El mecanismo de acción de los agentes alquilantes, como la etilnitrosourea, se mantiene todavía en discusión. La etilnitrosourea posee propiedades mutagénicas y oncogénicas (Malling y Wassom, 1977), produciendo diversas modificaciones de una o más bases del DNA. La porción de la molécula del ENU donde se supone que reside la base de la actividad oncogénica corresponde al catión etilo, actuando a nivel de los átomos de oxígeno de los ácidos nucleicos (Singer, 1976; Schreiber, 1990), siendo la formación de O<sup>6</sup>-alquilguanina la que juega un papel preferente en la neurooncogénesis, aunque la especificidad tisular de la producción tumoral no estaría necesariamente definida de manera exclusiva por la formación y/o persistencia de esta lesión en el DNA del tejido. La oncogénesis sería probablemente iniciada como una consecuencia de la compleja interacción entre la alquilación, reparación y replicación del DNA en aquellos tipos de células dentro de un tejido que finalmente da origen a tumores (Likhachev et al., 1983; Russell y Rubinstein, 1989). Scherer et al. (1989) encontraron una correlación cualitativa entre la capacidad tisular específica para inducir tumores y la formación de O<sup>6</sup>-alquilguanina; apoyando la hipótesis de que la modificación del DNA es necesaria para la iniciación de la oncogénesis por los carcinógenos químicos, y que la baja capacidad para la reparación de las lesiones promutagénicas, como la O<sup>6</sup>-alquilguanina, potencia este proceso.

La mayoría de los tumores cerebrales inducidos por ENU se encuentran en las paredes de los ventrículos laterales, el hipocampo, el tálamo y las áreas subcorticales de los hemisferios cerebrales (Jones et al., 1973); suponiéndose que se originan de las células indiferenciadas del área subventricular de los ventrículos laterales (la capa subependimaria) y de precursores de células gliales. Esta acción tumorigénica neurotrópica selectiva

se explicaría, parcialmente, porque estas células retienen su capacidad de reparación de la lesión del DNA inducida por el ENU durante el desarrollo del sistema nervioso central, característica que se correlaciona con su capacidad mitótica, la cual desaparece precozmente en las neuronas así como su capacidad de reparación del DNA, siendo por lo tanto más resistentes a la inducción tumoral (Heyting y van't Veer, 1981).

Es un hecho bien establecido que el ENU cuando se administra antes del día 12 de gravidez en ratas y hámsters actúa como un potente tóxico teratogénico (Rice, 1969; Givelber y DiPaolo, 1969; Nagao, 1988; Ohnishi, 1989), no obteniéndose efectos oncogénicos. Müller y Rajewsky (1983) estudiando la eliminación de la O<sup>6</sup>-etilguanina del DNA del cerebro y otros tejidos de la rata BD IX expuestas a ENU en diferentes estadios del desarrollo prenatal, observaron como uno de los factores que puede imposibilitar la acción carcinogénica del ENU antes del día 12 de gestación podría ser el tamaño crítico insuficiente de la población celular diana ( $<2 \times 10^5$  células/cerebro), el cual sería incompatible con un efecto neurooncogénico significativo del ENU, con independencia de la incapacidad de las células neurales para la eliminación enzimática de la O<sup>6</sup>-etilguanina del DNA.

La carcinogénesis transplacentaria inducida por ENU en ratones C3HeB/FeJ en los días 10, 13 y 15 de gestación para el estudio de la respuesta tumoral, la unión al DNA y la formación de complejos, puso de manifiesto que el nivel de unión del ENU al DNA fetal fue equivalente en todos los días de gestación estudiados, pero siendo significativamente inferior a la de los tejidos maternos; por lo tanto, la ausencia de respuesta tumorogénica al ENU en el ratón fetal expuesto precozmente en la gestación (día 10), no se debe a diferencias en la unión del ENU al DNA fetal durante el desarrollo (Branstetter et al., 1987). La exposición in vitro de *Escherichia coli* a ENU para determinar

cambios de bases específicos en el DNA genómico, condujo a la observación de que un 73 % de las mutaciones inducidas correspondieron a transiciones GC > AT, un 21 % a transiciones AT > GC, un 3 % a transversiones GC > CG y un 3 % a transversiones AT > CG; explicándose estas mutaciones por la alquilación del O<sup>6</sup> de la guanina seguido por unión con timina y por alquilación del O<sup>4</sup> de la timina dando un complejo que se aparearía con la guanina, para las mutaciones transicionales, y por alquilación del N<sup>1</sup> de la adenosina, para las mutaciones transversionales (Richardson et al., 1987; Lee et al., 1992). También se ha observado que el complejo O<sup>2</sup>-etiltimina puede ser una importante lesión premutagénica en células de mamíferos capaz de provocar mutaciones transversionales del par de bases AT (Eckert et al., 1988).

Jansen et al. (1994) estudiaron las mutaciones inducidas en el gen hipoxantina (guanina) fosforribosiltransferasa (*hprt*) por ENU en fibroblastos de rata in vivo, mutaciones que fueron dependientes de la dosis y predominantemente de tipo transversiones AT>TA. Espectro mutacional que difiere drásticamente del obtenido in vitro, lo cual indica que debe tenerse mucho cuidado en extrapolar los datos de la mutagénesis in vitro a la situación in vivo.

La lesión del DNA por alquilación del O<sup>6</sup>-guanina no ocurre de una manera aleatoria (Durante et al., 1989; Sendowski y Rajewsky, 1991), sino que la probabilidad para que una reacción por sustitución en el átomo O<sup>6</sup> nucleofílico ocurra va a estar condicionada por la secuencia de nucleótidos, la conformación del DNA y la estructura cromatínica. Así, una guanina 5' vecina, seguida por 5' adenina y 5' citosina, proporciona una condición *permissiva* para la O<sup>6</sup>-alquilación de la guanina central 10 veces superior que una 5' timina. La timina y la citosina fueron más *permissivas* cuando se situaron en 3' en comparación con sus efectos en 5'. En cultivo de células linfoblastoides

humanas tratadas con ENU se ha observado que las mutaciones estructurales ocurrieron más frecuentemente en loci polimorfos, no produciéndose por lo tanto de una forma casual y mostrando cierta predilección (Hanash et al., 1988).

No todas las interacciones del ENU con el DNA van a producir mutaciones. De hecho, todas las células tienen rigurosos mecanismos de reparación diseñados específicamente para restaurar tales lesiones, siendo uno de los principales mecanismos en las células eucarióticas la reparación por escisión. El estudio en células de rata de la capacidad relativa para la reparación enzimática específica de la O<sup>6</sup>-etilguanina, puso de manifiesto que la misma es un determinante crítico para el riesgo de malignización celular por el ENU (Thomale et al., 1990, 1994). Maher et al. (1990) y Bronstein et al. (1991, 1992b) estudiaron la contribución de la alquiltransferasa O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA (AGT) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER) en la protección de las células humanas a los efectos tóxicos y mutagénicos del ENU, indicando que la carencia de AGT o NER deterioraba significativamente la capacidad de las células humanas a resistir la lesión por etilación del DNA, aumentando significativamente la toxicidad y la mutagenicidad, y probando que la AGT y la NER actúan de un modo cooperativo en las células humanas para reparar las etilaciones del DNA, fundamentalmente la reparación de la O<sup>6</sup>-etilguanina (pero no de la O<sup>4</sup>-etiltimina ni la O<sup>2</sup>-etiltimina). Stammberger et al. (1990) observaron en fetos de ratas Wistar un intenso descenso en la actividad de la AGT 24 horas después del tratamiento con ENU, relacionándose con un aumento significativo en la incidencia de tumores cerebrales comparado con los controles, incidencia que disminuyó importantemente tras la inducción de la actividad AGT por irradiación, indicando que estos resultados corresponden probablemente a la inducción de la AGT. Cuando se usó la O<sup>6</sup>-bencilguanina,

un potente inhibidor de la alquiltransferasa, como pretratamiento en ratas intoxicadas posteriormente con ENU, se indujo una modesta aceleración en la aparición de tumores y una reducción de la supervivencia media no estadísticamente significativa, sugiriendo que la AGT juega sólo un papel limitado en la modulación de la carcinogénesis por ENU, o que la dosis administrada de bencilguanina no fue suficiente para alterar significativamente la persistencia de residuos guanina O<sup>6</sup>-sustituidos en el DNA producidos por el ENU (Lijinsky et al., 1994).

Ultimamente se ha llamado la atención sobre el papel que la mitocondria y el DNA mitocondrial juegan en la carcinogénesis (Baggetto, 1993). El DNA mitocondrial es más accesible a la acción de agentes mutágenos y carcinógenos que el DNA nuclear al no estar protegido por las histonas. Su estructura circular superarrollada favorece la unión de agentes alquilantes, encontrándose en ratas expuestas in vivo a ENU una activa eliminación enzimática del producto de alquilación del DNA formado, O<sup>6</sup>-etil-2'-deoxiguanosina, del DNA mitocondrial del hígado, mientras que en el riñón fue eliminado con un rendimiento moderado y en el DNA mitocondrial del cerebro no se observó su eliminación (Sato et al., 1988), estando en relación con la acción organotrópica de este agente químico.

Otros autores (Wen et al., 1990; Wen, 1991) estudiando la síntesis no-planificada de DNA (que se relaciona con el DNA dañado y la reparación por escisión) y la mutación en el locus hipoxantina (guanina) fosforribosiltransferasa (HPRT), sugieren que los mecanismos de reparación del DNA en las células del hámster son menos precisos y más inestables que los de las células humanas al encontrar una frecuencia mucho más baja de síntesis no-planificada de DNA en las células humanas, indicando que las células del hámster realmente llevan a cabo la reparación del DNA, correcta o aberrante,

más frecuentemente que las células humanas, mostrando estas últimas una mayor estabilidad cromosómica.

En la membrana mitocondrial interna se localiza el proto-oncogén *bcl-2* que cuando es sobreexpresado bloquea la muerte celular programada (apoptosis) de los linfocitos pre-B (Hockenbery et al., 1990), estando por lo tanto involucrado en la transformación tumoral de la célula y teniendo un papel en el normal circuito de comunicación núcleo-mitocondria. Los próximos pasos en el estudio de la carcinogénesis mitocondrial deben enfocarse en las complejas relaciones núcleo-mitocondriales, en las que este oncogén celular de localización mitocondrial está envuelto. El gen *bcl-2* parece orquestar la vida y la muerte celular a través de un programa genético que todavía permanece sin descubrir (Baggetto, 1993), habiéndose demostrado recientemente que el *bcl-2* se asocia con la proteína R-Ras p23, pudiendo alterar la capacidad de esta última para la transmisión de señales, interrumpiendo el camino de la transducción de la señal apoptótica (Fernandez-Sarabia y Bischoff, 1993).

La activación mutacional de otros proto-oncogenes celulares es un acontecimiento importante en el desarrollo de los tumores inducidos por carcinógenos químicos. Bargmann et al. (1986) observaron en tumores de rata inducidos transplacentariamente por ENU la activación del oncogén *neu*. Este gen controla la síntesis de una proteína de 185 kDa que comparte una extensa homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y es probable que sea un alelo del proto-oncogén humano *c-erbB2* (Barbacid, 1990; Harnden, 1992). En schwannomas de los nervios craneales y espinales inducidos en ratas F344 por ENU se ha encontrado una activación del oncogén *c-neu* e identificado una mutación transversional específica T-A en la secuencia de DNA que codifica la región o dominio transmembrana supuesto de la



proteína *neu* (Perantoni et al., 1987). Este oncogén mutado no se ha encontrado en gliomas ni en otras neoplasias inducidas por agentes químicos en estas ratas (Rice y Ward, 1988). Posteriormente, Perantoni et al. (1989), evaluaron la activación del oncogén *c-neu* en schwannomas inducidos por ENU en hámsters dorados sirios y en ratones C3H, encontrando que el *c-neu* está constantemente activado en los schwannomas malignos obtenidos e indicando que es un factor importante en la transformación celular y desarrollo de estos tumores del sistema nervioso.

Investigaciones realizadas sobre schwannomas de trigémino inducidos en ratas por ENU demostraron la presencia, en todos ellos, de mutaciones por transversión TA > AT en el nucleótido 2012 del gen *neu* (*erbB-2*). Esta mutación no se observó en ninguno de los tumores de médula espinal y cerebro aislados de los mismos animales. Las células tumorales portadoras del alelo mutante *neu* se hicieron detectables a partir del día 7 después de la administración del carcinógeno. Una mutación específica del gen *neu* representó de este modo un paso muy precoz, probablemente el primero, en la transformación maligna de las células de Schwann inmaduras de rata expuestas a ENU in vivo y fue diagnóstica para un subgrupo de células proliferativas con alto riesgo de progresar hacia la expresión de fenotipos totalmente malignos. La pérdida de heterocigocidad para el alelo mutante *neu* es un acontecimiento aspirante para un segundo paso crítico en el proceso (Nikitin et al., 1991). Recientemente, Nakamura et al. (1994a), han demostrado en neurofibromas inducidos por ENU en hámsters una mutación altamente específica en el proto-oncogén *neu*, siendo negativa en los melanomas y tumores de Wilms del mismo animal y en los tumores humanos de células de Schwann. Este mismo autor (Nakamura et al., 1994b) observó una fuerte expresión del producto del gen de la neurofibromatosis 1 (NF1), la

neurofibromina, en las células de Schwann del hámster, disminuyendo la frecuencia de células positivas en los neurofibromas, pero mostrando una unión específica a anti-NF1 en las células de Schwann neoplásicas, expresión que fue más alta en las células tumorales bien diferenciadas que en las células inmaduras con mayor potencia proliferativa, sugiriendo que este gen podría participar en la diferenciación y regulación del crecimiento de la célula de Schwann, que actuaría como un supresor tumoral y que la mutación del gen *neu* provocada por el ENU podría regular la expresión del mismo.

Breuer et al. (1991) en estudios sobre ratones *pim-1* transgénicos, en los que indujeron linfomas por intoxicación con ENU, observaron que en la mayoría de los tumores existía una expresión muy elevada de *c-myc*, probablemente como un efecto directo o indirecto del ENU. El análisis de los linfomas para mutaciones *ras* demostró que aproximadamente el 10 % de los linfomas tenían una mutación *ras*. Estos datos indicaron que al menos alguna de estas mutaciones no son el resultado directo de la alquilación por ENU sino que más bien representan mutaciones espontáneas que ocurrieron más tardíamente en el proceso de la oncogénesis.

Los tumores renales y esofágicos inducidos por ENU en ratas contienen una alta incidencia de mutaciones transicionales G > A en el gen *p53* que están localizadas casi selectivamente (89 %) en la primera base del codón 204 y en la segunda base del 213, conduciendo a las sustituciones de aminoácidos Glu > Lis y Arg > Gln, respectivamente. Todos los nefroblastomas inducidos presentaron mutaciones dobles en los codones 204 y 213 del exón 6; sugiriendo una acción selectiva sobre los mismos en las neoplasias inducidas por ENU, que el compromiso de la inactivación del *p53* durante la carcinogénesis sucede con un alto grado de especificidad tisular (no ocurrió en neoplasias de estómago y cerebro) y que la O<sup>6</sup>-etildeoxiguanosina es

la responsable de estas mutaciones (por el hallazgo de que la mayoría de las sustituciones de bases son transiciones G > A) (Ohgaki et al., 1992).

Por último, en tumores pulmonares inducidos por ENU en ratones A/J se encontró en todos ellos mutaciones en el gen K-ras siendo la mayoría (64 %) transiciones AT > GC en la segunda base del codón 61, el resto contenía predominantemente una transición GC > AT en la segunda base del codón 12 del gen K-ras. Prácticamente la totalidad de las mutaciones observadas en el gen K-ras son compatibles de derivar de los complejos promutagénicos O<sup>6</sup>-etilguanina y O<sup>4</sup>-etilimina formados por el ENU en el DNA (You et al., 1992).

### **1.3. Tumores inducidos en el hámster dorado sirio.**

Una amplia variedad de tumores son provocados por el ENU cuando se administra por vía transplacentaria en el hámster dorado sirio. Vamos a ocuparnos de describir los aspectos más importantes, desde el punto de vista anatomopatológico, de los dos grupos de neoplasias que con más frecuencia y en mayor número aparecen, los tumores de sistema nervioso periférico y los tumores renales, y dentro de estos últimos principalmente nos extenderemos en los nefroblastomas. Haremos un tercer grupo en el que incluiremos un breve resumen de aquellas neoplasias que característicamente también aparecen con el ENU, pero que son mucho menos frecuentes y no están relacionadas directamente con los objetivos de la presente tesis.

#### **1.3.1. Tumores del sistema nervioso periférico (SNP).**

Son los tumores más frecuentes, clasificándose como schwannomas y neurofibromas, pudiendo ser benignos y malignos, y

apareciendo a nivel intracraneal, raíces de médula espinal y sistema nervioso periférico (frecuentemente subcutáneos).

Hasta la fecha pocos trabajos se han publicado sobre la inducción transplacentaria de tumores del SNP en el hámster dorado sirio desde que en 1966 Druckrey et al. llamasen la atención sobre el neurotropismo de la etilnitrosourea cuando era administrada prenatalmente en ratas BD IX. La mayoría de los trabajos de inducción transplacentaria de tumores del SNP con ENU han sido desarrollados en ratas, al mostrar estas una mayor susceptibilidad y organotropismo, y por ser tumores que en estos animales espontáneamente aparecen de forma esporádica y muy raramente, características que también se dan en el hámster dorado sirio (Cardesa et al., 1982). Con la particularidad de que en este último, además de schwannomas como los que aparecen en ratas y ratones, desarrollan tumores que recuerdan a los neurofibromas plexiformes del ser humano (Nakamura et al., 1989; Muntané et al., 1992).

Ivankovic y Druckrey (1968) indujeron tumores del sistema nervioso en hámsters dorados por administración gástrica de ENU (60 mg/kg) en el día 11 a las madres gestantes, tipificándolos como neurinomas malignos. También obtuvieron tumores del sistema nervioso central (gliomas mixtos).

En 1969, Givelber y DiPaolo, administraron el ENU por vía intraperitoneal en el día 8 de gestación para estudio de los efectos teratogénicos y carcinogénicos en la prole, observando que mientras los efectos teratogénicos fueron máximos con el tratamiento en el día 8, los efectos oncogénicos no se asociaron con este tipo de tratamiento, apareciendo un único tumor en una cría de la camada (ovario quístico).

Mennel y Zülch (1972) provocaron neurinomas y neurosarcomas del nervio trigémino en la prole tras la inyección intravenosa de 30 mg/kg

ENU a las madres en el día 15 de gestación, no apareciendo tumores del sistema nervioso central.

Se han inducido tumores del sistema nervioso periférico en las camadas tras la administración gástrica de los precursores del ENU, etilurea y nitrito sódico, en hámsters gestantes durante los últimos días de embarazo, obteniéndose neurinomas y neurofibromas benignos y malignos, y apreciándose diferencias en la incidencia entre ambos sexos estadísticamente significativas (69 % en hembras; 12,5 % en machos), sugiriendo que los estrógenos juegan un importante papel en el desarrollo y crecimiento de estas neoplasias (Rustia y Shubik, 1974).

Pelfrene y Love (1977) publicaron la producción de melanomas, neurinomas y nefroblastomas por la administración transplacentaria con aplicación tópica cutánea de ENU en hámsters.

En los hámsters adultos intoxicados por vía intraperitoneal (Likhachev et al., 1983) se observó una distribución completamente distinta de los tumores inducidos. Así, la localización principal fue a nivel gástrico, fundamentalmente papilomas de células escamosas, no apareciendo tumores de los sistemas nerviosos periférico y central. Resultados que coincidieron con los obtenidos por Lijinsky, Knutsen y Kovatch (1985) y Lijinsky y Kovatch (1989), encontrando estos autores también una alta incidencia de hemangiosarcomas esplénicos y de tumores de cérvix, contrastando claramente con el amplio espectro de tumores inducidos por este carcinógeno en las ratas y en los hámsters hijos cuando se administra por vía transplacentaria.

Nakamura, Hara y Kasuga (1989) indujeron tumores del SNP en 45 de 60 hámsters nacidos (75%) tras la administración transplacentaria de 100 mg/kg de peso a las hembras en el día 16 de gestación. Los hallazgos histológicos, inmunohistoquímicos y de microscopia electrónica pusieron de

manifiesto la semejanza con los neurofibromas humanos, recordando su patrón de crecimiento y distribución a la neurofibromatosis de von Recklinghausen humana. Otros tumores que se obtuvieron con una menor frecuencia fueron melanomas (10%), feocromocitomas (5%) y tumores de Wilms (21,7%).

Muntané et al. (1991) indujeron tumores del SNP en el 17,6% de los animales nacidos de las hembras hámster tratadas con una dosis única de ENU (30 mg/kg en los días 13, 14 y 15 de gestación), clasificándose histológicamente como neurofibromas, algunos de ellos comparables a los neurofibromas plexiformes humanos.

#### **1.3.1.1. Hallazgos macroscópicos.**

Estos tumores pueden ser únicos o múltiples, uni- o bilaterales, apareciendo de forma simultánea en el tiempo o en distintos periodos de la vida del animal. Se presentan con mayor frecuencia en las hembras y la localización más común es a nivel subcutáneo, seguido de las cavidades abdominal y torácica (Nakamura et al., 1989), adyacentes a la musculatura paravertebral mediastínica, retroperitoneal o pélvica. También se puede demostrar macroscópicamente su origen de grandes nervios periféricos, como el nervio ciático, plexo braquial, plexo lumbosacro o plexo mientérico intestinal.

Suelen constituir masas redondas u ovaladas, relativamente bien circunscritas, salvo cuando adoptan un patrón infiltrativo de los tejidos próximos, y no encapsuladas, aunque ocasionalmente pueden presentar una cápsula incompleta o completa si permanecen confinadas por el epineurio. A veces se aprecia como crecen en relación con nervios y forman masas o estructuras plexiformes a lo largo del mismo. Su consistencia es variable, desde masas blandas de aspecto mixoide hasta tumoraciones firmes y elásticas. A la sección son normalmente lisas, brillantes y de coloración blanco-grisácea; menos habitualmente pueden presentar cambios degenerativos con áreas

quísticas conteniendo líquido claro o serohemático, hemorrágicas o de necrosis (principalmente en las neoplasias de larga evolución). Si la tumoración es de localización dérmica podría observarse ulceración superficial de la misma.

### **1.3.1.2. Hallazgos microscópicos.**

Los neurofibromas microscópicamente están constituidos por un crecimiento proliferativo de las distintas células que componen el nervio periférico: células de Schwann, fibras nerviosas, fibroblastos y colágena. Siendo el componente principal de estas neoplasias las grandes áreas de células de Schwann fusiformes, redondas o discretamente elongadas laxamente distribuidas en una delicada matriz fibrilar, cambiando la densidad celular de unas zonas a otras de la tumoración. Ocasionalmente en el seno del tumor o en la periferia del mismo pueden aparecer haces de fibras nerviosas, clasificándose entonces como neurofibromas plexiformes. También pueden observarse grupos de estructuras lamelares que forman cuerpos tactoides tipo Wagner-Meissner. Las células tumorales individuales poseen una cantidad variable de citoplasma eosinófilo fibrilar mal delimitado que se confunde con el estroma. Los núcleos son únicos, ovalados, con una cromatina reticular o finamente granular, no observándose normalmente nucléolos y siendo de pequeño tamaño cuando aparecen. Frecuentemente estos tumores presentan en el estroma un infiltrado por células cebadas junto con algunas células linfoides.

Los neurinomas son nódulos encapsulados constituidos por fascículos cortos de células fusiformes que pueden adoptar una disposición organoide con ordenaciones nucleares en empalizada (cuerpos de Verocay), junto con áreas celulares (Antoni tipo A) alternando con áreas laxas (Antoni tipo B). Estos tumores muestran una tendencia mayor a cambios degenerativos con formaciones quísticas, degeneración mixoide y necrosis.

Las formas malignas se van a caracterizar por una mayor densidad celular, disminución de la cantidad de estroma, invasión de los tejidos vecinos, pleomorfismo celular y nuclear marcado con aumento de la relación nucleocitoplásmica, aumento de la actividad mitótica con presencia de ocasionales figuras mitóticas atípicas y focos de necrosis, abscesificación, hemorragia o ulceración principalmente en los de localización subcutánea. Pueden también presentar en áreas focales las características descritas para los schwannomas y neurofibromas. Raramente se observan metástasis a distancia en otros órganos.

#### **1.3.1.3. Estudio inmunohistoquímico.**

Pocos trabajos se han publicado hasta la fecha en los que se haya incluido un estudio del fenotipo celular de los tumores del sistema nervioso periférico obtenidos en el hámster dorado sirio por intoxicación por ENU. Nakamura et al. (1989 y 1991) indicaron la positividad de las células tumorales tipo Schwann a la proteína S-100, así como la presencia de positividad periférica citoplásmica en las células tumorales para la laminina y positividad para la fibronectina en la matriz extracelular. Muntané et al (1992) observaron heterogeneidad en el fenotipo de las células tumorales con la inmunotinción para proteína básica de la mielina (MBA) y para lectinas de germen de trigo (WGA), Ricinus (RCA), cacahuete (PNA) y Canavalina (ConA). Nakamura et al. (1994b) estudiaron la expresión del producto del gen NF1 (neurofibromina) en las células de Schwann del hámster, hallando una fuerte expresión del mismo en las células de Schwann de los nervios periféricos normales, disminuyendo la frecuencia de células positivas en los neurofibromas y encontrando positividad en los focos de diferenciación schwanniana de los melanomas primarios y trasplantados.

#### **1.3.1.4. Estudio ultraestructural.**



Estas neoplasias están constituidas principalmente por células de Schwann y fibroblastos. Las células de Schwann se caracterizan por poseer prolongaciones citoplásmicas que se entrelazan en un patrón laminar, rodeadas por una membrana basal continua y con aisladas vesículas de pinocitosis. En el citoplasma se pueden observar de forma dispersa retículo endoplásmico rugoso, polisomas, aparato de Golgi y abundantes microfilamentos. Los núcleos son ovoides o elongados en forma de cigarro-puro. Las células fibroblásticas tienen un citoplasma más pequeño y pobremente desarrollado con retículo endoplásmico rugoso dilatado, no existiendo membrana basal (Rustia y Shubik, 1974; Nakamura et al., 1989).

#### **1.3.1.5. Cultivo de tejidos y citogenética.**

No se han publicado hasta la fecha trabajos de investigación que incluyan estos estudios en tumoraciones del sistema nervioso periférico obtenidos por la administración de ENU por vía transplacentaria en el hámster dorado sirio.

Ensayos in vitro con diversos carcinógenos químicos, entre ellos el ENU, permitieron observar en cultivos secundarios de células fetales de hámster dorado sirio, y solamente en aquellos originalmente expuestos a dietilnitrosamina (DENA) y ENU, el desarrollo de áreas de células orientadas aleatoriamente y en acúmulos que permitieron un diagnóstico de transformación celular. El estudio cromosómico de estas líneas transformadas demostró que, independientemente del carcinógeno, la moda cromosómica estuvo normalmente próxima a la diploide, con algunas líneas presentando marcadores cromosómicos. Los más comunes fueron un número aumentado de cromosomas telocéntricos en el grupo 16 a 19 y una pérdida de uno de los cromosomas metacéntricos pequeños del par 20 (DiPaolo et al., 1973).

Laerum y Rajewsky (1975), en cultivos de líneas celulares derivadas de tumores de sistema nervioso inducidos por ENU en ratas, pudieron comprobar la frecuente presencia de varios tipos de aberraciones cromosómicas (no especificadas) y poliploidía que osciló desde cariotipos diploides a hexaploides.

Lantos et al. (1976) estudiaron la morfología de tumores de SNC inducidos por ENU en ratas (gliomas pleomórficos malignos), reteniendo las células cultivadas su morfología glial.

Rubinstein et al. (1976) describieron cuatro tipos celulares en cultivos de schwannomas malignos de ratas inducidos por ENU. La célula neoplásica más frecuente correspondió a células uni-, bi- y tripolares, relativamente de pequeño tamaño, de contorno angulado y largas prolongaciones afiladas, ocasionalmente ramificadas. El núcleo fue oval, hipercromático o con un pequeño nucleolo central. El segundo tipo estuvo formado por sábanas de células pequeñas indiferenciadas, en estrecho contacto, de contornos citoplásmicos muy mal definidos y núcleo redondo u oval que con frecuencia contenía uno o más nucleolos. El tercer tipo de célula, muy frecuente, lo constituyeron células bipolares elongadas pálidas con un citoplasma ligeramente fibrilar y un núcleo grande, oval, con un nucleoplasma claro, conteniendo uno o frecuentemente dos nucleolos pequeños. Por último, el cuarto tipo fue interpretado como macrófagos cargados de hemosiderina hallados en la zona periférica de crecimiento.

#### **1.3.1.6. Histogénesis.**

Estudios de inmunofluorescencia, inmunohistoquímicos y de microscopia electrónica indican que la célula de Schwann es el principal componente proliferante en los neurofibromas del hámster, dada su inmunotinción para proteína S-100 y laminina y la presencia de una membrana

basal continua que las rodea. También se ha indicado que las células fibroblásticas pueden participar en la formación del tumor por la riqueza en fibronectina de la matriz extracelular de los neurofibromas. Existe la posibilidad de que estas células fibroblásticas en los tumores del hámster y en los neurofibromas humanos no sean verdaderos fibroblastos sino células primitivas derivadas de la cresta neural con capacidad de diferenciación schwanniana (Nakamura et al., 1989).

### **1.3.2. Tumores renales.**

Ha sido muy poco estudiada la producción de tumores renales en el hámster dorado sirio por la etilnitrosourea dado su organotropismo casi específico sobre el sistema nervioso periférico y central. Escasos trabajos relatan la aparición de neoplasias renales en el hámster, siendo uno de los más recientes el de Nakamura et al (1989), donde comunican la producción de nefroblastomas en el 21,7% de la prole estudiada, apareciendo el primero de ellos a las 27 semanas de vida, y siendo los segundos en frecuencia por detrás de los tumores del sistema nervioso periférico.

Histológicamente presentaron el típico patrón trifásico, con elementos tumorales epiteliales, estromales y blastemales, encontrando ocasional formación de cartílago. Inmunohistoquímicamente fueron negativos para la proteína S-100 y la neurofibromina (Nakamura et al. 1989, 1994b).

Trabajos previos de Mennel y Zülch (1972), Rustia y Shubik (1974) y Pelfrene y Love (1977) ya indicaron la aparición de nefroblastomas en la descendencia de hámsters intoxicados con etilnitrosourea por diversas vías, pero con una menor frecuencia, y estando estos trabajos basados primordialmente en el estudio de los tumores del sistema nervioso periférico obtenidos.

Estudios de cultivos celulares y citogenéticos en estos tumores renales inducidos por el ENU en hámsters no han sido publicados. Nagashima et al. (1989) establecieron y caracterizaron una línea celular epitelial inmadura derivada de un nefroblastoma de rata inducido por ENU, morfológicamente formada por células poligonales o fusiformes, de escaso citoplasma y núcleo relativamente grande. El crecimiento fue en monocapa y las células fusiformes tendían a disponerse en un patrón ondulado paralelo. Ultraestructuralmente se observaron ocasionales lucas intercelulares con proyecciones tipo microvellosidades y uniones desmosómicas inmaduras. El análisis cromosómico mostró una amplia distribución del número cromosómico, variando entre 22 y 88, con un número modal de 44 y otro pequeño pico alrededor de 88. El cariotipo modal fue de 44, XY, +1, +4, -12, +mar.

### **1.3.3. Otros tumores.**

Otras neoplasias que se han comunicado tras la administración transplacentaria de ENU, y que ocurren con mucha menor frecuencia, son melanomas (Rustia y Shubik, 1974; Pelfrene y Love, 1977; Nakamura et al, 1989; Muntané et al, 1991; Nemoto et al., 1993), tumores del sistema nervioso central (Ivankovic y Druckrey, 1968, -gliomas mixtos-; Nakamura et al, 1989, -oligodendrogliomas-) y otros tumores de aparición esporádica como carcinoma de células escamosas de la piel, adenoma hepático o tumor de células lipídicas del ovario (Nakamura et al, 1989).

## **2- TUMORES EXPERIMENTALES INDUCIDOS POR DIETILESTILBESTROL (DES).**

### **2.1. Perspectiva histórica.**

La relación más directa entre la carcinogénesis y la fisiología endocrina fue descubierta por Lacassagne cuando, en 1932, observó que la inyección de hormonas sexuales femeninas en ratones machos, bajo determinadas condiciones favorables (castración), provocaba la aparición de neoplasias de mama, y por Cook y Dodds (1933) cuando mostraron que determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos podrían presentar una leve actividad estrogénica además de la actividad carcinogénica (Haddow, 1959). Estas investigaciones significaron el inicio de múltiples experiencias que tomaron como base al hámster dorado sirio, por ser el único animal de laboratorio en el que tras un tratamiento prolongado con sustancias estrogénicas, y habiendo sido previamente gonadectomizado, aparecían neoplasias renales hormonodependientes. Siendo de gran interés este modelo experimental para el estudio de los mecanismos implicados en la carcinogénesis hormonal, y en particular en la oncogénesis renal.

Vázquez-López (1944) trabajando en hámsters dorados sirios para la inducción de tumores en la pars intermedia de la hipófisis por tratamiento crónico con estrógenos naturales y artificiales, observó casualmente una neoformación renal en un hámster unos 300 días después del implante subcutáneo de un pellet de estilbestrol, estimando que esta lesión renal era secundaria a los tumores de hipófisis o de epidídimo presentes en el mismo. Kirkman (1959) propuso más tarde que estas neoplasias renales eran idénticas a las observadas inicialmente por Matthews, Kirkman y Bacon (1947), quienes hicieron patente la peculiar susceptibilidad que posee el hámster dorado sirio para el desarrollo de neoplasias renales como respuesta a la administración prolongada de estrógenos. Posteriormente, estas observaciones fueron confirmadas y ampliadas por Kirkman y Bacon (1950, 1952a), Horning (1954, 1956), Kirkman (1957, 1959) y Llombart-Bosch (1964).

## **2.2. Estrógenos y tumores renales en el hámster.**

Los tumores renales espontáneos en los hámsters son muy raros. Pour et al. (1976) estudiando la frecuencia de las neoplasias del tracto urogenital en dos colonias de hámsters sirios, colonias Eppley y Hannover, no hallaron tumores renales espontáneos en la colonia Hannover mientras que en la Eppley encontraron una incidencia del 0,7% en las hembras y del 0% en los machos. Siendo muy interesante que a pesar de esta baja proporción de tumores renales espontáneos, los estrógenos poseen una acción única y muy bien definida en el riñón del hámster, induciendo neoplasias renales múltiples y bilaterales en el hámster sirio macho intacto y castrado, con una incidencia que se aproxima al 100% (Kirkman y Bacon, 1952a,b). En cambio, las hámsters hembras intactas u ovariectomizadas manifiestan una incidencia tumoral mucho más baja tras la exposición crónica a los mismos estrógenos y a dosis efectivas en los machos (Kirkman, 1959b).

### **2.2.1. Vías de administración. Inducción tumoral.**

El DES es un estrógeno sintético no esteroideo, derivado del estilbeno, que presenta efectos carcinogénicos en animales y seres humanos por exposición prenatal (transplacentaria) y posnatal.

El primer ejemplo claro de carcinogénesis transplacentaria en el hombre fue descubierto por Herbst y Scully (1970) al observar la aparición en mujeres jóvenes, cuyas madres habían sido tratadas con DES durante el embarazo, de adenocarcinomas de células claras de vagina. Rustia y Shubik (1976), posteriormente, estudiaron el efecto en la descendencia de hámsters sirios expuestos al DES en los últimos días de la gestación, encontrando hasta un 50% de neoplasias en el sistema reproductor de las hembras, no apreciándose adenocarcinomas vaginales de células claras. En los machos se

observaron granulomas de epidídimo y testículo y quistes de epidídimo. También existe experimentalmente evidencia (Walker, 1984) de que el tratamiento prenatal con DES aumenta la incidencia de carcinomas de útero y ovario en la segunda generación de ratones que no fueron directamente expuestos al carcinógeno.

La actividad carcinogénica por exposición posnatal al DES en humanos se ha observado en pacientes con síndrome de Turner (Cutler et al., 1972), síndrome de Sheehan (Reid y Shirley, 1974) o con carcinoma de mama metastásico (Khandekar et al., 1978) tratados por periodos prolongados con DES, mostrando una alta incidencia de carcinoma endometrial. En la experimentación con animales de laboratorio, Lacassange, como ya se comentó anteriormente, fue el primero en demostrar la cancerogenicidad del DES por inducción de tumores de mama en ratones machos.

Los estrógenos, tanto naturales como sintéticos, se pueden absorber a través de la piel y de las mucosas, del tracto digestivo o por vía parenteral (Brugger, 1978). Las dos vías de administración del DES más frecuentemente empleadas para la inducción tumoral renal en el hámster sirio son la inyección subcutánea (diaria o bien en días alternos) o el implante subcutáneo de pellets de absorción retardada (que se reponen cada 3-4 meses), siendo el periodo de latencia de producción tumoral con ambos métodos similar (entre 6 y 9 meses).

#### **2.2.1.1. Factores que afectan a la inducción y crecimiento tumoral.**

##### **2.2.1.1.1. Sexo y edad.**

Los tumores renales son fácilmente desarrollados por los hámsters machos castrados y no castrados expuestos al DES, con cifras de incidencia que oscilan desde el 69% (Llombart-Bosch y Peydró, 1975) hasta el

100% (Kirkman, 1959a; McGregor et al., 1960), y no siendo excesivamente importante la edad al inicio del tratamiento (Kirkman y Bacon, 1952b). Las hembras maduras e intactas, en cambio, muestran resistencia a la inducción tumoral, consiguiéndose superar esta resistencia por el empleo de animales gonadectomizados, iniciando el tratamiento hormonal en el metestro tardío (periodo de mínima secreción de progesterona, al final del cuarto día del ciclo) o antes de la madurez reproductiva y, por último, masculinizando irreversiblemente la hipófisis por tratamiento en el nacimiento con propionato de testosterona. Aunque se use alguno de los métodos mencionados, el porcentaje de tumores obtenidos en las hembras siempre será inferior al de los machos (Kirkman, 1959b).

#### **2.2.1.1.2. Tipo de estrógeno, dosis y duración del tratamiento.**

Una amplia variedad de estrógenos, naturales y sintéticos, se han empleado para la inducción de las neoplasias renales, encontrándose entre ellos grandes diferencias en cuanto a su potencia cancerogénica y periodos de latencia, y presentando dos características únicas, que les diferencian de otros carcinógenos químicos clásicos, como son la capacidad para iniciar y promover el crecimiento tumoral por sí mismos y el requerimiento de un tratamiento estrogénico prolongado. Kirkman (1959a) empleó el DES, estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol y el ácido 7-metilbisdehidroisonólico (Fenocylin), observando que los más potentes y con un menor periodo de latencia son el DES y el estradiol (incidencia tumoral del 100% y periodo de latencia entre 6 y 8 meses). Lacomba y Gabaldón (1971) y Llombart-Bosch y Peydró (1975) usaron el DES monoglucurónico (DESGA) y el DES dimetiléter (DESME), no apreciando inducción tumoral con el primero y obteniendo un periodo de latencia mayor (8-10 meses) y menor incidencia tumoral (aproximadamente del



30% a los 10 meses del inicio de la intoxicación) con el DESME que con el DES. Li et al. (1983) obtuvieron unos resultados comparables, pero siempre inferiores al DES y estradiol, con la equilina, a-dienestrol y hexestrol. Finalmente, otros estrógenos sintéticos como el 2,4-dideuterioestradiol (Liehr, 1983) y el E-3',3'',5',5''-tetrafluorodietilbestrol (Liehr et al., 1983) han mostrado una potencia carcinogénica superponible al DES y estradiol.

Kirkman y Bacon (1952b) calcularon que la dosis mínima de DES requerida para la inducción de tumores renales en los hámsters machos no castrados se situaba entre 0,09 mg (pellets implantados subcutáneamente) y 0,03 mg (inyecciones subcutáneas de solución salina o aceite de sésamo) por día y administrada durante 180 días. Si este tratamiento era cesado bruscamente, el crecimiento del tumor se detenía ocurriendo una regresión del mismo con disminución de su tamaño, quistificación y, por último, licuefacción; volviendo a reaparecer los nódulos tumorales si el tratamiento estrogénico se reinstauraba, demostrándose de esta forma que los tumores renales en el hámster no son lesiones autónomas y que dependen de los estrógenos para su inducción y crecimiento (Kirkman, 1959a; McGregor et al., 1960).

#### **2.2.1.1.3. Combinación con otras hormonas y carcinógenos químicos.**

La administración conjunta de DES con determinadas hormonas como el propionato de testosterona, progesterona, acetato de deoxicorticosterona (Kirkman, 1959a), provoca una importante inhibición de la tumorigénesis renal en el hámster. El tratamiento con prolactina y DES no modifica los resultados obtenidos sólo con el DES (Hamilton, 1975). La cortisona cuando se administra con el DES (Kirkman, 1959a) aumenta la incidencia de tumores y de metástasis.

Los agentes antiestrogénicos, nafoxidina, enclomifeno y tamoxifeno, inhiben parcial o completamente el desarrollo de tumores renales cuando se administran junto con el DES (Li et al., 1980; Liehr et al., 1988).

La 2-bromo-alfa-ergocriptina, alcaloide del cornezuelo de centeno, agonista dopaminérgico e inhibidor de la secreción de prolactina, cuando se administra junto con DES provoca una disminución importante o desaparición completa de los tumores renales en los hámsters (Hamilton et al., 1975).

El carcinógeno químico 20-metilcolantreno reduce la incidencia y crecimiento de los tumores en los hámsters tratados con DES (Kirkman y Horning, 1957), mientras que el tetracloruro de carbono la aumenta (Llombart-Bosch, 1964).

Otras sustancias no hormonales que actuarían sobre la aparición de neoplasias renales en los hámsters intoxicados con DES serían el etanol (Li et al., 1990), que intensificaría la cancerogenicidad estrogénica, y la vitamina C (Liehr y Wheeler, 1983) y determinados moduladores del metabolismo estrogénico, como el 2(3)-t-butil-4-hidroxianisol (BHA) y el dicumarol (Roy y Liehr, 1990), que ocasionarían una disminución de la incidencia tumoral.

#### **2.2.1.1.4. Otros factores.**

La nefrectomía (Horning, 1954) y la ureterectomía unilateral (Ising, 1956) provocan una disminución del periodo de latencia y un mayor tamaño de los tumores inducidos.

Además de la inducción de tumores renales, el DES causa agrandamiento macroscópico con hiperplasia, frecuentemente neoplasia, del lóbulo intermedio de la hipófisis (Vazquez-Lopez, 1944). También induce en el lóbulo anterior un aumento altamente significativo en el número de células productoras de prolactina y un descenso significativo en la frecuencia de células

basófilas y secretoras de somatotropina (Hamilton et al., 1975). Cuando se añadió al tratamiento con DES un inhibidor de la prolactina (2-bromo-alfa-ergocriptina), se observó un evidente cambio en la incidencia tumoral renal en los hámsters, disminuyendo su número e incluso llegando a desaparecer. Histológicamente esta droga también bloqueó la capacidad del DES para producir hipertrofia del lóbulo intermedio, una región de la hipófisis que normalmente sintetiza hormona estimulante de los melanocitos. Esta última hormona mostró un aumento significativo en sus niveles medios séricos en los animales tratados con DES, encontrándose en ratas que la 2-bromo-alfa-ergocriptina inhibe la secreción de la misma (Hamilton et al., 1977). Estos resultados implicaron a la hipófisis, y concretamente a la prolactina, en la génesis de los tumores renales inducidos con DES en el hámster dorado sirio.

Hámsters machos orquidectomizados a los que se practicó una hipofisectomía, fueron tratados posteriormente con pellets de DES durante 12-15 meses, no presentando ninguno de ellos tumores renales en la autopsia (Lin et al., 1982).

Kurl et al. (1990) comprobaron que la formación tumoral renal estuvo precedida por un aumento del peso de la hipófisis y la elevación de la hormona estimulante de los melanocitos y la prolactina. El desarrollo de los tumores y el agrandamiento del lóbulo intermedio de la hipófisis se acompañó de un descenso de la prolactina (a niveles normales) pero no de la hormona estimulante de los melanocitos. La hipofisectomía, la castración y la timectomía redujo los niveles séricos de la hormona estimulante de los melanocitos

Logan y Benson, en 1990, comunican que el mantenimiento en la oscuridad de los hámsters tratados con DES ocasiona una reducción del crecimiento y tamaño de los tumores renales, indicando la importancia del

sistema neuroendocrino en la modulación de los tumores inducidos por DES en el hámster.

Recientemente se ha obtenido la evidencia del compromiso hipotalámico en el mecanismo de la cancerogénesis por dietilestilbestrol (Smith y Walker, 1992). La interrupción de la diferenciación sexual hipotalámica en el feto es una de las hipótesis para explicar las anomalías del sistema reproductivo en las hembras y de la aparición de cáncer tras la exposición prenatal a dietilestilbestrol.

### **2.2.2. Metabolismo y mecanismo de acción.**

En general, los esteroides son metabolizados e inactivados fundamentalmente en el hígado, y los metabolitos inactivados son excretados por el riñón (Cook y Beastall, 1987). El metabolismo del DES tiene un gran interés, especialmente por la sospecha de que los productos intermedios tóxicos pueden generarse durante su degradación, estando íntimamente unidos su catabolismo y la actividad cancerogénica.

Los metabolitos mayores del DES en varias especies de animales de laboratorio, entre ellas el hámster, son el dienestrol y el *w*-hidroxidienestrol, pensándose que tienen su origen desde metabolitos intermedios quinona y epóxido. Estas sustancias intermedias han sido propuestas como los metabolitos reactivos del DES (Metzler, 1975).

Las hormonas esteroideas representan una de las categorías de moléculas reguladoras más importante, controlando el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, así como los procesos metabólicos. Actualmente se desconoce el mecanismo a través del cual el DES ejerce su actividad cancerogénica. Uno de los mecanismos propuestos estaría ligado a su actividad hormonal, íntimamente relacionada con los receptores estrogénicos celulares y el control hormonal de la expresión de determinados

protooncogenes, pudiendo causar un trastorno del crecimiento o diferenciación que se expresaría en forma de cáncer (mecanismo de acción epigenético). Un segundo mecanismo implicaría la transformación del DES a sustancias moleculares reactivas (carcinógenos últimos) durante su metabolismo, que podrían provocar una mutación cromosómica o genética en una célula o grupo de células (mecanismo genotóxico).

#### **2.2.2.1. Mecanismo epigenético (no-genotóxico).**

Una de las principales características del riñón del hámster es su capacidad para comportarse como un órgano dependiente y sensible a la acción de los estrógenos. Ya Kirkman en 1959 sugiere que el estrógeno por sí mismo, antes que uno de sus metabolitos, es el responsable de la inducción neoplásica. Ghaleb (Bloom et al., 1963a) trabajando con DES marcado con tritio, encontró evidencias para una acción cancerogénica directa del estrógeno sobre el epitelio renal del hámster, sospechando una posible relación entre la cancerogénesis renal en el hámster y la unión del DES a proteínas celulares renales.

La observación de receptores estrogénicos en los tumores del hámster estrógeno-dependientes y en los trasplantes tumorales, dependientes o independientes, fue puesta de manifiesto por Steggle y King en 1972. Estos autores describieron la presencia de receptores citoplásmicos (4S u 8S+4S) y nucleares (5S) en todos los tumores estudiados, no siendo esto necesariamente una prueba de su dependencia estrogénica, al no poder demostrar una correlación entre la sensibilidad a los estrógenos y el contenido en receptores de los tumores.

Li et al. (1974) y Anderson et al. (1979) demostraron como estos receptores aumentaban su concentración con el tratamiento estrogénico, estando relacionado este aumento con la duración del mismo, apoyando el concepto de una respuesta mediada por receptor en la génesis tumoral renal por estrógenos.

También observaron como en los riñones de ratas castradas aparecían cantidades insignificantes de tales receptores, siendo este hallazgo particularmente interesante ya que los tumores renales no son inducidos por los estrógenos en la rata.

La presencia de receptores de progesterona citosólicos también ha sido descrita (Li y Li, 1975), observándose un gran incremento de su concentración tras el tratamiento prolongado con estrógenos (Li et al., 1976). Este suceso podría explicar el efecto inhibitor de la progesterona en la tumorigénesis renal cuando se administra simultáneamente con el DES (Kirkman, 1959a).

Cortés-Vizcaíno (1990) y Cortés-Vizcaíno y Llombart-Bosch (1993) encontraron una positividad en el 50% de los casos estudiados para los receptores de estrógeno y progesterona, obteniendo una relación proporcional del índice de positividad con el tamaño tumoral y el grado de diferenciación para ambos tipos de receptores. Los receptores de estrógeno presentaron, además, una correlación con el tiempo de exposición y los sucesivos estadios de la cancerogénesis.

Otros receptores identificados en el riñón del hámster son los receptores de andrógenos (dihidrotestosterona) (Li y Li, 1975) y los receptores de esteroides adrenocorticales (dexametasona y aldosterona) (Li et al., 1979). Todos estos receptores esteroideos citosólicos una vez unidos a sus respectivas hormonas sufren una translocación nuclear, habiéndose identificado un receptor nuclear distinto y específico de cada uno de ellos en las neoplasias renales inducidas por estrógenos (Li et al., 1979).

La presencia en el tejido tumoral renal del hámster de cinco receptores esteroideos distintos y específicos, hace de este sistema un modelo

único para el estudio de la influencia de las diferentes hormonas sobre la neoplasia y para la investigación de las posibles interacciones hormonales.

Li y Li (1978, 1981) demostraron que el receptor de progesterona renal inducido por estrógenos en el hámster podía ser significativamente reducido por el tratamiento simultáneo con antiestrógenos, andrógenos y progestágenos sintéticos. La importancia de este sistema progesterona-receptor estrogénico en el riñón del hámster quedó demostrada por la completa inhibición del crecimiento tumoral estrógeno-inducido por los antiestrógenos, progesterona y andrógenos (Kirkman, 1959a; Antonio et al., 1974; Liehr et al., 1988).

Anderson et al. (1979) observaron en sus estudios la presencia de receptores específicos citosólicos y nucleares para el estradiol- $H^3$ , tanto en los animales normales como en los que portaban tumor, y el aumento de estos dos parámetros durante el proceso de inducción tumoral, apoyando este hecho el concepto de una respuesta mediada por receptores en la tumorigénesis renal por estrógenos en el hámster. Así mismo, demostraron que no existía un aumento espectacular de la captación esteroidea por el núcleo de las células tumorales ni un receptor de inusual afinidad o cantidad en el hámster, sospechando, por lo tanto, que otras acciones indirectas del estradiol podían tener la misma importancia o más en la aparición de este tumor renal.

Liehr et al. (1982) realizando estudios sobre una nueva línea celular establecida (H-301) desde un tumor renal estrógeno-dependiente del hámster (Sirbasku y Kirkland, 1976) postularon la existencia de un mecanismo indirecto para el crecimiento de las células tumorales que requiere la estimulación inicial de factores de crecimiento polipeptídicos específicos por los estrógenos en riñón o hígado, al comprobar que la mitogénesis aumentaba

notablemente cuando las células tumorales H-301 eran expuestas en cultivo a extractos hepáticos o renales de hámsters tratados con estrógenos.

Liehr (1983) y Liehr et al. (1986) demostraron la separación de las actividades cancerogénica y hormonal, al observar como dos compuestos de potencia estrogénica muy semejante, estradiol y 2-fluoroestradiol, no poseían la misma capacidad oncogénica. Estos autores no detectaron tumores renales en los animales expuestos al 2-fluoroestradiol. También, Li y Li (1984) encontraron que el etinilestradiol, un potente estrógeno sintético, produce solamente una incidencia tumoral del 20%, proponiendo que mientras la actividad hormonal puede ser necesaria para la actividad tumurogénica, puede no ser suficiente para llevar a cabo la transformación renal.

Los receptores esteroideos tienen la capacidad específica de unirse a hormonas, fijarse al DNA modulando la transcripción de genes diana por su interacción con secuencias específicas génicas y, por último, la activación de genes provocando efectos específicos a nivel transcripcional (Carson-Jurica et al., 1990). La amplitud de los productos regulados por los estrógenos no es conocida, pero incluye la producción de numerosas proteínas, muchas de las cuales están involucradas en la regulación de la síntesis de DNA y del crecimiento celular. De esta forma, los estrógenos pueden estimular la proliferación tumoral vía factores de crecimiento como segundos mensajeros. Se ha demostrado en cultivos de células renales de hámsters tratados con estrógenos (Beleh et al., 1993) la producción de una proteína semejante al factor de crecimiento alfa-transformante (TGF-alfa) y una proteína semejante al factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). La inducción de estos factores de crecimiento puede jugar un papel importante en la tumurogénesis en los riñones del hámster, incluyendo la proliferación celular y la vascularización del tejido tumoral. Chang et al. (1992) llevaron a cabo un



análisis morfológico de los cambios inducidos en el córtex renal del hámster por el dietilestilbestrol, mostrando que después de los primeros tres meses de tratamiento el riñón del hámster desarrolló focos displásicos y su masa fue mayor que la de los controles. El incremento de los componentes renales incluyó, en la región de la unión yuxtamedular, glomérulos, túbulos y vasos. Indicando que estos focos displásicos podían ser el ulterior lugar de la neoplasia, mientras que el incremento de la masa renal podría ser un resultado de la expresión/adaptación al estrógeno exógeno que podría contribuir al proceso cancerogénico.

El crecimiento de líneas celulares estrógeno-dependientes puede ser mantenido en ausencia de estradiol, si las células son suplementadas con factores de crecimiento que normalmente son inducidos por los estrógenos. Así mismo, se ha observado que los antagonistas estrogénicos en los tumores dan lugar a una inhibición de la producción de los factores estimuladores autocrinos, impidiendo de este modo el crecimiento tumoral. Otra función igualmente importante de los antiestrógenos es la estimulación de la secreción por las células tumorales de factor de crecimiento beta-transformante, un potente inhibidor de la proliferación de las células epiteliales (Horak y McGee, 1992).

En carcinomas de células renales humanos (Peter et al., 1989) se ha demostrado la expresión de altos niveles de factor de crecimiento alfa-transformante y del receptor para el factor de crecimiento epidérmico en comparación con el parénquima renal normal. En el tumor de Wilms, Ogawa et al. y Rainier et al. (1993), encontraron que existía un aumento de la expresión de RNA mensajero del factor de crecimiento tipo insulina II (IGF2 mRNA) como resultado de un incremento de la dosis génica o expresión bialélica del gen IGF2, que podría dar lugar a un ritmo alterado de

transcripción y consecuentemente modificar el patrón de síntesis de IGF2 durante el ciclo celular; proponiendo un nuevo mecanismo mutacional epigenético en la carcinogénesis, denominado "relaxation of genomic imprinting".

Los genes que codifican algunos de estos factores de crecimiento muestran extensas secuencias análogas a los oncogenes (por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y c-sis, y el receptor de factor de crecimiento epidérmico con c-erb-B), lo que sugiere la implicación de estos factores de crecimiento en la génesis del cáncer (Lorenzen et al., 1992).

Se han llevado a cabo diversos estudios de proliferación celular durante la cancerogénesis renal estrógeno-inducida en hámsters, tanto in vivo como in vitro. Oberley et al. (1989) estudiaron la proliferación celular inducida por estrógenos en cultivo del epitelio tubular proximal renal del hámster, observando que los efectos proliferativos de los estrógenos en el crecimiento de las células del túbulo proximal fueron específicos de especie, ya que el 17  $\beta$ -estradiol no alteró el crecimiento en cultivo de otros túbulos proximales de rata o de cerdo de Guinea. Estos autores apreciaron un incremento importante en el número de mitosis en el cultivo a los 7-10 días de exposición a los estrógenos, así como un aumento de la timidina tritiada en las células tubulares, indicando estos resultados que los estrógenos pueden inducir directamente la proliferación celular epitelial primaria a concentraciones fisiológicas y proporciona una fuerte evidencia del importante papel hormonal en la transformación neoplásica del riñón del hámster.

Estudios morfológicos in vivo en hámsters (Gonzalez et al., 1989; Oberley et al., 1991; Banerjee et al., 1992) han puesto de manifiesto la presencia de áreas de hiperplasia reparativa tubular secundaria al daño provocado por el tratamiento estrogénico prolongado junto con lesiones

intersticiales compuestas por células redondas pequeñas indiferenciadas, células primitivas intersticiales pluripotenciales comprometidas con la vía de diferenciación epitelial y consideradas origen de este tumor.

Finalmente, Liehr et al. (1992) demostraron por primera vez la sobreexpresión de los protooncogenes c-fos, c-myc y c-jun en los tumores renales de hámsters tratados con estradiol, en el tejido renal adyacente no tumoral y en las metástasis abdominales de los tumores renales. Esta expresión aumentada de los tres oncogenes comienzan a observarla a partir del 5º mes de tratamiento continuado con estradiol, periodo de tiempo en el que los tumores todavía no son observados, alcanzando un nivel de expresión comparable con los tumores más viejos a los 7 meses de tratamiento. Destacando estos autores la posible relación entre la sobreexpresión de tales oncogenes celulares y la inducción y crecimiento de los tumores renales en el hámster.

#### **2.2.2.2. Mecanismo genotóxico.**

Desde que Liehr (1983) y Li et al. (1983) pusieron de manifiesto la separación entre la actividad hormonal de los estrógenos y su capacidad cancerogénica, surgió la evidencia de que el modelo de los receptores por sí solo era insuficiente para explicar totalmente el proceso de transformación tumoral en el riñón del hámster. Creyéndose que ambas propiedades de los estrógenos, hormonal y cancerogénica, actúan conjuntamente para llevar a cabo los cambios neoplásicos en el hámster y que el modo por el que estas hormonas son metabolizadas por el riñón era de importancia crucial.

Los primeros autores en considerar la necesidad de una activación metabólica de los estrógenos, para la obtención de un metabolito estrogénico que actuase como agente cancerogénico último, fueron Kirkman y Bacon en 1952. Esta idea ha sido retomada más recientemente por McLachlan et al. (1978) y Liehr et al. (1982), proponiendo estos autores una acción oncogénica

vía oxidación metabólica de los estrógenos y obtención de carcinógenos últimos, que se unirían covalentemente al DNA o a otras macromoléculas celulares e inducirían diversas alteraciones.

Por lo tanto, el DES actuaría como una sustancia cancerogénica solitaria o completa (Appel et al., 1990) que mostraría un pronunciado organotropismo, con actividad inductora y promotora tumoral, y siendo suficiente por sí mismo para el desarrollo de tumores en el organismo expuesto a él.

Los estrógenos, en general, han mostrado en los ensayos mutagénicos a corto plazo (test de mutagenicidad bacteriana de Ames) incapacidad para la inducción de mutaciones génicas (McCann et al., 1975; McCann y Ames, 1976), observándose, no obstante, con el DES inducción de síntesis no planificada de DNA (Tsutsui et al., 1984), cambios numéricos cromosómicos (Tsutsui et al., 1983), desorganización del huso mitótico por interacción DES-microtúbulos (Sharp y Parry, 1985), aneuploidia (Tsutsui et al., 1983) y aumento de la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (Rudiger et al., 1979).

Se han estudiado diversas vías metabólicas de activación de los estrógenos, intentando explicar los efectos genotóxicos de los mismos y de sus metabolitos en el proceso de la tumorigénesis renal en el hámster dorado sirio. Los principales sistemas enzimáticos implicados son: la estrógeno 2- y 4-hidroxilasa, las oxigenasas multisustrato dependientes del citocromo P-450, la aril-hidrocarbon hidroxilasa, el sistema glutatión y otros enzimas antioxidantes, y la prostaglandin-H-sintetasa.

Así, se ha podido estudiar (Roy y Liehr, 1988) la actividad de los enzimas reductores del metabolismo de los fármacos (citocromo P-450, citocromo b5 y NADH:citocromo c reductasa), enzimas del metabolismo del

glutación (glutación peroxidasa, glutación transferasa y gamma-glutamyl transpeptidasa) y las enzimas "limpiadoras" de radicales libres (superóxido dismutasa, catalasa y quinona reductasa) en el tejido tumoral del riñón del hámster, siendo su actividad significativamente inferior a la encontrada en el tejido renal no tratado y estando la actividad de estas enzimas en el tejido que rodea al tumor entre los valores observados en el tumor y el riñón control.

#### **2.2.2.2.1. Estrógeno 2-/4-hidroxilasa.**

La estrógeno 2- y 4-hidroxilasa es una enzima microsomial que metaboliza los estrógenos a compuestos catecol en el riñón del hámster (Li y Li, 1984), observándose posteriormente (Li y Li, 1987) que por lo menos el 60 % de la actividad de esta enzima está localizada en el córtex renal, región donde surgen con más frecuencia las neoplasias. Li et al. (1985) demostraron que la actividad de esta enzima y la formación de estrógenos catecol era significativamente más alta en el riñón del hámster que en el tejido correspondiente de ratas Sprague-Dawley, después del tratamiento con diversos estrógenos. Cuando a los hámsters tratados con estrógenos se les incorporó en su dieta la alfa-naftoflavona, un inhibidor de las monooxigenasas multisustrato microsómicas, se apreció una marcada reducción en la inducción de tumores renales en los hámsters, que se correspondió con un importante descenso de la actividad de la estrógeno 2-/4-hidroxilasa y en la formación de compuestos catecol en el tejido renal. Poniéndose, por lo tanto, de manifiesto la importancia de esta vía metabólica en la tumorigénesis renal inducida por estrógenos en el hámster dorado.

Los dos compuestos principales catecol obtenidos, 2- y 4-hidroxiestrógenos, han mostrado tener distinta potencia cancerogénica. Liehr et al. (1986a) demostraron que la actividad del 4-hidroxiestradiol es comparable a la del estradiol, mientras que el 2-hidroxiestradiol no posee capacidad

inductora tumoral debido a la rápida metilación y aclaramiento metabólico de este estrógeno catecol por la catecol-O-metiltransferasa (Li y Li, 1987). Otra acción del 2-hidroxiestradiol es la inhibición de la metilación del 4-hidroxiestradiol por la catecol-O-metiltransferasa (Liehr, 1990), habiéndose propuesto que un aumento de los 4-hidroxiestrógenos precede a la inducción del tumor renal por estrógenos.

La catecol-O-metiltransferasa (COMT) es una enzima citosólica ubicua que tiene un papel importante en la inactivación de los estrógenos catecol sintéticos y naturales. La catecol-O-metiltransferasa y el ácido ascórbico inhiben la unión covalente de los metabolitos estrogénicos reactivos a las proteínas microsomiales del riñón e hígado del hámster (Haaf et al., 1987), habiéndose observado que los metabolitos responsables de esa unión covalente de carácter irreversible a los microsomas son quinoides derivados de los catecoles previamente formados en el metabolismo estrogénico.

También existen variaciones en la actividad de esta enzima en los tejidos de distintos roedores (Li et al., 1989). Así, mientras el riñón del hámster posee una moderada actividad de COMT, el hígado y los hematíes del hámster están casi desprovistos de tal actividad enzimática comparado con el ratón y la rata. Por lo tanto, es concebible que un tratamiento crónico de estrógenos a altas dosis induzca elevadas concentraciones de estrógenos catecol, que excederían la capacidad de la COMT para catalizar estos metabolitos activos a inactivos, acumulándose y contribuyendo a la cancerogenicidad estrogénica observada en el hígado y riñón del hámster.

#### **2.2.2.2.2. Oxigenasas multisustrato dependientes del citocromo P-450.**

Este grupo enzimático comprende la citocromo P-450, citocromo b<sub>5</sub>, NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa y NADPH citocromo c reductasa. Todos

ellos presentaron descenso de sus niveles en el hígado del hámster tras tratamiento estrogénico, siendo más acusado en las dos últimas (Li y Li, 1984).

Liehr et al. (1986b) demostraron que los catecolestrógenos o el dietilestilbestrol son oxidados a semiquinonas y quinonas por la actividad peroxidativa del citocromo P-450, compuestos que han sido considerados metabolitos intermedios reactivos del metabolismo estrogénico. También se ha demostrado (Beyer y Juchau, 1987) que los estrógenos endógenos (17-beta estradiol) pueden ser convertidos por el citocromo P-450 a sustancias intermedias embriotóxicas, sugiriéndose que los metabolitos próximos reactivos son precatecoles, quizá epoxienonas.

Adams y Notides (1987) sugirieron que el citocromo P-450 en el córtex renal del hámster metaboliza el DES a especies reactivas que se unen covalentemente a macromoléculas, unión irreversible que es descendida por los inhibidores del citocromo P-450 (dietilaminoetil 2,2-difenilpentanoato HCL; metirapona; hidroxitolueno butilado y dicumarol). Datos apoyados también por Roy y Liehr (1990), cuando apreciaron un descenso importante de la incidencia tumoral renal en hámsters tratados con dos moduladores del metabolismo estrogénico, butilhidroxianisol (BHA) y dicumarol, que ocasionan una disminución de la actividad peroxidativa renal del citocromo P-450 e implican a las quinonas formadas por la oxidación metabólica de los estrógenos catecol en la mediación de la carcinogénesis estrógeno-inducida.

Roy y Liehr (1989) estudiaron la formación de DES-quinona en los riñones e hígados de hámsters adultos machos y hembras, neonatos y fetos, y en útero y placenta. La formación de este metabolito ocurrió en todos los tejidos investigados, siendo inhibida cuando se pretrataba a los hámsters con ácido ascórbico o alfa-naftoflavona. Estos resultados apoyaron el papel del DES-quinona en la carcinogénesis DES-inducida. Pero los autores no

encontraron correlación entre las concentraciones de DES-quinona y la especificidad del tejido diana de los tumores DES-inducidos, indicando que la oxidación del DES a DES-quinona y la genotoxicidad de este metabolito podían ser un evento necesario pero no suficiente en el desarrollo tumoral, y que el crecimiento hormono-dependiente de las células iniciadas puede ser también necesario para la aparición de los tumores.

Roy et al. (1991) observaron como probablemente el citocromo b5 participa en la oxidación del DES a DES-quinona por interacción con el citocromo P-450 y en la reducción del DES-quinona a DES por interacción con el citocromo b5 reductasa, demostrando de este modo que el citocromo b5 juega un activo papel en las reacciones biológicas de oxidación y reducción.

#### **2.2.2.2.3. Aril-hidrocarburo hidroxilasa.**

Esta enzima desempeña un importante papel en el metabolismo oxidativo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en los tejidos de los mamíferos hacia posibles sustancias reactivas cancerogénicas. Dada la similitud química de estos compuestos con los estrógenos, Li et al. (1983a) y Li y Li (1984) estudiaron la actividad de esta enzima en los microsomas hepáticos y renales del hámster gonadectomizado e intacto, apreciando que el tratamiento estrogénico provocó un importante descenso de la actividad de la aril-hidrocarburo hidroxilasa renal, pero no hepática, en los hámsters castrados comparado con los animales no tratados; proponiendo que esta supresión de la actividad enzimática inhibiría la transformación de los metabolitos estrogénicos hacia sustancias menos cancerogénicas, o quizá facilitaría su metabolismo hacia formas más reactivas.

#### **2.2.2.2.4. Sistema glutatión y otros enzimas antioxidantes.**



Muchos trabajos experimentales se han llevado a cabo para determinar la relación de estos sistemas enzimáticos y la carcinogénesis química, incidiendo especialmente en la reacción de los mismos con los metabolitos de los carcinógenos o en la importancia de prevenir los enlaces con macromoléculas celulares o con el DNA.

Las actividades enzimáticas más estudiadas relacionadas con el glutatión han correspondido a la glutatión transferasa, glutatión peroxidasa, glutatión disulfuro reductasa y la gamma-glutamyl-transpeptidasa. Otras actividades enzimáticas estudiadas corresponden a enzimas "barredoras" de radicales libres, entre ellas la DT-diaforasa (quinona reductasa dielectrónica), superóxido dismutasa y catalasa. Todas estas enzimas presentaron disminución significativa de su actividad en los animales tratados con estrógenos (Roy y Liehr, 1988).

Adams y Notides (1987a) comprobaron que el glutatión, el tior proteico predominante en las células, ejerció un efecto protector contra la unión irreversible de los metabolitos del dietilestilbestrol a las macromoléculas celulares en el córtex renal del hámster.

Segura-Aguilar et al. (1990a,b) llevaron a cabo la determinación de las actividades enzimáticas relacionadas con el glutatión y las actividades DT-diaforasa y superóxido dismutasa en el riñón del hámster durante la carcinogénesis inducida por dietilestilbestrol. Estos autores encontraron una marcada disminución de la actividad DT-diaforasa citosólica y microsomial, así como de la glutatión reductasa, y menos intensa en la actividad glutatión transferasa y glutatión peroxidasa en las lesiones pre- y neoplásicas renales. La actividad superóxido dismutasa presentó una disminución transitoria en la primera fase de la carcinogénesis (2.2 veces el valor control, 6 meses de tratamiento), observándose posteriormente, en la fase tumoral, un incremento

de su actividad estadísticamente significativo (1.9 veces el valor control, 8 meses de tratamiento), en contraste con estudios posteriores (McCormick et al., 1991). La dramática disminución en la actividad DT-diaforasa reveló una fuerte merma en la capacidad de los hámsters tratados con DES de catalizar la reducción de DES-quinona en su correspondiente hidroquinona. Esta reacción es necesaria tanto para prevenir la formación de metabolitos reactivos como para permitir la excreción de los conjugados de quinona fuera de la célula. La disminución de la actividad DT-diaforasa y superóxido dismutasa en el riñón del hámster tratado con DES daría lugar a una incapacidad celular para inactivar los radicales libres generados durante el metabolismo del DES, productos que reaccionarían directamente con macromoléculas celulares con efectos citotóxicos, mutagénicos y probablemente cancerogénicos (Monsalve, 1990).

Oberley et al. (1991a) demostraron, en cultivos de células del túbulo proximal renal del hámster, la supresión de la proliferación celular DES-inducida con liposomas que contenían superóxido dismutasa o catalasa, mientras que liposomas vacíos o conteniendo superóxido dismutasa inactivada no la inhibían. Sugiriendo con estos estudios la importancia que tienen estas enzimas antioxidantes en el crecimiento en cultivo de las células tubulares proximales tratadas con DES.

#### **2.2.2.2.5. Prostaglandín-H-sintetasa.**

La doctora Gisela H. Degen junto a otros investigadores del Instituto de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Würzburg (Alemania) han estudiado en profundidad el papel de esta enzima en el metabolismo del dietilestilbestrol.

La prostaglandín-H-sintetasa es una enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas, observándose que oxida gran número de compuestos,

incluyendo xenobióticos, durante la formación de hidroxiendoperóxido PGH<sub>2</sub> desde prostaglandín hidroperoxi-endoperóxido PGG<sub>2</sub> (Degen et al., 1986).

La incubación in vitro de trans-dietilestilbestrol con prostaglandín-H-sintetasa (Degen y McLachlan, 1983) conduce a la formación de los metabolitos cis,cis-dienestrol (Z,Z-DIES) y cis-dietilestilbestrol (Z-DES), los cuales poseen una actividad estrogénica considerablemente disminuida con respecto a su compuesto de origen. Posteriormente, observaron (Degen et al., 1986; Freyberger y Degen, 1987) como otros análogos estructurales del dietilestilbestrol con al menos un grupo hidroxil fenólico eran metabolizados in vitro desde microsomas de vesículas seminales de carnero en presencia de ácido araquidónico, revelando la formación de p-quinoides y la unión covalente a proteínas. Sin embargo, a altas concentraciones los análogos estructurales del DES ejercieron un efecto inverso sobre la actividad de la prostaglandín-H-sintetasa inhibiendo su acción. Otras sustancias que actúan inhibiendo in vitro la actividad de la prostaglandín-H-sintetasa son la alfa- y la beta-naftoflavona (Degen, 1988), compuestos que también disminuyen la incidencia de tumores renales en el hámster intoxicado con DES (Li et al., 1985), abriendo una nueva vía para el estudio del mecanismo de acción de este compuesto cancerogénico e implicando a los prostanooides en la promoción tumoral.

Adams y Notides (1987) estudiaron la unión irreversible de dietilestilbestrol en el córtex renal del hámster, encontrando que la indometacina (inhibidor de la prostaglandín-H-sintetasa) y el ácido araquidónico no alteraban esta unión irreversible del DES, indicando una ausencia de participación de la prostaglandín-H-sintetasa en el metabolismo del DES hacia compuestos reactivos intermedios.

Estudios en riñones de hámster y conejo han permitido observar la existencia de múltiples rutas metabólicas relacionadas entre sí para el metabolismo oxidativo de los estrógenos (Degen et al., 1989 y 1990). Así, se vio que el sistema de monooxigenasas fueron aparentemente las responsables de la mayoritaria oxidación del DES en los microsomas y esta actividad estuvo preferentemente localizada en el córtex renal. Mientras que la oxidación del DES y del estrógeno catecol 2-hidroxiestrone mediada por la prostaglandín-H-sintetasa se demostró tanto en el córtex como en la médula renal. Proponiéndose que las actividades prostaglandín-H-sintetasa y monooxigenasa actúan conjuntamente en la activación metabólica de los estrógenos cancerogénicos. Esto parece aplicarse en particular a los estrógenos esteroideos, a partir de estrógenos catecol formados por monooxigenasas que son más tarde oxidados a metabolitos reactivos por la prostaglandín-H-sintetasa y otras enzimas peroxidativas.

La prostaglandín-H-sintetasa parece estar involucrada en la formación de metabolitos de DES causantes de intercambios de cromátides hermanas (Lundgren et al., 1988). La exposición in vitro a DES indujo un aumento concentración-dependiente en intercambios de cromátides hermanas en cultivos primarios de linfocitos humanos de mujeres premenopáusicas. La adición de indometacina (un conocido agente bloqueador de la formación de prostaglandina G<sub>2</sub>) a los cultivos inhibió parcialmente los intercambios de cromátides hermanas inducidas por el DES, no obteniéndose efectos cuando se añadió alfa-naftoflavona, y sugiriendo que la vía metabólica de la prostaglandín-H-sintetasa está comprometida en este mecanismo.

Igualmente, se ha estudiado en cultivos celulares de vesículas seminales de carnero (expresan prostaglandín-H-sintetasa pero no actividad monooxigenasa) la inducción por DES de micronúcleos y su oxidación por la

prostaglandín-H-sintetasa (Degen; 1993), acciones ambas que fueron inhibidas por la indometacina y apoyando estos datos la hipótesis de que la oxidación PHS-dependiente del DES juega un papel en su genotoxicidad, permitiendo este modelo superar ciertas limitaciones impuestas por los sistemas in vivo

#### **2.2.2.2.6. Unión de los metabolitos estrogénicos a DNA y otras macromoléculas celulares.**

Una vez llevada a cabo la activación metabólica de los estrógenos por los diversos sistemas enzimáticos hasta constituir productos finales cancerógenos (formas moleculares activas, cancerógenos últimos), estos pueden causar una lesión permanente en las células renales mediante enlace covalente con su DNA. Las células con DNA dañado responderían después a los estímulos de crecimiento proporcionados por los propios estrógenos (Liehr et al., 1982 y 1983; Liehr, 1984).

Caviezel et al. (1984) estudiaron la interacción de estrona y estradiol con DNA y proteína de hígado y riñón en rata y hámster in vivo e in vitro, observando que la unión covalente al DNA no era significativa y concluyendo que la unión a DNA era un mecanismo improbable de la acción tumorogénica de la estrona y estradiol. Pero estos datos no excluían un mecanismo genotóxico de acción en general, ya que en el proceso de metabolización de los estrógenos se podrían generar radicales libres capaces de hidroxilar el DNA.

Sufrin et al. (1984) observaron una expresión génica alterada en el carcinoma renal del hámster estrógeno-inducido, tras aislar RNA del tumor y realizar una traslación in vitro. Mostrando los productos de la traslación patrones alterados de síntesis proteica que indicaban que el mRNA del tejido tumoral era un resultado de la expresión génica alterada durante la inducción tumoral.

Liehr et al. (1985a) estudiaron la relación del metabolito reactivo del dietilestilbestrol 4',4''-DES quinona con péptidos y ácidos nucleicos, proponiendo que este metabolito da lugar a complejos inestables con el DNA, que se descomponen con el tiempo, y a uniones covalentes con importantes proteínas. Ambos sucesos podrían jugar un papel en la carcinogénesis. Este mismo autor (Liehr et al., 1985b) demostró por primera vez que la exposición al estrógeno sintético DES conducía a la formación in vivo de complejos covalentes DNA-DES en animales de experimentación (hámster dorado sirio), señalando que estos se manifestaban solamente tras una prolongada exposición de los animales al DES. Estos complejos se desarrollaron específicamente en el órgano (riñón) en el que estos tumores surgen como resultado del tratamiento estrogénico, no siendo hallados en hígado, un órgano no diana.

En ese mismo año, otros investigadores observaron que tras la peroxidación del DES, los productos obtenidos de la misma se unieron al DNA firmemente pero no de forma covalente, mientras que la unión a proteínas pareció ser covalente y no dependió de la presencia de grupos tiol (Epe y Metzler, 1985). Birnboim (1985) estudiando la actividad clastogénica del DES tras incubación con leucocitos humanos, obtuvo frecuentes roturas de la hebra de DNA que dependían de la dosis por encima de un aparente umbral de 10  $\mu$ M. Un año después, Epe, Schiffmann y Metzler investigaron sobre el posible papel de los radicales de oxígeno en la transformación celular por DES y otros compuestos relacionados, concluyendo que el DES, bajo condiciones de metabolismo peroxidativo, puede dar lugar a superóxidos y roturas de la hebra de DNA. Recientemente, Han y Liehr (1994), han demostrado un tipo de lesión del DNA mediada por radicales libres (rotura de la hebra de DNA) inducida específicamente en el riñón de hámsters tratados crónicamente con hormonas

esteroides, apoyando estos resultados un mecanismo de carcinogénesis renal estrógeno-inducida mediada por alteraciones provocadas por radicales libres.

Se ha estudiado la correlación entre la cancerogenicidad, la formación de catecoles y la modificación del DNA por diversos estrógenos sintéticos (Liehr, 1986c; Liehr et al., 1987a). Apreciándose que la incidencia tumoral no se correlacionó con la producción de catecoles in vitro por los microsomas renales del hámster, así como no se detectaron diferencias en la concentración de complejos de DNA a pesar de las marcadas diferencias en la incidencia tumoral. Por lo tanto, deduciéndose que la producción de catecoles y la modificación del DNA son necesarios pero no suficientes para la inducción de los tumores renales en el hámster.

Las alteraciones en el DNA del riñón del hámster son estrógeno-específicas, puesto que otras hormonas esteroideas (progesterona, deoxicorticosterona) no indujeron estas alteraciones (Liehr et al., 1986d). Estos autores demostraron que el 17 beta-estradiol y otros estrógenos esteroideos y estilbenos sintéticos provocaron alteraciones covalentes del DNA específicamente en el riñón del hámster, hallando que todos ellos indujeron un idéntico grupo de nucleótidos modificados covalentemente en el DNA del tejido diana, indicando un nuevo mecanismo para la formación de complejos de DNA, y concluyendo que cada uno de los estrógenos indujo la unión del mismo compuesto (o compuestos) endógeno desconocido al DNA del tejido diana. Estos resultados proporcionaron la evidencia de que estrógenos estructuralmente distintos manifestaban actividades genotóxicas altamente específicas en el organismo intacto, más aún, todos ellos podrían actuar a través del mismo mecanismo molecular para inducir el cáncer en un órgano diana.

Trabajos posteriores investigando la naturaleza de la unión al DNA de los productos del DES in vivo (Gladek y Liehr, 1989), condujeron a la

observación en riñón, útero y testículo de hámsters de un patrón único e inequívoco de complejos de DNA tras el tratamiento con una única inyección de DES. Este grupo de complejos de DNA fue exactamente igual a los patrones generados *in vitro* por la reacción del dietilestilbestrol-4',4''-quinona con DNA o 2'-deoxiguanosina 3'-monofosfato. Estos resultados demostraron que el DES era capaz de modificar covalentemente el DNA. Además, el dietilestilbestrol-4',4''-quinona fue la sustancia mayor metabólica reactiva responsable de la actividad genotóxica del DES, teniendo los complejos DNA-DES una corta vida media biológica que hace esperar que los tumores surjan solamente de las células que se dividen rápidamente. Este patrón de complejos, generados por el metabolito genotóxico dietilestilbestrol-4',4''-quinona, ha sido también observado en tejidos fetales (Gladek y Liehr, 1991), demostrándose que el DES es un agente genotóxico activo transplacentariamente y obteniéndose pruebas para el metabolismo fetal de DES a DES-quinona y a otros intermedios genotóxicos desconocidos.

El estudio de la distribución intrarrenal en el hámster de las modificaciones del DNA inducidas por estrógenos y de los enzimas del metabolismo de los mismos, ha llevado a la observación de que los niveles microsomiales de citocromo P-450 y la formación de complejos de DNA estrógeno-inducidos fue más alta en el córtex renal del hámster, lugar de origen de los tumores (Liehr et al., 1987b). Siendo, por lo tanto, la citocromo P-450 el sistema enzimático más estrechamente ligado a la lesión inducida por estrógenos en el DNA anterior a la aparición del carcinoma.

La hipótesis de que la metilación del DNA regula el nivel de expresión génica y de que su alteración estaría implicada en la expresión génica aberrante encontrada en las neoplasias, ha llevado a diversos investigadores (Lu et al., 1988) a estudiar el nivel de metilación del DNA durante la inducción por



estrógenos de tumores renales en el hámster. Demostrándose claramente que el DNA de los tumores estrógeno-dependientes estaba hipometilado, manteniéndose después de trasplantes seriados.

La administración de tamoxifeno (Liehr et al., 1988), vitamina C (Liehr et al., 1989) o alfa-naftoflavona (Liehr et al., 1991), conocidos inhibidores de la carcinogénesis renal inducida por estrógenos, se ha realizado para intentar conocer el mecanismo de inducción de la lesión del DNA, de inhibición de la tumorigénesis y del papel de los receptores estrogénicos en la misma.

Cuando el tamoxifeno se administró junto con 17 beta-estradiol la incidencia tumoral descendió desde el 100% de los animales tratados con 17 beta-estradiol al 25% en el grupo que recibieron ambas drogas. El nivel de complejos de DNA fue comparable en los hámsters tratados con 17 beta-estradiol y 17 beta-estradiol más tamoxifeno durante 5 ó 7 meses. En los hámsters inoculados con células H-301 (derivadas de un carcinoma renal de hámster estrógeno-inducido), el tamoxifeno disminuyó el crecimiento del tumor H-301 estrógeno-dependiente. Sin embargo, en el cultivo celular ni el 17 beta-estradiol ni el tamoxifeno influyeron en la división de las células H-301. Estos resultados apoyaron los datos previos (Sirbasku y Kirkland, 1976) de que el crecimiento in vivo de las células H-301 estrógeno-estimuladas no es iniciado por una acción directa hormonal en estas células, sino que es mediada por factores de crecimiento estrógeno-inducidos. Estos factores de crecimiento están activados en los órganos del animal huésped, que sería también el lugar de acción de inhibición del crecimiento por el tamoxifeno. La inhibición del crecimiento de las células H-301 por tamoxifeno observada in vivo, pero no en el cultivo celular, proporciona mayor evidencia para un mecanismo indirecto de estimulación del crecimiento. El tamoxifeno inhibió el crecimiento del

carcinoma renal inducido por estrógenos pero no interfirió con la iniciación tumoral, puesto que no inhibió la formación de complejos de DNA. Es más, probablemente los mecanismos del receptor no estuvieron envueltos en la inducción de las modificaciones del DNA por los estrógenos.

La vitamina C ha mostrado que reduce la incidencia tumoral aproximadamente un 50% cuando se administra junto con estrógenos (Liehr y Wheeler, 1983). La administración concomitante de vitamina C y DES disminuyó la concentración de los complejos DES-DNA entre un 70 y un 90% en hígado, riñón y testículos, con respecto a los animales tratados sólo con DES. In vitro, la vitamina C redujo el DES-4',4''-quinona a cis- y trans-DES de un modo dosis dependiente. Por lo tanto, la vitamina C inhibió la carcinogénesis estrógeno inducida por reducción de las concentraciones de metabolitos estrógeno-quinona y sus complejos de DNA.

La coadministración de estrógenos más alfa-naftoflavona suprime la carcinogénesis renal pero en cambio induce tumores hepáticos. El pretratamiento de los hámsters con alfa-naftoflavona durante tres días, disminuyó entre el 75 y el 80% los complejos DNA-DES a nivel renal y hepático. Por lo tanto, la prevención de los tumores renales estrógeno inducidos por la alfa-naftoflavona podría ser consecuencia del descenso en las concentraciones renales de estos complejos en respuesta a la misma.

Roy et al. (1991a) observaron in vivo e in vitro que el ciclo redox del dietilestilbestrol genera radicales libres, superóxido e hidroxilo, que reaccionan con bases guanina del DNA, dando lugar a la formación de 8-hidroxi-guanosina. Los niveles de 8-hidroxi-guanosina doblaron el valor control específicamente en el riñón del hámster cuando la exposición al DES fue de carácter crónico.

Se han propuesto dos mecanismos potenciales para la inducción de la transformación celular por DES (Tsutsui et al., 1986). Un primer mecanismo aparentemente no ocasionaría un daño directo al DNA, sino que actuaría a nivel de la organización microtúbular ocasionando fenómenos de aneuploidia y como consecuencia transformación celular. El segundo mecanismo requeriría activación metabólica exógena con lesión directa del DNA, pudiendo ocasionar entre otros síntesis no-planificada de DNA, mutaciones génicas, aneuploidia o mutación cromosómica.

Ebert et al. (1989) realizaron la clonación y caracterización, en células transformadas de embrión de hámster, del gen c-Ha-ras mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación directa. No detectaron cambios en los codones 12,13,59,61,117 ó en regiones adyacentes en las líneas de células tumorales inducidas por DES. De este modo, no se pudo saber si mutaciones puntuales en el protooncogén H-ras son esenciales para la adquisición del fenotipo neoplásico de las células embrionarias de hámster; pudiendo estar presentes otros lugares de mutación en el gen Ha-ras o que la activación de otros oncogenes puedan ser responsables de la progresión neoplásica de estas células.

Se ha demostrado in vitro, en células de embrión de hámster, que el DES o sustancias relacionadas no inducen síntesis no-planificada de DNA, salvo si se añade a las células en cultivo un sistema de activación metabólica exógeno (Tsutsui et al., 1984). Comprobándose que el DES bajo condiciones que dan lugar a transformación celular no induce síntesis no-planificada de DNA, por lo tanto la transformación neoplásica de las células no requiere daño directo del DNA.

Diversos estudios se han realizado para determinar la capacidad del DES en inducir transformación celular por un mecanismo genético a nivel

cromosómico. Tsutsui et al. (1983) estudiaron in vitro, en células de embrión de hámster sincrónicas y asincrónicas, el efecto del dietilestilbestrol sobre cambios cromosómicos numéricos y aberraciones estructurales. Encontrando que el DES induce cambios en el número de cromosomas bajo condiciones que provocan transformación morfológica y neoplásica de las células, no apareciendo alteraciones estructurales ni mutaciones génicas; las líneas celulares neoplásicas inducidas por DES fueron aneuploides, con números cromosómicos modales próximos al diploide; las células tratadas durante la mitosis (cultivos sincrónicos) presentaron mayor sensibilidad a la inducción de transformación celular y aneuploidía, y las curvas dosis-respuesta para la transformación celular y la aneuploidía inducidas por el DES fueron paralelas. El mecanismo por el cual el DES indujo aneuploidía fue desconocido, encontrándose tanto ganancias como pérdidas cromosómicas y no apreciándose diferencias significativas entre el número de células hipodiploides e hiperdiploides; estos hallazgos hicieron sospechar a los autores un posible mecanismo de no disyunción cromosómica como base de estas alteraciones.

Experiencias similares a la anterior pero usando el 17 beta-estradiol como tóxico, permitieron observar unos resultados superponibles a los del dietilestilbestrol pero con dosis más elevadas, apareciendo cambios numéricos cromosómicos (tanto ganancias como pérdidas de cromosomas) (Tsutsui et al., 1987).

Las proteínas cromosómicas juegan un papel crítico en la regulación de la estructura cromosómica y de la expresión génica, habiéndose investigado la unión covalente de metabolitos reactivos de DES a las mismas (Roy, 1991b). Estos estudios han mostrado que los núcleos de las células renales del hámster poseen potencial metabólico para oxidar DES a DES-quinona, metabolito reactivo que apareció unido covalentemente a proteínas

histona y no histona; la modificación covalente de estas proteínas cromosómicas estructurales podría jugar un papel en la carcinogénesis hormonal vía modulación de la regulación de la expresión génica.

Investigaciones para caracterizar las alteraciones cromosómicas durante los estadios precoces de la tumorigénesis (1 a 5 meses de tratamiento) en el riñón del hámster tratado con DES (Banerjee et al., 1992a), han permitido observar un incremento dramático de aneuploidía al mes y medio de tratamiento (que persistió durante el periodo de tratamiento), y un aumento de la frecuencia de micronúcleos y de fusiones teloméricas y endomitosis después de tres meses de tratamiento. Además, aumentaron las rupturas cromosómicas y de cromátides, y también se vieron cambios cromosómicos numéricos entre el mes y medio y los tres meses y medio de tratamiento. Por estos resultados se ha propuesto que algunas de estas lesiones genéticas precoces en el riñón del hámster, como resultado del tratamiento con estrógenos, tendrían un papel crítico en la inducción tumoral.

Otras estructuras y macromoléculas celulares estudiadas relacionadas con la división y transformación neoplásica celular han sido el huso mitótico, los microtúbulos y la tubulina. Así, se ha documentado que las concentraciones de DES que causan aneuploidía también producen husos mitóticos anormales o detención de los mismos (Tucker y Barrett, 1986). Estas acciones podrían estar provocadas por un descenso en la polimerización de los microtúbulos ocasionado por el DES, siendo los microtúbulos del huso mitótico más sensibles al DES que los citoplásmicos; y existe también evidencia de que el DES afecta al material pericentriolar, a los centros organizadores de microtúbulos y a los dímeros de tubulina, habiéndose observado la unión de DES a los dímeros de tubulina y la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos in vitro (Sharp y Parry, 1985; Sato et al., 1987). Estos resultados

subrayan que la desorganización de los microtúbulos del huso mitótico es una vía particular en el desarrollo de aneuploidía. Aneuploidía y progresión neoplásica que podrían producirse por cualquier agente que inhibiese los componentes del huso mitótico, incluyendo el centrosoma, microtúbulos, proteínas asociadas a los microtúbulos, actina y miosina, o sistemas reguladores tales como el AMP cíclico o el calcio.

La acción del DES sobre el huso mitótico de la célula ocasionando mecanismos de no disyunción cromosómica y aneuploidía, ha llevado a investigar la unión a la tubulina de metabolitos del DES y de compuestos relacionados (Epe y Metzler, 1987; Epe et al., 1987; Epe et al., 1989), comprobándose la existencia de un lugar de unión específico capaz de formar una unión covalente con ciertos metabolitos del DES en la región C-terminal de la beta-tubulina. Por último, se ha examinado el efecto del DES sobre las redes de actina celulares en células de ratón BALB 3T3, encontrándose que el DES indujo un cambio de la distribución de las fibras de estrés de actina (Sakakibara et al., 1992).

### **2.3. Tumores inducidos en el hámster dorado sirio.**

#### **2.3.1. Tumores renales.**

##### **2.3.1.1. Hallazgos macroscópicos.**

Las primeras lesiones tumorales macroscópicamente visibles aproximadamente aparecen sobre el 5º ó 6º mes de tratamiento, en forma de nódulos únicos o múltiples, generalmente bilaterales, entre 1 y 5 mm de diámetro máximo, y en este estadio precoz localizados en córtex renal subcapsularmente, proyectándose sobre la superficie renal. A la sección del riñón estos nódulos pueden aparecer distribuidos a distintos niveles de la

corteza, estando bien delimitados, no encapsulados, presentando una coloración blanquecina, apariencia sólida y consistencia densa, carnosa, sin necrosis.

En los periodos avanzados de tratamiento, 8<sup>o</sup>-9<sup>o</sup> mes, los riñones presentan un importante aumento de tamaño con distorsión de su superficie, observándose múltiples nódulos tumorales de diverso tamaño, sólidos o quísticos, blanquecinos o hemorrágicos, bien delimitados, mostrando a la sección los de mayor tamaño áreas quísticas, hemorrágicas y/o de necrosis. Entre estas masas tumorales se puede observar la presencia de restos de parénquima renal aparentemente normal. El riñón izquierdo es generalmente el más afectado, llegando a alcanzar un peso entre 15 y 20 gr (peso normal de 600 mg aproximadamente).

Después de 9-10 meses de tratamiento, los tumores renales se extienden por contigüidad afectando a médula y pelvis renal, o tras la rotura de la cápsula renal asociándose a depósitos tumorales secundarios en cavidad abdominal, con implantes sobre la superficie peritoneal del diafragma, el hilio esplénico, el omento y mesenterio, el peritoneo parietal, la porta hepática y el saco escrotal. Son menos frecuentes las metástasis sobre la serosa hepática y del tracto gastrointestinal. La invasión esplénica ocurre con frecuencia, pero no así la invasión hepática. Más tarde, estos animales pueden presentar metástasis por vía linfática o hemática, pudiéndose encontrar afectación pulmonar o de ganglios cervicales (Kirkman, 1959c).

Recientemente, se han distinguido dos fases macroscópicas denominadas "tumores pequeños" y "tumores grandes" (Gonzalez et al., 1989; Cortés-Vizcaíno, 1990); estando la primera caracterizada por la presencia de múltiples nódulos, entre 0,1 y 0,5 cm de diámetro, blanquecinos, repartidos por la superficie de uno o ambos riñones, de la que sobresalen ligeramente. En esta fase no está aumentado el tamaño del riñón, hay una considerable cantidad

de parénquima conservado y no existe deformación del órgano, no observándose tampoco signos de hemorragia o necrosis y siendo los quistes raros. La localización de los nódulos suele ser cortical. La fase de "tumores grandes" consiste en la presencia de tumoraciones mayores de 0,5 cm, mal delimitadas en ocasiones, blanquecinas o amarillentas, con frecuente necrosis, hemorragia y quistificación. Hay aumento del tamaño de la víscera, que puede alcanzar hasta 4 cm de diámetro vertical y adoptar un aspecto polilobulado, no quedando apenas restos de parénquima sano, aunque aún se pueden distinguir por su color parduzco. Las áreas neoplásicas se pueden hallar en corteza, médula o incluso en pelvis.

#### **2.3.1.2. Hallazgos microscópicos.**

Microscópicamente, las lesiones precoces aparecían como pequeños nódulos sólidos localizados a cualquier nivel de la corteza, pero siendo más frecuente su presencia cerca de la unión corticomedular, en la zona adyacente a los vasos arcuatos.

Histológicamente se pueden distinguir claramente dos estadios (Cortés-Vizcaino, 1990): lesiones precoces preneoplásicas y lesiones neoplásicas plenamente desarrolladas.

##### **2.3.1.2.1. Lesiones preneoplásicas.**

Diversos autores han considerado la displasia tubular y la hiperplasia de células intersticiales como los focos más precoces de transformación hacia la malignidad en el riñón del hámster tratado con estrógenos (Kirkman y Bacon, 1950; Horning y Whittick, 1954; Kirkman y Robbins, 1959c; Llombart-Bosch, 1964; Llombart-Bosch y Peydró, 1975, 1986; Cortés-Vizcaino, 1990; Goldfarb y Pugh, 1990; Oberley et al., 1991).

La displasia tubular aparece en los túbulos contorneados proximal y distal, y regularmente esta lesión precede la iniciación tumoral o se asocia



con la presencia de una neoplasia (Llombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986; Goldfarb y Pugh, 1990).

La displasia tubular está constituida por túbulos quísticos tapizados por epitelio tubular alto, con células de citoplasma basófilo y cambios nucleares, observándose mitosis. En estadios más avanzados, se produce rotura de la membrana basal en continuidad con focos de hiperplasia de células intersticiales.

La hiperplasia de células intersticiales se observa también en estrecha contigüidad con la displasia tubular. Los grupos de células intersticiales adoptan una configuración mesenquimal, se disponen apretadamente y en pequeños nidos y están en contacto con los vasos capilares. Ultraestructuralmente estas células contienen escasos orgánulos. En algunas de estas células también se observan mitosis. Puede estar presente en algunos casos una reacción inflamatoria (Llombart-Bosch y Peydró, 1986).

#### **2.3.1.2.2. Lesiones neoplásicas.**

Se distinguió desde un principio en estos tumores la presencia de áreas epiteliales y mesenquimales o sarcoma-like (Kirkman y Bacon, 1950; Horning, 1954; Kirkman y Robbins, 1959c).

Siguiendo a Llombart-Bosch y Peydró-Olaya (1986), en ellos existen tres tipos característicos de patrón histológico: a) nidos sólidos de células blastemales, b) áreas con estructuras trabeculares y tubulares, y c) componentes papilares y quísticos.

Cada uno de estos patrones puede combinarse de forma aleatoria y normalmente se presentan de modo simultáneo en grado variable. Los focos sólidos blastemales son los más frecuentes, siendo los quísticos y papilares más raros.

Las áreas blastemales están constituidas por masas o cordones sólidos de células anastomosantes unidas entre sí. También pueden verse células tumorales formando pseudorrosetas alrededor de un núcleo central de necrosis, así como patrones perivasculares radiales en los que las células adoptan un aspecto más fusiforme. Estos campos tumorales aparecen en continuidad con otros más trabeculares o tubulares, observándose también glomérulos o túbulos rudimentarios. En estas áreas las células adquieren un apariencia epitelioide y, ocasionalmente, incluso una forma claramente cúbica o cilíndrica. Existen estructuras tubulares bien definidas, tapizadas por células epiteliales típicas que se asemejan a túbulos renales.

La continuidad existe entre las células epiteliales y blastemales. Por otra parte, dentro de la neoplasia también están presentes algunos túbulos y glomérulos normales pero generalmente involutivos.

La configuración papilar y quística del tumor es, como ya se mencionó, la más raramente encontrada. Los espacios quísticos de diámetro variable están revestidos por células cúbicas o cilíndricas aplanadas, algunas con borde ciliado. Un material amorfo basófilo o negativo al PAS puede rellenar algunos de los espacios quísticos. Las fibras reticulares son escasas o están incluso ausentes. La necrosis aparece en cantidad variable, junto con una rica reacción inflamatoria de células histiocíticas.

Recientemente se ha considerado (Gonzalez et al., 1989) que estas neoplasias están constituidas por dos poblaciones celulares distintas: un componente de células grandes de claro carácter epitelial, y un segundo componente de células pequeñas pobremente diferenciadas. Encontrando estos autores que los tumores pequeños se componían predominantemente de células pequeñas indiferenciadas y los tumores grandes siempre mostraban ambos tipos celulares.

Cortés-Vizcaíno (1990) introdujo el concepto de "tumorlet" para definir aquellos tumores microscópicos incipientes que no se detectan en el estudio macroscópico del riñón y las lesiones de tipo intermedio o transicional entre la hiperplasia de células intersticiales y los tumores propiamente dichos, que son a veces difíciles de clasificar en una u otra fase (pretumoral o tumoral) y que sugieren una serie de cambios secuenciales y progresivos en el proceso de la cancerogénesis renal inducida por estrógenos en el hámster, señalando la existencia de un espectro continuo entre hiperplasia, displasia y tumor. Histológicamente distinguió 7 patrones distintos, los cuales no suelen ser puros, sino que se presentan con diversa proporción en un mismo tumor, y no siempre todos o igualmente asociados, habiéndolos de tipo predominante o difuso y de tipo focal. Por orden decreciente de frecuencia los clasificó en: 1) patrón blastemal, 2) patrón hipernefroide, 3) patrón neuroendocrinoide, 4) patrón adenoide (distinguiendo dentro de él las variedades papilar, glandular, cordonal, sólida, quística y la poco diferenciada con empalizada periférica), 5) patrón neuroectodérmico, 6) patrón sarcomatoide, y 7) patrón anaplásico. Destacando, y coincidiendo con Gonzalez et al. (1989), que histológicamente los tumorlets correspondieron en su mayoría al tipo blastemal y en algunos casos al tipo endocrinoide.

Goldfarb y Pugh (1990) sólo mencionaron lesiones del epitelio tubular proximal correspondientes a displasias de diversos tipos, carcinoma in situ y carcinoma infiltrante.

Posteriormente, Oberley et al. (1991), encontraron diferencias en cuanto a las lesiones provocadas por dos sustancias estrogénicas, el dietilestilbestrol y el etinilestradiol. La primera de ellas ocasionó lesiones intersticiales compuestas por células pequeñas redondas con una alta relación nucleocitoplásmica. Mientras que los animales tratados con etinilestradiol

presentaron lesiones en la corteza profunda, adyacente a la pelvis renal, constituidas por túbulo proximales con cambios hiperplásicos, mostrando células columnares con gran núcleo, mitosis ocasionales y pérdida del citoplasma apical.

### **2.3.1.3. Histoquímica.**

Diversos estudios histoquímicos se han llevado a cabo de este tumor. Las células blastémicas y mesenquimales normalmente presentan abundantes gotas sudanofílicas y lípidos neutros, dando así una apariencia de célula clara a la neoplasia (Kirkman y Robbins, 1959c; Horning y Whittick, 1954). Algunas células tumorales contienen ésteres de colesterol con algo de colesterol libre, principalmente en la periferia de las masas tumorales. No se ha podido demostrar la presencia de glucógeno tanto en las áreas epiteliales como mesenquimales del tumor (Horning y Whittick, 1954; Llombart-Bosch, 1965).

El tumor muestra un intensa actividad de fosfatasa alcalina, ATPasa y fructosa-1,6-difosfatasa, estando ausente la actividad de glucosa-6-fosfatasa (Llombart-Bosch y Peydró, 1975). También se ha demostrado en extractos de tumores renales de hámster la presencia de 4 isoenzimas de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, además de en el tejido embrionario del hámster, en contraste con la aparición de sólo dos isoenzimas en el riñón no tratado y en el tratado con estrógenos (Li et al., 1975a). Sugiriendo estos resultados que el tumor renal podría representar una regresión a un estado más embrionario así como una conversión a un tejido hormono-sensible como el útero o el ovario. Este patrón de isoenzimas podría servir para diferenciar al tumor primario estrógeno-dependiente del riñón normal tratado con DES y el tumor renal estrógeno-independiente o autónomo (Dodge, 1977).

Hacker et al. (1988, 1991) han demostrado en los tumores renales inducidos por estrógenos una muy alta actividad de fosfatasa alcalina, adenilato

ciclase y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, estando muy bajas o ausentes las actividades de glucosa-6-fosfatasa, succinato deshidrogenasa, gamma-glutamyl transpeptidasa y gamma-glutamyl transferasa. Estos autores sugieren la posible utilización de la fosfatasa alcalina y la adenilato ciclase como marcadores para la identificación tanto de los tumores como de los focos proliferativos.

#### **2.3.1.4. Estudio inmunohistoquímico.**

Diversos estudios inmunohistoquímicos se han llevado a cabo en los tumores renales inducidos por dietilestilbestrol. Dodge et al. (1988) demostraron material renina-positivo en el tumor primario, en las metástasis peritoneales y en los trasplantes de un tumor renal inducido por DES con características secretoras. Asimismo, observaron en los hámsters trasplantados valores plasmáticos de actividad de renina significativamente más altos que los valores normales.

Hacker et al. (1988) mediante técnicas de inmunofluorescencia para la demostración de los filamentos intermedios anticitoqueratina, antivimentina y antidesmina, apreciaron que los focos precoces y los tumores sólo expresaron vimentina y desmina, no observando inmunotinción para citoqueratina. Estos mismos autores, en estudios posteriores (1991), comprobaron que en los focos proliferativos y en los estadios precoces tumorales, las células coexpresaban vimentina y desmina, siendo la actina de músculo liso negativa. Todos los tumores grandes y el componente principal de las metástasis expresaron vimentina, desmina y fibronectina. El mesotelio que rodeó a las metástasis tumorales fue positivo para vimentina, desmina, actina de músculo liso, fibronectina, citoqueratina y tenascina.

El estudio inmunohistoquímico comparativo para filamentos intermedios en el riñón embrionario del hámster y en los tumores renales del mismo ha sido realizado por Gonzalez et al. (1989), apreciando que tanto en el

hámster en desarrollo como en el recién nacido los túbulos renales mostraron positividad para citoqueratina, las células blastemales para desmina y las estromales fueron positivas para vimentina. Las células tumorales renales presentaron inmunorreactividad para los tres tipos de filamentos intermedios.

Cortés-Vizcaino (1990), demostró que tanto las áreas indiferenciadas como en las diferenciadas de tumores renales inducidos por dietilestilbestrol en el hámster expresaron positividad para las tres familias de anticuerpos utilizados (epiteliales, mesenquimales y neurales). Los marcadores inmunohistoquímicos que resultaron positivos en más casos fueron, por orden decreciente: CAM 5.2, vimentina, citoqueratina, proteína S-100, mioglobina, HNK, enolasa neuronal específica y antígeno carcinoembrionario. Los únicos que presentaron grados altos de intensidad o proporciones elevadas de tumor teñido fueron, también por orden decreciente: vimentina, proteína S-100, desmina, citoqueratina y mioglobina. Esta autora destaca la gran especificidad que demostró el anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario para teñir las áreas de diferenciación glandular y papilar, así como las luces incipientes en el seno de las áreas sólidas periglandulares. La vimentina y la proteína S-100 fueron los marcadores que mejor delimitaban la interfase tumor-parénquima renal.

Oberley et al. (1991), estudiando las lesiones renales precoces inducidas por estrógenos en el hámster, obtuvieron en los focos intersticiales una expresión intensa para vimentina, desmina y PCNA, mostrando trazas de inmunotinción para citoqueratina. Los tumores renales desarrollados presentaron igualmente intensa tinción para los anticuerpos antes referidos, pero en contraste, mostraron una moderada tinción para citoqueratina. Tanto los focos intersticiales como los tumores fueron negativos para Mn- y CuZn-superóxido dismutasa y catalasa, enzimas que presentaron una moderada a

intensa expresión en el túbulo proximal. La hiperplasia tubular inducida por estrógenos expresó fuerte positividad para citoqueratina y moderada para CuZn-superóxido dismutasa.

#### **2.3.1.5. Estudio ultraestructural.**

La primera publicación (Mannweiler y Bernhard, 1957) describió la presencia de estructuras ciliadas altamente diferenciadas en las células tumorales. Formaciones que también detallaron en un primer estudio L.Lombart-Bosch y Peydró (1970), publicando posteriormente un estudio más completo sobre estos tumores (1975). En este mismo año apareció en prensa un trabajo acerca de las diferenciaciones de unión presentes en estas neoplasias (Letourneau et al., 1975). Alice Dodge (1974, 1977) hizo importantes contribuciones al conocimiento de la ultraestructura de los trasplantes. Tanto esta autora como L.Lombart-Bosch (1973) detectaron la presencia de partículas víricas de tipo C en los trasplantes hormonoindependientes, hallazgo de gran interés y que se comentará más ampliamente en el apartado de trasplantes.

A nivel de microscopia electrónica (L.Lombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986) pueden distinguirse tres tipos de estructuras: blastemales, tubulares y papilares. Estas se encuentran en estrecha contigüidad, o incluso entremezcladas, dentro de un mismo tumor.

Las células se disponen en grupos mal definidos de cordones, tubos o quistes; es destacable la presencia de un borde ciliado en asociación con microvellosidades. En las células epiteliales se puede observar algo de actividad secretora.

Las células blastemales, que son desde poligonales a elongadas, están organizadas en grupos compactos; hay un íntimo contacto entre las células, y están unidas por uniones rudimentarias imperfectas. El núcleo celular es irregular, con cromatina condensada periférica y de uno a tres nucleolos

bien desarrollados. Las organelas son escasas, las mitocondrias tienen pocas crestas y se ven aislados perfiles de retículo endoplásmico rugoso. El aparato de Golgi es inaparente y no hay actividad secretora. En algunas células se observan bloques de filamentos intermedios densamente agrupados. También algunas de estas células poseen cilios provistos de corpúsculo basal y matriz filamentosa axial. Los depósitos lipídicos son frecuentes, relleno parcialmente el citoplasma. Los lisosomas son escasos, pero aparecen algunas figuras mielínicas.

Otro tipo celular tiene una morfología epitelial con un contorno de elongado a prismático o poligonal; están dispuestas apretadamente, y en algunos campos existe pseudoestratificación, pero no se han encontrado islotes escamosos. Las células que revisten los túbulos o quistes son cilíndricas y están provistas de un sistema ciliar abundante y bien organizado. Cada una de estas células posee una estructura ciliar a la sección de tipo 9+2, pero en algunos casos se han observado estructuras ciliares de 8+2, 7+2 y 10+2. Los filamentos ciliares están en continuidad con el corpúsculo basal y las raicillas estriadas. Ocasionalmente se han visto estereocilios y microvellosidades.

Las uniones intercelulares entre las células epiteliales son muy elaboradas, se han encontrado complejos unión y desmosomas. En secciones ultrafinas teñidas con la impregnación de lantano se confirma la presencia de membranas tipo gap (annular nexus) en el interior de la célula. Estas están presentes no sólo en el tumor primario, sino también en las metástasis (Letourneau et al., 1975). Esta estructura no se ve habitualmente en el riñón normal. Otra característica de estas células es la abundancia en orgánulos (mitocondrias, ribosomas) y la existencia de un sistema de retículo endoplásmico rugoso en estrecha relación con el aparato de Golgi. También se ven diversas vacuolas secretoras.



Los campos blastemales y las áreas más mesenquimales del tumor están en estrecha continuidad con las epiteliales, con una transición suave entre ellas. A veces, se observan perfiles incompletos de membrana basal, aislando a los grupos de células epiteliales y blastemales entre sí. Más aún, los túbulos y glomérulos del parénquima residual del hámster aparecen aisladamente secuestrados por el tejido neoplásico, siendo rodeados por numerosas capas de células neoplásicas pero estando separadas de ellas por una gruesa membrana basal. Tampoco se observaron estructuras virales en los tumores primarios ni en el parénquima renal vecino.

Gonzalez et al. (1989) distinguían dos tipos celulares, uno grande de carácter epitelial y otro pequeño o indiferenciado. Ultraestructuralmente ambos tipos celulares tenían carácter epitelial, ya que presentaban desmosomas. Sin embargo, las células grandes poseían características epiteliales adicionales como microvellosidades, luces intracitoplásmicas y cilios. Cuando estos autores compararon la morfología ultraestructural del ríñon embrionario del hámster, encontraron similitudes de las células grandes con los túbulos metanéfricos precoces y de las células pequeñas con las células blastemales.

Cortés-Vizcaíno (1990) demostró nuevamente la heterogeneidad morfológica de este tumor, detectando la presencia de gránulos neurosecretorios intracitoplásmicos, que confirmaron el carácter neural o neuroendocrino de algunas de las áreas tumorales. Por otra parte se apreció la gran semejanza de las células blastemales o intersticiales con las células del metanefros normal del hámster en desarrollo, la existencia de una clara transición blastemal-epitelial y se confirmó la capacidad de tubulogénesis de las células blastemales.

El estudio ultraestructural de las lesiones precoces renales (Oberley et al., 1991), mostró células pequeñas con escaso citoplasma y sin características de diferenciación excepto por la presencia de algún desmosoma

primitivo. Estas células tuvieron una muy alta relación núcleo-citoplasma. El citoplasma presentó un escaso número de mitocondrias pequeñas, retículo endoplásmico rugoso poco abundante, ocasionales gotas de grasa y un aparato de Golgi pequeño.

#### **2.3.1.6. Cultivo de tejidos y citogenética.**

La primera línea celular in vitro establecida a partir de los tumores renales hormono-dependientes del hámster se debe a Kirkland, Sorrentino y Sirbasku (1974). Fue establecida a través de tres métodos de selección: 1) enriquecimiento mediante pases animales (trasplantes); 2) crecimiento en placas de Petri no tratadas y 3) dependencia de tipo sérico. Los cultivos de estas células tuvieron la esperada morfología epitelial y cuando se reimplantaron en huéspedes tratados con hormonas esteroideas mostraron propiedades idénticas a las del tumor primario. En cultivo, las células mostraron dependencia de al menos un 2,5% de suero bovino fetal en el medio, siendo óptimo entre el 10 y el 15%. La adición de estradiol al medio de cultivo en una concentración del rango de  $10^5$  veces mayor, empezando con 1 ng/ml, no muestra efecto estimulador. Sin embargo, la adición de suero bovino fetal al 5% al medio que contiene suero bovino fetal y estrógeno permite la reanudación de velocidades de crecimiento casi normales. Concluyendo que el estrógeno sólo no es suficiente para el crecimiento de las células tumorales en cultivo, pero que el suero bovino fetal contiene un factor o factores adicionales que promueven el crecimiento de estas células.

Sirbasku y Kirkland (1976) siguieron estudiando la nueva línea celular derivada de un tumor renal estrógeno dependiente del hámster, y vieron que la inoculación de estas células, designadas como línea H-301, en animales huésped mostró formación tumoral en los animales macho o hembra tratados con estrógenos, pero no en animales normales o sólo castrados. In vivo el

crecimiento tumoral fue inhibido por la progesterona, hidrocortisona y testosterona. La adición al medio de cultivo de estrógenos, entre 0,1 y 10 ng/ml no produjo efecto alguno, ni estimulante ni inhibidor. En cambio, la adición de suero bovino fetal a un medio conteniendo previamente suero bovino promueve un crecimiento máximo. El agente promotor del crecimiento del suero bovino fetal es termolábil siendo inactivado por tratamiento con calor a los 90°C. Por tanto, la línea de células tumorales renales H-301 muestra un patrón de crecimiento dependiente de estrógenos in vivo y dependiente de un factor sérico in vitro.

Morfológicamente las células en cultivo de monocapa son predominantemente epiteliales, con un menor componente de células fibroblásticas. Aproximadamente un 10-20% de las células aisladas muestran cilios móviles. A densidad celular baja las células tumorales se dividen en cultivo con un tiempo de duplicación de la población de 24 horas (Lin et al., 1980).

Talley et al.(1982) estudiaron el comportamiento de las células del tumor renal del hámster estrógeno-dependiente, primario y trasplantado, en cultivos de monocapa y de gel de colágena. Los cultivos monocapa realizados en frascos de plástico de tumores primarios mostraron un marcado declive en el número de células tras 4-6 días de cultivo. Las células del 1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> trasplante se mantuvieron constantes durante dos semanas y luego disminuyeron. Los cultivos celulares de un cuarto trasplante, a lo largo de un mes de cultivo presentaron un aumento del cuádruple en el número de células. Estos autores comprobaron que el declive del número de células cultivadas en monocapa, tanto de los tumores primarios como de los tumores del primer trasplante, puede prevenirse cultivándolas en geles de colágeno.

El estudio del patrón proliferativo de las células H-301 y sus derivados clonales (Soto et al., 1988) ha permitido observar que su proliferación in vitro es inhibida por el suero tratado con carbón dextrano (para inhibir los niveles endógenos de hormonas esteroideas) y que la inhibición fue más potente en el suero homólogo que en el heterólogo. En las células mantenidas con suero de hámster tratado con carbón dextrano al 2%, los estrógenos, tanto naturales como sintéticos, fueron incapaces de aumentar la proliferación celular. Sin embargo, a concentraciones mayores del 2% dicho suero inhibió significativamente la proliferación, pero los estrógenos anularon completamente este efecto inhibitor, cosa que no consiguen los esteroides no estrogénicos. Estos resultados fueron compatibles con las siguientes interpretaciones: a) el suero del hámster contiene un potente inhibidor específico de la proliferación de células sensibles a los estrógenos (estrocólona); b) los estrógenos inducen la proliferación celular neutralizando el efecto de este inhibidor sérico; c) la pobre correlación entre la unión al receptor (estrofilina) y la potencia proliferativa sugiere que dicho receptor no está implicado directamente en el efecto proliferativo de los estrógenos en dichas células; d) los resultados obtenidos en este modelo in vitro son compatibles con los obtenidos en el animal; y e) el proceso de tumorigénesis en el riñón del hámster, desencadenado por los estrógenos, probablemente implica la neutralización de la estrocólona y también su interacción directa con estas células a nivel del efecto "interruptor" (shut-off).

El efecto de los estrógenos en cultivo sobre el crecimiento de explantes celulares de túbulo contorneado proximal de riñón de hámster y en células sueltas disociadas derivadas de estos explantes (subcultivos), ha sido estudiado por Oberley et al. (1989), comprobando que los estrógenos pueden inducir directamente proliferación epitelial primaria a concentraciones

fisiológicas y aportando una fuerte evidencia adicional del importante papel que juegan las hormonas en la transformación neoplásica del riñón del hámster.

Gonzalez et al. (1990, 1993) observaron como los cultivos a largo plazo de células tumorales de hámster inducidas por dietilelbestrol conservaban su potencial maligno tanto in vitro como in vivo. Estos autores encontraron que las colonias tenían un crecimiento rápido con un núcleo de células altamente mitóticas que expresaron vimentina y desmina. Conforme las células emigraban hacia fuera, presentaron diferenciación, expresaron citoqueratina y las mitosis cesaron. Después de varios meses, las colonias se separaron de su sustrato, formando esférulas tridimensionales y permaneciendo viables en suspensión.

Cortés-Vizcaíno (1990) observó en los casos tumorales cultivados una morfología predominantemente epitelial, presentando algunos de ellos vacuolas de aspecto secretor. También encontró, aunque en menor frecuencia, un componente fusocelular y la presencia de un cilio móvil en uno de los casos. En dos casos observaron el desarrollo de largas prolongaciones citoplasmáticas con engrosamientos, que se correspondieron con las descritas como varicosidades o procesos neurales por otros autores a nivel de los neuroblastomas humanos (Tsokos et al., 1987) y también en otros tumores humanos de probable origen neural, como es el tumor de Ewing (Cavazzana et al., 1987).

El primer análisis citogenético del tumor renal del hámster inducido por estrógenos fue realizado por Cortés Vizcaíno (1990). Tuvo la posibilidad de estudiar cinco casos en los que obtuvo una mayoría de metafases de 44 cromosomas y pequeños porcentajes de metafases pseudotetraploides y aneuploides, si bien no se pudo concluir que las células aneuploides estuvieran directamente implicadas en los procesos de transformación neoplásica. También

podría explicarse por un mecanismo de no disyunción como consecuencia de la inestabilidad genética que se da a lo largo de la progresión tumoral (Nowell, 1986), pero sin que por ello halla de ser la inestabilidad genética la responsable de la propia progresión.

Banerjee et al. (1992a) han demostrado alteraciones cromosómicas persistentes y no aleatorias en las células epiteliales transformadas por estrógenos naturales y sintéticos. Hallando aumento de aneuploidía, de la frecuencia de micronúcleos, de fusiones teloméricas y endomitosis, roturas cromosómicas y de cromátides, y cambios cromosómicos numéricos; proponiendo que algunas de estas lesiones genéticas jugarían un papel crítico en la tumorigénesis.

#### **2.3.1.7. Trasplantes.**

Los tumores renales estrógeno inducidos en el hámster son trasplantables en forma de neoplasia estrógeno dependiente en pases seriados en hámsters intactos o gonadectomizados de cualquier sexo, siempre que el receptor esté pretratado con estrógenos (Kirkman, 1959a; LLombart-Bosch, 1965). Si el tumor es trasplantado sin la administración de estrógeno, no crece después de varios pases seriados. Los trasplantes subpaniculares del tumor renal muestran mayores velocidades de crecimiento que los intratorácicos o los del interior de los abazones. Después del tercer pase puede esperarse al menos un 100% de crecimiento en los trasplantes subpaniculares mantenidos con DES. El periodo de latencia de palpabilidad (entre tres y doce meses) de los trasplantes y el tiempo de supervivencia del huésped tiende a hacerse más corto, y la velocidad de crecimiento del tumor más alta en los sucesivos pases seriados.

Los trasplantes, generalmente, después de un largo periodo de hormonodependencia, adquieren la hormonoindependencia o autonomía, ocurriendo esto normalmente tras cinco años de trasplantes seriados (Kirkman,

1957). El periodo de latencia de la palpabilidad es al principio de casi un año, pudiendo llegar a disminuir hasta 2-3 semanas al cabo de 9 años (Bloom et al., 1963b).

En el Servicio de Cancerología Experimental del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia han sido mantenidos in vivo desde 1961 numerosas líneas hormono-dependientes y hormono-independientes, mediante trasplantes subcutáneos, y dos de estas líneas continúan siendo transferidas actualmente, después de 31 años (hormono-dependiente) y de 25 años (hormono-independiente). Una línea tumoral hormonodependiente fue iniciada en un hámster tratado con DES en 1961 y mantenida mediante trasplantes sucesivos en hámsters condicionados con DES durante 35 generaciones, hasta el final de 1966, momento en el cual el tumor adquirió la hormono-independencia. El tiempo de latencia era de 72 días en 1962 y se elevó progresivamente a 385 días en 1966. Una rápida modificación en su velocidad de crecimiento se produjo, sin cambios ambientales aparentes, en el pase número 34; de ese modo, en las generaciones 34 y 35 la neoplasia experimentó un rápido crecimiento. Su periodo de latencia disminuyó primero a 92 días en 1967, y subsiguientemente a 35 días en 1972. Esta aceleración de la velocidad de crecimiento tumoral se asoció con una disminución de su dependencia frente a los estrógenos. Simultáneamente se observaron otras modificaciones morfológicas y ultraestructurales que se detallaran a continuación.

#### **2.3.1.7.1. Aspectos macroscópicos.**

Los trasplantes en el curso del primer mes tras la implantación ofrecen un aspecto poliquístico o transparente (Llombart-Bosch, 1964, 1965). A partir del primer mes se van haciendo más sólidos, rellenándose los espacios quísticos por masas carnosas. En los más tardíos (6-7 meses) ya puede

observarse su configuración típica, es decir, tumoraciones de gran tamaño (unos 10 cm), de contorno polilobulado y en las que alternan áreas carnosas o sólidas, nodulares, de coloración blanco amarillenta, con focos necróticos y formaciones quísticas rellenas generalmente de líquido hemorrágico.

#### **2.3.1.7.2. Aspectos histológicos.**

El patrón microscópico predominante (Llombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986) en tres líneas tumorales trasplantadas durante 24 años fue una textura sólida, poco diferenciada, con células blastemales y algunas pseudorrosetas. También se observaron algunas células mesenquimales fusiformes, con una distribución fasciculada o estrellada perivascular. En los trasplantes precoces se detectó la presencia de diferenciación tubular o quística, recubiertas por epitelio cúbico o prismático. Los espacios epiteliales no aparecieron en trasplantes tumorales más avanzados.

Dentro de los trasplantes hormonodependientes el DES indujo cambios histológicos en el tejido. Las neoplasias de crecimiento lento poseyeron células claras hipernefroides, con vacuolas y numerosos lípidos citoplásmicos, mientras que los tumores expuestos a altas concentraciones de DES crecieron más rápidamente y desarrollaron una configuración fusocelular, haciéndose escasos los lípidos y abundante la necrosis.

#### **2.3.1.7.3. Histoquímica.**

En ambos tipos de células tumorales, hormono-dependientes así como hormono-independientes, se observó una intensa actividad de fosfatasa alcalina, ATPasa, fructosa-1,6-difosfatasa y deshidrogenasas (isocitrato, lactato y fumarato); similares a las vistas en las neoplasias renales primarias y mucho más altas que en el tejido renal normal. No se apreció actividad de glucosa-6-fosfatasa ni de beta-hidroxibutirato deshidrogenasa (Llombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986).



#### 2.3.1.7.4. Ultraestructura.

La presencia de grupos, sábanas y pseudorrosetas de células blastemales indiferenciadas es un hallazgo patognomónico para estos tumores. Las células epiteliales localizadas en estructuras tubulares o quísticas van progresivamente desapareciendo en los sucesivos trasplantes de la neoplasia.

Las células vecinas se entremezclan estrechamente a través de las membranas plasmáticas adyacentes, unidas por desmosomas y uniones de tipo nexus. El tamaño celular es muy variable, estando las células grandes y pequeñas dispuestas juntas y apretadamente. Algunas células oscuras aparecen entremezcladas con claras. El núcleo celular es redondo o elongado, con cromatina finamente dispersa y varios nucleolos localizados en la periferia. Durante las primeras generaciones del trasplante hubo numerosos orgánulos citoplasmáticos. Más aún, aparecieron filamentos intermedios muy agrupados y numerosos microtúbulos. El aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso fueron muy prominentes pero no hubo evidencia de secreción. Se observaron aislados gránulos pequeños y densos recubiertos por membranas. Las mitocondrias estaban bien preservadas y poseían varias crestas. Se vieron escasos depósitos lipídicos y también se encontraron grupos de cilios y raicillas ciliares en la superficie de la célula (Llombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986).

Después de 24 años de trasplante, el tumor permanece bajo control hormonal y mantiene una morfología celular similar, pero los orgánulos son escasos; no se ven filamentos intermedios ni microtúbulos. Los perfiles de retículo endoplásmico rugoso son más numerosos y ocasionalmente aparecen partículas víricas de tipo R. A veces se observan cilios aislados. En el tumor hormono-independiente (después de 18 años) se presentaron varias modificaciones ultraestructurales: las células asumieron una apariencia mesenquimal, se dispusieron de modo laxo sin adhesividad; aparecieron

proyecciones citoplasmáticas en el seno de una matriz mixoide, y las células estuvieron desprovistas de membranas basales. También pudieron observarse algunos desmosomas y uniones tipo nexus, conectando células adyacentes. En el interior del citoplasma hubo numerosos perfiles de retículo endoplásmico rugoso llenos de partículas de tipo retroviral. Las características morfológicas de estas partículas fueron similares a las ya descritas en los fibroblastos de la línea BHK/21 y en el melanoma maligno trasplantable del hámster sirio. Las partículas de tipo retrovirus sólo han sido vistas dentro del retículo endoplásmico rugoso de las células tumorales, que está implicado en la elaboración de la cápside. Únicamente se observaron en neoplasias con pérdida completa o parcial de la dependencia hormonal (Llombart-Bosch, 1973; Dodge, 1974), nunca en el riñón normal del hámster, ni en los tumores primarios, ni en los trasplantes hormono-dependientes. Llombart-Bosch (1973) interpretó que este hecho permite suponer que este virus, reprimido en el genoma del hámster, hace su aparición cuando una célula de este animal, por distintos motivos (exógenos, endocrinos o endógenos víricos) se maligniza. En este caso la aparición del virus RTP del hámster sería no causa sino testimonio de la malignización de un grupo celular del mismo.

#### **2.3.1.8. Histogénesis.**

La histogénesis de los tumores renales estrógeno-inducidos del hámster todavía permanece incierta.

Ya en la década de los 50 se desató la polémica entre la escuela inglesa, con Horning a la cabeza (Horning y Whittick, 1954), que defendía su origen epitelial en los túbulos renales, y la escuela alemana (Dontenwill y Eder, 1959) en la que, por el contrario, se postulaba un origen mesenquimal a partir de las células del intersticio renal. Kirman (1959), en su extensa

monografía, demostró detalladamente que era posible encontrar firmes argumentos que apoyaban tanto una como otra teorías histogenéticas.

Llombart-Bosch, en su tesis doctoral (1964), encontró pruebas que confirmaban la hipótesis epitelial de Horning, pero no descartaba del todo la hipótesis contraria. Citándole textualmente: "Es cierto que en la presente tesis no se aclaran completamente todos los aspectos de la cuestión; a nuestro modo de ver el problema que subsiste, y al que pensamos dedicarle estudios posteriores, es la relación existente entre el epitelio tubular y el mesénquima intersticial. Nos referimos al conocimiento de su interacción, en la que no debe olvidarse para su correcta interpretación que poseen un común origen mesonefrol y que, por tanto, están dotados de semejante potencia prospectiva".

Posteriormente, publicó un nuevo estudio de estos tumores (Llombart-Bosch y Peydró, 1975), con microscopia electrónica e histoquímica, confirmando las dificultades implicadas en determinar por simple morfología óptica un origen tubular o intersticial para el tumor. Encontraron argumentos obvios en favor de las dos posibilidades, probablemente porque el DES en el riñón del hámster induce no sólo una respuesta hiperplásica de las células epiteliales tubulares sino también una hiperplasia de los restos de células localizados en las áreas intersticiales del riñón. La hiperplasia de células intersticiales debe ser considerada como el origen inicial de esta neoplasia, ya que esta lesión se encontró íntimamente asociada con el tumor, apoyando también dicha hipótesis los estudios histoquímicos y ultraestructurales. La investigación histológica y ultraestructural de estos tumores, comparándolos con el metanefros del riñón del hámster en desarrollo, parece determinar un origen del tumor en las células intersticiales, debiendo ser considerado como un nefroblastoma de tipo epitelial-blastemal. Para estos autores parece probable que los elementos mesenquimales de origen metanéfrico, que permanecen en el

estroma renal del hámster recién nacido como células intersticiales, son los responsables de la continuidad del crecimiento bajo la estimulación del DES.

Más tarde, diversos hechos morfológicos, histoquímicos y ultraestructurales de estas neoplasias (Llombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986) argumentaron en favor de un origen disgenético, en el que los componentes epiteliales y mesenquimales crecen juntos. Hasta el momento actual en cuanto a la verdadera histogénesis de estos tumores no ha sido aclarada ninguna de estas posturas: la epitelial (carcinoma) o la disembrionaria (nefroblastoma). Ambas deben aceptarse como pertenecientes a una neoplasia de patrón histológico heterogéneo pero con una historia natural bastante homogénea.

Se ha postulado también un origen en las células yuxtaglomerulares (Dodge y Kirkman, 1981), habiéndose demostrado mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de renina en este tumor (Dodge et al., 1988).

Hacker et al. (1988, 1991) afirmaron que la morfología, el patrón histoquímico enzimático y la inmunofluorescencia apoyan un origen mesenquimal, probablemente sean neoplasias derivadas de células musculares lisas vasculares, probablemente pericitos, de un subtipo particularmente sensible a la estimulación y transformación hormonal, pudiendo raramente adquirir durante la progresión tumoral un fenotipo epitelial por transformación metaplásica.

Otros estudios realizados sobre estos tumores renales comparándolos con el riñón del hámster en desarrollo llevaron a la conclusión de que los mismos se originan en una célula precursora (blastemal) comprometida con la vía de diferenciación epitelial (Gonzalez et al., 1989). Además, este mismo grupo de investigadores (Oberley et al., 1989, 1991), sobre cultivos de explantes de células del túbulo contorneado proximal y

lesiones precoces renales inducidas por estrógenos en el hámster, afirmaron que la célula intersticial primitiva en el riñón del hámster está fuertemente implicada en el origen de las neoplasias DES-inducidas.

Goldfarb y Pugh (1990) tras el estudio de las microneoplasias y las displasias tubulares proximales renales inducidas en el hámster por cuatro estrógenos diferentes, llegaron a la conclusión de que las displasias presentes en el túbulo proximal y desarrolladas en el parénquima renal profundo son los precursores más probables de los cánceres estrógeno-inducidos.

Cortés-Vizcaíno (1990) propuso como origen de los tumores renales del hámster inducidos por dietilestilbestrol, tras una profunda aproximación biológica, morfológica e inmunológica, a las células indiferenciadas o blastemales situadas en el intersticio renal, células de estirpe metanéfrica con expresión fenotípica múltiple, fundamentalmente epitelial, mesenquimal y neural.

## **IV- MATERIAL Y METODOS**

## 1- ANIMALES Y DIETA.

Los hámsters dorados sirios (HDS), machos y hembras, empleados en la experiencia, procedieron del animalario del Servicio de Cancerología Experimental del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, en el que han sido mantenidos desde la década de 1960 cruzando las distintas camadas entre ellas.

Todos los hámsters fueron separados de sus madres a las cuatro semanas después del nacimiento y distribuidos por sexos en jaulas, 3 ó 4 por cada una de ellas, bajo las mismas condiciones ambientales durante el estudio experimental. Se alimentaron con agua y una dieta comercial de mantenimiento para animales de laboratorio (LETICA®, ref.: IPM-R20) *ad libitum*, con los siguientes niveles nutricionales: humedad, 9,00%; proteína, 17,00%; lisina, 0,70%; metionina + cistina, 0,50%; grasa bruta, 3,00%; fibra bruta, 5,00%; cenizas, 5,00%; calcio, 0,80%; fósforo, 0,65%; cloruros, 0,60%; M.E.L.N., 57,00% y energía metabolizable de 2.950 Kcal./Kg.

## 2- CARCINOGENOS Y DOSIFICACION.

El dietilestilbestrol (DES) y la N-etil-N-nitrosourea (ENU) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co, St Louis, MO y conservados en un arcón congelador a -20° C. Inmediatamente antes de ser administrado el ENU se disolvió en suero fisiológico a una concentración de 10 mg/ml. El DES se administró en forma de comprimidos de absorción retardada, fabricados por el Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario, y constituidos por una mezcla de DES y carboximetilcelulosa en forma de gel (disolución en agua destilada), siendo desecados y prensados posteriormente. Cada comprimido contenía 25 mg de principio activo y excipiente en cantidad suficiente para 100 mg.

El ENU se administró a las madres en inyección única por vía intraperitoneal a razón de 100 mg/kg de peso en el día 15 de gestación. El parto se produjo entre las 12 y 24 horas postratamiento.

Los comprimidos de absorción retardada de 25 mg de DES se implantaron subcutáneamente en la región dorsal de los animales (machos y hembras) gonadectomizados a las 8 semanas de vida. Este implante se repitió cada 3 meses durante un periodo 9 meses.

### **3- GONADECTOMIA.**

La gonadectomía se practicó, tanto en machos como en hembras, a los dos meses de vida, anestesiando previamente a los animales con éter etílico anestésico y tratando de prolongar su acción durante todo el periodo de la intervención sin llegar a ocasionar una parada cardio-respiratoria por efecto tóxico del éter.

Para la castración (bilateral) en los machos se realizaba en la línea media abdominal y 1 cm por encima de la uretra una incisión transversal de aproximadamente 1 cm de longitud, seccionando piel y planos musculares y penetrando en cavidad peritoneal. Con la ayuda de unas pinzas y ejerciendo una leve presión sobre la bolsa escrotal podíamos entonces observar con facilidad como asomaba la porción superior de ambos epidídimos. Pinzando los mismos y realizando una leve y continuada tracción para no desgarrar el cordón espermático, alojábamos los testículos fuera de la cavidad abdominal, se ligaba su pedículo vascular con hilo de sutura estéril (seda de 2 ceros), seccionando a continuación el cordón. Posteriormente, se opusieron los bordes quirúrgicos de la herida (planos muscular y cutáneo) longitudinalmente y se colocaron 4 ó 5 agrafes metálicos durante dos semanas.



En las hembras la técnica sufría pequeñas variaciones. La incisión abdominal era supra-infraumbilical en línea media de 1 cm de longitud y, una vez en cavidad abdominal, se usaba un separador para ayudar a desplazar las asas intestinales y dejar expuestos los cuernos uterinos y los ovarios. Seguidamente, con unas pinzas finas, se traccionaba suavemente del tercio superior del cuerno uterino y se ligaba con hilo de sutura (seda de 2 ceros), seccionando por encima de este punto y extirpando ovario y tercio distal del cuerno uterino. A partir de este punto se continuaba la técnica igual que en los machos.

Una vez finalizada la intervención, los hámsters se distribuían por sexos y en grupos de 3/4 en cajas limpias, permitiéndoles durante las primeras 24 horas sólo la ingesta de agua, reanudándose la alimentación con pienso a partir del segundo día.

#### **4- DISEÑO EXPERIMENTAL.**

El número total de animales con el que se inició la experiencia fue de 266, siendo el número final de animales estudiados (número efectivo) de 221 (83,08%). Hubo una mortalidad global durante la experiencia de 45 animales (16,92%), que por diversas causas se excluyeron del estudio (Tabla 1). El número efectivo de animales se distribuyó en los siguientes grupos (Tabla 2):

##### **-Grupo DES machos**

Se pudieron estudiar un total de 36 hámsters machos (nº inicial de 40), gonadectomizados a las 8 semanas de vida e implantándose en el mismo momento, en región dorsal, el primer comprimido de 25 mg de DES, que se repuso cada 3 meses durante 9 meses.

##### **-Grupo DES hembras**

Constituido por 20 hámsters hembras (nº inicial de 30), ovariectomizadas a las 8 semanas de vida y con la misma pauta de intoxicación con DES que el grupo 1.

#### **-Grupo ENU**

El total de animales es de 62 (nº inicial de 70), intoxicándose a las madres con ENU por vía intraperitoneal en el día 15 de gestación (se consideró primer día de embarazo el día después del apareamiento) a razón de 100 mg/kg de peso corporal, y estudiándose las distintas camadas obtenidas. Se establecieron cuatro subgrupos:

1. Hámsters machos no castrados en un número total de 17.
2. Hámsters machos castrados a los 2 meses de vida en un número total de 14.
3. Hámsters hembras no ovariectomizadas en un total de 19.
4. Hámsters hembras gonadectomizadas a los dos meses de vida con un total de 12 animales.

#### **-Grupo ENU+DES**

Este cuarto grupo fue constituido por un total de 52 animales (nº inicial de 75), 30 machos y 22 hembras, todos ellos gonadectomizados a las 8 semanas de vida, implantándose subcutáneamente un comprimido de 25 mg de DES en el momento de la intervención, repitiéndose cada 3 meses durante 9 meses. Todos estos animales procedían de camadas de las que a las madres se les había administrado ENU por vía intraperitoneal a las dosis ya referidas anteriormente.

#### **-Grupo Control**

Un total de 30 animales, 20 machos y 10 hembras, la mitad de ellos gonadectomizados a los dos meses, se mantuvieron a lo largo de toda la

experiencia bajo las mismas condiciones de laboratorio, siendo sacrificados al final de la misma y estudiados sus órganos.

#### **-Grupo Control "MADRES"**

Este grupo estuvo compuesto por 15 hembras intoxicadas durante el embarazo con ENU para estudio posterior de las camadas, intentando observar los efectos del ENU sobre animales adultos.

#### **-Grupo Control DT-diaforasa**

Constituido por 6 animales machos adultos no gonadectomizados y alimentados durante 14 días con una mezcla del pienso comercial y dos inductores de los sistemas enzimáticos antioxidantes, Sudán III y BHA (butilhidroxianisol), siendo sacrificados tras este periodo de tiempo. No fueron intoxicados con DES ni ENU.

### **5- ESTUDIO MORFOLOGICO.**

Todos los animales intoxicados fueron sacrificados en pequeños grupos y a intervalos de un mes aproximadamente, siendo elegidos predominantemente aquellos con peor estado general y distribuidos por series experimentales. Una vez el último animal experimental fue sacrificado, se autopsiaron el resto de animales control.

Se practicaron necropsias completas, incluyendo la disección del sistema nervioso central, tumores asociados a sistema nervioso periférico y lesiones tumorales cutáneas y de partes blandas. Se realizó estudio histológico de la totalidad de los tumores observados macroscópicamente, así como de sistema nervioso central, ambos riñones, hígado y pulmones, mostrasen o no lesiones macroscópicas. En todos aquellos tumores que por su tamaño lo permitían se tomaban muestras, que se congelaban inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaban en un arcón congelador a -80°C.

### **-Microscopia óptica**

Las muestras fueron fijadas en formol al 10 % tamponado durante 24-36 horas. Posteriormente, se procesó en alcoholes de concentración creciente (deshidratación) y en xiloles para, a continuación, incluirlos en parafina.

Las secciones de las muestras, entre 4 y 6 micras de grosor, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Otros métodos de tinción empleados fueron el PAS, tricrómico de Masson, reticulina de Gomori y Giemsa.

### **-Microscopia electrónica**

Durante la práctica de la autopsia se seleccionaban pequeños fragmentos tumorales o de áreas sospechosas y se fijaban de forma inmediata en glutaraldehído al 2,5% en tampón Sorensen. Se recogieron un total de 102 muestras que se seccionaron con bisturí en forma de pequeños cubitos entre 0,1 y 0,2 cm, reservándose de 6 a 8 de los mismos. También se tuvo la posibilidad de procesar 7 cultivos celulares, procedentes de tumores renales para estudio ultraestructural.

El tratamiento del material procedente de las muestras practicadas durante las necropsias en el Servicio de Microscopia Electrónica fue como sigue:

- 1- Fijación en glutaraldehído al 2,5% en tampón Sorensen (0,1 M, pH 7,3) a 4º C, entre 2 y 4 horas.
- 2- Lavado en tampón Sorensen durante 12-78 horas, a 4º C en nevera, cambiándolo varias veces.
- 3- Postfijación en tetróxido de osmio al 2% en tampón Sorensen durante 2 horas.
- 4- Lavado corto en agua destilada.
- 5- Deshidratación en concentraciones crecientes de acetona.

6- Aclaramiento en óxido de propileno, seguido de óxido de propileno más epón y finalmente de epón puro.

7- Inclusión en epón puro (Luft, 1961) realizando los bloques en medias cápsulas, que se mantienen a 40° C en estufa durante las primeras 24 horas y a 60° C en las segundas 24 horas.

8- Realización de cortes semifinos con un ultramicrotomo LKB

### III.

9- Tinción de los mismos con azul de toluidina y montaje.

10- Revisión de los semifinos en el microscopio óptico con el fin de comprobar el material obtenido y seleccionar el área más representativa para realizar los cortes ultrafinos.

11- Realización de las secciones ultrafinas en el ultramicrotomo Reichert-Jung (ultracut E).

12- Tinción de los ultrafinos con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

13- Revisión de los ultrafinos teñidos en el microscopio electrónico Jeol 100 B y realización de placas fotográficas.

14- Revelado de los negativos y posterior estudio de los positivos.

El procesado de los cultivos para el estudio ultraestructural de los mismos fue como sigue a continuación:

1- Obtención del cultivo celular como se expondrá con más detalle posteriormente en frascos de cultivo FALCON de 25 cm<sup>2</sup>.

2- Extracción total del medio de cultivo.

3- Lavado con tampón PBS estéril o con solución de Hank, 2 ó 3 veces, procurando no arrastrar y soltar las células.

4- Fijación en glutaraldehído al 2,5% en tampón Sorensen (0,1 M, pH 7,3) y mantener en nevera a 4º C durante una hora y en posición horizontal.

5- Sin quitar el glutaraldehído, rascar el suelo del frasco para soltar las células y recoger la suspensión celular en un tubo cónico (Laboratorios NUNC-Denmark).

6- Centrifugar durante 5 min. a 1000 rpm.

7- Eliminar el sobrenadante.

8- Resuspender el sedimento en tampón Sorensen.

9- Repetir 2 veces más los pasos 6, 7 y 8.

10- Por último, quitar el sobrenadante y seguir el procesado como a partir del punto 2 para las muestras biópsicas.

## **6- INMUNOHISTOQUIMICA.**

El estudio inmunohistoquímico se aplicó sobre la totalidad de las lesiones tumorales obtenidas. Para ello, tras el diagnóstico y revisión de todo el material con microscopia óptica, se seleccionaron aquellos bloques que correspondían a las lesiones más significativas, practicando sobre las secciones de estos bloques los distintos marcadores. De cada bloque se realizaron entre 20 y 25 cortes de 3 a 5 micras de grosor. En las tablas 3 y 4 pueden observarse los distintos anticuerpos empleados y sus características.

La preparación e inmunotinción del material se llevó a cabo como sigue:

1- Fijación de las secciones parafinadas en el portaobjetos. Estos últimos fueron desengrasados previamente con alcohol, y una vez secos, se trataron con un adhesivo de tejidos (solución al 10% p/v de cola sintética blanca

en agua destilada). A continuación se dejan secar los portas con el tejido cortado a 60° C durante 30 minutos.

2- Desparafinar los cortes. Se realizaron 3 baños de 10 minutos de duración en xileno, a temperatura ambiente.

3- Hidratación. Se elimina el xileno con 2 baños en alcohol absoluto de 3 minutos y 2 baños en alcohol de 70° de 3 minutos. Posteriormente se lava en agua corriente.

4- Tratamientos previos a las técnicas inmunohistoquímicas. El fijador utilizado, formol neutro tamponado al 10%, de tipo aldehído puede formar enlaces con el antígeno pudiendo enmascararlo. Por esto, frente a determinados anticuerpos, queratinas, se realizó un tratamiento enzimático, para aumentar la antigenicidad, con tripsina (Difco, USA) 0,1% más cloruro cálcico 0,1%, a pH 7,8 ajustado con NaOH 0,1%, o bien en PBS. Se dejó actuar durante 30-60 minutos en estufa a 37° C.

5- Bloqueo de la peroxidasa endógena. Los portas se someten a un baño durante 30 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en alcohol metílico. En los cultivos se sustituye el alcohol metílico por PBS con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%.

6- Lavado con tampón PBS 0,1 M a pH 7,6-7,7, con tres cambios de 5 minutos cada uno de ellos.

7- Bloqueo de la actividad inespecífica del colágeno (supresión de fondo). Se realiza con suero obtenido de animales distintos a los utilizados para la obtención del anticuerpo primario. Se ha empleado suero de caballo (OXOID) diluido al 20% en suero fisiológico, incubando los portas durante 20 minutos.

8- Incubación durante 45 minutos con el anticuerpo primario. Los anticuerpos frente a los distintos antígenos se diluyen, a las concentraciones expresadas en las tablas 3 y 4, en suero de caballo al 10% en suero fisiológico.

Las secciones se incuban a temperatura ambiente, cubriéndolas con 0,2 ml del anticuerpo diluido, directamente sobre el tejido. Previamente se ha retirado el suero de caballo del paso anterior. Algunos anticuerpos necesitaron incubación nocturna (anti-DT-diaforasa, anti-vimentina, 13E10, anti-proteína gliofibrilar ácida y anti-antígeno de membrana epitelial), realizándose esta en cámara húmeda a 4º C.

9- Lavado con PBS 0,1M (3 cambios de 5 min. cada uno).

10- Incubación durante 30 min. con el anticuerpo secundario o puente. Las secciones se cubren con 0,2 ml de anticuerpo secundario diluido en suero de caballo al 10% en suero fisiológico. Para los anticuerpos primarios policlonales obtenidos en conejo se usaron inmunoglobulinas de cabra frente a las inmunoglobulinas de conejo (Bio-makor), diluidas a 1/100 en suero de caballo al 10% en suero fisiológico. Con los anticuerpos monoclonales obtenidos en ratón se utilizaron anticuerpos de conejo biotinizados frente a las inmunoglobulinas de ratón (Vector, USA), diluidos a 1/200 en suero de caballo al 10% en suero fisiológico.

11- Lavado con PBS 0,1M (3 cambios de 5 min. cada uno).

12- Procedimiento peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Sternberger et al., 1970) frente a los anticuerpos policlonales, utilizando complejos PAP obtenidos en conejo (Dako) diluidos a 1/100 en suero de caballo al 10% en suero fisiológico. Solución de avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Hsu et al., 1981) para los anticuerpos monoclonales, usando una dilución de 10 µl de avidina y 10 µl de biotina (Vector, USA) por cada ml de dilución de suero de caballo al 10% en suero fisiológico. Las secciones se incuban durante 30 min. a temperatura ambiente.

13- Lavado con PBS 0,1M (3 cambios de 5 min. cada uno).



14- Disolución reveladora de la actividad peroxidásica. Los cromógenos empleados fueron la bencidina ( $\beta,\beta$  diaminobenzidine tetrahydrochloride) (DAB) (Sigma Chem Co., USA) o el carbazol (2,3-amino-9 etilcarbazol) (AEC) (Sigma Chem Co., USA) en soluciones preparadas extemporáneamente. La disolución reveladora de DAB se prepara diluyendo 50 mg de DAB en 100 ml de tampón Tris 0,2M a pH 7,4, añadiendo en el momento de su uso y bajo agitación 35  $\mu$ l de  $H_2O_2$  de 110 volúmenes. La disolución se filtra sobre las preparaciones y se incuban en oscuridad y a 37° C durante 3-5 min., formando un precipitado marrón e insoluble en alcohol, pudiendo ser deshidratadas y montadas con los medios de montaje habituales. La disolución de carbazol se prepara disolviendo 20 mg de AEC en 1 ml de N,N dimetilformamida, añadiendo 100 ml de tampón acético-acetato de sodio 0,1M a pH 5,2. En el momento de su uso se añaden 35  $\mu$ l de  $H_2O_2$  de 110 volúmenes bajo agitación. La disolución se filtra sobre los portas, incubándose en oscuridad durante 30 min., formando un producto rojo soluble en alcohol no pudiéndose deshidratar.

15- Lavar abundantemente con agua durante varios minutos.

16- Contratación nuclear. Se tiñen los núcleos con hematoxilina y se lava bien a continuación.

17- Montar. Cuando se utilizó el carbazol, las preparaciones fueron montadas con glicerina o glicerina gelatinada de Kayser (Merck), por la extrema solubilidad de este colorante en solventes orgánicos.

Las distintas tinciones inmunohistoquímicas se realizaron bajo una serie de controles para asegurar la especificidad del antígeno detectado y valorar la efectividad de la inhibición de la peroxidasa endógena y del colágeno. Como controles positivos se utilizaron secciones cuya reactividad frente al antígeno a estudiar había sido establecida de antemano, siendo

procesadas del mismo modo que las secciones a analizar. Los controles negativos se basaron en la sustitución de uno de los anticuerpos por suero no inmune diluido o tampón en un corte testigo de probada reactividad.

Los resultados inmunohistoquímicos se expresaron como:

a) porcentaje global de células tumorales marcadas, estableciéndose 4 grupos: hasta el 25% (1), 25 a 50% (2), 50 a 75% (3) y más del 75% (4). Indicándose también el carácter focal o difuso de su distribución.

b) intensidad de la inmunotinción, con los siguientes grados: negativa (-), débil (+), moderada (++) y fuerte (+++).

c) distribución de la inmunotinción a nivel histológico (patrones tisulares -epitelial, fusocelular, hipernefroide,etc.) y celular (citoplásmico - difuso, granular, golgiano- o nuclear).

## **7- ESTUDIO BIOQUIMICO Y ACTIVIDAD DE LA DT-DIAFORASA.**

### **1- Obtención de muestras**

Los hámsters fueron sacrificados como anteriormente se ha descrito. Ambos riñones fueron cortados en dos mitades, una se reservó para el estudio histológico y la otra fue inmediatamente congelada por inmersión en nitrógeno líquido y destinada a la determinación de la DT-diaforasa una vez obtenidos el citosol y los microsomas de cada uno de ellos, como se detallará en el apartado correspondiente.

### **2- Preparación de homogeneizados y obtención del citosol.**

La homogeneización de los riñones de los hámsters se hizo con tampón fosfato sódico 0,1M, a pH 7,0 y 4°C de temperatura, mediante un homogeneizador automático, previo troceado fino con tijeras.

### **3- Centrifugación**

Los homogeneizados frescos se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos. Se aspiró el sobrenadante y este a su vez fue centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos. Ambas centrifugas utilizadas estaban refrigeradas (3-6°C). El sobrenadante de la última centrifugación es el que se utilizó como muestra en los procedimientos analíticos. Esta fracción celular es denominada citosol y contiene los componentes solubles del citoplasma. La fracción celular microsomal se obtiene a partir del precipitado de la última centrifugación (100.000 x g) , una vez se ha recogido el sobrenadante y se resuspende en 2 ó 3 ml del mismo tampón en el que fue preparado el homogenado.

Una vez obtenidas las distintas fracciones celulares, se separaron en alícuotas que se guardaron a -28°C hasta el momento de su utilización para las distintas pruebas analíticas. De esta forma, eliminamos la posibilidad de desnaturalización de proteínas y, por tanto, de pérdida de actividad que se pueda dar si congeláramos y descongeláramos las muestras repetidamente.

### **4- Determinación del contenido de proteínas**

La determinación de proteínas se realizó por el procedimiento de Lowry et al. (1951); con las modificaciones que a continuación se detallan.

Los reactivos (PANREAC Montplet-Esteban, Barcelona) empleados fueron:

-reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (2%)+ $\text{NaOH}$ (0,4%) (en agua destilada).

-reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (1%) (en agua destilada).

-reactivo C: Na-K tartrato (2%) (en agua destilada).

-reactivo D: consistente en 99 partes del reactivo A y una parte de la mezcla del reactivo B más el reactivo C a partes iguales.

-reactivo E: Folin-Ciocalteu 1N (en agua destilada).

Procedimiento:

Se colocan 2 ml del reactivo D y 50  $\mu$ l de la muestra, se agita durante unos segundos y se deja incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añaden 200  $\mu$ l del reactivo E, se agita y se incuba 10 minutos más. Se mide, entonces, la absorbancia en el espectrofotómetro a 578 nm.

Los valores de absorbancia de cada muestra se extrapolan en la ecuación lineal obtenida midiendo la absorbancia correspondiente a las cantidades de muestra conocidas (en mg proteína/ml) de una curva patrón de seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), y posteriormente se corrige el valor según la dilución realizada.

Todas las determinaciones se realizaron como mínimo por duplicado, preparándose el reactivo D y la dilución del Folin-Ciocalteu inmediatamente antes de su utilización. La seroalbúmina bovina se había preparado en alícuotas que se mantenían congeladas a  $-28^{\circ}\text{C}$ .

Las determinaciones de proteínas se realizaron en los sobrenadantes resultantes de las correspondientes centrifugaciones, en los microsomas y en el homogenado fresco, para poder expresar los datos en actividad específica, es decir referirlos al contenido de proteína de la muestra, para cada caso en particular.

#### **5- Determinación de la actividad DT-diaforasa**

Esta se realizó con arreglo a Lars Ernster et al. (1962).

Fundamento:

Esta determinación está basada en las reacciones que a continuación se detallan:

NADPH+menadiona o vit. K<sub>3</sub> > DT-diaforasa > NADP<sup>+</sup> +  
menadiol

menadiol + citocr. c ox. > espontánea > menadiona + citocr. c  
red.

Midiendo en un espectrofotómetro, a 550 nm, el paso del  
citocromo oxidado, que posee un coeficiente de extinción molar a esta longitud  
de onda (E<sub>550</sub>) de 18,5 nm<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, a citocromo reducido.

Procedimiento:

El ensayo se realiza a temperatura de 30°C, con un volumen total  
en la cubeta de 1 ml y con la longitud de onda reseñada en el apartado de  
fundamento. La mezcla reactiva contiene: KCN 0,5mM, NADPH 0.5mM, K<sub>3</sub>  
10 µM y 77 µM de citocromo c.

La actividad real dependiente del enzima se obtiene al inhibir esta  
mediate 10<sup>-5</sup> M de dicumarol añadido a la mezcla.

## 8- TRASPLANTES.

Las muestras para los trasplantes se obtuvieron de los tumores  
renales primarios de los hámsters de las series DES y ENU+DES. Previamente  
a la realización de los trasplantes, se preparaba a los hámsters receptores  
mediante castración e implante de un comprimido de absorción retardada de 25  
mg de DES, que se renovaba cada 3 meses.

La técnica consistía en tomar una muestra de tumor renal, bajo  
condiciones de asepsia, entre 0,5 a 1 cm de tamaño, del animal que se  
sacrificaba, eliminando a continuación los restos de parénquima renal normal  
presente o aquellas áreas que por su aspecto macroscópico fuesen sospechosas  
de necrosis tumoral o hemorragia. Posteriormente se fragmentaba la muestra

con unas tijeras bañando el tejido en una pequeña cantidad de suero fisiológico. Una vez obtenida una homogeneización del material, este se introducía mediante un trócar adecuado en la región dorsal del animal previamente seleccionado y se suturaba la herida mediante una grapa metálica que se retiraba a la semana del implante. Esta operación se repetía en dos animales más para asegurar el prendimiento del implante, trasplantándose cada tumor renal primario en un total de tres hámsters previamente preparados.

En los hámsters portadores del trasplante se hizo un seguimiento periódico con palpación del dorso del animal con el fin de detectar la aparición de tumoración. Cuando el tamaño de la tumoración era suficiente, aproximadamente de 2 cm de diámetro máximo, y dependiendo del estado general del animal trasplantado, se volvía a practicar otro pase (trasplante de segunda generación) en otros tres hámsters preparados, y así sucesivamente, intentando con ello establecer líneas tumorales de trasplantes.

## **9- CULTIVOS.**

Se han estudiado mediante técnicas de cultivo celular un total 15 muestras tumorales, añadiendo en 5 casos DES y 17beta estradiol a una concentración de 1nM. Las técnicas empleadas fueron:

### **1- Técnica de siembra por explantes**

\*Toma de muestras: se obtiene un fragmento tumoral evitando las zonas de necrosis, hemorragia, quísticas o de parénquima normal, y en condiciones de asepsia. La muestra se introduce inmediatamente en un tubo estéril con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) más 1% de disolución de antibióticos (penicilina 5000 U/ml y estreptomycinina 5000 µg/ml) más 0,1% de gentamicina 80 UI, mantenido en nevera a 4°C.

\*Procesado: se fragmenta el tejido y se lava 3 veces con solución salina PBS (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) con antibióticos. Posteriormente se trocea en fragmentos pequeños, aproximadamente de 1 mm<sup>3</sup>, sembrándose en frascos de cultivo FALCON de 25 cm<sup>2</sup>, separados 1 cm entre ellos. Los frascos se llevan a estufa de 37°C durante 1 hora para permitir la adhesión del fragmento al sustrato. Transcurrido este tiempo se añaden 2 ml de medio de cultivo MEM (Sigma Chemical Co.) con 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de L-glutamina (Sigma Chemical Co.) y 1% de solución de antibióticos (penicilina+estreptomicina).

## **2- Técnica de digestión enzimática**

\*Toma de muestras: se procede de la misma forma que en la técnica anterior.

\*Procesado:

a) Se fragmenta la muestra y se lava 3 veces con solución salina PBS más antibióticos (penicilina, 5000 U/ml; estreptomicina, 5000 µg/ml y 0,1% gentamicina, 40 mg/ml), centrifugando a 800 rpm durante 5 minutos y decantando los fragmentos.

b) Se incuba en medio de cultivo completo con 0,02 gr de colagenasa tipo I (Sigma Chemical Co.) durante 2 horas, agitando de vez en cuando.

c) Se decantan los fragmentos de tejido no digerido.

d) Se centrifuga el sobrenadante a 800 rpm durante 5 minutos.

e) Se resuspende el sedimento en medio completo.

f) Se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos.

g) Se resuspende el sedimento en medio completo.

h) Se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos.

i) Se resuspende el sedimento en medio completo.

j) Se siembra en frascos de cultivo FALCON de 25 cm<sup>2</sup> a razón de 500.000 células/ml, 5 ml por frasco.

Al día siguiente, si las células muestran una buena adherencia, se procede a cambiar el medio de cultivo.

Los medios de cultivo empleados fueron:

-Para la técnica de siembra por explantes: MEM más 10% de suero bovino fetal, 1% de L-glutamina y 1% de solución de antibióticos (penicilina y estreptomicina).

-Para la técnica de digestión enzimática: Ham F-12 y Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma Chemical Co.) a partes iguales más 10% de suero bovino fetal, 1% de L-glutamina, 1% de solución de antibióticos (penicilina 5000 UI/ml y estreptomicina 5000 µg/ml) y 0,1% de gentamicina (40 mg/ml).

### **3- Técnica para subcultivos**

Cuando los cultivos lo permitieron se realizaron subcultivos mediante los siguientes pasos:

a) Eliminar el medio de cultivo del cultivo primario.

b) Lavar agitando cuidadosamente con PBS o solución de Hanks (Sigma Chemical Co.).

c) Añadir 4 ml de solución tripsina-EDTA (Laboratorios Flow) y mantener en estufa a 37°C, 3 ó 4 minutos, hasta observar el despegamiento de las células.

d) Recoger la suspensión celular en un tubo cónico esteril (Laboratorios Nunc, Denmark).

e) Añadir 4 ml de medio completo y centrifugar a 800 rpm durante 5 minutos.



f) Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 4 ml de medio completo.

g) Repetir 2 veces más los pasos e y f.

h) Resuspender el sedimento en 8 ml de medio completo y sembrar en 2 frascos FALCON de 25 cm<sup>2</sup>, a razón de 4 ml cada uno.

i) Llevar a estufa de 37°C con CO<sub>2</sub> y humedad controlada.

j) A las 24 horas lavar con PBS y cambiar el medio de cultivo.

## **10- CITOGENÉTICA.**

Para la obtención del cariotipo se procedió a partir de cultivos celulares.

A cada frasco de cultivo se le añade 0,1 ml de colchicina, dejándola actuar durante 1 hora y 30 minutos en estufa a 37°C. Transcurrido este tiempo se realiza la tripsinización del cultivo, con el fin de desprender a las células. Se prepara la solución con una parte de tripsina (Difco) en 3 partes de PBS y se procede de la siguiente forma:

a) Se elimina el medio de cultivo recogiéndolo en un tubo y se realizan dos lavados con PBS a 37 °C agitando suavemente.

b) Se añade 1 ml de la solución de tripsina y se deja actuar durante 1 minuto a 37°C.

c) Se elimina la solución del paso anterior y se añaden 2 ml nuevos de la solución de tripsina, dejándolo en la estufa a 37 °C.

d) A los 5 minutos se observa al microscopio de contraste de fases para ver si ya se han desprendido las células. De no ser así, se vuelve a introducir en la estufa otros 5 minutos, tras los cuales se observa al microscopio de nuevo. Se continúa procediendo de este modo hasta que las

células se hayan soltado, teniendo en cuenta que nunca se debe exceder el tiempo más de 20 minutos en total para este paso.

e) Una vez las células se han soltado se mezclan con el medio de cultivo previamente recogido en el tubo, para neutralizar la acción de la tripsina.

**\*Sacrificio celular:**

a) Se centrifuga la suspensión a 1000 rpm durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante y al sedimento se le añaden 5 ml de C1K (0,075M) durante 10 minutos a 37°C.

b) Se vuelve a centrifugar la suspensión a las mismas condiciones para separar las células y someterlas al proceso de fijación.

c) La fijación se realiza con suspensión de Carnoy (metanol/acético 3:1). La solución se añade gota a gota y agitando, dejándolo actuar en nevera a 4 °C durante 15 minutos.

d) Se realizan 3 lavados en Carnoy hasta que el sobrenadante aparezca completamente transparente.

e) En el último lavado se retira el Carnoy, dejando una pequeña cantidad para resuspender el botón celular y realizar las extensiones.

f) En portaobjetos muy limpios, y tras sumergirlos en agua fría, se deposita una gota de la suspensión. La gota se expande y desplaza la película de agua hacia los extremos del portaobjetos. Después se elimina el agua que queda en dichos extremos con la ayuda de una gasa. Por último, se flamea suavemente con el fin de que se rompan las membranas celulares y se facilite la extensión de los cromosomas.

g) Las preparaciones se dejan secar y se tiñen posteriormente con Giemsa al 2% en agua bidestilada durante 25 minutos.

h) A continuación se procede a la observación microscópica.

\*La técnica de bandas G utilizada es una modificación de la de Marina Seabright (1971):

a) Las preparaciones se envejecen 7-10 días.

b) Transcurrido este periodo de tiempo, se introducen en una solución de tripsina al 0,5% durante 5-7 segundos, a temperatura ambiente. La solución de tripsina se prepara disolviéndola en PBS a pH 7,2-7,4.

c) Una vez tratadas con tripsina, las preparaciones se lavan bien con agua corriente.

d) Se dejan secar y posteriormente se tiñen con una solución al 10% de Giemsa en tampón McIlvane o Sorensen (pH 6,8) durante 2 ó 3 minutos.

La ordenación del cariotipo se hizo de acuerdo con el idiograma propuesto por Li et al. (1982). Las fórmulas cromosómicas se han elaborado siguiendo el sistema de nomenclatura propuesto para los cromosomas humanos (ISCN, 1991).

## **11- EVALUACION ESTADISTICA.**

El significado de la diferencia en la incidencia de los tumores y el número de tumores por animal según los distintos carcinógenos empleados, el sexo y la gonadectomía, se evaluó por medio de la Regresión Logística. Esta permite cuantificar las variaciones en el Odds Ratio según la presencia o ausencia de un conjunto de factores. Es similar a los modelos Logit o Probit, pero permite tratar con múltiples variables independientes.

## **V- RESULTADOS**

## **1- FRECUENCIA, TIPOS DE TUMORES Y PERIODOS DE LATENCIA.**

El número total de animales estudiados, macro y microscópicamente, fue de 221, siendo tratados un total de 170 (73 hembras y 97 machos), distribuidos en 56 hámsters intoxicados con DES, 62 intoxicados con ENU y 52 con una combinación de ambas drogas. Los distintos grupos control estaban constituidos por 51 hámster (15 de estos animales fueron hembras adultas gestantes, madres, en las que se había inyectado ENU por vía intraperitoneal para intoxicación de la prole, manteniéndose las mismas hasta el final de la experiencia). En las tablas 5 a 10 se puede observar de forma resumida las distintas lesiones neoplásicas y no neoplásicas surgidas en cada uno de los animales de los distintos grupos experimentales.

Se encontraron tumores en 109 animales (64.11%), de los cuales 49 fueron hembras, representando el 67.12% de la totalidad de las hembras (n=73), y 60 machos, constituyendo el 61.86% de todos los machos (n=97), con un número total de neoplasias de 232 (2.13/hámster) (gráfica 1).

Los tumores más frecuentes fueron los de sistema nervioso periférico, contabilizándose un total de 106 neoplasias (45.69%), seguidos por los tumores renales (50/21.55%), tumores de glándulas suprarrenales (25/10.78%), tumores névicos (18/7.76%), tumores intracraneales (17/7.33%), tumores pulmonares (9/3.88%) y un pequeño grupo heterogéneo de neoplasias (7/3.02%) (gráficas 2, 3 y 4).

Por series, fueron los hámsters machos gonadectomizados y tratados con ENU y DES los que presentaron un mayor número de tumores por hámster afectado, apareciendo en 26 hámsters un total de 71 tumores, lo que hace una media de 2.73 tumores por hámster. La serie con un menor número

de hámsters afectados y tumores correspondió al grupo de hámsters hembras gonadectomizadas y tratadas únicamente con DES.

Los periodos de latencia mínimos para la aparición del primer tumor renal y de sistema nervioso periférico correspondieron al grupo de hámsters hembras gonadectomizadas e intoxicadas con ENU y DES, hallándose el primer tumor renal a los 125 días de tratamiento con DES (194 días desde la administración del ENU) y la primera neoplasia de sistema nervioso periférico a los 69 días tras la administración del ENU. El periodo de latencia mínimo más prolongado para la aparición de una neoplasia renal sucedió en los animales machos gonadectomizados y tratados con ENU y DES, observándose la primera de ellas a los 259 días de tratamiento con DES (327 días desde la administración del ENU). Para las neoplasias de sistema nervioso periférico, el periodo de latencia mínimo más prolongado se observó en los hámsters machos no castrados y tratados con ENU, apareciendo en ellos el primer tumor a los 400 días de la intoxicación (tablas 11 y 12).

### **1.1. Tumores de sistema nervioso periférico.**

La frecuencia máxima de tumores de sistema nervioso periférico se obtuvo en los animales intoxicados solamente con ENU, con un total de 78 neoplasias (73.58%) encontradas en 44 animales (1.77/hámster). La incidencia tumoral en hámsters hembras (74.19%) fue más alta que la obtenida en hámsters machos (67.74%), no observándose diferencias significativas entre las hembras gonadectomizadas (75.00%) y las no gonadectomizadas (73.68%), que sí aparecieron entre los machos castrados (78.57%) y los no castrados (58.82%). Cuando el tratamiento con ENU fue suplementado con DES y gonadectomía, se produjo un descenso significativo del número de hámsters afectados tanto en machos (46.67%) como en hembras (36.36%) (tabla 12).

La multiplicidad de los tumores de sistema nervioso periférico entre los distintos grupos experimentales se comparó (tabla 13), hallándose que la gonadectomía en las hembras tratadas con ENU afectaba intensamente al número de tumores del sistema nervioso periférico obtenido. Así, las hembras no ovariectomizadas presentaron 32 neoplasias distribuidas en 14 animales afectados, con una media de 2.28 tumores por hámster, mientras que las ovariectomizadas mostraron 14 tumores en 9 hámsters afectados, con una media de 1.55 tumores por animal. En los machos, en cambio, se observó una incidencia tumoral inversa a la obtenida en las hembras, siendo en los animales castrados donde se encontró una incidencia tumoral mayor, con 20 tumores en 11 animales afectados (1.81 por hámster). Los machos no castrados presentaron un menor número de tumores, 12, en un menor número también de animales afectados, 10, con una media de 1.2 tumores por hámster ( la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto a las hembras gonadectomizadas o no y a los machos castrados).

Cuando a los animales tratados con ENU y gonadectomizados se añadió el DES a los 2 meses de vida, apareció un descenso en el número de animales afectados y en el número de tumores por animal, siendo esta disminución más intensa en las hembras que en los machos (1/hámster a 1.43/hámster respectivamente). Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas cuando se compararon con los animales tratados únicamente con ENU.

La localización más frecuente de los tumores de sistema nervioso periférico (gráfica 5) fue a nivel subcutáneo, representando el 65.09 % del total, seguido por retroperitoneo (11.32 %), neoformaciones dependientes de plexo sacro (8.49 %), cavidad abdominal (4.72 %), y con la misma incidencia sucedieron en mediastino posterior, región torácica intercostal y pared

intestinal (2.83 %). Se pudieron observar también un tumor retroorbitario y otro lingual.

Los animales que fueron tratados con DES, tanto machos como hembras, no presentaron tumores del sistema nervioso periférico.

### **1.2. Tumores renales.**

Los tumores renales fueron los segundos en frecuencia, observándose 43 hámsters afectados (39.45 %) con un total de 50 neoplasias renales (21.55 %/1.16 por hámster) (gráfica 2). La incidencia tumoral fue exáctamente la misma en machos y hembras, con 25 tumores en cada uno de los sexos (gráfica 3). Aunque desde este punto de vista no se apreciaron diferencias, algo completamente distinto sucedió cuando se estudiaron los diferentes grupos individualmente (tabla 12). Así, las hámsters hembras ovariectomizadas y tratadas con DES y ENU presentaron, con diferencia, el mayor número de animales afectados, 20 de 22 (90.91 %), y la incidencia tumoral más alta, con un total de 25 neoplasias renales en los 20 animales (1.25 por hámster). El número de hámsters afectados fue de 16 (53.33 %), cuando estos fueron machos castrados y tratados igualmente con ENU y DES, encontrándose 18 neoformaciones renales en los 16 hámsters (tabla 13). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

El número de animales con tumor renal descendió drásticamente cuando fueron tratados con DES y gonadectomía únicamente. Los machos castrados presentaron una incidencia del 19.44 %, con un total de 7 tumores en 7 animales. Las hembras gonadectomizadas y tratadas con DES, así como los machos y hembras, gonadectomizados o no, y tratados con ENU no presentaron tumoraciones renales.

### **1.3. Otros tumores.**



Los tumores de glándula suprarrenal representaron el 10.78 %, con un total de 25 neoplasias distribuidas en todos los grupos experimentales y constituyendo la tercera neoplasia más frecuente (tablas 11 y 12). La máxima incidencia se observó en los hámsters machos castrados y tratados con ENU y DES, apareciendo un total de 10 tumores, que representaron el 40 % de todos los tumores de glándula suprarrenal. A continuación fueron los machos castrados y tratados con ENU, con 5 tumoraciones (20 %), las hembras ovariectomizadas y tratadas con DES con 3 (12 %), las hembras ovariectomizadas o no tratadas con ENU con 2 tumores en cada grupo, y por último, con un tumor en cada grupo, los machos castrados y tratados con DES, los machos no castrados y tratados con ENU, y las hembras ovariectomizadas e intoxicadas con ENU y DES.

Los tumores cutáneos, representados en su totalidad por tumoraciones névicas (benignas y malignas), ocuparon el cuarto lugar en frecuencia. Se contabilizaron un total de 18 neoformaciones (7.76 %). La máxima incidencia correspondió al grupo de animales machos castrados y tratados con ENU y DES, con un total de 6 tumores (33.33 %), seguido con 3 tumores en cada grupo para las hembras ovariectomizadas y tratadas con ENU y con ENU y DES, con 2 tumores en los machos castrados y no castrados y tratados con ENU y, por último, apareció 1 tumor en las hembras intoxicadas con ENU no gonadectomizadas. No aparecieron tumoraciones cutáneas en los hámsters, machos y hembras, tratados sólo con DES.

En quinto lugar, con un tumor menos que en el grupo anterior, 17 (7.33 %), se observaron las neoplasias de sistema nervioso central. Aquí, como en los tumores de glándula suprarrenal y cutáneos, correspondió también la máxima incidencia a los animales machos castrados y tratados con ENU y DES, con un total de 9 tumores que suponen el 52.94 % de los mismos. A

importante distancia se sitúan los grupos de hembras ovariectomizadas tratadas con ENU y DES y los machos no castrados y tratados con ENU y los castrados y tratados con DES con 2 tumoraciones en cada grupo. Finalmente, con 1 tumor en cada grupo, aparecen los machos castrados y tratados con ENU y las hembras no ovariectomizadas y tratadas con ENU.

También los tumores pulmonares, con un total de 9 (3.88 %), fueron más frecuentes en los hámsters machos castrados e intoxicados con ENU y DES, presentando este grupo un total de 5 tumoraciones (55.55 %). Los machos no castrados y tratados con ENU presentaron 2, y apareció 1 tumor en las hembras no gonadectomizadas y tratadas con ENU y en las hembras ovariectomizadas y tratadas con ENU y DES.

Otros tumores encontrados correspondieron a un hemangioendotelioma, un carcinoma ductal de mama, una leucemia/linfoma, un leiomioma de útero, un ameloblastoma mandibular, un adenoma de glándula salivar y un sarcoma indiferenciado.

## **2. ESTUDIO MORFOLOGICO.**

### **2.1. Tumores de sistema nervioso periférico.**

#### **2.1.1. Hallazgos macroscópicos.**

Los tumores de sistema nervioso periférico, la mayoría de ellos tumoraciones subcutáneas (65,09%), se distribuyeron de forma uniforme por toda la superficie del cuerpo de los hámsters. Aparecieron aislados (fig. 1) o múltiples (fig. 2), alcanzando la máxima multiplicidad en el grupo de hámsters hembras no gonadectomizadas y tratadas con ENU, con una media de 2,28 tumores por hámster afectado.

Macroscópicamente, los tumores de pequeño tamaño, entre 0,5 y 1 cm aproximadamente de diámetro máximo, tuvieron una forma oval o

redondeada, generalmente bien circunscritos pero no encapsulados, y ocasionalmente presentaron una delimitación poco precisa, con márgenes infiltrantes, no pudiendo definir exáctamente su extensión. Su consistencia fue firme o elástica y a la sección la superficie de corte fue lisa y uniforme, brillante, y de coloración blanco-grisácea (figs. 3 y 4).

Los tumores de mayor tamaño, que alcanzaron en ocasiones hasta 8-9 cm de diámetro transversal máximo, presentaron en general una buena delimitación, una consistencia blanda e incluso fluctuante, y a la sección frecuentemente áreas de degeneración quística, hemorragia y necrosis (fig. 5a y b). Cuando estuvieron localizados a nivel subcutáneo y alcanzaron unas dimensiones importantes no fue raro el encontrar ulceraciones en la superficie de los tumores. Con cierta frecuencia fue posible el observar la relación de las neoplasias con raíces nerviosas, que continuaron identificándose perfectamente en el seno del tumor tras su sección, pudiéndose seguir su trayecto en el mismo (fig. 6).

### **2.1.2. Hallazgos microscópicos.**

La clasificación histológica de los 106 tumores del sistema nervioso periférico se muestran en las gráficas 6 y 7, observándose un total de 57 tumoraciones benignas (53,78%) y 49 malignas (46,22%). Las neoformaciones benignas correspondieron a 55 neurofibromas (51,89%) y 2 ganglioneurofibromas (1,89%). Las malignas se distribuyeron en 40 neurinomas malignos (37,74%), 5 ganglioneuromas malignos (4,72%), 3 neurofibrosarcomas (2,83%) y 1 ganglioneuroblastoma (0,94%). La incidencia por sexos (gráfica 8 y 9) mostró la aparición 23 neurofibromas en machos por 32 en hembras y 21 neurinomas malignos en machos por 19 en hembras. Los 5 ganglioneuromas malignos se presentaron en machos, no observándose ninguno en hembras. Los ganglioneurofibromas benignos se repartieron con 1 caso en

cada uno de los sexos, y los neurofibrosarcomas con 2 casos en machos y 1 en hembras. El único ganglioneuroblastoma sucedió en un hámster hembra.

Cuando a los animales tratados con ENU se les practicó la gonadectomía, se pudieron constatar interesantes diferencias en cuanto a la aparición y frecuencia de los tumores obtenidos. Así, en las hámsters hembras gonadectomizadas se apreció un importante descenso en el número global de tumores con respecto a las no gonadectomizadas, obteniéndose un total de 14 (30,43%) y 32 (69,57%) tumores respectivamente, superando por lo tanto en más del doble la cantidad de tumores obtenido en los animales ovariectomizados. La diferencia más amplia se produjo en el grupo de los neurofibromas hallándose un total de 7, por 19 en las no gonadectomizadas. Los neurinomas malignos también fueron menos frecuentes con un total de 6, por 11 en las no gonadectomizadas. Otros tumores mucho menos frecuentes correspondieron a 1 ganglioneurofibroma en una hembra ovariectomizada y 1 ganglioneuroblastoma y 1 neurofibrosarcoma en dos hembras no gonadectomizadas (gráficas 10 y 11).

Los machos tratados con ENU mostraron, globalmente, una menor incidencia tumoral con un total de 32 tumores. Observándose una inversión en la aparición y frecuencia de los tumores en relación con lo sucedido en las hembras. Las neoplasias fueron más frecuentes en los machos castrados con un total de 20 (62,5%), casi dos veces las obtenidas en los no castrados que presentaron 12 (37,5%). También existió una distribución histológica inversa a la encontrada en las hembras, siendo tres veces más frecuentes los neurofibromas en los machos castrados que en los no castrados (9 y 3 respectivamente). Los neurinomas malignos mostraron una menor diferencia, pero también fueron más frecuentes en los castrados que en los no castrados (9 y 7 respectivamente). Otros tumores encontrados correspondieron

a 2 neurofibrosarcomas en machos no castrados y 1 ganglioneurofibroma y 1 ganglioneuroma maligno en los gonadectomizados (gráficas 12 y 13).

Las hámsters hembras gonadectomizadas y tratadas con ENU y DES mostraron un total de 8 tumores, correspondientes a 6 neurofibromas y 2 neurinomas malignos, con un número de hámsters afectados y una incidencia tumoral muy inferior al grupo de hembras sólo tratadas con ENU y ovariectomizadas.

Los machos castrados y tratados con ENU y DES presentaron un total de 20 tumores distribuidos en 11 neurofibromas, 5 neurinomas malignos y 4 ganglioneuromas malignos. Encontrándose un menor número de hámsters afectados pero una incidencia tumoral equiparable a la obtenida en los machos castrados y tratados con ENU.

Los tumores benignos del sistema nervioso periférico correspondieron histológicamente a 55 neurofibromas y 2 ganglioneurofibromas. La localización más frecuente de los neurofibromas fue a nivel subcutáneo en región maxilar y cervical, con un total de 6 casos en cada región. Microscópicamente los neurofibromas se caracterizaron mayoritariamente por estar constituidos por células tipo Schwann, con citoplasmas eosinófilos elongados, mostrando ocasionalmente prolongaciones del mismo, separadas entre sí por un abundante estroma mixoide. Junto a estas células también se observaron neurofibrillas y fibroblastos. Las células tumorales periféricas crearon a veces una imagen falsa de cápsula por la compresión provocada por el crecimiento expansivo tumoral. Los núcleos fueron únicos redondos u ovales, con cromatina finamente granular. Fue rara la presencia de uno o más nucleolos, siendo de pequeño tamaño cuando se observaron. Sí se apreció con relativa frecuencia la existencia de vacuolas citoplásmicas intranucleares. No se observaron figuras mitóticas. Ocasionalmente, en el seno del tumor y más

frecuentemente en la periferia, se encontraron englobados filetes nerviosos. Otra de las características halladas en estos tumores con frecuencia consistió en la observación de estructuras organoides distorsionadas parecidas a corpúsculos de Wagner-Meissner (cuerpos tactoides o meissniformes). En el laxo estroma tumoral no fue infrecuente el encontrar abundantes mastocitos acompañados por aisladas células linfoides. Áreas quísticas tapizadas por células tumorales conteniendo material granular amorfo o hematíes se observaron en los tumores de mayor tamaño y tiempo de evolución (fig. 7a y b).

Los dos ganglioneurofibromas observados ocurrieron a nivel subcutáneo en región mandibular izquierda y en retroperitoneo. Ambos mostraron una histología semejante a la descrita anteriormente, con la característica de presentar diferenciación ganglionar focal en ambos y predominio de áreas celulares fusiformes en el de localización retroperitoneal.

Los tumores malignos se distribuyeron en 40 neurinomas malignos, 5 ganglioneuromas malignos, 3 neurofibrosarcomas y 1 ganglioneuroblastoma.

La localización más frecuente de los neurinomas malignos fue a nivel subcutáneo en región dorsal (5 casos), retroperitoneal (5 casos) (fig. 9a y b) y plexo sacro (5 casos). En tres casos se observaron metástasis a nivel linfático, hepático (fig. 10) y pulmonar. Microscópicamente presentaron un patrón tumoral semejante a los neurinomas pero observándose con mayor frecuencia unos márgenes peor definidos con invasión de tejidos vecinos, predominio de áreas densas celulares con disminución de la matriz mixoide, moderado pleomorfismo celular y nuclear, ocasional presencia de células bi- o multinucleadas y focos de necrosis, trombosis vascular y hemorragia. Presencia de figuras mitóticas, generalmente en un número superior a 4 mitosis por 10 campos de gran aumento, siendo raro el observar mitosis atípicas (fig. 11).

Los ganglioneuromas malignos se localizaron en plexo sacro (1), retroperitoneo (2) y subcutáneo en región cervical (2), distinguiéndose de los anteriores por la presencia de diferenciación ganglionar.

Los neurofibrosarcomas surgieron en pata anterior derecha, abazón izquierdo y cavidad abdominal, y se caracterizaron por estar encapsulados, presentar predominio de áreas celulares fusiformes con extensa necrosis, degeneración quística y actividad mitótica elevada. Uno de ellos, el localizado en cavidad abdominal, presentó metaplasia condral y múltiples nódulos metastáticos en grasa peritoneal y pared retroperitoneal.

El ganglioneuroblastoma se localizó en región retroperitoneal, no presentó encapsulación, e infiltraba músculo estriado adyacente y pelvis renal. Presentó áreas densas celulares, con células pequeñas redondas indiferenciadas, con escaso citoplasma y formación de estructuras rosetoides, junto con zonas de degeneración quística, áreas mixoides, de hemorragia y necrosis tumoral. Existió focal diferenciación ganglionar y englobamiento de fibras nerviosas. En el seno tumoral se observaron focos de metaplasia mieloide.

## **2.2 Tumores renales.**

Las características macro y microscópicas de las neoplasias encontradas en cada animal quedan reflejadas en las descripciones realizadas en los apartados correspondientes de los protocolos.

### **2.2.1. Hallazgos macroscópicos.**

En la fase macroscópica precoz ("tumores pequeños") se observó característicamente la presencia de múltiples nodulillos, entre 0,1 y 0,5 cm aproximadamente, repartidos por toda la superficie frecuentemente de ambos riñones, de coloración blanquecina, bien delimitados y sobresaliendo ligeramente del resto del parénquima conservado predominante, no estando la víscera aumentada de tamaño ni deformada. A la sección, la localización de los

nódulos suele ser cortical, aunque también se observaron con una menor frecuencia en la unión corticomedular, en médula o próximos a pelvis renal. Es raro encontrar quistificación, focos de hemorragia o necrosis tumoral en esta fase (fig. 12).

En periodos más avanzados de la carcinogénesis, las tumoraciones superaron los 0,5 cm de diámetro ("tumores grandes"), con frecuencia fueron confluentes, estando bien delimitadas y provocando deformidad y aumento del tamaño de los riñones, adoptando en ocasiones un aspecto polilobulado. El parénquima renal conservado fue escaso en este estadio. Las áreas tumorales presentaron una coloración blanco-amarillenta, distinguiéndose a menudo quistificación, hemorragia y necrosis, y siendo de consistencia blanda (figs. 13 y 14). A la sección, las áreas neoplásicas se extendían, generalmente, desde la corteza hasta pelvis, llegando a ocasionar la rotura de la cápsula renal y pudiendo afectar en ocasiones por contigüidad a diafragma, pared retroperitoneal, superficies hepática y esplénica y grasa mesentérica. Se observaron metástasis a distancia pulmonares y hepáticas en tres casos (DES 20 H, E+D 8 H y E+D 19 M).

### **2.2.2. Hallazgos microscópicos.**

Las lesiones no neoplásicas, consideradas precursoras de las lesiones tumorales, halladas en los animales que no presentaron tumor correspondieron a 15 hiperplasias de células intersticiales, 6 displasias tubulares y 6 casos en los que hubo combinación de ambas lesiones. Estas lesiones se repartieron en los grupos de machos castrados e intoxicados con DES (7 hiperplasias de células intersticiales), hembras ovariectomizadas y tratadas con DES (3 hiperplasias de células intersticiales, 2 displasias tubulares y 1 caso combinando ambas), machos castrados y tratados con ENU y DES (5 hiperplasias de células intersticiales, 3 displasias tubulares y 4 combinando



ambas) y hembras gonadectomizadas tratadas con ENU y DES (1 displasia tubular y 1 hiperplasia de células intersticiales con displasia tubular) (gráfica 14).

La hiperplasia de células intersticiales fue más frecuente en la región cortical renal, apareciendo como pequeños nidos o cordones sólidos de células pequeñas indiferenciadas, de escaso citoplasma basófilo y núcleo redondo, oval o elongado hipercrómico, localizándose en el espacio intertubular o en proximidad a formaciones glomerulares, y más raramente junto a estructuras vasculares o en el seno del tejido conectivo laxo yuxtapélvico (figs. 15, 16 y 17). Los túbulos adyacentes podían o no presentar alteraciones displásicas. La displasia tubular estuvo representada por una transformación de la morfología tubular, consistente ocasionalmente en una quistificación y más frecuentemente en una reducción del tamaño, con disminución de la altura del epitelio y del volumen celular, citoplasmas basófilos, aumento de la relación nucleocitoplásmica y núcleos hipercrómicos, pudiéndose observar ocasionalmente alguna mitosis (figs. 18, 19 y 20).

Histológicamente, las 50 neoplasias renales obtenidas, correspondieron a 43 (86%) tumores nefroblastoma-like (entre ellos 7 tumorlets), 3 (6%) adenocarcinomas, 1 (2%) carcinoma urotelial de pelvis renal y 3 (6%) adenomas. La distribución por series, de mayor a menor incidencia, fue de 20 nefroblastomas-like (1 tumorlet) (fig. 21), 2 adenocarcinomas, 1 carcinoma urotelial y 2 adenomas en las hembras ovariectomizadas y tratadas con DES y ENU (E+D H); 16 nefroblastomas-like (5 tumorlets), 1 adenoma y 1 adenocarcinoma en los machos castrados e intoxicados con DES y ENU (E+D M); y, por último, 7 nefroblastomas-like (1 tumorlet) en los machos castrados y tratados con DES.

En el estudio microscópico de los tumores renales tipo nefroblastoma se distinguieron 6 patrones histológicos, clasificándose en orden decreciente de frecuencia en patrón blastemal (69,77%), hipernefroide (41,86%), neuroectodérmico (25,58%), sarcomatoide (23,26%), adenoide (20,93%) y neuroendocrinoide (6,98%). Estos patrones no se presentaron normalmente en forma pura, sino que aparecieron habitualmente combinados en diversa proporción dentro de una misma neoplasia y estando esta variación en relación directa con el tamaño tumoral, así los tumores de menor tamaño mostraron la presencia de uno o dos patrones diferentes como máximo, mientras que los tumores de gran tamaño en los estadios avanzados de la carcinogénesis presentaban una amplia mezcla de patrones histológicos (gráficas 15-18).

El **patrón blastemal** (fig. 22) fue el más frecuente, hallándose en 30 casos (69,77%), observándose su máxima frecuencia en el grupo de hámsters hembras gonadectomizadas y tratadas con DES y ENU (16 casos), seguido por los hámsters machos castrados y tratados con DES y ENU (11 casos) y los machos castrados y tratados con DES (3 casos). Este patrón estuvo constituido por células de pequeño tamaño, redondas u ovales, de escaso citoplasma basófilo o bien de aspecto estrellado asociado a material mixoide, y núcleo redondo de cromatina condensada, distribuyéndose en nidos o cordones sólidos que rodeaban y llegaban a colapsar las estructuras glomerulares y tubulares, o provocando dilatación quística tubular. En ocasiones se observó zonas de transición entre las áreas blastemales y otras de morfología epitelial, con citoplasmas amplios y formación de estructuras tubulares rudimentarias, o bien con áreas hipernefroides o fusocelulares.

El **patrón hipernefroide** (fig. 23), el segundo en frecuencia (41,86%), se halló en 18 animales, con 4 casos en los machos castrados y

tratados con DES y 7 casos en machos y 7 en hembras gonadectomizadas y tratadas con ENU y DES. Este patrón histológico recordó al carcinoma renal de células claras, estando constituido predominantemente por nidos sólidos de células con amplio citoplasma ópticamente vacío o de aspecto espumoso y núcleo central o lateralizado de cromatina grosera (fig. 24). Estas células fueron PAS negativas siendo su aspecto debido al acúmulo intracitoplásmico de lípidos; ocasionalmente también aparecieron gotas hialinas de variado tamaño en el citoplasma de las células cuando estaban en vecindad a focos de necrosis o hemorragia.

El **patrón neuroectodérmico** (fig. 25) se observó en 11 casos (25,58%), con igual frecuencia en hembras y machos gonadectomizados tratados con DES y ENU ( 5 casos) y 1 caso en los machos castrados y tratados con DES. Estuvo constituido por células indiferenciadas con un patrón de crecimiento sólido en el que se observó la formación de rosetas y, con más frecuencia, pseudorrosetas perivasculares.

El **patrón sarcomatoide** (fig. 26) con 10 casos (23,26%) representó el 4º patrón más frecuente, encontrándose únicamente en los machos y hembras gonadectomizados y tratados con ENU y DES (5 casos en cada uno). Histológicamente se caracterizó por la presencia de células elongadas, en forma de huso, con citoplasmas amplios eosinófilos y de límites imprecisos, y núcleos fusiformes centrales. Estas células se disponían en fascículos paralelos distribuidos irregularmente y formando en ocasiones remolinos.

El **patrón adenoide** (fig. 27-28) fue hallado en 9 casos (20,93%), 4 casos en cada grupo de animales machos y hembras gonadectomizados y tratados con ENU y DES y 1 caso en los machos castrados y tratados con DES. La morfología histológica predominante fue la de células de citoplasma amplio, de límites precisos, con un patrón de crecimiento sólido,

en el que se observaron ocasionalmente células en anillo de sello PAS -, la formación de estructuras pseudotubulares y la aparición de luces intracitoplásmicas que a grandes aumentos y en cortes semifinos permitieron adivinar la presencia de cilios, los cuales fueron confirmados posteriormente con la microscopia electrónica.

El **patrón neuroendocrinoide** (fig. 29), el menos frecuente de todos, con 3 casos (6,98%), se observó sólomente en los machos castrados y tratados con ENU y DES (1 caso) y en las hembras ovariectomizadas e igualmente tratadas con los dos tóxicos (2 casos). Microscópicamente se caracterizó por un crecimiento "organoide" con formación de nidos sólidos de células de tamaño medio y citoplasma eosinófilo bien delimitado, separados por un delicado estroma conectivo-vascular, recordando la morfología de tumores carcinoides y paragangliomas.

Características comunes a los distintos patrones histológicos observados fue la ausencia o la muy escasa reacción estrómicca (fig. 30) encontrada en todos ellos; la baja actividad mitótica hallada en general, excepto en los patrones neuroectodérmico y sarcomatoide, y el patrón blastemal predominante en los tumorlets. El comportamiento más agresivo fue observado en las hámsters hembras ovariectomizadas y tratadas con ENU y DES, con una aparición más temprana de los tumores (a los 125 días del inicio del tratamiento con DES) y una supervivencia media menor que en el resto de los grupos experimentales.

Los 3 adenomas renales encontrados microscópicamente se caracterizaron por estar localizados a nivel cortical, ser bien delimitados, quísticos y presentar una o más proyecciones papilares tapizadas por un epitelio cúbico, no encontrándose pleomorfismo, pérdida de la polaridad o hipercromasia nuclear (fig. 31).

Los 3 adenocarcinomas renales estuvieron localizados a nivel cortical y mostraron una buena delimitación, siendo dos de ellos sólidos y uno quístico. Las tumoraciones con patrón sólido estuvieron constituidas por estructuras tubulares separadas por escaso estroma, tapizadas por un epitelio cúbico que mostró atipia celular, pérdida de la polaridad, aumento de la relación nucleocitoplásmica y actividad mitótica elevada (fig. 32). La neoplasia quística se caracterizó por una cavidad central cuyas paredes estuvieron tapizadas por epitelio estratificado, distinguiéndose formaciones tubulares en el mismo con atipia celular y presencia de figuras mitóticas.

Los dos carcinomas de pelvis renal aparecieron en las hembras gonadectomizadas y tratadas con ENU y DES, y se caracterizaron por ocupar parcialmente pelvis renal, mostrar extensión hacia parénquima renal y estar constituidos por estructuras papilares con ejes conectivo-vasculares tapizados por epitelio urotelial, presentando polimorfismo celular y nuclear y actividad mitótica elevada (fig. 33).

### **2.3. Otros tumores.**

#### **2.3.1. Glándula suprarrenal.**

Las neoplasias de las glándulas suprarrenales constituyeron el tercer grupo en frecuencia por detrás de las de sistema nervioso periférico y riñón, con un total de 25 tumores (10,78%) que correspondieron a 20 adenomas (fig. 34) y 5 carcinomas (figs. 35-36-37), no observándose feocromocitomas. Sólo uno de los carcinomas presentó metástasis en un ganglio hiliar renal homolateral.

#### **2.3.2. Cutáneos.**

Las tumoraciones cutáneas encontradas correspondieron en su totalidad a proliferaciones de células névicas. Macroscópicamente se

caracterizaron por su crecimiento nodular, estar pigmentadas y con frecuencia ulceradas superficialmente (figs 38-39). Histológicamente, las 3 tumoraciones névicas benignas recordaban a los nevus celulares intradérmicos humanos, con focal pigmentación y ausencia de actividad de unión. Los melanomas malignos encontrados, un total de 15, microscópicamente presentaron con frecuencia epidermotropismo con ulceración superficial, pigmentación más o menos extensa, atipia citológica evidente, actividad mitótica elevada, áreas de hemorragia y necrosis y extensión con infiltración de tejidos vecinos (figs. 40-41-42). Metástasis se pudieron evidenciar en 8 casos, de los cuales en 5 casos fueron metástasis pulmonares, en 1 caso metástasis linfáticas, 1 caso metástasis pulmonares y renales y, por último, 1 caso presentó metástasis pulmonares, renales y linfáticas (fig. 43).

### **2.3.3. Intracraneales.**

A nivel intracraneal la localización más frecuente de las neoplasias fue la hipofisaria, con un total de 10 tumoraciones, que histológicamente correspondieron a 7 adenomas hipofisarios (fig. 44) y 3 carcinomas.

El trigémino intracraneal fue la segunda localización más frecuente, encontrándose 6 neoformaciones que microscópicamente se clasificaron en 2 neurofibromas, 1 ganglioneurofibroma, 2 neurinomas malignos (fig. 45) y 1 ganglioneurofibroma maligno.

Por último, se observó una tumoración glial (fig. 47-48).

### **2.3.4. Aparato respiratorio.**

A nivel pulmonar se apreciaron un total de 9 tumoraciones primarias, que histológicamente correspondieron a 6 adenomas pulmonares (fig. 49), 1 tumorlet, 1 adenomatosis y 1 hemangiopericitoma-like.

### **2.3.5. Miscelánea.**

Otras neoplasias halladas aisladamente se clasificaron histológicamente como 1 hemangioendotelioma, 1 carcinoma ductal de mama (fig. 52), 1 leucemia/linfoma, 1 leiomiomasarcoma de útero, 1 ameloblastoma mandibular (fig. 53), 1 adenoma de glándula salivar y 1 sarcoma indiferenciado abdominal.

### **3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.**

Se han podido estudiar inmunohistoquímicamente un total de 154 lesiones tumorales repartidas en los distintos grupos experimentales establecidos. De este total 84 han correspondido a tumores de sistema nervioso periférico, 46 a tumores renales y 24 a un grupo heterogéneo de neoplasias entre las que se encuentran 12 tumores intracraneales (3 adenomas y 2 carcinomas de hipófisis; 2 neurofibromas, 1 ganglioneurofibroma, 1 neurinoma maligno y 1 ganglioneuroma maligno de rama intracraneal de trigémino; y 2 tumores gliales), 4 melanomas malignos, 3 adenomas pulmonares, 1 hemangioendotelioma, 1 carcinoma suprarrenal, 1 sarcoma abdominal, 1 carcinoma de mama y 1 leiomiomasarcoma de útero. Otras lesiones que se pudieron contabilizar fueron 2 metástasis por tumor renal nefroblastoma-like y 3 hiperplasias de células intersticiales/displasia tubular renal. También se realizó la inmunotinción de 2 tumores trasplantados (1 nefroblastoma-like y 1 carcinoma de suprarrenal) y de 2 cultivos celulares de tumores renales nefroblastoma-like.

Los marcadores inmunohistoquímicos empleados y sus características quedan reflejados en las tablas 3 y 4 de material y métodos. En las tablas de inmunohistoquímica (tablas 14-19) y en los protocolos se resumen los resultados en cada uno de los animales en los que se aplicó esta técnica.

Los resultados se expresaron como casos negativos, casos positivos (gradando la intensidad de la inmunotinción en comparación con el control, débil,+, moderada,++, y fuerte,+++) y porcentaje global de células tumorales marcadas.

### **3.1. Tumores de sistema nervioso periférico.**

De los 84 tumores de sistema nervioso periférico en los que se emplearon técnicas inmunohistoquímicas, 43 se clasificaron histológicamente como benignos (42 neurofibromas y 1 ganglioneurofibroma) y 41 como malignos (34 neurinomas malignos, 5 ganglioneuromas malignos y 2 neurofibrosarcomas).

#### **3.1.1. Benignos.**

La inmunotinción con **vimentina (VIM)** de las células tumorales se observó en 36 casos (92,31%), siendo de tipo citoplásmico difuso. La intensidad fue de moderada (++) a fuerte (+++) en 35 casos (fig. 54a) y débil en un caso. Dos casos fueron negativos, 1 no valorable y en 4 casos no se realizó. El porcentaje global de células neoplásicas marcadas fue igual o superior al 75% en 21 casos (53,85%), entre el 50 y 75 % se encontraron 11 casos (28,21%), entre el 25 y 50% 3 casos (7,69%) y fue inferior al 25% en 1 caso (2,56%).

La **proteína S-100** mostró una distribución semejante al anterior, encontrándose positiva en los 42 casos en los que se realizó (100%), con tinción citoplásmica y nuclear (fig. 54b). La intensidad fue de moderada (++) a fuerte (+++) en 36 casos y débil (+) en 6. El porcentaje de células tumorales teñidas fue igual o superior al 75% en 22 casos (52,38%), estuvo entre el 50 y 75% en 12 casos (28,57%), entre el 25 y 50% en 6 casos (14,29%) y fue inferior al 25% en 2 casos (4,76%).



Las células tumorales presentaron inmunotinción con la **enolasa neuronal específica (NSE)** en 32 casos (76,19%), con tinción citoplásmica en células aisladas, frecuentemente de carácter granular. La intensidad fue de moderada a fuerte en 30 casos, débil en 2 y hubo 10 casos negativos. El tanto por ciento de células marcadas fue igual o superior al 75% en 1 caso (2,38%), se encontró entre el 50 y 75% en 3 casos (7,14%), 5 casos (11,90%) estuvieron entre el 25 y 50% y fue inferior al 25% en 23 casos (54,76%).

La **HNK** fue positiva en 6 casos (15,38%) y negativa en 33 (84,62%), siendo la tinción de tipo citoplásmico difuso en células aisladas. La intensidad fue fuerte en 1 caso y de débil a moderada en 5. El porcentaje de células tumorales teñidas en todos los casos fue inferior al 25%.

La **proteína gliofibrilar ácida (GFAP)** marcó con carácter citoplásmico difuso las células tumorales de dos casos, siendo su intensidad fuerte en uno y moderada en el otro, y con un porcentaje de células teñidas del 25% y 75%.

La técnica con **DT-diaforasa** se pudo realizar en 4 casos, siendo negativa en uno y positiva débil en 3.

En 1 caso (ENU 33) se halló positividad tumoral para **neurofilamentos** (<25%/+++ ) y **antígeno de membrana epitelial (EMA)** (<25%/+). El resto de tumores fueron negativos a ambos marcadores.

Otros marcadores tumorales utilizados con resultado de inmunotinción negativa en las células neoplásicas fueron la **sinaptofisina**, **desmina**, **antígeno carcinoembrionario (CEA)**, **UEA-I (Ulex europaeus I aglutinina)** y **alfa-1-antiquimotripsina (a-QT)**.

### 3.1.2. Malignos.

La **vimentina** fue positiva en 37 casos (97,37%) con carácter citoplásmico difuso, negativa en 1 caso y no se realizó en 3 casos. La intensidad

fue de moderada a fuerte en 32 casos (84,21%) y débil en 5 casos. El porcentaje de células tumorales teñidas fue igual o superior al 75% en 22 casos (57,89%), entre el 50 y 75% se constataron 6 casos (15,79%), 5 casos (13,16%) presentaron entre el 25 y 50% y en 4 casos (10,53%) fue inferior al 25% (figs. 55-56-57).

La **proteína S-100** con distribución citoplásmica y nuclear se observó en 37 casos (92,5%), en 1 caso fue negativa, en 2 casos resultó no valorable y no se realizó en 1 caso. La intensidad de la tinción fue de moderada a fuerte en 32 casos (80%) y débil en 5 casos. El porcentaje de células neoplásicas teñidas fue igual o superior al 75% en 12 tumores (30%), entre el 50 y 75% en 10 casos (25%), entre el 25 y 50% se observó en 10 casos (25%) y fue inferior al 25% en 5 casos (12,5%) (fig. 58-59).

La **NSE** fue positiva en las células tumorales de 33 casos (80,49%), negativa en 7 casos y no valorable en 1. La tinción citoplásmica en células aisladas fue predominantemente de tipo granular. La intensidad se apreció fuerte en 2 casos, moderada en 26 y débil en 5 casos. El porcentaje de células tumorales marcadas fue igual o superior al 75% en 1 caso (2,44%), estuvo entre el 50 y 75% en 4 casos (9,76%), entre el 25 y 50% en 6 casos (14,63%) e inferior al 25% en 22 (53,66%).

La **HNK** fue positiva en 12 casos (30%), en 27 (67,5%) resultó negativa, en 1 caso no valorable y en 1 caso no se realizó. La intensidad de la tinción fue fuerte en 2 casos, moderada en 9 y débil en 1 caso. El porcentaje de células marcadas fue superior al 50% en 1 caso (2,5%), estuvo entre el 25 y 50% en 3 casos (7,5%) y fue inferior al 25% en 8 casos (20%) (fig. 60).

Los **neurofilamentos** fueron positivos en 3 casos, siendo la intensidad de la tinción de moderada a fuerte y el porcentaje de células

tumorales teñidas inferior al 25%. La técnica de la **DT-diaforasa** se realizó en 1 caso siendo positiva.

La **proteína gliofibrilar ácida**, el **antígeno de membrana epitelial**, la **sinaptofisina**, la **desmina**, el **CEA**, el **UEA-I** y la **a-QT** fueron negativos.

### **3.2. Tumores renales.**

Inmunohistoquímicamente se ha tenido la posibilidad de poder estudiar un total de 46 tumores renales, que histológicamente correspondieron a 40 tumores nefroblastoma-like, 3 adenocarcinomas, 2 carcinomas uroteliales de pelvis renal y 1 adenoma.

Los resultados inmunohistoquímicos, por orden de frecuencia, en los tumores tipo nefroblastoma fueron los siguientes:

La **vimentina** se pudo valorar en 40 casos siendo positiva en 38 (95%), con una tinción citoplásmica difusa, frecuentemente más intensa y constante en las células periféricas de los nidos tumorales. Un caso fue negativo y en otro no se encontró tumor en la sección teñida con vimentina. La intensidad fue de moderada a fuerte en 37 casos y débil en 1 caso. El porcentaje de células tumorales marcadas fue igual o superior al 75% en 24 casos (60%), entre el 50 y 75% hubo 7 casos (17,5%), entre el 25 y 50% se encontraron 3 casos (7,5%) e inferior al 25% en 4 casos (10%) (fig. 61-62).

La **proteína S-100** se valoró en 39 casos, obteniéndose una tinción de las células tumorales de tipo citoplásmico y nuclear en 37 casos (94,87%), siendo negativos los 2 restantes. La intensidad fue fuerte (+++) en 25 casos (67,57%) y moderada (++) en 12 casos (32,43%). En 29 casos (78,38%) el porcentaje de células tumorales marcadas fue igual o superior al 75%, entre el 50 y 75% se encontraron 4 casos (10,81%), 1 caso (2,70%) entre el 25 y

50% y con un porcentaje inferior al 25% se hallaron 3 casos (8,11%) (fig. 63-64).

La **desmina**, el tercer anticuerpo más frecuente que mostró positividad, se pudo valorar en 35 casos, siendo positivo en 31 casos (88,57%) y negativo en 4 (11,43%). La inmunotinción de tipo citoplásmico difuso también se observó en células tumorales de citoplasma claro y una distribución más intensa perivascularmente. La intensidad fue de moderada a fuerte en 28 casos (90,32%) y débil en 3 casos. El porcentaje de células tumorales teñidas fue superior al 75% en 1 caso (3,23%), estuvo entre el 50 y 75% en 6 casos (19,35%), entre el 25 y 50% en 9 casos (29,03%) y fue inferior al 25% en 15 casos (48,39%) (fig. 65-66).

La **actina** se realizó en 31 tumores siendo positiva en 19 casos (61,29%), negativa en 11 casos (35,48%) y no valorable en 1. La intensidad fue fuerte en 8 casos (42,11%), moderada en 8 (42,11%) y débil en 3 casos (15,79%). El porcentaje de células tumorales teñidas fue en general bajo, siendo inferior al 25% en 16 casos y en 3 situándose entre el 25 y 50% (fig. 67-68).

La **enolasa neuronal específica (NSE)** se realizó en 39 tumores, encontrándose positividad de las células tumorales en 19 casos (48,72%), fueron negativas en 18 (46,15%) y no se pudo valorar en 2. La tinción fue de tipo citoplásmico difuso. La intensidad fue moderada en 9 casos y débil en 10 casos. En ninguno de los tumores estudiados se obtuvo una tinción superior o igual al 75% de las células, estando entre el 50 y 75 % en 1 caso (5,26%), entre el 25 y 50% en 5 casos (26,32%) y siendo inferior al 25% en 13 casos (68,42%) (fig. 69).

La **HNK** se realizó en 40 casos siendo positiva únicamente en 6 tumores (15%) y negativo en 34 (85%). La tinción celular fue de tipo

citoplásmico difuso y en células aisladas. La intensidad fue moderada en 5 casos y débil en 1. El porcentaje de células tumorales marcadas siempre fue inferior al 25% (entre 1 y 5%) (fig. 70).

Las **queratinas (K, CK, CAM 5.2)** fueron negativas, encontrándose únicamente positividad débil a moderada en dos casos a la **K** en áreas quísticas en el epitelio de revestimiento, de un total de 36 casos (fig. 71-72).

El **CEA** se realizó en 37 casos, encontrándose positividad en 6 casos (16,22%), en áreas quísticas en el epitelio de revestimiento. La tinción fue débil y focal y siempre en un porcentaje de células inferior al 25% (fig. 73).

El **UEA-I** fue positivo en 2 casos en las áreas quísticas en el epitelio de revestimiento, siendo la tinción débil y focal. Se realizó la técnica en 40 tumores.

La **a-QT** se realizó en 32 casos, siendo positiva en 1 caso en áreas quísticas en el epitelio de revestimiento.

Los **neurofilamentos** se llevaron a cabo en 37 tumores, encontrándose positividad en 1 caso de carácter difuso y débil en el 75% de las células tumorales.

La **GFAP** se pudo estudiar en 7 tumores, encontrándose positividad en 3 casos, siendo su intensidad de moderada a fuerte y el porcentaje de células tumorales teñidas en dos casos superior al 75% y en el otro entre el 25 y 50% (fig. 74).

La **DT-diaforasa** se realizó en 12 tumores, siendo negativa en 7 casos, dudosa (+/-) en 3 y no valorable en 2 casos (fig. 75-76).

El **antígeno de membrana epitelial**, la **sinaptofisina**, el **FVIIIIRA** y el **13E10** fueron negativos en todos los casos.

Las dos metástasis por nefroblastoma-like estudiadas inmunohistoquímicamente presentaron un inmunofenotipo similar al tumor primario renal.

Otros tumores renales a los que se realizaron técnicas inmunohistoquímicas correspondieron a 3 adenocarcinomas que se caracterizaron por presentar positividad a CEA (2 casos), UEA-I (2 casos), K (1 caso) y negatividad a VIM, S-100, DES, ACT, CK y EMA (fig. 32). También 1 adenoma renal con intensa positividad a UEA-I y negatividad al resto de anticuerpos. Y dos carcinomas de pelvis renal presentaron negatividad para VIM, S-100, NSE, DES y CAM 5.2 y fueron positivos a CEA, UEA-I y HNK (1 caso) (fig. 33).

### **3.3. Otros tumores.**

El hemangioendotelioma epitelioides-like mostró positividad a la VIM (100%/+++), NSE (50%/++), DES (50%/++), y fue negativo a S-100, HNK, K, CK, CEA, EMA, SINAP, CROM, UEA-I, aQT, NF y FVIIIIRa (endotelio positivo).

El carcinoma suprarrenal fue positivo a VIM (25%/++) y negativo a S-100, SINAP, CEA, NSE, NF y HNK.

Los 3 adenomas pulmonares presentaron positividad a UEA-I, EMA (1 caso) y fueron negativos a K, CK y CEA.

Los 3 adenomas hipofisarios mostraron extensa e intensa positividad a la prolactina, considerándose prolactinomas hipofisarios. Los 2 carcinomas hipofisarios presentaron distribución desigual, mostrando uno de ellos positividad en células aisladas a ACTH, prolactina y HNK, siendo negativo para somatostatina, GFAP, S-100 y neurofilamentos. El segundo mostró positividad focal a S-100, HNK y neurofilamentos, siendo negativo para VIM, NSE, EMA, CEA, somatostatina, ACTH y prolactina.

Los 4 melanomas malignos presentaron positividad intensa a la S-100, 3 fueron positivos a la VIM y todos ellos mostraron negatividad frente a HNK, NSE, NKI-C3, HMB-45, K y CK.

El sarcoma abdominal mostró positividad a VIM, S-100, DES, y GFAP, siendo negativo a HNK, SINAP, EMA, UEA-I,  $\alpha$ QT, ACT, CAM 5.2 y CK.

El carcinoma de mama presentó positividad a K, CEA, UEA-I, DT-diaforasa y focal a HNK, siendo negativo frente a VIM, S-100, CK, CAM 5.2, EMA, DES y ACT (fig. 52).

El tumor de útero presentó positividad a VIM, DES y NSE, siendo negativo a ACT, S-100, HNK, NF, CEA y EMA.

Los 2 tumores gliales presentaron positividad a VIM, S-100, GFAP, NSE, HNK (1 caso), NF (1 caso), DT-diaforasa (1 caso).

Los tumores de rama intracraneal de trigémino mostraron unas características inmunohistoquímicas similares a las de los tumores de sistema nervioso periférico.

#### **4. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.**

Para el estudio de microscopia electrónica de los tumores renales y de sistema nervioso periférico se recogieron muestras tisulares de 75 hámsters (grupo DES machos: 14; grupo ENU+DES hembras: 14; grupo ENU+DES machos: 18; grupo ENU: 29), representando un total 102 muestras tumorales, a las que habría que añadir el procesamiento de 7 cultivos celulares procedentes de tumores renales. Se realizaron cortes semifinos de todas ellas, seleccionándose tras su estudio un total de 33 casos (22 tumores renales, 10 tumores neurales y 1 melanoma), en los que se practicaron cortes ultrafinos para su análisis ultraestructural. Los hallazgos ultraestructurales de estos casos

se encuentran descritos en los protocolos correspondientes a cada animal. Los hámsters con tumor neural incluidos son los machos ENU+DES 18 y 21; las hembras ENU+DES 1, 5 y 20; y ENU 9, 11, 12, 28 y 56. Los tumores renales provienen de los machos DES 17, 20, 23, 24 y 28; ENU+DES machos 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20 y 26; y de las hembras ENU+DES 1, 3, 5, 8, 9, 11, 16 y 20. El tumor melánico analizado correspondió al macho ENU+DES 21.

#### **4.1. Tumores de sistema nervioso periférico.**

El examen ultraestructural confirmó las características morfológicas encontradas con el microscopio óptico. Los neurofibromas benignos presentaron un amplio espacio extracelular con abundantes fibras de colágena (fig. 77) y células tumorales dispersas en esta matriz, mostrando largos y finos procesos citoplásmicos, rodeadas total o parcialmente por una membrana basal (fig. 78). Las prolongaciones citoplásmicas se disponían formando complejas interdigitaciones que frecuentemente rodeaban otros procesos citoplásmicos, cuerpos celulares o haces de colágena, simulando mesoaxones (fig. 79). Ocasionalmente estas prolongaciones se dispusieron ordenadamente de una forma concéntrica recordando estructuras meissniformes (fig. 80). Los procesos contenían en general pocos orgánulos, pudiéndose distinguir microfilamentos y microtúbulos. También se observaron formaciones lamelares (fig. 81).

Los núcleos fueron redondos u ovals mostrando con frecuencia indentaciones irregulares en su membrana y ocasionalmente vacuolas citoplásmicas intranucleares (fig. 82). La heterocromatina estaba difusamente distribuida.

Otros elementos celulares hallados en la matriz extracelular correspondieron a mastocitos y células fibroblásticas.



Los tumores neurales malignos también estuvieron constituidos por células de tipo schwanniano, mostrando frecuentemente áreas densas celulares con escasa matriz extracelular pobre en fibras de colágena, ausencia de mastocitos y complejas interdigitaciones de procesos citoplásmicos normalmente más anchos que en los tumores benignos, en los que algunas veces se podía distinguir una membrana basal fragmentada o discontinua y formación de pseudomesoaxones. El polimorfismo celular y nuclear era evidente, encontrándose desde células pequeñas, redondas con escaso citoplasma, indiferenciadas, hasta células fusiformes de citoplasma amplio con procesos altamente organizados correspondientes a parte de un cuerpo de Verocay en un área Antoni A (fig. 83). Los núcleos presentaron una cromatina grosera y una membrana irregular con frecuentes hendiduras. Entre las células tumorales no fue raro el observar fibras nerviosas amielínicas y mielinizadas (fig. 84)

#### **4.2. Tumores renales.**

Los tumores renales inducidos por DES y ENU+DES, en machos y hembras, presentaron una morfología óptica y ultraestructural semejante, encontrándose que los patrones de crecimiento tumoral más frecuentes por microscopia óptica (epitelial, blastemal y neuroectodérmico) fueron también los predominantes en el estudio de microscopia electrónica. El crecimiento de las células neoplásicas, en todos los casos, se localizó a nivel del intersticio renal.

El patrón epitelial se caracterizó por un predominio de las áreas poco diferenciadas, constituidas por elementos celulares poligonales, de escaso citoplasma claro, dispuestas compactamente en el intersticio (fig. 85). Este patrón frecuentemente formaba un continuo con el blastemal, con presencia ocasional de células oscuras de morfología estrellada.

Existían zonas tumorales con clara diferenciación epitelial, encontrándose luces intra e intercelulares asociadas a microvellosidades, cilios o

material de secreción granular amorfo (fig. 86-87). Las estructuras ciliares, más frecuentemente relacionadas con luces intracelulares, mostraron a la sección generalmente nueve dobletes periféricos y dos microtúbulos únicos centrales, que podían faltar (fig. 88). En el epitelio superficial de los quistes y en las luces intercelulares fue más frecuente la existencia de microvellosidades (fig. 89). Los orgánulos citoplásmicos fueron escasos observándose mitocondrias con pocas crestas, y ocasionalmente retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi activados. Depósitos lipídicos existieron prácticamente en todos los casos, ocupando parcial o totalmente el citoplasma (fig. 90), existiendo aislados cuerpos lipídicos o figuras mielínicas (fig. 91). Los núcleos, en general, irregulares presentaron una cromatina distribuida periféricamente pudiendo o no observarse nucleolos. Las uniones intercelulares estaban bien desarrolladas apareciendo en todos los casos (fig. 92) junto con abundantes interdigitaciones.

Las áreas blastemales neoplásicas se caracterizaron por nidos sólidos de células de escaso citoplasma, pálido u oscuro, poligonal o elongado con formación de estructuras tubulares primitivas y en transición normalmente con áreas epiteliales (fig. 93-94). No se observó la formación de estructuras glomeruloides tumorales.

Otras características halladas son la presencia de pies basales como signo de diferenciación epitelial, pseudorrosetas perivasculares (fig. 95) en el patrón neuroectodérmico, filamentos intermedios tanto en células tumorales de hábito epitelial como mesenquimal (fig. 96), membrana basal que delimitaba claramente las áreas tumorales de los tejidos normales adyacentes, débil respuesta estrómic a al crecimiento neoplásico con escasa cantidad de fibras de colágena y gránulos Birbeck-like perinucleares asociados frecuentemente a los gránulos neurosecretorios.

Finalmente, destacar la clara diferenciación neural hallada en grupos tumorales de células intersticiales que presentaban complejas prolongaciones citoplásmicas, con tendencia a rodear otros procesos citoplásmicos o estructuras de aspecto neural, conteniendo gránulos neurosecretores y microfilamentos, indicando diferenciación schwanniana (fig. 97-98).

## 5. CULTIVOS.

Se realizó el estudio mediante cultivos celulares de 8 tumores renales tipo nefroblastoma (DES 20M, DES 24M, E+D 12M, E+D 6H, E+D 8H, E+D 9H, E+D 19H, E+D 20H), 1 carcinoma suprarrenal (ENU 46H), 1 neurinoma maligno (ENU 60M) y de dos tumores trasplantados, uno procedente de un tumor renal tipo nefroblastoma (E+D 19H) y otro procedente del carcinoma suprarrenal (ENU 46H).

Los cultivos **DES 20M** (fig. 99) y **DES 24M** presentaron un crecimiento lento, caracterizándose por la aparición de placas y grupos de células poligonales epitelioides con numerosas granulaciones citoplásmicas.

El cultivo **E+D 6H** mostró un buen crecimiento conformando placas bi y tridimensionales de células de aspecto epitelioides con presencia de granulaciones intracitoplásmicas. A dos de los frascos se añadió, en uno DES 1nM y en el otro 17beta-estradiol 1nM, no observándose diferencias en la velocidad de crecimiento ni cambios en la morfología celular.

El cultivo **E+D 8H** se caracterizó por presentar un buen crecimiento con abundante celularidad en monocapa o en placas tridimensionales de células de aspecto epitelioides y fusiformes con granulaciones perinucleares y vacuolas citoplásmicas. Igual como en el anterior, se añadió

DES 1nM y 17beta-estradiol en dos frascos distintos, no existiendo diferencias notables con los frascos en los que no se incorporaron estas sustancias.

Los cultivos **E+D 9H** y **E+D 19H** (fig. 100) mostraron un buen crecimiento con características morfológicas similares, formando placas bi o tridimensionales de células de hábito epitelioide con granulaciones y vacuolas citoplásmicas. Se añadió en varios frascos DES 1nM y 17beta-estradiol 1nM no observándose diferencias en el primer caso y apareciendo una velocidad de crecimiento más acusada en el segundo caso en el frasco tratado con DES, sin producirse cambios evidentes en la morfología celular.

El cultivo **E+D 20H** presentó también un buen crecimiento en monocapa y en grupos tridimensionales de células de hábito epitelioide con abundantes granulaciones y vacuolas citoplásmicas.

El cultivo **E+D 12M** mostró un buen crecimiento con formación de placas o grupos tridimensionales de células que adoptaban una morfología de célula pequeña epitelioide o bien de citoplasmas amplios con finas prolongaciones del mismo. Ambos tipos poseían numerosas granulaciones citoplásmicas perinucleares y vacuolas en menor número.

Los cultivos del carcinoma suprarrenal (**ENU 46H**) y de su trasplante presentaron un rápido crecimiento en forma de placas o grupos tridimensionales de células epitelioides con amplio citoplasma con granulaciones y vacuolas citoplásmicas.

El cultivo del neurinoma maligno (**ENU 60H**) (fig. 101) presentó un buen crecimiento, apareciendo una doble población celular, una constituida por células de pequeño tamaño y escaso citoplasma con prolongaciones finas constituyendo una malla, y otra población de células de mayor tamaño y amplio citoplasma de aspecto fibroblástico. Las técnicas inmunohistoquímicas realizadas en este cultivo mostraron elementos celulares

positivos a la VIM, proteína S-100 y NSE, siendo negativas a HNK, GFAP y EMA.

El cultivo del trasplante del tumor renal tipo nefroblastoma (E+D 19H) (fig. 102) presentó unas características de crecimiento y citológicas similares al cultivo del tumor primario, mostrando inmunohistoquímicamente los siguientes resultados: VIM 100%/+++; S-100 100%/++; NSE 25%/++; GFAP -; NF -; SINAP 50%/+ o ++; CROM 10%/+; 13E10 -; CK 90%/++; CEA -; EMA -; MIOG 75%/+++; DES 75%/+++; ACT 75%/+++; HNK -; CKMM 50%/++.

## **6. CITOGENETICA.**

Se han estudiado un total de 8 tumores, obteniéndose el cariotipo a partir de cultivo a corto plazo. De todos los tumores analizados, 2 corresponden a la serie de intoxicación con DES (DES 20 y DES 24) mientras que los 6 restantes pertenecen a la serie de tumores obtenidos mediante intoxicación con ENU y DES (E+D 6, E+D 8, E+D 9, E+D 12, E+D 19, E+D 20).

A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

## **\*DES-20**

-Sacrificio de los cultivos realizados en los días 27 y 34, correspondiente al pase 2.

-Número total de células analizadas: 12

-Rango: 43-P cromosomas (siendo  $P > 4n$ )

-Moda: 44 cromosomas (58.33%)

-Metafases cariotipadas: 9, obteniéndose las siguientes fórmulas cromosómicas:

1 metafase: 43, XY, +6, +15, +15, -17, -17, -19, -19, +20, -21

1 " : 43, Y, -X, +8, -19

1 " : 43, XY, -21

1 " : 44, XY, -3, +8

1 " : 45, X, +X, -Y, +16

1 " : 87, XXY, -Y, -12, +14

3 " : 44, XY correspondiente al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 1 (8.33%)

-Células con endorreduplicación: -

## **\*DES 24**

-Sacrificio del cultivo realizado el día 7.

-Número total de células analizadas: 28

-Rango: 39-P cromosomas

-Moda: 44 cromosomas (57.14%)

-Metafases cariotipadas: 13, obteniéndose las siguientes fórmulas

cromosómicas.

1 metafase: 42, XY, -11, -13

1 " : 43, XY, -15

1 " : 44, Y, -X, +15

1 " : 44, XY, -5, +11

1 " : 44, XY, +2, -5, +13, -16

1 " : 44, XY, +8, -10, -13, +16, -18, +19

1 " : 44, XY, -12, +14

1 " : 44, XY, -4, -5, -7, +14, +15, +20

5 " : 44, XY correspondiente al cariotipo normal del

hámster

-Células poliploides: 3 (10.71%)

-Células con endorreduplicación: 5 (17.85%)

**\*E+D 6**

-Sacrificio del cultivo realizado en el día 7.

-Número total de células analizadas: 47

-Rango: 39-P cromosomas

-Moda: 44 cromosomas (74.46%)

-Metafases analizadas: 9, obteniéndose las siguientes fórmulas cromosómicas.

1 metafase: 39, XX, -5, -9, -11, -16, -17

1 " : 40, XX, -2, -3, -18, -19

1 " : 41, XX, -7, -8, -13, -14, -18, +20, +21

1 " : 42, XX, +X, -4, -7, +8, -9, -21

1 " : 42, XX, +X, +5, -9, -9, +10, -12, +15, -16, -17, -21

1 " : 42, X, -X, -12

1 " : 43, XX, -4, -6, +11, -16, +21

2 " : 44, XX correspondientes al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 4 (8.51%)

-Células con endorreduplicación: -



**\*E+D 8**

-Sacrificio del cultivo realizado en el día 11 (pase 2).

-Número total de células analizadas: 38

-Rango: 40-P cromosomas

-Moda: 44 cromosomas (63.15%)

-Metafasas cariotipadas: 11, obteniéndose las siguientes fórmulas

cromosómicas.

1 metafase: 42, XX, -12, -19

1 " : 42, XX, +1, -9, +10, -11, -12, -20

1 " : 43, XX, +7, -8, +10, -17, -19

1 " : 43, XX, +2, +3, -6, -13, -14, +16, -18

1 " : 44, XX, +8, -19

1 " : 44, XX, +6, +9, -10, -11, -13, +mar (marcador de

origen desconocido)

1 " : 44, XX, -9, -13, -13, 18p+, -19, +20, +3

1 " : 45, XX, -1, -7, -12, +14, +15, +18, +mar

3 " : 44, XX correspondientes al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 4 (10.52%)

-Células con endorreduplicación: 1 (2.63%)

**\*E+D 9**

-Sacrificio del cultivo realizado en el día 11 (pase 1)

-Número total de células analizadas: 55

-Rango: 36-P cromosomas

-Moda: 44 (60.00%)

-Metafases cariotipadas: 15, obteniéndose las siguientes fórmulas cromosómicas.

1 metafase: 41, X, -X, -17, -18

1 " : 43, XX, -1, -2, -4, +7, +11

1 " : 43, XX, +4, -11, +16, -18, -19

1 " : 43, XX, +6, -7, -8, -11, -12, +14, +18

1 " : 43, X, -X, +8, -19

1 " : 43, XX, -5

1 " : 44, XX, +8, +9, -11, +14, -16, -18

1 " : 44, XX, +4, -12, -15, +19

1 " : 44, XX, +5, -19

1 " : 44, XX, +3, -5, -8, -9, +13, +15

1 " : 44, XX, -4, +6, +9, -20

1 " : 44, XX, +4, -7, -8, +9, -10, +16

1 " : 44, XX, -13, +17

2 " : 44, XX correspondiente al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 9 (16.36%)

-Células con endorreduplicación: 4 (7.27%)

## **\*E+D 12**

-Sacrificio del cultivo realizado el día 13.

-Número total de células analizadas: 20

-Rango: 42-P cromosomas

-Moda: 44 cromosomas (45%)

-Metafases cariotipadas: 10, obteniéndose las siguientes fórmulas cromosómicas.

1 metafase: 42, XY, -1, -5, -6, -9, +21, +21

1 " : 43, XY, +11, -15, -20

1 " : 44, -X, -Y, -1, -3, -5, +7, +11, +15, +15, +20

1 " : 44, XY, +3, -4, -14, +17, -20, +21

1 " : 44, XY, +3, +5, -7, -12, -19, +21

1 " : 44, XY, +3, -7, +9, -10, +14, -18

1 " : 44, XY, +2, -4, +6, -8, -10, +14

1 " : 44, XY, -10, +12, +14, -17

1 " : 44, XY, +2, -5, +11, -12

1 " : 44, XY, correspondiente al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 7 (35%)

-Células con endorreduplicación: 2 (10%)

**\*E+D 19**

-Sacrificio del cultivo realizado en el día 7.

-Número total de células analizadas: 33

-Rango: 35-P cromosomas

-Moda: 44 (48.48%) cromosomas

-Metafase cariotipadas: 15, observándose las siguientes fórmulas cromosómicas.

1 metafase: 41, XX, +5, -7, -8, -11, -11, -12, +16

1 " : 44, XX, +9, -14

1 " : 44, XX, -12, +15

1 " : 44, XX, -6, +9

1 " : 44, X, -X, -1, -1, -4, +6, +7, +9, +11

1 " : 44, XX, -12, +mar

1 " : 44, XX, +3, -9

1 " : 44, XX, +10, -11, -13, -14, +16, +21

1 " : 44, XX, +6, -7, -10, +12

1 " : 45, XX, -4, +6, +21

5 " : 44, XX correspondientes al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 1 (3.03%)

-Células con endorreduplicación: 2 (6.06%)

**\*E+D 20**

-Sacrificio del cultivo realizado en el día 7.

-Número total de células analizadas: 25

-Raango: 32-P cromosomas

-Moda: 44 cromosomas (40%)

-Metafases cariotipadas: 10, obteniéndose las siguientes fórmulas cromosómicas.

1 metafase: 40, XX, -3, -5, -8, -12, -13, +16

1 " : 41, XX, -1, -2, -9, -10, +14, -20, +21

1 " : 43, XX, -20

1 " : 43, X, -X, -4, +11

1 " : 44, XX, -1, +8

1 " : 44, X, -X, -3, +7, +14

1 " : 44, X, -X, -1, +9, +16

1 " : 44, XX, -4, +21

2 " : 44, XX correspondientes al cariotipo normal del

hámster.

-Células poliploides: 2 (8%)

-Células con endorreduplicación: 4 (16%)

## **VI- DISCUSSION**

En carcinogénesis experimental se estableció desde hace décadas al hámster dorado sirio (HDS) como modelo adecuado para la carcinogénesis hormonal y la tumorigénesis renal (Matthews et al., 1947), siendo más recientemente cuando se ha podido observar como este animal de laboratorio ha resultado también un magnífico modelo para el estudio de la neurofibromatosis de von Recklinghausen debido a la naturaleza de los tumores inducidos por la etilnitrosourea en el mismo (Nakamura et al., 1989; Cardesa et al., 1989).

Al igual que en las neurocristopatías humanas se han observado una mayor frecuencia de tumores de Wilms, además de otras neoplasias poco frecuentes (Stein, 1991), en los HDS tratados con ENU además de la aparición de tumores de sistema nervioso periférico también se ha visto un aumento de la incidencia de tumores renales tipo nefroblastoma (Pelfrene y Love, 1977), sospechándose que este tipo de tumor, tanto en humanos como en hámsters, pueda en parte proceder de restos celulares de la cresta neural persistentes en el intersticio renal. Para intentar dilucidar este posible origen de algunos tumores renales hemos decidido combinar ambos carcinógenos: DES y ENU en una asociación no realizada hasta el momento, lo cual teóricamente permitiría analizar simultáneamente la influencia de factores como sexo y gonadectomía sobre la señalada tumorigénesis renal.

En los resultados de este estudio se ponen de manifiesto las importantes variaciones en cuanto a tipo, incidencia y distribución por sexos de los tumores producidos por la administración conjunta de dietilestilbestrol y etilnitrosourea, comparados con los obtenidos por la intoxicación con cada una de estas drogas por separado en el mismo HDS.

La probabilidad de aparición de tumores en las distintas series estuvo directamente relacionada con el tipo de tratamiento aplicado. La

distribución del número total de animales con tumor, tumores por serie, periodos de latencia y las distintas localizaciones de los mismos viene recogida en la tabla de CANCEROGENESIS POR ENU Y DES (tabla 11).

Considerando globalmente todos los tipos tumorales inducidos, el mayor porcentaje de producción neoplásica se logró en los hámsters machos castrados y tratados con ENU y en las hembras gonadectomizadas y tratadas con ENU y DES, estando en ambas series el 100% de los animales afectados por neoplasias.

La multiplicidad de tumores por hámster afectado, en cambio, fue máxima en los machos castrados y tratados con ENU y DES con una media de 2,73 tumores/hámster (un total de 71 tumores en 26 animales estudiados de 30), seguido por las hembras no gonadectomizadas y tratadas con ENU que mostraron 2,53 tumores/hámster (un total de 38 tumores en 15 animales estudiados de 19). No coincidieron por tanto las series con mayor número de animales afectados con las de mayor número de tumores.

En la serie de animales tratados con ENU se establecieron dos subgrupos para poder estudiar el efecto de la gonadectomía en los mismos y poder establecer comparaciones con las series tratadas con ENU y DES y al mismo tiempo poder servir de controles internos en la experiencia. Las diferencias, si las hubo, entre el número de animales afectados y el número de tumores inducidos en las series ENU y ENU+DES se comentarán más adelante en los apartados correspondientes a los distintos tumores encontrados. Aquí, únicamente queremos señalar las diferencias globales que se hallaron en los animales tratados con ENU gonadectomizados o no. Así, en las hembras la gonadectomía parece ejercer un efecto protector, disminuyendo el número de animales afectados y el número total de tumores (9/20) con respecto a las no



gonadectomizadas (15/38), aunque las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas ( $p > 0.1$ ).

Con los machos tratados con ENU ocurre justo lo contrario que con las hembras. La gonadectomía parece favorecer la aparición de tumores y su multiplicidad, junto con un mayor número de hámsters afectados (en este caso fue del 100%, frente al 70% en los no castrados). El p-valor, como en las hembras, fue mayor de 0.1, indicando que el efecto de la gonadectomía no fue significativo (tabla 11).

Los criterios histológicos adoptados para la clasificación de los tumores experimentales obtenidos fueron aquellos recomendados por diversos trabajos de referencia de patología tumoral humana (Rosai, 1989; Russell y Rubinstein, 1989; Sternberg, 1994; Bennington y Beckwith, 1983; Enzinger, 1988) y patología tumoral experimental (Turusov, 1982; Jones et al., 1986; Jones et al., 1988).

## **1- TUMORES RENALES**

Nuestros resultados han demostrado un marcado efecto del tratamiento en cuanto a la probabilidad de la presencia de tumores renales, con un p-valor inferior a 0.01, es decir la aparición y frecuencia de los tumores renales depende directamente del tratamiento empleado en el hámster.

Los tumores renales fueron los segundos en frecuencia (21.55%) por detrás de los tumores de sistema nervioso periférico (45.69%). Como puede observarse en la tabla 12, el efecto promotor del dietilestilbestrol sobre la carcinogénesis renal inducida por la etílnitrosourea es evidente, existiendo un claro e importante incremento de la incidencia tumoral renal ( $p < 0.01$ ) y demostrándose fehacientemente, por lo tanto, la influencia de los factores hormonales en el desarrollo de los tumores renales.

Cuando los animales fueron tratados únicamente con ENU no se obtuvieron tumores renales, independientemente del sexo y de la presencia o ausencia de gonadectomía, hecho que contrasta con los resultados de otros autores (Nakamura et al., 1989) que obtuvieron hasta un 21,7% de nefroblastomas en la prole.

El tratamiento con DES en hámsters, machos y hembras, previamente gonadectomizados para facilitar la inducción tumoral renal, como clásicamente se ha descrito (Kirkman y Bacon, 1952a,b), provocó la aparición de tumores renales únicamente en los machos castrados y en un bajo porcentaje, próximo al 20%. Tales resultados en este grupo experimental podrían explicarse por el empleo quizás de una baja dosis de principio activo (25 mg de DES/comprimido/3 meses), por una inadecuada absorción y, con referencia a las hembras, por la resistencia a la inducción tumoral que estas presentan (Kirkman, 1959b).

Interesantes y significativas variaciones en la incidencia de los tumores renales aparecen cuando se unen los dos tratamientos. Los cambios más intensos se produjeron en las hembras gonadectomizadas, apareciendo tumores renales en aproximadamente el 91% de los animales intoxicados, contrastando claramente con la ausencia de tumores cuando se emplearon los dos agentes carcinogénicos por separado. Un aumento menos acusado se observó en los machos, pero siendo también significativo, pasando de un 19.44% de animales afectados cuando únicamente se trataron con DES a un 53.33% cuando se emplearon ambas drogas, siendo nula la tumorigénesis renal en los hámsters tratados con ENU.

Estos hallazgos sugieren la presencia de un efecto potenciador del DES sobre la carcinogénesis renal durante la oncogénesis inducida por ENU. Existiría un efecto sincancerogénico por el cual el DES incrementaría la acción

iniciante del ENU, probablemente por cambios en las células diana renales que aumentarían su susceptibilidad al DES. Hallazgos que han sido observados también en ratas, pero siendo tratadas con estradiol, obteniéndose una menor incidencia de tumores renales y manteniéndose la amplia diferencia entre machos (4%) y hembras (38%) (Aoyama et al., 1989), también presente en nuestra experiencia.

El periodo de latencia entre el inicio de la intoxicación y la aparición de los primeros tumores renales presentó amplias variaciones dependiendo del tipo de tratamiento. Así, el tiempo de latencia mínimo hasta la aparición del primer tumor fue observado en las hámsters hembras gonadectomizadas y tratadas con DES y ENU (125 días), correspondiéndose también con un mayor número de tumores, como se comentó anteriormente, un comportamiento más agresivo de los mismos y subsecuentemente una peor evolución y menor supervivencia de los animales. El tiempo de latencia más prolongado hasta la aparición del primer tumor se observó en los machos gonadectomizados y tratados con DES y ENU, siendo este periodo de 259 días. Los machos castrados y tratados únicamente con DES presentaron un tiempo de latencia intermedio entre los dos anteriores de 180 días, con un crecimiento tumoral más lento, menos agresivo y mayor supervivencia, explicándose esta última por la ausencia de tumores en otras localizaciones que aceleraban el deterioro físico del hámster, presentes en los machos y hembras tratados con ambas drogas.

Se encontraron variaciones en los tipos histológicos de los tumores renales obtenidos según la serie. Así, las hámsters hembras gonadectomizadas y tratadas con ENU y DES presentaron 20 tumores tipo nefroblastoma, 2 adenocarcinomas, 2 adenomas y 1 carcinoma urotelial de pelvis renal. En los machos con el mismo tratamiento se identificaron 1

adenoma, 1 adenocarcinoma y los 16 restantes correspondieron a nefroblastomas. En la serie de machos intoxicados con DES todos los tumores renales fueron de tipo nefroblastoma. Por lo tanto, el tratamiento también parece influir en el espectro histológico de tumores renales obtenidos, aunque no de manera estadísticamente significativa.

El estudio de los patrones histológicos en los tumores renales tipo nefroblastoma demostró la existencia de dos patrones de mayor agresividad, sarcomatoide y neuroendocrinoide, en los machos y hembras tratados con ENU y DES, no viéndose en los machos únicamente tratados con DES. El patrón más frecuente en machos y hembras tratados con las dos sustancias fue el blastemal seguido por el hipernefroide, mientras que en los machos tratados con DES el patrón más frecuente fue el hipernefroide y a continuación el blastemal. El patrón blastemal fue el predominante en los tumorlets. Otras características comunes a destacar fueron una actividad mitótica, en general, baja excepto en los patrones neuroectodérmico y sarcomatoide y una reacción estrómicamente prácticamente nula al crecimiento tumoral. Estos hallazgos sugieren la existencia de una correlación entre el patrón histológico y la agresividad de los tumores con el tratamiento administrado.

### **1.1. Inmunohistoquímica.**

Inmunohistoquímicamente, los anticuerpos que con más frecuencia mostraron una fuerte tinción celular y mayor porcentaje de células tumorales teñidas fueron la vimentina (95% de los casos), proteína S-100 (94,87%), desmina (88,57%) y actina (61,29%). Resultados que coinciden en líneas generales con los obtenidos por diversos autores (Hacker et al., 1988; Gonzalez et al., 1989; Oberley et al., 1991; Hacker et al., 1991). Todos los demás anticuerpos presentaron índices de positividad por debajo del 50%, encontrándose que las células tumorales fueron también positivas frente a

diversos marcadores epiteliales, mesenquimales y neurales. No se observaron variaciones en el inmunofenotipo de las metástasis frente a los tumores primitivos renales. Cortés-Vizcaíno (1990) recientemente realizó análoga correlación de los distintos marcadores inmunohistoquímicos (epiteliales, mesenquimales y neurales) frente a las estructuras normales en el riñón del hámster y en los tumores renales DES-inducidos.

La vimentina y la proteína S-100 demostraron ser los anticuerpos más sensibles y específicos, no sólo en la tinción de los tumores renales tipo nefroblastoma bien desarrollados, sino que en muchas ocasiones delimitaron con nitidez pequeños nidos o grupos de células intersticiales correspondientes a lesiones tipo hiperplasia de células intersticiales o tumorlets, facilitando de tal modo su identificación y estudio. Comprobándose por lo tanto que las lesiones preneoplásicas resultaron positivas desde un primer momento a estos dos anticuerpos, ofreciendo al mismo tiempo una perfecta delimitación entre el parénquima renal normal y los distintos tipos de lesiones encontradas durante la carcinogénesis.

Los marcadores musculares, desmina y actina, en los tumores presentaron una mayor intensidad en las células neoplásicas perivasculares y, principalmente, con el primero de ellos. La mioglobina y la CKMM, otros dos marcadores musculares, se pudieron demostrar sólo en el cultivo celular del tumor renal tipo nefroblastoma, siendo negativos en los tumores originales.

La queratina policlonal (K), el CEA y el UEA-I fueron positivos en aquellos casos con una clara diferenciación epitelial y fundamentalmente en el epitelio de revestimiento de las áreas quísticas. Estos marcadores también resultaron útiles para establecer el diagnóstico diferencial con tumores renales no nefroblastomatosos (adenomas, adenocarcinomas y carcinomas uroteliales), los cuales mostraron negatividad constante a VIM, S-100, DES y ACT, siendo

positivos a CEA, K y UEA-I. Es llamativa la intensa y específica inmunotinción de los ductos y túbulos colectores de los rayos medulares frente a UEA-I, intensidad de marcaje que aumentaban claramente cuando el tejido había sido fijada en Carnoy. El cultivo celular demostró la expresión de CK, no encontrada en los cortes de parafina.

La expresión de distintos marcadores tumorales de diferenciación neural se han demostrado en las células de los tumores tipo nefroblastoma, hallándose inmunotinción frente a proteína S-100 (94.87%), NSE (48.72%), HNK (15%), neurofilamentos en 1 caso de 37 y GFAP en 3 casos de los 7 estudiados. Inmunohistoquímicamente, en el cultivo celular se pudo demostrar además la expresión de cromogranina y sinaptofisina. Estos hallazgos coinciden en cierto modo con los descritos por Dodge et al. (1988), quienes demostraron en un tumor renal inducido por DES en el hámster dorado sirio y en sus metástasis la presencia de gránulos secretores que resultaron positivos a la inmunotinción con renina.

El anticuerpo policlonal frente a la DT-diaforasa fue negativo o débilmente positivo en las células tumorales, correspondiéndose con los resultados bioquímicos previos (Segura-Aguilar et al., 1990) y con los estudios de los niveles de esta enzima llevados a cabo durante esta experiencia, que indicaron un progresivo descenso de la actividad de la DT-diaforasa a nivel renal durante la inducción tumoral por DES tanto en la fase preneoplásica como en la neoplásica. En un nefroblastoma humano utilizado como control la distribución de la DT-diaforasa fue equiparable a la vista en los hámsters, existiendo negatividad al anticuerpo en las áreas indiferenciadas del tumor y mostrando positividad evidente en las zonas bien diferenciadas con formación de estructuras pseudotubulares o glomeruloides. El parénquima renal normal, tanto en el humano como en el hámster, mostró positividad frente al anticuerpo

en las células del epitelio visceral glomerular, epitelio tubular y epitelio urotelial de pelvis renal con un refuerzo de la intensidad en las capas basales de este último. Estos resultados apoyan la hipótesis de una posible acción específica del DES sobre este sistema enzimático antioxidante, disminuyendo los niveles de DT-diaforasa, y alterando de este modo las vías de metabolización del DES y favoreciendo el desarrollo de lesiones neoplásicas renales.

Otras enzimas antioxidantes estudiadas en diversos tejidos, maduros e inmaduros, de la rata (Munim et al., 1992) y el hámster (Oberley et al., 1990), han sido las superóxido dismutasa (CuZnSOD y MnSOD) y la catalasa. En el riñón de la rata se encontró expresión de SOD, en la fase tardía de la gestación y en el tejido maduro, a nivel de los túbulos proximales y distales, asas de Henle y ductos colectores. El riñón del hámster no mostró reactividad durante su desarrollo en la etapa prenatal, apareciendo ya positividad un día después del nacimiento, tanto para la SOD como para la catalasa, a nivel de túbulos proximales, asas de Henle, túbulos distales, ductos colectores y células superficiales del epitelio transicional de la pelvis renal, que aumentaba de intensidad conforme la maduración renal progresaba. En los tumores renales estrógeno-inducidos (McCormick et al., 1991) se ha demostrado unos bajos niveles de actividad catalasa y de SOD, incluso en las fases iniciales tumorales.

Inmunohistoquímicamente, en el tumor de Wilms humano, se han demostrado también marcadores tumorales epiteliales, mesenquimales y neurales. Yeger et al. (1985) y Wakely et al. (1989) demostraron la coexpresión de vimentina y citoqueratina en algunas células tumorales, y van Muijen et al. (1987) la observaron en los túbulos inmaduros localizados en el blastema renal, expresión de filamentos intermedios también estudiada por

Moll et al. (1991). Wick et al. (1986) observaron la expresión de citoqueratina y EMA en nefroblastomas humanos, no obteniendo positividad frente a la vimentina. Este último anticuerpo sí fue detectado en nefroblastomas de perros y cerdos así como la proteína S-100. La desmina, NSE y neurofilamentos no fueron encontrados en ningún caso. Wolman et al. (1990) observaron la coexpresión en las células tumorales de vimentina, desmina, CK y EMA. Estudios realizados sobre lesiones no tumorales y tumorales en riñones de rata y humanos, permitieron a Ward et al. (1992) observar que el grado de dediferenciación de las células tubulares y los cambios en el fenotipo se asociaron con la expresión de vimentina. Walford y Delemarre (1991) encontraron tinción positiva para los marcadores musculares desmina, HHF 35 (mioepitelio y músculo liso) y CGA 7 (actina de músculo liso). Magee et al. (1987) y Jenkins et al. (1991) demostraron la presencia de diferenciación neural al encontrar inmunotinción frente a NSE, proteína S-100 y GFAP, confirmando así los hallazgos previos histológicos de Masson al sugerir la presencia de diferenciación neuroectodérmica en algunos tumores de Wilms. El empleo de un gran panel de anticuerpos (laminina, fibronectina, CK, vimentina, villina, CD24, CALLA/CD10, CR1, CD26, y complejos mayores de histocompatibilidad clases I y II) ha permitido a Droz et al. (1990) confirmar que la diferenciación celular en los tumores de Wilms recuerda a la observada durante el desarrollo del metanefros, ofreciendo un modelo adecuado para el estudio de la nefrogénesis humana. Roth y Zuber (1990) identificaron por técnicas inmunohistoquímicas, inmunoblotting e inmunomicroscopia electrónica la presencia de N-CAM en células del tumor de Wilms, proponiendo que esta molécula puede modular el comportamiento y potencial invasivo de las células tumorales.



Estudios en cultivos celulares de tumores de Wilms (Velasco et al., 1993; Gonzalez et al., 1990, 1993) han demostrado la expresión de vimentina, CK, desmina, NSE y N-CAM, volviendo a ser estos hallazgos consistentes con un modelo de iniciación tumoral en una célula pluripotente que es capaz de sufrir diferenciación en múltiples líneas diferentes y que remeda la nefrogénesis normal.

Este conjunto de hallazgos de expresión neural tanto en los nefroblastomas humanos (tumores de Wilms) como en otros modelos experimentales vienen a potenciar nuestra hipótesis defendiendo el carácter disembrionatoso y blastemal del tumor inducido por DES/ENU en el hámster dorado sirio.

### **1.2. Microscopia electrónica.**

Los hallazgos encontrados en el estudio ultraestructural confirman en líneas generales las observaciones realizadas previamente (Llombart-Bosch y Peydró-Olaya, 1986; Cortés-Vizcaíno, 1990). Las características ultraestructurales de los tumores plenamente desarrollados sirvieron para confirmar las encontradas por microscopia óptica, distinguiéndose campos blastemales, mesenquimales y epiteliales, así como áreas con una clara diferenciación neural. La transición entre estos distintos patrones fue progresiva, existiendo un estrecho contacto entre ellos y localizándose en el intersticio renal.

Las áreas blastemales recordaban al metanefros embrionario, también descritas en el tumor de Wilms humano (Schmidt et al., 1982), estando constituidas por células oscuras y estrelladas y estructuras pseudotubulares que semejaban los túbulos primitivos, situados siempre a nivel intersticial, aspectos ultraestructurales ya descritos previamente (Llombart-Bosch y Peydró, 1975; Gonzalez et al., 1989; Cortés-Vizcaíno, 1990). El componente blastemal fue

definido como áreas compactas de células con núcleo hiperocrómico y escaso citoplasma con una pobre representación de organelas.

El patrón epitelial pudo observarse en transición con áreas blastemales (Mannweiler y Bernhard, 1957; Llombart-Bosch y Peydró 1975, 1986; Cortés-Vizcaíno, 1990), comprendiendo un amplio espectro ultraestructural. El tipo celular predominante tuvo una morfología epitelial, con citoplasma poligonal o prismático (generalmente cuando tapizaban túbulos o espacios quísticos) rico en organelas, formación de luces intracelulares (que con la microscopia óptica fueron consideradas vacuolas intracelulares) o intercelulares con presencia de microvellosidades y/o cilios, interdigitaciones intercelulares y uniones muy elaboradas (complejos de unión y desmosomas). Se apreciaron rasgos secretores con un retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi bien desarrollado. La presencia de depósitos lipídicos fue característico de las áreas epiteliales hipernefroides, aunque también se encontraron en células blastemales (Llombart-Bosch y Peydró, 1975, 1986; Cortés-Vizcaíno, 1990). Tanto en células blastemales como epiteliales se identificaron figuras mielínicas, coincidiendo con hallazgos previos (Llombart-Bosch y Peydró, 1975; Gonzalez et al., 1989; Cortés-Vizcaíno, 1990). Distintas características de diferenciación epitelial en cultivos celulares de líneas de nefroblastomas de rata y hámster han sido comunicadas por diversos autores (Nagashima et al., 1989; Gonzalez et al., 1993).

La presencia de gránulos citoplásmicos de tipo neurosecretor ("dense-core") (Cortés-Vizcaíno, 1990) pudo verse fundamentalmente en las áreas neuroendocrinas y neuroectodérmicas, siendo más frecuente a su vez en los hámsters intoxicados con ENU y DES. En este grupo de animales ocasionalmente se pudo apreciar la existencia de elementos celulares intersticiales con prolongaciones citoplásmicas que tendían a rodear estructuras

de aspecto neural, adoptando una morfología schwanniana. También Dodge et al. (1988) destacaron la presencia de gránulos de tipo neurosecretor en un tumor renal de hámster, demostrando que correspondían a gránulos de renina tras estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos.

También se han podido demostrar filamentos intermedios en distintos tipos celulares de los tumores renales, pero de forma característica se identificaron más frecuentemente en las áreas perivasculares. La presencia de los mismos ya fue descrita previamente por Llombart-Bosch y Peydró (1975, 1986) y Cortés-Yizcaíno (1990).

El estudio con microscopia electrónica de procesos tumorales precoces ha permitido confirmar como desde el inicio de las mismas ya se pueden identificar diversas características de diferenciación en las células, como son la formación de luces intracitoplásmicas, ciliogénesis, microvellosidades e incluso la presencia de gránulos de tipo neurosecretor. Hallazgos estos que no coinciden con los descritos por Gonzalez et al. (1989) y Oberley et al. (1991), indicando estos autores el predominio en los focos precoces de células pequeñas sin características de diferenciación evidenciables morfológicamente.

## **2- TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP).**

En este grupo de tumores, como sucede con los tumores renales, su incidencia depende del tratamiento empleado, siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) cuando se distinguen los tres grupos principales de hámsters tratados con DES, ENU y ENU+DES.

Coincidiendo con el resto de la literatura, los animales tratados con DES no presentaron tumores de SNP, aunque sí que se observaron

diferencias estadísticamente significativas en la inducción tumoral cuando se emplearon conjuntamente el DES y ENU, permitiendo suponer la posible influencia de factores hormonales en la aparición de tumores de SNP.

De hecho, coincidiendo con diversos autores (Nakamura et al., 1989; Muntané et al., 1991; Nemoto et al., 1993), hemos encontrado diferencias en la incidencia de tumores de SNP en base al sexo, observándose una mayor proporción de hembras afectos (73.68%) y de tumores por animal (2.28) que en los machos (58.82% y 1.2) tratados con ENU. Diferencias que desaparecieron cuando a los machos se les castró, apreciándose un aumento del número de animales afectados (78.57%) y de la incidencia tumoral en los mismos (1.81), igualándose a la frecuencia obtenida en las hembras. Estos hallazgos sugieren la existencia de un posible efecto inhibitor de los andrógenos endógenos en el desarrollo y crecimiento de los tumores de SNP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rustia (1976a).

En las hembras tratadas con ENU no se encontró efecto significativo tras la realización de la gonadectomía, en referencia al número de animales afectados: 73.68% en las no gonadectomizadas frente al 75% en las gonadectomizadas. Sin embargo, sí que se establecieron diferencias analizando la multiplicidad de los tumores, ya que disminuyeron de una media de 2.28 tumores por hembra no ovariectomizada a 1.55 tumores en las gonadectomizadas.

Cuando al tratamiento con ENU más gonadectomía se añadió el DES, se encontró una inhibición de la incidencia tumoral y del número de hámsters con tumor, tanto en machos como en hembras, estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ); pasando del 75% al 36.36% y de 1.55 tumores/hámster a 1.00 en las hembras, y del 78.57% al 46.67% y de 1.81 tumores/hámster a 1.43 en los machos. Existe una clara acción inhibitora ejercida por el DES sobre la

aparición de tumores de SNP en los hámsters, siendo algo menos acusada en los machos que en las hembras. Ello haría esperar una inhibición mayor de la tumorigénesis en los machos si estos no hubiesen estado castrados, al añadirse el efecto supresor de los andrógenos endógenos, anteriormente comentado, sobre la acción del DES.

Aoyama et al. (1989), contrariamente a la presente experiencia, encontraron que las ratas macho fueron más susceptibles que las hembra a la inducción por ENU de tumores del nervio trigémino. Esta diferencia desapareció después de la gonadectomía, y el tratamiento sustitutivo con estradiol seguido por gonadectomía suprimió la incidencia de tumores trigeminales. Estas diferencias podrían explicarse por la distinta sensibilidad que presentan las ratas a la carcinogénesis por ENU sobre sistema nervioso (Koestner et al., 1971).

El periodo de latencia hasta la identificación del primer tumor de SNP también ofreció importantes variaciones dependiendo del tratamiento y de la realización o no de gonadectomía, estando relacionado asimismo con el número de hámsters afectados y el número de tumores por hámster. Las hembras tratadas con ENU presentaron el primer tumor a los 78 días tras el nacimiento, periodo de tiempo que se retrasó hasta los 182 días en las ovariectomizadas, volviendo a descender hasta los 69 días cuando se añadió el DES. El estrógeno en este último grupo disminuiría el número de tumores por animal así como de hámsters afectados, pero mantendría aproximadamente el mismo tiempo de latencia que en el primer grupo.

En los machos ocurre la circunstancia inversa, viéndose el primer tumor a los 400 días del nacimiento en los machos tratados con ENU, acortándose hasta los 180 días cuando se castraron y aumentando hasta los 306 días cuando se añadió DES.

Por estos resultados se puede intuir un importante papel de los andrógenos endógenos y de los estrógenos en la inducción transplacentaria de tumores de SNP en el hámster, incrementando o inhibiendo el número de tumores (multiplicidad) y de hámsters afectados y acortando o prolongando los tiempos de latencia.

La localización más frecuente de los tumores de SNP fue la subcutánea (65.09%), seguidos por los ubicados en cavidad abdominal, que suponen en conjunto el 27.36% del total de tumores de SNP. Hallazgos que están en consonancia con los obtenidos por Nakamura et al. (1989).

Histológicamente los tumores de SNP logrados se distribuyeron en porcentajes similares entre benignos (53.78%) y malignos (46.23%), siendo un poco más elevada la incidencia tumoral en las hembras que en los machos (54 tumores en 31 hámster afectados y 52 en 35 respectivamente) y detectándose una frecuencia más alta de tumores malignos en los machos (53.85%) que en las hembras (38.89%).

Si valoramos los distintos tratamientos llevados a cabo en su conjunto, la mayor frecuencia de tumores (malignos y benignos) se vio en los hámsters tratados con ENU, apareciendo una importante disminución de la frecuencia tumoral, tanto de benignos como de malignos, cuando se incorporó el DES a la experiencia. Por estos resultados, cabe sugerir que la presencia de tumores malignos está relacionada con la incidencia tumoral y el tiempo de evolución del tumor hasta el sacrificio del hámster. Así, los hámsters con mayor número de tumores y mayor periodo de supervivencia presentarán con más probabilidad transformación maligna de los tumores de SNP, recordando a los cambios malignos en fases avanzadas del crecimiento tumoral que aparecen en los neurofibromas de la enfermedad de von Recklinghausen en los humanos.

A pesar de que los tumores malignos suponen aproximadamente la mitad (46.23%) de todos los tumores de SNP, sólo se encontraron metástasis a distancia en tres casos (linfática, hepática y pulmonar). Otras características de malignidad fueron más frecuentes, tal es el caso de la mala delimitación tumoral y la extensión e infiltración a tejidos adyacentes.

Cabe destacar en este punto la ausencia de desarrollo de tumoraciones de SNP en los animales adultos expuestos al ENU (hámsters "madres" gestantes intoxicadas por vía intraperitoneal) que se sacrificaron al final de la experiencia, coincidiendo con los resultados de Wechsler et al. (1969), indicando que los hámsters adultos fueron menos susceptibles a la inducción tumoral, siendo necesario para ello el uso de dosis más elevadas.

### **2.1. Inmunohistoquímica.**

Inmunohistoquímicamente no se encontraron grandes diferencias entre los tumores malignos y benignos, siendo en ambos casos compuestos por células de Schwann como principal componente celular neoplásico. Ellas mostraron una intensa inmunotinción frente a vimentina y proteína S-100, y menos intensa frente a NSE y HNK. La NSE y neurofilamentos fueron unos buenos marcadores para la identificación de los axones atrapados en el seno de los tumores. A estos se sumó el EMA, que en estos tumores marcó las fibras nerviosas y no las células perineuriales, como sucede en los tumores de SNP y en los nervios periféricos humanos (Ariza et al., 1988; de la Monte, 1990). Quizás esto esté ocasionado por una reacción cruzada del EMA con la NSE y/o los neurofilamentos a nivel del sistema nervioso periférico y sus tumores en el hámster.

### **2.2. Microscopia electrónica.**

El estudio con microscopia electrónica ofreció semejantes resultados a los descritos por otros autores (Wechsler et al., 1969; Walker et

al., 1988; Cardesa et al., 1989), viéndose como estaban constituidos básicamente por células de aspecto fibroblástico entremezcladas con células de Schwann bien diferenciadas, rodeadas por una membrana basal y presentando múltiples proyecciones citoplásmicas, con formación ocasional de mesoaxones o pseudomesoaxones cuando rodeaban haces de colágena u otros procesos citoplásmicos. El espacio extracelular fue generalmente muy amplio, conteniendo abundantes haces de colágena con aislados mastocitos que tenían gránulos electrón-densos en su citoplasma. También se pudo confirmar con microscopia electrónica la presencia de formaciones pseudomeissnerianas y, en un neurinoma maligno de trigémino intracraneal, se hallaron células fusiformes con largos procesos citoplásmicos muy organizados, que formaban parte de un cuerpo de Verocay en un área Antoni A.

### **3. CITOGENÉTICA.**

Existen varios estudios referidos en la bibliografía que analizan como actúa el DES a nivel genético para inducir la transformación neoplásica. Así se sabe que el DES en dosis que inducen la transformación neoplásica sobre células en cultivo, no producen mutación génica a nivel del ADN (Barret et al., 1981) o aumento del número de anomalías estructurales en los cromosomas (Tsutsui et al., 1983; Mailhes et al., 1993). Por otra parte, Ishidate y Odashima (1977) han indicado que el DES no produce ninguna aberración cromosómica en cultivo de células del hámster chino. A su vez, otros autores (Banerjee et al., 1991) han indicado que el DES induce roturas y gaps de cromátides, roturas cromosómicas y endorreduplicación en células renales corticales del HDS. También se ha indicado que el DES interfiere en el aparato mitótico a nivel de la profase temprana, resultando como consecuencia de ello la formación de micronúcleos que conllevarían a la pérdida de cromátides y cromosomas



(Schiffmann y De Boni, 1991). Por último, Ozawa et al. (1989) han sugerido que la ganancia del cromosoma 11 y/o 19 es importante en la inducción neoplásica producida por el DES o que una vez transformadas las células, éstas necesitan de otros cambios numéricos y estructurales sugiriendo con ello que el proceso carcinogénico es un proceso que se realiza en varias fases o etapas.

Por otra parte en el estudio a nivel cromosómico realizado por Tsutsui et al. (1983) en células de embrión de HDS transformadas en cultivo por la acción del DES, se vio que al administrar la mínima dosis de DES capaz de producir la transformación neoplásica de las células, la mayoría de metafases eran normales existiendo un pequeño porcentaje de células aneuploides y pseudotetraploides; sin embargo cuando aumentaban la dosis de DES o el tiempo de exposición encontraron un aumento de células aneuploides llegando a un 15-19%. Basándose en estos resultados concluyeron que el DES induce no disyunciones cromosómicas y aneuploidia. Estos hallazgos a nivel cromosómico están en consonancia con los descritos por otros autores (Tucker y Barret, 1986; Sharp y Parry, 1985; Epe et al., 1987; Epe y Metzler, 1987; Epe et al., 1989; Albertini et al., 1993) estudiando el comportamiento de la proteína tubulina de los microtúbulos: el DES se une a la tubulina de los microtúbulos e inhibe su polimerización mientras que a dosis bajas se inhibe la despolimerización produciéndose con ello anomalías en las fibras del huso mitótico que conducen a no disyunción, aneuploidia y poliploidización cromosómica.

El estudio citogenético realizado por nosotros en tumores renales inducidos por el DES en el HDS coincide con el realizado por Tsutsui et al. (1983) al haber obtenido mayoritariamente células diploides así como un porcentaje similar de células aneuploides. Al igual que ellos, en las aneuploidias obtenidas en este trabajo también se observaron pérdidas y ganancias de

cromosomas producidas al azar, si bien en nuestro caso estas anomalías afectaban de forma mayoritaria a más de uno o dos cromosomas, signo este a nuestro parecer, de una mayor inestabilidad genética. Por otra parte el hecho de haber realizado las técnicas de bandas GTG nos ha permitido observar que también en las células diploides se producía el mismo fenómeno de pérdidas y ganancias de varios cromosomas al azar, aspecto este que no ha sido analizado previamente al no haberse realizado técnicas de bandeado cromosómico. También nuestro estudio muestra la presencia de un único cariotipo clonal correspondiente al normal del HDS.

Estos resultados apoyarían la hipótesis propuesta por Tsutsui et al. (1983) destacando la importancia de la aparición de aneuploidías como mecanismo genético de transformación neoplásica causada por el DES. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Banerjee et al. (1991) en no encontrar gaps ni roturas a nivel de cromátides y cromosomas; a su vez tampoco hemos observado micronúcleos como consecuencia de la acción del DES a diferencia de lo propuesto por Schiffmann y De Boni (1991) y así mismo tampoco hemos localizado ganancias en el cromosoma 11 y/o 19 ni otras anomalías como sugieren Ozawa et al. (1989). Sin embargo este estudio ha sido realizado con células ya transformadas, neoplásicas, y por ello sujetas a la inestabilidad genética inherente a toda célula tumoral como ha insistido Nowell (1976) como el mecanismo genético fundamental en la progresión tumoral.

No existen referencias en la bibliografía de tumores renales inducidos en el HDS mediante la acción combinada del dietilestilbestrol y la etilnitrosourea. Se conoce que el ENU produce alteraciones estructurales en los cromosomas así como mecanismos de no disyunción que conducen a trisomías y polisomías en el cromosoma 4 y/o reestructuraciones que afectan a este

cromosoma, en líneas en cultivo obtenidas a partir de tumores neurogénicos inducidos en la rata por esta droga (Au et al., 1977).

En el estudio citogenético realizado por nosotros en la serie mixta ENU+DES también hemos obtenido un cariotipo clonal correspondiente al cariotipo normal del HDS, células diploides en las que también se observaron pérdidas y ganancias cromosómicas producidas al azar como consecuencia de mecanismos de no disyunción, aneuploidías y poliploidías.

Por último cabe destacar la presencia de anomalías estructurales esporádicas (mar) que confirman otros autores (Au et al., 1977; Soukup y Au, 1975), que el ENU produce alteraciones estructurales en los cromosomas, si bien en nuestro caso éstas no fueron de origen clonal.

#### **4. HISTOGÉNESIS DEL TUMOR RENAL DEL HDS INDUCIDO POR DES.**

Hoy día existen dos posibles hipótesis sobre el origen celular del cáncer: desde la dediferenciación de células maduras que han retenido la capacidad para dividirse, o desde la maduración detenida en distintos estadios de evolución de células "stem" inmaduras (Sell y Pierce, 1994).

Uno de los motivos por los que se decidió combinar el dietilestilbestrol con la etilnitrosourea fue para contribuir a dilucidar este problema, buscando la acción sinérgica de dos carcinógenos con distinto mecanismo de acción sobre un órgano diana, en este caso el riñón del hámster dorado sirio.

La etilnitrosourea (ENU), un agente carcinógeno iniciador, está considerada una sustancia "genotóxica" capaz de inducir una mutación crítica en la célula iniciada por unión al DNA de metabolitos carcinogénicos electrofílicos (Miller, 1978). El dietilestilbestrol (DES), un agente carcinógeno

promotor, estimularía la proliferación de las células iniciadas. Ambos agentes han mostrado actuar de forma independiente y a través de mecanismos de acción probablemente distintos sobre el riñón del hámster, la etilnitrosourea de forma secundaria (acción mucho más intensa y específica sobre derivados de la cresta neural) y el dietilestilbestrol de forma predominante y casi exclusiva.

Los hallazgos obtenidos con los estudios de microscopia óptica han permitido identificar una serie de lesiones precursoras, denominadas displasia tubular e hiperplasia de células intersticiales. La displasia tubular ha sido una lesión poco frecuente en los animales intoxicados con DES, no pudiéndose constatar su evolución hacia una lesión neoplásica franca. En los hámsters tratados con ENU y DES se observaron adenomas y adenocarcinomas renales, pero en una frecuencia muy inferior a los tumores tipo nefroblastoma. Mucho más frecuente ha sido la hiperplasia de células intersticiales (en hámsters tratados con DES y ENU+DES), lesión preneoplásica que sí ha permitido estudiar perfectamente su evolución hasta la presencia de una neoplasia clara, en la que se ha encontrado diferenciación epitelial con formación de estructuras tubulares, no apreciándose sin embargo en ningún momento la transición entre túbulos displásicos a túbulos carcinomatosos. Junto con esta diferenciación epitelial (hipernefroide y adenoide básicamente), también se ha podido distinguir patrones neuroendocrinoide, neuroectodérmico, sarcomatoide y blastemal. En los hámsters tratados con ENU solamente, ha llamado la atención la frecuente presencia de túbulos inmaduros a nivel cortical, considerándose como zonas nefrogénicas persistentes (o displasias tubulares) que en ningún caso dio origen a tumores renales por muy larga que fuese la supervivencia del animal. Por estos hallazgos, y coincidiendo con Cortés-Vizcaíno (1990), a nivel de microscopia óptica los tumores renales

inducidos por DES o DES+ENU se iniciarían a partir de las células intersticiales indiferenciadas (blastemales) y no en el epitelio tubular.

Los resultados inmunohistoquímicos han permitido confirmar los hallazgos obtenidos con la microscopia óptica, encontrándose inmunotinción de las células tumorales frente a marcadores de diferenciación epitelial, mesenquimal y neural, mantenida también en los cultivos celulares. Las lesiones intersticiales precoces mostraron desde su inicio positividad frente a vimentina y proteína S-100, positividad que no se encontró en los casos donde se apreció displasia tubular. Hallazgos que orientan también hacia un probable origen de los tumores a partir de células indiferenciadas intersticiales, interpretación que no siempre es segura basándose en datos inmunohistoquímicos, ya que es posible que determinados cambios en la expresión génica no reflejen la línea celular diferenciada.

La microscopia electrónica permitió afianzar y ampliar los hallazgos obtenidos por las anteriores técnicas. Así se pudo estudiar en profundidad la ausencia de relación de las lesiones precursoras, tumorlets y neoplasias completamente desarrolladas con el epitelio tubular, observándose en todo momento su origen y desarrollo desde elementos celulares intersticiales que ya en estadios muy precoces podían manifestar algún tipo de diferenciación. Se confirmó la presencia de gránulos neurosecretorios y la diferenciación celular de tipo schwanniano en grupos de células intersticiales, diferenciación probablemente ocasionada por la etilnitrosourea, carcinógeno de conocida acción sobre elementos derivados de la cresta neural.

## **VII- CONCLUSIONES**

1ª. La asociación de etilnitrosourea (ENU) por vía transplacentaria junto con dietilestilbestrol (DES) por vía subcutánea **produce neoplasias renales y del sistema nervioso periférico** en el hámster dorado sirio (HDS). La incidencia y la multiplicidad tumoral está directamente relacionada con el **tipo de tratamiento aplicado** en cada uno de los grupos experimentales.

2ª. La gonadectomía ejerció un **efecto supresor** de la incidencia tumoral en las hembras tratadas con ENU, disminuyendo tanto el número total de hámsters afectados como el número de tumores por grupo. En los machos intoxicados con ENU **aumentó** el número total de animales afectados así como el número de tumores por grupo. Al parecer los andrógenos endógenos ejercen un efecto protector ante la carcinogénesis inducida por ENU.

3ª. La **incidencia de tumores renales** dependió del tipo de intoxicación empleada. Fue máxima en las hembras gonadectomizadas, tratadas con DES y ENU (91%), seguida por los machos castrados y tratados también con ambos tóxicos (53.33%) y machos castrados y tratados sólo con DES (19.44%). No presentaron tumores renales las hembras gonadectomizadas y tratadas con DES así como tampoco los machos o hembras, gonadectomizados o no, intoxicadas únicamente por ENU.

4ª. Existe un **efecto sincancerogénico** de ambos productos, referido a la tumorigénesis renal, ya que el DES implementa la acción iniciadora del ENU, aumentando la susceptibilidad de las células diana renales frente esta hormona sintética.

**5ª. Existe un efecto anticancerogénico del DES** inhibiendo la acción del ENU en la inducción de tumores de sistema nervioso periférico en el HDS, en ambos sexos. La intoxicación asociada DES+ENU disminuye la multiplicidad y el número de HDS portadores de tumores del sistema nervioso periférico.

**6ª. La asociación DES+ENU influyó en el espectro histológico de los tumores renales**, apareciendo en los hámsters tratados con los dos carcinógenos, además de nefroblastomas, otros tumores epiteliales como adenocarcinomas, adenomas y carcinomas uroteliales. En los nefroblastomas fueron más frecuentes los patrones histológicos de mayor agresividad: tipo sarcomatoide y neuroendocrinoide, tanto en los machos como en las hembras tratados con ambos carcinógenos; estos patrones histológicos no se detectaron en los HDS machos tratados únicamente con DES. Otros componentes histológicos hallados en los nefroblastomas fueron el blastemal, hipernefroide, adenoide y neuroectodérmico.

**7ª. La hiperplasia multifocal de células intersticiales** en el riñón fue la lesión preneoplásica más frecuente, pudiéndose estudiar su progresiva evolución hasta formar nefroblastomas. Esta hiperplasia de células intersticiales no mostró relación con el tipo de tratamiento o el sexo del animal, apareciendo como lesión precursora de aquellos riñones que desarrollaron nefroblastomas. Estos hallazgos confirman que las células intersticiales son el elemento diana de los tumores renales inducidos por DES y ENU en el HDS.

**8ª. La displasia tubular** fue infrecuente y no se relacionó con la aparición de nefroblastomas.



9<sup>a</sup>. Inmunohistoquímicamente se encontró en las células neoplásicas renales marcadores tumorales de diferenciación **epitelial, mesenquimal y neural**. El anticuerpo policlonal DT-diaforasa, enzima antioxidante implicada en el metabolismo del dietilestilbestrol, mostró negatividad en las células tumorales o bien una positividad débil en la áreas tumorales más diferenciadas. Estos hallazgos confirman la hipótesis de que el proceso tumorigénico renal inducido por ENU y DES se inicia sobre células pluripotentes capaces de expresar diferenciación a través de múltiples líneas de patrón morfológico distinto.

10<sup>a</sup>. Con microscopia electrónica se confirmaron los hallazgos de microscopia óptica y de inmunohistoquímica tanto en los tumores renales como en los de sistema nervioso periférico. En los primeros se diferenciaron áreas blastemales, mesenquimales y epiteliales en continuidad y con transición progresiva entre ellas, estando localizadas **a nivel del espacio intersticial**. También se evidenció la presencia de células con diferenciación neural por la presencia de gránulos neurosecretores y prolongaciones citoplásmicas, adoptando un fenotipo schwanniano.

11<sup>a</sup>. Los cultivos in vitro de los tumores renales presentaron una morfología mixta epitelial junto con componentes fusocelulares y neurales. Inmunohistoquímicamente también se demostró en estos cultivos la presencia de marcadores epiteliales, mesenquimales y neurales.

12<sup>a</sup>. Los estudios citogenéticos en los tumores renales evidenciaron un cariotipo clonal correspondiente al cariotipo normal del hámster. También se hallaron pérdidas y ganancias cromosómicas producidas al azar, como consecuencia de mecanismos de no disyunción, aneuploidías y poliploidías, en las mismas células diploides.

**13<sup>a</sup>.** Los hallazgos morfológicos relativos tanto a los tumores renales (nefroblastomas) como del sistema nervioso periférico y otros derivados de las crestas neurales (glándulas suprarrenales) así como tumores névicos, confirman la hipótesis de que la asociación DES+ENU induce en el HDS **hiperplasias y tumores derivados de las crestas neurales.**

**14<sup>a</sup>.** El presente modelo experimental semeja al tipo de patología humana conocido como Neurofibromatosis tipo I, siendo un buen modelo para estudiar la histogénesis y biología de esta enfermedad.

- Adams, S. P., & Notides, A. C. (1987).** Reduction of irreversible binding of diethylstilbestrol in hamster renal cortex by inhibitors of cytochrome P-450. Toxicol Appl Pharmacol, 88(1), 113-122.
- Adams, S. P., & Notides, A. C. (1987a).** Glutathione protection against irreversible binding of diethylstilbestrol in the hamster renal cortex. Fundam Appl Toxicol, 9(4), 715-721.
- Anderson-III, N. S., David, Y., & Fanestil, D. D. (1979).** Estrogen receptor in hamster kidney during estrogen-induced renal tumorigenesis. Steroid Biochem, 10, 123-128.
- Antonio, P., Gabaldon, M., Lacomba, T., & Juan, A. (1974).** Effect of antiestrogen nafoxidine on the occurrence of estrogen-dependent renal tumors in hamster. Horm Metab Res, 6, 522-524.
- Aoyama, H., Naito, M., Fujimoto, N., Oda, M., Naito, Y., Mori, M., & Ito, A. (1989).** Effects of sex difference, gonadectomy and estradiol on N-ethyl-N-nitrosourea-induced trigeminal nerve tumors in rats. Carcinogenesis, 10(8), 1505-1509.
- Appel, K. E., Fürstenberger, G., Hapke, H. J., Hecker, E., Hildebrandt, A. G., Koransky, W., Marks, F., Neumann, H. G., Ohnesorge, F. K., & Schulte-Hermann, R. (1990).** Chemical cancerogenesis: definitions of frequently used terms. J Cancer Res Clin Oncol, 116, 232-236.
- Ariza, A., Bilbao, J. M., & Rosai, J. (1988).** Immunohistochemical detection of epithelial membrane antigen in normal perineurial cells and perineurioma. Am J Surg Pathol, 12(9), 678-683.
- Baggetto, L. G. (1993).** Role of mitochondria in carcinogenesis. Eur J Cancer, 29A(1), 156-159.
- Banerjee, S., Banerjee, S. K., Li, S. A., & Li, J. J. (1992).** Cell proliferation studies during estrogen-induced renal tumorigenesis in Syrian hamsters. Proc Am Assoc Cancer Res, 33, 115.

- Banerjee, S. K., Banerjee, S., Li, S. A., & Li, J. J. (1992a).** Cytogenetic aberrations during estrogen-induced renal tumorigenesis in the Syrian hamster. Proc Am Assoc Cancer Res, 33, 129.
- Barbacid, M. (1990).** ras oncogenes: their role in neoplasia. Eur J Clin Invest, 20, 225-235.
- Bargmann, C. I., Hung, M.-C., & Weinberg, R. A. (1986).** The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature, 319, 226-230.
- Beleh, M. A., Brueggemeier, R. W., Chang, G. C. J., & Lin, Y. C. (1993).** Biosynthesis and secretion of growth factor proteins by kidney cells from DES-treated Syrian hamsters. Biochem Biophys Res Commun, 190(3), 1029-1036.
- Bennington, J. L., & Beckwith, J. B. (1983).** Tumors of the kidney, renal pelvis, and ureter. (2 ed.). Washington: Armed Forces Institute of Pathology.
- Beyer, B. K., & Juchau, M. R. (1987).** Conversion of estradiol-17 beta to reactive embryotoxic intermediates by cytochrome P-450-dependent bioactivating systems. Biochem Biophys Res Commun, 145(1), 402-407.
- Bhat, H. K., Hacker, H.-J., Bannasch, P., Thompson, E. A., & Liehr, J. G. (1993).** Localization of estrogen receptors in interstitial cells of hamster kidney and in estradiol-induced renal tumors as evidence of the mesenchymal origin of this neoplasm. Cancer Res, 53, 5447-5451.
- Birnboim, H. C. (1985).** DNA clastogenic activity of diethylstilbestrol. Biochem Pharmac, 34(18), 3251-3257.
- Bloom, H. J. G., Dukes, C. E., & Mitchley, B. C. V. (1963a).** Hormone-dependent tumours of the kidney. I. The oestrogen-induced renal tumour of the Syrian hamster. Hormone treatment and possible relationship to carcinoma of the kidney in man. Br J Cancer, 17(4), 611-645.

- Bloom, H. J. G., Baker, W. H., Dukes, C. E., & Mitchley, B. C. V. (1963b).** Hormone-dependent tumours of kidney. II. Effect of endocrine ablation procedures on the transplanted oestrogen-induced renal tumour of the Syrian hamster. Br J Cancer, 17, 646-656.
- Bolande, R. P. (1977).** Teratogenesis and oncogenesis. In J. G. Wilson & F. C. Fraser (Ed.), Handbook of Teratology (Vol. 2, pp. 293-325). New York: Plenum Press.
- Branstetter, D. G., Stoner, G. D., Schut, H. A., Senitzer, D., Conran, P. B., & Goldblatt, P. J. (1987).** Ethylnitrosourea-induced transplacental carcinogenesis in the mouse: tumor response, DNA binding, and adduct formation. Cancer Res, 47(2), 348-352.
- Branstetter, D., & Mosely, P. (1990).** Variation in size and incidence of perinatally induced mouse lung tumors after treatment with ethylnitrosourea (ENU) in C3HeB/FeJ mice. Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res, 31, 160 (A951).
- Breuer, M., Wientjens, E., Verbeek, S., Slebos, R., & Berns, A. (1991).** Carcinogen-induced lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: dose dependence and involvement of myc and ras. Cancer Res, 51(3), 958-963.
- Bronstein, S. M., Cochrane, J. E., Craft, T. R., Svenberg, J. A., & Skopek, T. R. (1991).** Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. Cancer Res, 51, 5188-5197.
- Bronstein, S. M., Hooth, M. J., Svenberg, J. A., & Skopek, T. R. (1992a).** Modulation of ethylnitrosourea-induced toxicity and mutagenicity in human cells by O6-benzylguanine. Cancer Res, 52, 3851-3856.
- Bronstein, S. M., Skopek, T. R., & Svenberg, J. A. (1992b).** Efficient repair of O6-ethylguanine, but not O4-ethylthymine or O2-ethylthymine, is dependent upon O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. Cancer Res, 52(7), 2008-2011.

- Brugger, A. J. (1978).** Estrógenos y antiestrógenos. In J. Esplugues (Ed.), Hormonas (Vol. 3, pp. 89-102). Valencia: Fundación García Muñoz.
- Cardesa, A., Rustia, M., & Mohr, U. (1982).** Tumours of the nervous system. In V. S. Turusov (Ed.), Pathology of tumours in laboratory animals. (Vol. 3, pp. 413-436). Lyon: IARC Scientific Publications No.34.
- Cardesa, A., Llanes, F., Merchán, J., Alvarez, T., Ludeña, M. D., & Mohr, U. (1983).** Plexiform structures in malignant schwannomas after prenatal exposure to ethylnitrosourea. Exp Pathol, 24, 103-115.
- Cardesa, A., Ribalta, T., Schilling, B. v., Palacín, A., & Mohr, U. (1989).** Experimental model of tumors associated with neurofibromatosis. Cancer, 63(9), 1737-1749.
- Cardesa-García, A., & Mundo, E. C. (1990).** Principales teorías sobre el origen del cáncer: Factores causales, mecanismos patogénicos y predisponentes. In J. Fariña (Ed.), Anatomía Patológica pp. 325-335). Barcelona: Salvat Editores S.A.
- Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T., & O'Malley, B. W. (1990).** Steroid receptor family: structure and functions. Endocr Rev, 11(2), 201-220.
- Cavazzana, A. O., Miser, J. S., Jefferson, J., & Triche, T. J. (1987).** Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. Am J Pathol, 127(3), 507-518.
- Caviezel, M., Lutz, W. K., Minini, U., & Schlatter, C. (1984).** Interaction of estrone and estradiol with DNA and protein of liver and kidney in rat and hamster in vivo and in vitro. Arch Toxicol, 55, 97-103.
- Chang, C. J., Lin, Y. C., Brueggemeier, R. W., & Rikihisa, Y. (1992).** Morphometric analysis of renal cortex changes induced by diethylstilbestrol (DES) in Syrian hamsters. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 78(3), 341-358.

- Cook, J. W., & Dodds, E. C. (1933).** Sex hormones and cancer-producing compounds. Nature, 131, 205-206.
- Cook, B., & Beastall, G. H. (1987).** Measurement of steroid hormone concentrations in blood, urine and tissues. In B. Green & R. E. Leake (Ed.), Steroid hormones. A practical approach. (Vol. 1, pp. 1-65). Washintong DC: IRL Press.
- Cortés-Vizcaino, V. (1990)** Caracterización biológica de los tumores renales inducidos por el dietilestilbestrol en el hámster dorado sirio. Tesis doctoral, Valencia.
- Cortés-Vizcaino, V., & Llombart-Bosch, A. (1993).** Estrogen and progesterone receptors in the diethylstilbestrol-induced kidney neoplasms of the Syrian golden hamster: correlation with histopathology and tumoral stages. Carcinogenesis, 14(6), 1215-1219.
- Cutler, B. S., Forbes, A. P., Ingersoll, F. M., & Scully, R. E. (1972).** Endometrial carcinoma after stilbestrol therapy in gonadal dysgenesis. N Engl J Med, 287, 628-631.
- Degen, G. H., & McLachlan, J. A. (1983).** Non-estrogenic metabolites of diethylstilbestrol produced by prostaglandin synthase mediated metabolism. Steroids, 42(1), 253-265.
- Degen, G. H., Metzler, M., & Sivarajah, K. S. (1986).** Co-oxidation of diethylstilbestrol and structural analogs by prostaglandin synthase. Carcinogenesis, 7(1), 137-142.
- Degen, G. H. (1988).** Inhibition of prostaglandin H synthase-catalyzed cooxidation of diethylstilbestrol by alpha-naphthoflavone and beta-naphthoflavone. J Biochem Toxicol, 3(1), 1-10.
- Degen, G. H., Blaich, G., & Metzler, M. (1989).** Multiple pathways for the oxidative metabolism of estrogens in Syrian hamster kidney. J Cancer Res Clin Oncol, 115 Supp, S8.
- Degen, G. H., Blaich, G., & Metzler, M. (1990).** Multiple pathways for the oxidative metabolism of estrogens in Syrian hamster and rabbit kidney. J Biochem Toxicol, 5(2), 91-97.

- Degen, G. H. (1993).** SEMV cell cultures: a model for studies of prostaglandin-H-synthase-mediated metabolism and genotoxicity of xenobiotics. Toxicol Lett, 67(1-3), 187-200.
- DiPaolo, J. A., Nelson, R. L., Donovan, P. J., & Evans, C. H. (1973).** Host-mediated in vivo-in vitro assay for chemical carcinogenesis. Arch Pathol, 95, 380-385.
- Dodge, A. H. (1974).** Fine structural, HaLVgs antigen, and reverse transcriptase study of the Syrian hamster stilbestrol-induced renal carcinoma. Lab Invest, 31(3), 250-257.
- Dodge, A. H. (1977).** Fine structural, G-6-PD isoenzyme, and HaLV gs antigen studies of Poly I/C and antiestrogen treated DES-induced hamster renal tumors. Europ J Cancer, 13, 1377-1387.
- Dodge, A. H., & Kirkman, H. (1981).** A secretory stilbestrol-induced renal tumor of the Syrian hamster. Proc Am Ass Cancer Res, 22, 134.
- Dodge, A. H., Brownfield, M., Reid, I. A., & Inagami, T. (1988).** Immunohistochemical renin study of DES-induced renal tumor in the Syrian hamster. Am J Anat, 182(4), 347-352.
- Dontenwill, W., & Eder, M. (1959).** Histogenese und biologische Verhaltensesweise hormonell ausgelöster Geschwülste. Beitr Path Anat, 120, 270-301.
- Druckrey, H., Ivankovic, S., & R.Preussmann (1966).** Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. Nature, 210, 1378-1379.
- Druckrey, H., Schagen, B., & Ivankovic, S. (1970a).** Erzeugung neurogener Malignome durch einmalige Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff (ÄNH) an neugeborene und junge BD IX-Ratten. Z Krebsforsch, 74, 141-161.
- Druckrey, H., Landschütz, C., & Ivankovic, S. (1970b).** Transplacentare erzeugung maligner tumoren des nervensystems. II. Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. Z Krebsforsch, 73, 371-386.



- Durante, M., Geri, C., Bonatti, S., & Parenti, R. (1989).** Non-random alkylation of DNA sequences induced in vivo by chemical mutagens. Carcinogenesis, 10(8), 1357-1361.
- Ebert, R., Barrett, J. C., & Wiseman, R. (1989).** Molecular cloning of the Syrian hamster its characterization in neoplastically transformed cells by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. J Cancer Res Clin Onc, 115 (Suppl), S9.
- Eckert, K. A., Ingle, C. A., Klinedinst, D. K., & Drinkwater, N. R. (1988).** Molecular analysis of mutations induced in human cells by N-ethyl-N-nitrosourea. Mol Carcinog, 1(1), 50-56.
- Epe, B., & Metzler, M. (1985).** Nature of the macromolecular binding of diethylstilbestrol to DNA and protein following oxidation by peroxidase/hydrogen peroxide. Chem Biol Interact, 56(2/3), 351-362.
- Epe, B., Schiffmann, D., & Metzler, M. (1986).** Possible role of oxygen radicals in cell transformation by diethylstilbestrol and related compounds. Carcinogenesis, 7(8), 1329-1334.
- Epe, B., Hegler, J., & Metzler, M. (1987).** Site-specific covalent binding of stilbene-type and steroidal estrogens to tubulin following metabolic activation in vitro. Carcinogenesis, 8(9), 1271-1275.
- Epe, B., & Metzler, M. (1987).** Possible role of covalent protein binding in cell transformation by diethylstilbestrol. J Cancer Res Clin Oncol, 113 (Suppl), S15.
- Epe, B., Harttig, U. H., & Metzler, M. (1989).** Tubulin is a possible cellular target for quinoid metabolites of carcinogenic estrogens. J Cancer Res Clin Oncol, 115 (Suppl), S8.
- Ernster, L., Danielson, L., & Ljunggren, M. (1962).** DT-diaphorase. I. Purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm. Biochim Biophys, Acta 58, 171-188.
- Fernández-Sarabia, M. J., & Bischoff, J. R. (1993).** Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. Nature, 366(6452), 274-275.

- Freyberger, A., & Degen, G. H. (1987).** Prostaglandin-H-synthase catalyzed formation of reactive intermediates from estrogens and arachidonic acid and their covalent binding to proteins. J Cancer Res Clin Oncol, 113 (Suppl), S13.
- Gladek, A., & Liehr, J. G. (1989).** Mechanism of genotoxicity of diethylstilbestrol in vivo. J Biol Chem, 4(28), 16847-16852.
- Gladek, A., & Liehr, J. G. (1991).** Transplacental genotoxicity of diethylstilbestrol. Carcinogenesis, 12(5), 773-776.
- Goldfarb, S., & Pugh, T. D. (1990).** Morphology and anatomic localization of renal microneoplasms and proximal tubule dysplasias induced by four different estrogens in the hamster. Cancer Res, 50, 113-119.
- Gonzalez, A., Oberley, T. D., & Li, J. J. (1989).** Morphological and immunohistochemical studies of the estrogen-induced Syrian hamster renal tumor: probable cell of origin. Cancer Res, 49, 1020-1028.
- Gonzalez, A., Oberley, T. D., & Li, J. J. (1990).** Long term cultures of DES-induced Syrian hamster tumor cells retain their malignant potential in-vivo and in-vitro. Proc Am Assoc Cancer Res, 31, 109.
- Gonzalez, A., Oberley, T. D., Schultz, J. L., Ostrom, J., & Li, J. J. (1993).** In vitro characterization of estrogen induced Syrian hamster renal tumors: comparison with an immortalized cell line derived from diethylstilbestrol-treated adult hamster kidney. In Vitro Cell Dev Biol, 29A, 562-573.
- Haaf, H., Li, S. A., & Li, J. J. (1987).** Covalent binding of estrogen metabolites to hamster liver microsomal proteins: inhibition by ascorbic acid and catechol-O-methyl transferase. Carcinogenesis, 8(2), 209-215.
- Hacker, H. J., Bannasch, P., & Liehr, J. G. (1988).** Histochemical analysis of the development of estradiol-induced kidney tumors in male Syrian hamsters. Cancer Res, 48, 971-976.
- Hacker, H. J., Vollmer, G., Chiquet-Ehrismann, R., Bannasch, P., & Liehr, J. G. (1991).** Changes in the cellular phenotype and

- extracellular matrix during progression of estrogen-induced mesenchymal kidney tumors in Syrian hamsters. Virchows Archiv B Cell Pathol, 60, 213-223.
- Haddow, A. (1959).** The chemical and genetic mechanisms of carcinogenesis. I. Nature and mode of action. In M. D. F. Homburger (Ed.), The Physiopathology of Cancer. pp. 565-601). New York: Hoeber-Harper.
- Hamilton, J. M. (1975).** Renal carcinogenesis. Adv Cancer Res, 22, 1-56.
- Hamilton, J. M., Flaks, A., Saluja, P. G., & Maguire, S. (1975).** Hormonally induced renal neoplasia in the Syrian hamster and the inhibitory effect of 2-bromo-alpha-ergocryptine methanesulfonate. J Natl Cancer Inst, 54(6), 1385-1400.
- Hamilton, J. M., Saluja, P. G., Thody, A. J., & Flaks, A. (1977).** The pars intermedia and renal carcinogenesis in hamsters. Europ J Cancer, 13, 29-32.
- Han, X., & Liehr, J. G. (1994).** DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. Carcinogenesis, 15(5), 997-1000.
- Hanash, S. M., Boehnke, M., Chu, E. H., Neel, J. V., & Kuick, R. D. (1988).** Nonrandom distribution of structural mutants in ethylnitrosourea-treated cultured human lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci USA, 85(1), 165-169.
- Harris, C. C. (1991).** Chemical and Physical Carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res, 51 (Suppl), 5023s-5044s.
- Herbst, A. L., & Scully, R. E. (1970).** Adenocarcinoma of the vagina in adolescence. A report of 7 cases including 6 clear-cell carcinomas (so-called mesonephromas). Cancer, 25, 745-757.
- Heyting, C., & Veer, L. v. (1981).** Repair of ethylnitrosourea-induced DNA damage in the newborn rat. II. Localization of unscheduled DNA synthesis in the developing rat brain. Carcinogenesis, 2(11), 1173-1180.

- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature, 348, 334-336.
- Horak, E. R., & McGee, J. O. (1992). Prognosis and tumour markers. In J. O. McGee, P. G. Isaacson, & N. A. Wright (Ed.), Oxford Textbook of Pathology. (Vol. 2a, pp. 1663-1670). Oxford: Oxford University Press.
- Horning, E. S., & Whittick, J. W. (1954). The histogenesis of stilboestrol-induced renal tumours in the male golden hamster. Brit J Cancer, 8(3), 451-457.
- Horning, E. S. (1954). The influence of unilateral nephrectomy on the development of stilboestrol-induced renal tumours in the male hamster. Brit J Cancer, 8(4), 627-634.
- Horning, E. S. (1956). Observations on hormone-dependent renal tumours in the golden hamster. Brit J Cancer, 10(4), 678-687.
- Hsu, S., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. J Histochem Cytochem, 29, 577-580.
- Ising, U. (1956). The effect of unilateral ureterectomy on the development of estrogen-induced renal tumors in male hamsters. Acta Physiol Microbiol Scandinav, 39, 168-180.
- Ivankovic, S., & Druckrey, H. (1968). Transplacentare erzeugung maligner tumoren des nervensystems. I. Athyl-nitroso-harnstoff (ANH) an BD IX-ratten. Z Krebsforsch, 71, 320-360.
- Jansen, J. G., Mohn, G. R., Vrieling, H., Teijlingen, C. M. M. V., Lohman, P. H. M., & Zeeland, A. A. V. (1994). Molecular analysis of hprt gene mutations in skin fibroblasts of rats exposed in vivo to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. Cancer Research, 54, 2478-2485.

- Jenkins, M. C. F., Allibone, E. B., & Berry, P. J. (1991).** Neuroglial tissue in partially cystic Wilms' tumour. Histopathology, 18, 309-313.
- Jones, E. L., Searle, C. E., & Smith, W. T. (1973).** Tumours of the nervous system induced in rats by neonatal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. J Pathol, 109, 123-139.
- Khandekar, J. D., Victor, T. A., & Mukhopadhyana, P. (1978).** Endometrial carcinoma following estrogen therapy for breast cancer. Report of three cases. J Am Med Assoc, 138, 539-541.
- Kirkland, W. L., Sorrentino, J. M., & Sirbasku, D. A. (1974).** Serum factor requirement for growth of a cell line derived from an estrogen-dependent kidney tumor. J Cell Biol, 63, 168a.
- Kirkman, H., & Bacon, R. L. (1950).** Malignant renal tumors in male hamsters (*Cricetus auratus*) treated with estrogen. Cancer Res, 10, 122-124.
- Kirkman, H., & Bacon, R. L. (1952a).** Estrogen-induced tumors of the kidney. I. Incidence of renal tumors in intact and gonadectomized male golden hamsters treated with diethylstilbestrol. J Nat Cancer Inst, 13, 745-755.
- Kirkman, H., & Bacon, R. L. (1952b).** Estrogen-induced tumors of the kidney. II. Effect of dose, administration, type of estrogen, and age on the induction of renal tumors in intact male golden hamsters. J Nat Cancer Inst, 13(3), 757-771.
- Kirkman, H. (1957).** Steroid tumorigenesis. Cancer, 10(4), 757-764.
- Kirkman, H., & Horning, E. S. (1957).** Endocrine carcinogenesis. Rept Brit Empire Cancer Campaign, 35, 66-69.
- Kirkman, H. (1959).** Estrogen-induced tumors of the kidney in the Syrian hamster. Nat Cancer Inst Monograph No. 1.
- Kirkman, H. (1959a).** Estrogen-induced tumors of the kidney. III. Growth characteristics in the Syrian hamsters. In U. S. G. P. Office



- (Ed.), Estrogen-induced tumors of the kidney in the Syrian hamster. (Vol. 1, pp. 1-57). Washington: U.S. Department of Health, Education, and Welfare.
- Kirkman, H. (1959b)**. Estrogen-induced tumors of the kidney. IV. Incidence in female Syrian hamsters. Natl Cancer Inst Monogr No. 1, 59-91.
- Kirkman, H., & Robbins, M. (1959c)**. Estrogen-induced tumors of the kidney. V. Histology and histogenesis in the Syrian hamster. Natl Cancer Inst Monogr, 1, 93-139.
- Koestner, A., Svenberg, J. A., & Wechsler, W. (1971)**. Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of nervous system in Sprague-Dawley rats. Am J Pathol, 63(1), 37-56.
- Kurl, R. N., Naylor, P. H., Loring, J. M., Todd, R. B., & Villet, C. A. (1990)**. Acute and chronic effects of diethylstilbestrol on serum levels of alpha melanocyte stimulating hormone and prolactin in the hamster. In-Vivo, 4(2), 89-92.
- Lacassange, A. (1932)**. Appearance of mammary cancer in the male mouse injected with folliculin. Compt rend Acad d sc, 195, 630-632.
- Lacomba, T., & Gabaldón, M. (1971)**. Biochemical studies of diethylstilbestrol-induced kidney tumors in the golden Syrian hamster. Cancer Res, 31, 1251-1256.
- Laerum, O. D., & Rajewsky, M. F. (1975)**. Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo. J Natl Cancer Inst, 55(5), 1177-1187.
- Lantos, P. L., Roscoe, J. P., & Skidmore, C. J. (1976)**. Studies of the morphology and tumorigenicity of experimental brain tumours in tissue culture. Br J Exp Path, 57, 95-104.
- Lee, G. S., Blonsky, K. S., Van-On, D. L., Savage, E. A., Morgan, A. R., & Von-Borstel, R. C. (1992)**. Base alterations in yeast induced by alkylating agents with differing swain-scott substrate constants. J Mol Biol, 223(3), 617-626.

- Letourneau, R. J., Li, J. J., Rosen, S., & Vilee, C. A. (1975). Junctional specialization in estrogen-induced renal adenocarcinomas of the golden hamster. Cancer Res, 35, 6-10.
- Li, J. J., Talley, D. J., Li, S. A., & Vilee, C. A. (1974). An estrogen binding protein in the renal cytosol of intact, castrated and estrogenized golden hamsters. Endocrinology, 95, 1134-1141.
- Li, J. J., & Li, S. A. (1975). Translocation of specific steroid hormone receptors into purified nuclei in vitro in Syrian hamster tissues and estrogen-dependent renal tumor. No. 7th Congress of the International Study Group for Steroid Hormones.
- Li, J. J., Li, S. A., Klein, L. A., & Vilee, C. A. (1975a). Dehydrogenase isozymes in the hamster and human renal adenocarcinoma. In Isozymes, III. Development Biology. pp. 837-853. New York-San Francisco- London: Academic Press, Inc.
- Li, S. A., Li, J. J., & Vilee, C. A. (1976). Significance of the progesterone receptor in the estrogen-induced and dependent renal tumor of the Syrian golden hamster. In Progesterone, . New York Academy of Science:
- Li, S. A., & Li, J. J. (1978). Estrogen-induced progesterone receptor in the Syrian hamster Kidney. I. Modulation by antiestrogens and androgens. Endocrinology, 103(6), 2119-2128.
- Li, J. J., Li, S. A., & Cuthbertson, T. L. (1979). Nuclear retention of all steroid hormone receptor classes in the hamster renal carcinoma. Cancer Res, 39, 2647-2651.
- Li, J. J., Cuthbertson, T. L., & Li, S. A. (1980). Inhibition of estrogen tumorigenesis in the Syrian golden hamster kidney by antiestrogens. J Nat Cancer Inst, 64(4), 795-800.
- Li, J. J., & Li, S. A. (1981). Estrogen-induced progesterone receptor in the Syrian hamster kidney. II. Modulation by synthetic progestins. Endocrinology, 108(5), 1751-1756.

- Li, S., Pathak, S., & Hsu, T. C. (1982). High resolution G-banding patterns of syrian hamster chromosomes. Cytogenet cell genet, 33, 295-302.
- Li, J. J., Li, S. A., Klicka, J. K., Parsons, J. A., & Lam, L. K. T. (1983). Relative carcinogenic activity of various synthetic and natural estrogens in the Syrian hamster kidney. Cancer Res, 43, 5200-5204.
- Li, S. A., Lam, L. K. T., & Li, J. J. (1983a). Effect of steroid hormone treatment on aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the Syrian hamster kidney. Biochem Pharmacol, 32(19), 2847-2850.
- Li, J. J., & Li, S. A. (1984). Estrogen-induced tumorigenesis in hamsters: roles for hormonal and carcinogenic activities. Arch Toxicol, 55, 110-118.
- Li, S. A., Klicka, J. K., & Li, J. J. (1985). Estrogen 2- and 4-hydroxylase activity, catechol estrogen formation, and implications for estrogen carcinogenesis in the hamster kidney. Cancer Res, 45, 181-185.
- Li, J. J., & Li, S. A. (1987). Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism. Federation Proc, 46, 1858-1863.
- Li, S. A., Purdy, R. H., & Li, J. J. (1989). Variations in catechol O-methyltransferase activity in rodent tissues: possible role in estrogen carcinogenicity. Carcinogenesis, 10(1), 63-67.
- Li, S. A., Ping, P., Peterson, D., & Li, J. J. (1990). Promotion of estrogen carcinogenicity in the Syrian hamster kidney by alcohol. Proc Am Assoc Cancer Res, 31, 159.
- Li, Y., & Trush, M. A. (1994). Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. Cancer Res (Suppl.), 54, 1895s-1898s.
- Liehr, J. G., DaGue, B. B., Ballatore, A. M., & Sirbasku, D. A. (1982). Multiple roles of estrogen in estrogen-dependent renal clear-cell carcinoma of Syrian hamster. Cold Spring Harbor Conf Cell Proliferation, 9, 445-458.



- Liehr, J. G. (1983). 2-Fluoroestradiol. Separation of estrogenicity from carcinogenicity. Molecular Pharmacol, 23, 278-281.
- Liehr, J. G., Ballatore, A. M., McLachlan, J. A., & Sirbasku, D. A. (1983). Mechanism of diethylstilbestrol carcinogenicity as studied with the fluorinated analogue E-3',3'',5',5''-tetrafluorodiethylstilbestrol. Cancer Res, 43, 2678-2682.
- Liehr, J. G., & Wheeler, W. J. (1983). Inhibition of estrogen-induced renal carcinoma in Syrian hamsters by vitamin C. Cancer Res, 43, 4638-4642.
- Liehr, J. G. (1984). Modulation of estrogen-induced carcinogenesis by chemical modification]. .
- Liehr, J. G., DaGue, B. B., & Ballatore, A. M. (1985a). Reactivity of 4'4''-diethylstilbestrol quinone, a metabolic intermediate of diethylstilbestrol. Carcinogenesis, 6(6), 829-836.
- Liehr, J. G., Randerath, K., & Randerath, E. (1985b). Target organ-specific covalent DNA damage preceding diethylstilbestrol-induced carcinogenesis. Carcinogenesis, 6(7), 1067-1069.
- Liehr, J. G., Stancel, G. M., Chorich, L. P., Bousfield, G. R., & Ulubelen, A. A. (1986). Hormonal carcinogenesis: separation of estrogenicity from carcinogenicity. Chem Biol Interact, 59(2), 173-184.
- Liehr, J. G., Fang, W. F., Sirbasku, D. A., & Ari-Ulubelen, A. (1986a). Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. J Steroid Biochem, 24(1), 353-356.
- Liehr, J. G., Ulubelen, A. A., & Strobel, H. W. (1986b). Cytochrome P-450-mediated redox cycling of estrogens. J Biol Chem, 261(36), 16865-16870.
- Liehr, J. G. (1986c). Carcinogenicity and catechol formation from synthetic steroid estrogens. P Am Ass Ca, 27(Mar), 226.

- Liehr, J. G., Avitts, T. A., Randerath, E., & Randerath, K. (1986d). Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible mechanism of hormonal cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 83, 5301-5305.
- Liehr, J. G., Purdy, R. H., Baran, J. S., Nutting, E. F., Colton, F., Randerath, E., & Randerath, K. (1987a). Correlation of aromatic hydroxylation of 11 beta-substituted estrogens with morphological transformation in vitro but not with in vivo tumor induction by these hormones. Cancer Res, 47, 2583-2588.
- Liehr, J. G., Hall, E. R., Avitts, T. A., Randerath, E., & Randerath, K. (1987b). Localization of estrogen-induced DNA adducts and cytochrome P-450 activity at the site of renal carcinogenesis in the hamster kidney. Cancer Res, 47, 2156-2159.
- Liehr, J. G., Sirbasku, D. A., Jurka, E., Randerath, K., & Randerath, E. (1988). Inhibition of estrogen-induced renal carcinogenesis in male Syrian hamsters by Tamoxifen without decrease in DNA adduct levels. Cancer Res, 48, 779-783.
- Liehr, J. G., Roy, D., & Gladek, A. (1989). Mechanism of inhibition of estrogen-induced renal carcinogenesis in male Syrian hamsters by vitamin C. Carcinogenesis, 10(11), 1983-1988.
- Liehr, J. G. (1990). Genotoxic effects of estrogens. Mutat Res, 238(3), 269-276.
- Liehr, J. G., Gladek, A., Macatee, T., Randerath, E., & Randerath, K. (1991). DNA adduct formation in liver and kidney of male Syrian hamsters treated with estrogen and/or alpha-naphthoflavone. Carcinogenesis, 12(3), 385-389.
- Liehr, J. G., Chiappetta, C., Roy, D., & Stancel, G. M. (1992). Elevation of protooncogene messenger RNAs in estrogen-induced kidney tumors in the hamster. Carcinogenesis, 13(4), 601-604.
- Lijinsky, W., Knutsen, G. L., & Kovatch, R. M. (1985). Carcinogenic effect of nitrosoalkylureas and nitrosoalkylcarbamates in Syrian hamsters. Cancer Res, 45(2), 542-545.

- Lijinsky, W., & Kovatch, R. M. (1989).** The uniform carcinogenic action of alkylnitrosoureas in Syrian hamsters. Biomed Environ Sci, 2(2), 167-173.
- Lijinsky, W., Pegg, A. E., Anver, M. R., & Moschel, R. C. (1994).** Effects of inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rats on carcinogenesis by methylnitrosourea and ethylnitrosourea. Jpn J Cancer Res, 85, 226-230.
- Likhachev, A. J., Ivanov, M. N., Brésil, H., Planche-Martel, G., Montesano, R., & Margison, G. P. (1983).** Carcinogenicity of single doses of N-nitroso-N-methylurea and N-nitroso-N-ethylurea in Syrian golden hamsters and the persistence of alkylated purines in the DNA of various tissues. Cancer Res, 43, 829-833.
- Lin, Y. C., Talley, D. J., & Villet, C. A. (1980).** Dynamics of progesterone binding in nuclei and cytosol of estrogen-induced adenocarcinoma cells in primary culture. Steroid Biochem, 13(1), 29-37.
- Lin, Y. C., Loring, J. M., & Villet, C. A. (1982).** Permissive role of the pituitary in the induction and growth of estrogen-dependent renal tumors. Cancer Res, 42, 1015-1019.
- Llombart-Bosch, A. (1964).** Estudios experimentales sobre oncogénesis: La acción del tetracloruro de carbono y estradiol en el desarrollo de los tumores renales malignos del hámster dorado. Arch Español Morf Suppl, 65, 15-204.
- Llombart-Bosch, A. (1965).** Sur l'histogénèse et la nature des néoplasies rénales produites par l'oestradiol chez le hamster doré. Bull Assoc Fr Cancer, 52(1), 11-33.
- Llombart-Bosch, A., & Peydró, A. (1970).** Ultra-estructura ciliar en el riñón del hámster dorado intoxicado por dietilestilbestrol. Su relación con los llamados nefroblastomas diferenciados hormono dependientes. Med Esp, 64, 235-241.

- Llombart-Bosch, A. (1973).** Partículas víricas tipo R (RTP virus) en transplantes del tumor hormonoindependiente (RHI/GH) del hámster dorado sirio inducido por DES. Med Esp, 69(409), 236-246.
- Llombart-Bosch, A., & Peydró, A. (1975).** Morphological, histochemical and ultrastructural observations of diethylstilbestrol-induced kidney tumors in the Syrian golden hamster. Europ J Cancer, 11, 403-412.
- Llombart-Bosch, A., & Peydró-Olaya, A. (1986).** Estrogen-induced malignant tumor, kidney, Syrian hamster. In T. C. Jones, U. Mohr, & R. D. Hunt (Ed.), Urinary system pp. 141-152). Berlin: Springer-Verlag.
- Logan, J. L., & Benson, B. (1990).** Light deprivation retards the growth of the diethylstilbestrol-induced renal tumor in hamsters. Growth Dev Aging, 54(1-2), 39-43.
- Lorenzen, J., Pusztai, L., & McGee, J. O. (1992).** Growth factors. In J. O. McGee, P. G. Isaacson, & N. A. Wright (Ed.), Oxford Textbook of Pathology (Vol. 1, pp. 673-678). Oxford: Oxford University Press.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 193(265-275).
- Lu, L. J. W., Liehr, J. G., Sirbasku, D. A., Randerath, E., & Randerath, K. (1988).** Hypomethylation of DNA in estrogen-induced and dependent hamster kidney tumors. Carcinogenesis, 9(6), 925-929.
- Luft, J. (1961).** Improvements in epoxy resin embedding methods. J Biophys Biochem Cytol, 9, 409-414.
- Lundgren, K., Randerath, K., & Everson, R. B. (1988).** Role of metabolism and DNA adduct formation in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by diethylstilbestrol. Cancer Res, 48, 335-338.
- Maher, V. M., Domoradki, J., Bhattacharyya, N. P., Tsujimura, T., Corner, R. C., & McCormick, J. J. (1990).** Alkylation damage,

- DNA repair and mutagenesis in human cells. *Mutat Res*, 233(1-2), 235-245.
- Malling, H. V., & Wassom, J. S. (1977).** Action of mutagenic agents. In J. G. Wilson & F. C. Fraser (Ed.), *Handbook of teratology*. (Vol. 1, pp. 99-152). New York: Plenum Press.
- Mannweiler, K., & Bernhard, W. (1957).** Recherches ultrastructurales sur une tumeur rénale expérimentale du hamster. *J Ultrastruc Res*, 33, 158-169.
- Matthews, V. S., Kirkman, H., & Bacon, R. L. (1947).** Kidney damage in the golden hamster following chronic administration of diethylstilbestrol and sesame oil. *Proc Soc Exp Biol Med*, 66, 195-196.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & Ames, B. N. (1975).** Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsomes test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci*, 72, 5135-5139.
- McCann, J., & Ames, B. N. (1976).** Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsomes test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Natl Acad Sci*, 73, 950-954.
- McCormick, M. L., Oberley, T. D., Elvell, J. H., Oberley, L. W., Sun, Y., & Li, J. L. (1991).** Superoxide dismutase and catalase levels during estrogen-induced renal tumorigenesis, in renal tumors and their autonomous variants in the Syrian hamster. *Carcinogenesis*, 12(6), 977-983.
- McGregor, R. F., Putch, J. D., & Ward, D. N. (1960).** Estrogen-induced kidney tumors in the golden hamster. I. Biochemical composition during tumorigenesis. *J Nat Cancer Inst*, 24, 1057-1066.
- McLachlan, J. A., Metzler, M., & Lamb, J. C. (1978).** Possible role of peroxidase in the diethylstilbestrol-induced lesions of the Syrian hamster kidney. *Life Sci*, 23(25), 2521-2524.
- Mennel, H. D., & Zülch, K. J. (1972).** Zur Morphologie transplacentar erzeugter neurogener Tumoren beim Goldhamster. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 21, 194-203.



- Metzler, M. (1975).** Metabolic activation of diethylstilbestrol: indirect evidence for the formation of a stilbene oxide intermediate in hamster and rat. Biochem Pharmacol, 24, 1449-1453.
- Miller, E. C. (1978).** Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. Cancer Res, 38, 1479-1496.
- Miller, E. C., & Miller, J. A. (1981).** Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. Cancer, 47, 2327-2345.
- Moll, R., Hage, C., & Thoenes, W. (1991).** Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. Lab Invest, 65(1), 74-86.
- Monsalve-Villalba, E. (1990).** La toxicidad del oxígeno: el sistema glutation y otros mecanismos antioxidantes en diferentes tejidos y modelos experimentales. In Experimental. Valencia:
- Muijen, G. N. P. V., Ruiters, D. J., & Warnaar, S. O. (1987).** Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. Lab Invest, 57(4), 359-369.
- Munim, A., Asayama, K., Dobashi, K., Suzuki, K., Kawaoi, A., & Kato, K. (1992).** Immunohistochemical localization of superoxide dismutases in fetal and neonatal rat tissues. J Histochem Cytochem, 40(11), 1705-1713.
- Muntané, J., Ribalta, T., Cruz-sánchez, F. F., Cardesa, A., & Mohr, U. (1991).** Tumores melánicos (TM) y del sistema nervioso periférico (TSNP) inducidos por exposición prenatal a etil-nitrosourea (ENU) en el hamster dorado sirio (HDS). Libro de abstracts del XY Congreso Nacional Sociedad Española de Anatomía Patológica, 103.
- Muntané, J., Cardesa, A., Ribalta, T., Cruz-Sánchez, F., Cervós-Navarro, J., & Mohr, U. (1992).** Transplacental induction of peripheral nerve system tumors (PNST) and melanotic tumors (MT) in

- Syrian golden hamsters (SGH) with ethyl-nitrosourea (ENU). Patologia (Suppl), 25(3), 216.
- Müller, R., & Rajewsky, M. F. (1983).** Elimination of O<sup>6</sup>-ethylguanine from the DNA of brain, liver and other rat tissues exposed to ethylnitrosourea at different stages of prenatal development. Cancer Res, 43, 2897-2904.
- Nagashima, Y., Ohaki, Y., Umeda, M., Oshimura, M., & Misugi, K. (1989).** Establishment and characterization of an immature epithelial cell line (ENU-T-1) derived from a rat neuroblastoma. Virchows Archiv B Cell Pathol, 57, 383-392.
- Nakamura, T., Hara, M., & Kasuga, T. (1989).** Transplacental induction of peripheral nervous tumor in the Syrian golden hamster by N-Nitroso-N-ethylurea. Am J Pathol, 135(2), 251-259.
- Nakamura, T., Hara, M., & Kasuga, T. (1991).** Early lesion of N-Nitroso-N-ethylurea-induced Hamster Neurofibromatosis model. Cancer Res, 51, 434-438.
- Nakamura, T., Ushijima, T., Ishizaka, Y., Nagao, M., Nemoto, T., Hara, M., & Ishikawa, T. (1994a).** neu proto-oncogene mutation is specific for the neurofibromas in a N-nitroso-N-ethylurea-induced hamster neurofibromatosis model but not for hamster melanomas and human Schwann cell tumors. Cancer Res, 54, 976-980.
- Nakamura, T., Nemoto, T., Arai, M., Yamazaki, Y., Kasuga, T., Gutmann, D. H., Collins, F. S., & Ishikawa, T. (1994b).** Specific expression of the neurofibromatosis type 1 gene (NF1) in the hamster Schwann cell. Am J Pathol, 144(3), 549-555.
- Nemoto, T., Nakamura, T., Ohashi, K., & Kasuga, T. (1993).** N-nitroso-N-ethylurea-induced hamster melanoma: a new method for efficient induction and schwannian differentiation of melanoma. Jpn J Cancer Res, 84, 512-517.
- Nikitin, A. Y., Ballering, L. A., Lyons, J., & Rajewsky, M. F. (1991).** Early mutation of the neu (erbB-2) gene during

- ethylnitrosourea-induced oncogenesis in the rat Schwann cell lineage. Proc Natl Acad Sci USA, 88(22), 9939-9943.
- Novell, P. C. (1986).** Mechanisms of tumor progression. Cancer Res, 46, 2203-2207.
- Oberley, T. D., Lauchner, L. J., Pugh, T. D., Gonzalez, A., Goldfarb, S., Li, S. A., & Li, J. J. (1989).** Specific estrogen-induced cell proliferation of cultured Syrian hamster renal proximal tubular cells in serum-free chemically defined media. Proc Natl Acad Sci USA, 86, 2107-2111.
- Oberley, T. D., Oberley, L. W., Slattery, A. F., Lauchner, L. J., & Elwell, J. H. (1990).** Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult Syrian hamster tissues and during kidney development. Am J Pathol, 137(1), 199-214.
- Oberley, T. D., Gonzalez, A., Lauchner, L. J., Oberley, L. W., & Li, J. J. (1991).** Characterization of early kidney lesions in estrogen-induced tumors in the Syrian hamster. Cancer Res, 51, 1922-1929.
- Oberley, T. D., Slattery, A. F., Gonzalez, A., Li, S. A., & Li, J. J. (1991).** Comparative morphologic and immunohistochemical studies of estrogen plus alpha-naphthoflavone-induced liver tumors in Syrian hamsters and rats. Am J Pathol, 139(3), 669-679.
- Oberley, T. D., Allen, R. G., Schultz, J. L., & Lauchner, L. J. (1991a).** Antioxidant enzymes and steroid-induced proliferation of kidney tubular cells. Free Radic Biol Med, 10(1), 79-83.
- Ogawa, O., Eccles, M. R., Szeto, J., McNoe, L. A., Yun, K., Mav, M. A., Smith, P. J., & Reeve, A. E. (1993).** Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in wilms tumour. Nature, 362(6422), 749-751.
- Ohgaki, H., Hard, G. C., Hirota, N., Maskawa, A., Takahashi, M., & Kleihues, P. (1992).** Selective mutation of codons 204 and 213 of the p53 gene in rat tumors induced by alkylating N-Nitroso compounds. Cancer Res, 52, 2995-2998.



- Ohnishi, M. (1989).** Craniofacial malformations induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rat embryos in vivo and in vitro. Kobe J Med Sci, 35(2), 47-63.
- Pardo-Mindán, F. J., Vázquez, J. J., Idoate, M., Antón, L., & Aliaga, L. (1991).** Neoplasias. In F. J. Pardo-Mindán (Ed.), Anatomía Patológica General (Vol. 1, pp. 309-369). Barcelona: Ediciones Doyma, S.A.
- Pelfrene, A. F., & Love, L. A. (1977).** Experimental induction of melanotic tumors in Syrian golden hamster by transplacental and topical application of ethylnitrosourea. Z Krebsforsch, 90, 233-239.
- Perantoni, A. O., Rice, J. M., Reed, C. D., Watatani, M., & Wenk, M. L. (1987).** Activated neuoncogene sequences in primary tumors of the peripheral nervous system induced in rats by transplacental exposure to ethylnitrosourea. Proc Natl Acad Sci USA, 84, 6317-6321.
- Perantoni, A. O., Reed, C. D., Devor, D. E., Anderson, L. M., Divan, B. A., & Rice, J. M. (1989).** c-neuoncogene activation in schwannomas induced in hamsters and mice by ethylnitrosourea (ENU). Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res, 30, A730.
- Peter, S., Munemitsu, S., Slamon, D., & Ullrich, A. (1989).** Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and transforming growth factor alpha (TGF-alpha) mRNA in normal kidney and renal cell carcinoma. J Cancer Res Clin Onc, 115 Sup., S18.
- Pour, P., Mohr, U., Althoff, J., Cardesa, A., & Knoch, N. (1976).** Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters. III. Urogenital system and endocrine glands. J Natl Cancer Inst, 56(5), 949-961.
- Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E., & Feinberg, A. P. (1993).** Relaxation of imprinted genes in human cancer. Nature, 362(6422), 747-749.

- Reid, D. E., & Shirley, R. L. (1974).** Endometrial carcinoma associated with Sheehan's syndrome and stilbestrol therapy. Am J Obstet Gynecol, 119, 264-266.
- Reynolds, E. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol, 17, 208-212.
- Rice, J. M. (1969).** Transplacental carcinogenesis in Mice by 1-ethyl-1-nitrosourea. Ann NY Acad Sci, 163, 813-827.
- Rice, J. M., & Ward, J. M. (1988).** Schwannomas (induced), cranial, spinal and peripheral nerves, rat. In T. C. Jones, U. Mohr, & R. D. Hunt (Ed.), Nervous system pp. 154-160. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Richardson, K. K., Richardson, F. C., Crosby, R. M., Svenberg, J. A., & Skopek, T. R. (1987).** DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of Escherichia coli to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. Proc Natl Acad Sci USA, 84(2), 344-348.
- Roscoe, J. P., & Claisse, P. J. (1976).** A sequential in vivo-in vitro study of carcinogenesis induced in the rat brain by ethylnitrosourea. Nature, 262, 314-316.
- Roy, D., & Liehr, J. G. (1988).** Characterization of drug metabolism enzymes in estrogen-induced kidney tumors in male Syrian hamsters. Cancer Res, 48(20), 5726-5729.
- Roy, D., & Liehr, J. G. (1989).** Metabolic oxidation of diethylstilbestrol to diethylstilbestrol-4',4"-quinone in Syrian hamsters. Carcinogenesis, 10(7), 1241-1245.
- Roy, D., & Liehr, J. G. (1990).** Inhibition of estrogen-induced kidney carcinogenesis in Syrian hamsters by modulators of estrogen metabolism. Carcinogenesis, 11(4), 567-570.
- Roy, D., Strobel, H. W., & Liehr, J. G. (1991).** Cytochrome b5-mediated redox cycling of estrogen. Arch Biochem Biophys, 285(2), 331-338.

- Roy, D. (1991). Reactive potential of diethylstilbestrol reactive metabolites towards cellular nuclear proteins: implications for estrogen-induced carcinogenesis. Adv Exp Med Biol, 283, 809.
- Roy, D., Floyd, R. A., & Liehr, J. G. (1991a). Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of diethylstilbestrol-treated Syrian hamsters: covalent DNA damage by free radicals generated by redox cycling of diethylstilbestrol. Cancer Res, 51, 3882-3885.
- Rubinstein, L. J., Conley, F. K., & Herman, M. M. (1976). Studies on experimental malignant nerve sheath tumors maintained in tissue and organ culture systems. I. Light microscopy observations. Acta neuropath (Berl.), 34, 277-291.
- Ruddon, R. W. (1987). Causes of cancer: chemical and physical carcinogens. In R. W. Ruddon (Ed.), Cancer biology (Vol. 1, pp. 297-336). New York: Oxford University Press.
- Rudiger, H. W., F. Haenisch, Metzler, M., Glatt, H. R., & Oesch, F. (1979). Activation of diethylstilbestrol to metabolites which induce sister chromatid exchanges in human cultured fibroblasts. Nature, 281, 392-394.
- Rusell, D. S., & Rubinstein, L. J. (1989). Experimental tumours of the nervous system. In L. J. Rubinstein (Ed.), Pathology of tumours of the nervous system (Vol. 1, pp. 58-82). London: Edward Arnold.
- Rustia, M., & Shubik, P. (1974). Prenatal induction of neurogenic tumors in hamster by precursors ethylurea and sodium nitrite. J Nat Cancer Inst, 52(2), 605-608.
- Rustia, M., & Shubik, P. (1976). Transplacental effects of diethylstilbestrol on the genital tract of hamster offspring. Cancer Lett, 1, 139-146.
- Sakakibara, Y., Saito, I., Oda, T., Tsujibo, H., Inamori, Y., & Sato, Y. (1992). Effects of 3,3'-dihydroxy-alpha, beta-diethylstilbene and 3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene on microtubule assembly in vitro,

- aneuploidy induction, and cellular microtubule and actin networks. Chem Pharm Bull Tokyo, 40(8), 2115-2119.
- Sato, Y., Murai, T., Oda, T., Saito, H., Kodama, M., & Hirata, A. (1987).** Inhibition of microtubule polymerization by synthetic estrogens: formation of a ribbon structure. J Biochem, 101(5), 1247-1252.
- Satoh, M. S., Huh, N., Rajewsky, M. F., & Kuroki, T. (1988).** Enzymatic removal of O<sup>6</sup>-ethylguanine from mitochondrial DNA in rat tissues exposed to N-ethyl-N-nitrosourea in vivo. J Biol Chem, 263(14), 6854-6856.
- Scherer, E., Van-Den-Berg, T., Vermeulen, E., Winterwerp, H. H., & Den-Engelse, L. (1989).** Immunocytochemical analysis of O<sup>6</sup>-alkylguanine shows tissue specific formation in and removal from esophageal and liver DNA in rats treated with methylbenzyl nitrosamine, dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine and ethylnitrosourea. Cancer Lett, 46(1), 21-29.
- Schreiber, D. (1990).** Neurooncogenesis experimental. Patologia, 23(4), 308-310.
- Seabright, M. (1971).** A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, 2, 971-972.
- Searle, C. E., & Jones, E. L. (1972).** Tumours of the nervous system in mice treated neonatally with N-ethyl-N-nitrosourea. Nature, 240, 559-560.
- Segura-Aguilar, J., Cortés-Vizcaino, V., Llombart-Bosch, A., Ernster, L., Monsalve, E., & Romero, F. J. (1990a).** The levels of quinone reductases, superoxide dismutase and glutathione-related enzymatic activities in diethylstilbestrol-induced carcinogenesis in the kidney of male Syrian golden hamsters. Carcinogenesis, 11(10), 1727-1732.
- Segura-Aguilar, J., Cortés-Vizcaino, V., Ernster, L., Llombart-Bosch, A., Monsalve, E., & Romero, F. J. (1990b).** A dramatic decrease of microsomal and cytosolic DT-diaphorase activities during

- diethylstilbestrol (DES)-induced in the kidney of male Syrian golden hamster. In M. Ingelman-Sundberg, J. A. Gustafsson, & S. Orrenius (Ed.), VIIIth International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations pp. 210). Stockholm: Karolinska Institutet.
- Sell, S., & Pierce, G. B. (1994).** Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. Lab Invest, 70(1), 6-22.
- Sendowski, K., & Rajewsky, M. F. (1991).** DNA sequence dependence of guanine-O6 alkylation by the N-nitroso carcinogens N-methyl- and N-ethyl-N-nitrosourea. Mutat Res, 250(1-2), 153-160.
- Sharp, D. C., & Parry, J. M. (1985).** Diethylstilbestrol: the binding and effects of diethylstilboestrol upon the polymerisation of purified microtubule protein in vitro. Carcinogenesis, 6(6), 865-871.
- Singer, B. (1976).** All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents. Nature, 264, 333-339.
- Sirbasku, D. A., & Kirkland, W. L. (1976).** Control of cell growth. IV. Growth properties of a new cell line established from an estrogen-dependent kidney tumor of the Syrian hamster. Endocrinology, 98(5), 1260-1272.
- Smith, D. A., & Walker, B. E. (1992).** Evidence of hypothalamic involvement in the mechanism of transplacental carcinogenesis by diethylstilbestrol. Cancer Lett, 67(1), 55-59.
- Soto, A. M., Bass, J. C., & Sonnenschein, c. (1988).** Estrogen-sensitive proliferation pattern of cloned Syrian hamster kidney tumor cells. Cancer Research, 48, 3676-3680.
- Stammburger, I., Schmahl, W., & Nice, L. (1990).** The effects of X-irradiation, N-ethyl-N-nitrosourea or combined treatment on O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in fetal rat brain and liver and the induction of CNS tumours. Carcinogenesis, 11(2), 219-222.
- Steggles, A. W., & King, R. J. B. (1972).** Oestrogen receptors in hamster tumours. Europ J Cancer, 8, 323-334.



- Sternberger, L., Cuculis, J., & Meyer, H. (1970).** The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. J Histochem Cytochem, 18, 315-333.
- Stoica, G., & Koestner, A. (1984).** Diverse spectrum of tumors in male Sprague-Dawley rats following single high dose of N-ethyl-N-nitrosourea. Am J Pathol, 116, 319-326.
- Sufrin, G., Chamberlin, L., & Luchey, I. (1984).** Altered gene expression in the estrogen induced hamster renal carcinoma. J Urol, 131, 129A.
- Svenberg, J. A., Koestner, A., Wechsler, W., & Denlinger, R. H. (1972).** Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats. Cancer Res, 32, 2656-2660.
- Talley, D. J., Roy, W. A., & Li, J. J. (1982).** Behavior of primary and serially transplanted estrogen-dependent renal carcinoma cells in monolayer and in collagen gel culture. In vitro, 18(2), 149-156.
- Thomale, J., Huth, N. H., Nehls, P., Eberle, G., & Rajewsky, M. F. (1990).** Repair of O6-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tumorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. Proc Natl Acad Sci USA, 87(24), 9883-9887.
- Thomale, J., Hochleitner, K., & Rajewsky, M. F. (1994).** Differential formation and repair of the mutagenic DNA alkylation product O6-ethylguanine in transcribed and nontranscribed genes of the rat. J Biol Chem, 269(3), 1681-1686.
- Tomatis, L., Turusov, V. S., Cardis, E., & Cabral, J. P. (1990).** Tumour incidence in the progeny of male rats exposed to ethylnitrosourea before mating. Mutat Res, 229(2), 231-237.
- Tsokos, M., Scarpa, S., Ross, R. A., & Triche, T. J. (1987).** Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest

- development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix proteins. Am J Pathol, 128(3), 484-496.
- Tsutsui, T., Maizumi, H., McLachlan, J. A., & Barrett, J. C. (1983).** Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol chromosomal mechanism in carcinogenesis. Cancer Res, 43, 3814-3821.
- Tsutsui, T., Degen, G. H., Schiffmann, D., Wong, A., Maizumi, H., McLachlan, J. A., & Barret, J. C. (1984).** Dependence on exogenous metabolic activation for induction of unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells by diethylstilbestrol and related compounds. Cancer Res, 44, 184-189.
- Tsutsui, T., Suzuki, N., Maizumi, H., McLachlan, J. A., & Barrett, J. C. (1986).** Alteration in diethylstilbestrol-induced mutagenicity and cell transformation by exogenous metabolic activation. Carcinogenesis, 7(9), 1415-1418.
- Tsutsui, T., Suzuki, N., Fukuda, S., Sato, M., Maizumi, H., McLachlan, J. A., & Barrett, J. C. (1987).** 17-beta-estradiol-induced cell transformation and aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture. Carcinogenesis, 8(11), 1715-1719.
- Tucker, R. W., & Barrett, J. C. (1986).** Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol. Cancer Res, 46, 2088-2095.
- Turusov, V. S., Tomatis, L., Cabral, R., Cardis, E., & Tiutiunnik, N. F. (1988).** Transzygotic carcinogenic effect of nitrosoethylurea in rats. Eksp Onkol, 10(3), 25-28.
- Vazquez-Lopez, E. (1944).** The reaction of the pituitary gland and related hypothalamic centres in the hamster to prolonged treatment with oestrogens. J Pathol Bacteriol, 56(1), 1-13.
- Wakely, J. P. E., Sprague, R. I., & Kornstein, M. J. (1989).** Extrarenal Wilms' tumor: An analysis of four cases. Hum Pathol, 20, 691-695.

- Walford, N., & Delemarre, J. F. M. (1991).** Wilms' tumour associated with deep cystic nephroma-like changes: three cases of a putative Wilms' tumour precursor. Histopathology, 18, 123-131.
- Walker, B. E. (1984).** Tumors of female offspring of mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. J Natl Cancer Inst, 73, 133-140.
- Walker, D. M., Walker, V. E., Hardisty, J. F., Morgan, K. T., & Svenberg, J. A. (1988).** Peripheral nerve sheath tumors, rat. In T. C. Jones, U. Mohr, & R. D. Hunt (Ed.), Nervous System pp. 143-154. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Ward, J. M., Stevens, J. L., Konishi, N., Kurata, Y., Uno, H., Divan, B. A., & Ohmori, T. (1992).** Vimentin metaplasia in renal cortical tubules of preneoplastic, neoplastic, aging, and regenerative lesions of rats and humans. Am J Pathol, 141(4), 955-964.
- Wechsler, W., Kleihues, P., Matsumoto, S., Zülch, K. J., Ivankovic, S., Preussmann, R., & Druckrey, H. (1969).** Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. Ann NY Acad Sci, 159, 360-408.
- Wen, J., Emura, M., Riebe, M., & Mohr, U. (1988).** Toxicity and chromosomal damage in fetal Syrian hamster and human pulmonary epithelial cells. Cancer Lett, 41, 37-43.
- Wen, J., Emura, M., Riebe, M., & Mohr, U. (1990).** Unscheduled DNA synthesis and HPRT mutation in fetal Syrian hamster and human respiratory epithelial cells exposed to ethylnitrosourea. Cancer Lett, 50(1), 57-62.
- Wen, J. M. (1991).** Comparison of point mutation induced by ethylnitrosourea in human fetus and Syrian hamster pulmonary epithelial cells. Chung Hua Chung Liu Tsa Chih, 13(4), 253-256.
- Wick, M. R., Manivel, C., O'Leary, T. P., & Cherwitz, D. L. (1986).** Nephroblastoma. A comparative immunocytochemical and lectin-histochemical study. Arch Pathol Lab Med, 110, 630-635.



- Wiggenhauser, A., & Schmahl, W. (1987).** Postnatal development and neoplastic disease pattern in NMRI mice after combined treatment with ethylnitrosourea and X-irradiation on different days of the fetal period. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 51(6), 1021-1029.
- Wiseman, H., & Halliwell, B. (1993).** Carcinogenic antioxidants. Diethylstilboestrol, hexoestrol and 17  $\alpha$ -ethynyloestradiol. FEBS Lett, 332(1,2), 159-163.
- Wolman, S. R., Camuto, P. M., Eisenberg, A. J., Feiner, H. D., & Greco, M. A. (1990).** Wilms' tumor: A search for the critical lesion. Hum Pathol, 21, 715-721.
- Yang, J.-L., Lee, P.-C., Lin, S.-R., & Lin, J.-G. (1994).** Comparison of mutation spectra induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the hprt gene of Mer+ and Mer- diploid human fibroblasts. Carcinogenesis, 15(5), 939-945.
- Yeger, H., Baumal, R., Bailey, D., Pawlin, G., & Phillips, M. J. (1985).** Histochemical and immunohistochemical characterization of surgically resected and heterotransplanted Wilms' tumor. Cancer Res, 45, 2350-2357.
- You, M., Wang, Y., Lineen, A. M., Gunning, W. T., Stoner, G. D., & Anderson, M. W. (1992).** Mutagenesis of the K-ras protooncogene in mouse lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea or N-nitrosodiethylamine. Carcinogenesis, 13(9), 1583-1586.
- Yuspa, S. H. (1994).** The pathogenesis of squamous cell cancer: Lessons learned from studies of skin carcinogenesis--Thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res, 54, 1178-1189.

**TABLA 1. Causas de mortalidad durante la experiencia**

CAUSA	DES ♂	DES ♀	ENU ♂/♀	E+D ♂/♀
Muerte postratamiento (primeros 15 días)	0	1	0	0
Muerte postnatal (primera semana)	0	0	3	13*
Muerte intraoperatoria (efecto tóxico anestésico)	2	3	0	1
Muerta postoperatoria (primera semana)	0	2**	0	0
Animales devorados (canibalismo)	1	3	3	5
Animales muertos en estado de autólisis avanzada	1	1	2	4

\*Tras inyección intraperitoneal, a los 3 y 4 días , fallecen 2 madres y sus proles

\*\*Infección peritoneal, sepsis

**TABLA 2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

GRUPO	Nº EFECTIVO/ ORIGINAL	SEXO	TRATAMIENTO		
			GONADECTOMIA	ENU	DES
1	20/30	H	Si	No	Si
2	36/40	M	Si	No	Si
3	19/20	H	No	Si	No
4	12/13	H	Si	Si	No
5	17/20	M	No	Si	No
6	14/17	M	Si	Si	No
7	22/36	H	Si	Si	Si
8	30/39	M	Si	Si	Si
<b>GRUPOS CONTROL:</b>					
9	10/10	M	No	No	No
10	10/10	M	Si	No	No
11	5/5	H	No	No	No
12	5/5	H	Si	No	No
13	15/15	H	No	Si*	No
14	6/6**	M	No	No	No

\* Grupo madres control

\*\* Animales tratados con BHA y Sulfán III

**TABLA 3. Estudio inmunohistoquímico. Anticuerpos primarios.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Animal(Tipo)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Método</b>	<b>Incubación</b>	<b>Digestión enzimática</b>
Queratina	Dako	Conejo(AcP)	Prediluida	PAP	45 min	Tripsina (30 min)
Citoqueratina	Dako	Ratón(AcM)	1/100	ABC	45 min	Tripsina (30 min)
CAM 5.2	Biomeda	Ratón(AcM)	1/40	ABC	45 min	Tripsina (30 min)
CEA	Dako	Conejo(AcP)	1/100	PAP	45 min	No
EMA	Dako	Ratón(AcM)	1/100	ABC	Nocturna**	No
Vimentina	Dako	Ratón(AcM)	1/20	ABC	Nocturna**	No
Desmina	Dako	Ratón(AcM)	1/50	ABC	45 min	No
Actina	Biomeda	Ratón(AcM)	Prediluida	ABC	45 min	No
Mioglobina	Dako	Conejo(AcP)	1/400	PAP	45 min	No
Proteína S-100	Dako	Conejo(AcP)	1/200	PAP	45 min	No
GFAP	Dako	Ratón(AcM)	1/15	ABC	Nocturna**	No
HNK-I	ATCC TIB 200*	Ratón(AcM)	Pura	ABC	45 min	No
NSE	Dako	Ratón(AcM)	1/100	ABC	45 min	No
Cromogranina	Biomeda	Ratón(AcM)	Pura	ABC	45 min	No
Sinaptofisina	Boehringer	Ratón(AcM)	1/40	ABC	45 min	No
Neurofilamentos	Boehringer	Ratón(AcM)	1/15	ABC	45 min	No

**TABLA 3. Estudio inmunohistoquímico. Anticuerpos primarios. (Continuación)**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Animal(Tipo)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Método</b>	<b>Incubación</b>	<b>Digestión enzimática</b>
UEA-I	Sigma	Conejo(AcP)	1/400	PAP	45 min	No
FVIIR:Ag	Dako	Conejo(AcP)	1/400	PAP	45 min	No
$\alpha$ -1-Antiquimotripsina	Dako	Conejo(AcP)	1/200	PAP	45 min	No
$\alpha$ -1-Antitripsina	Dako	Conejo(AcP)	1/200	PAP	45 min	No
DT-diaforasa	Wallenberg Laboratory***	Conejo(AcP)	1/200	PAP	Nocturna**	Tripsina (30 min)

CEA: antígeno carcinoembrionario. EMA: antígeno de la membrana epitelial. GFAP: proteína gliofibrilarácida. HNK-I: anticuerpo contra las células NK humanas. NSE: enolasa neuronal específica. UEA-I: ulex europaeus I aglutinina. FVIIR:Ag: antígeno asociado al factor VIII. AcP: anticuerpo policlonal. AcM: anticuerpo monoclonal. PAP: método peroxidasa-antiperoxidasa. ABC: sistema avidina-biotina.

\* Catálogo ATCC TIB 200. Mouse-mouse hybridoma. References: J. Immunol. 127: 1024-1029, 1981. J. Exp. Med. 155: 321-326, 1982. Originators: Drs. T. Abo and C. Balch, University of Alabama, Birmingham, Alabama.

\*\* En cámara húmeda, a 4°C.

\*\*\* Biochemical Toxicology, Prof. J. de Pierre, University of Stockholm, S-106 91, Stockholm, Sweden.

**TABLA 4. Estudio inmunohistoquímico. Anticuerpos secundarios y complejos.**

<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Animal</b>	<b>Dilución</b>	<b>Método</b>
Anti-Ig Conejo	Vector	Cerdo	1/50	PAP
Anti-Ig Ratón	Vector	Conejo	1/200	ABC
Complejo PAP	Dako	Conejo	1/100	PAP
Complejo ABC	Vector	-----	50µl/cc	ABC

**TABLA 5. HAMSTER HEMBRAS INTOXICADAS CON DES (N=20)**

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNO	MALIGNO
1	HCI	-	-
2	-	-	-
3	HCl. DT	-	-
4	DT	-	-
5	HCI	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	DT	-	-
9	-	-	-
10	HCI	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	AdenomaSuprarrenal	-
16	-	AdenomaSuprarrenal	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	AdenomaSuprarrenal	-

**TABLA 6. HAMSTER MACHOS INTOXICADOS CON DES (N= 36)**

Nº ANIMALES	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	HCl	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	HCl	-	-
15	HCl	-	-
16	HCl	-	-
17	-	-	NFB-like (BL,HP)
18	-	-	-
19	-	-	Tumorletrenal(BL,HP)
20	-	-	NFB-like (BL,HP) M+pulmonares
21	HCl	-	-
22	HCl	-	-
23	HCl	-	-
24	-	Ad. hipófisis	NFB-like (BL)
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	NFB-like (HP)
28	-	-	NFB-like(AD,NEC)
29	-	Ad. hipófisis	NFB-like (HP)
30	-	-	-
31	-	-	-
32	Abscesoabdominal	-	Regr. tumoralrenal



**TABLA 6 (Cont.). HAMSTER MACHOS INTOXICADOS CON DES (n= 36)**

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	Ad. suprarrenal	-
36	-	-	Regr. tumoralrenal

TABLA 7. HAMSTER HEMBRAS INTOXICADAS CON ENU (n= 31)

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	T. Névico cervical dcho. NF r. maxilar	-
7	-	NF mediastino post.	N. M. plexo braquial
8	-	NF supraciliar NF r. maxilar	-
9	-	NF torácico	-
10	-	NF VIII par	N. M. plexo sacro
11	-	-	N. M. pata ant. izq. N. M. plexo sacro. Ca. suprarrenal dcha.
12	-	-	N. M. abazón izq. N. M. plexo sacro
13	-	NF submandibular izq. NF mediastino post.	GNBretroperitoneal
14	DTR	NF región cervical NF pata ant. dcha. NF h. ciático izq. Ad. suprarrenal	N. M. plexo axilar Melanoma maligno Leiomiomasarcoma utero
15	DTR	NF subcutáneo dorsal NF r. maxilar izq.	GNF n. trigémino i. c.
16	DTR	-	NFS pata ant. dcha.
17	DTR	-	N. M. pata ant. dcha.
18	-	NF retrorbitario	N. M. Cervical
19	-	T. Névico hocico GNF retroperitoneal	N. M. abazón izq. Melanoma M. dorsal
20	-	NF torácico ventral	-
21	-	NF abazón dcho. NF cervical dcho. NF pata post. izq. NF pared vaginal	N. M. dorsolateral izq. N. M. pata ant. izq.
22	-	NF r. axilar izq.	-
23	-	NF pata ant. izq. NF cervical ant.	Melanoma M. supraciliar Ca. suprarrenal izq. M+ gánglio hiliarrenal
24	-	NF lingual Ad. suprarrenal	N. M. mandibular dcha.
25	-	-	N. M. retroperitoneal

TABLA 7 (Cont.). HAMSTER HEMBRAS INTOXICADAS CON ENU (n= 31)

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
26	-	NF torácico	-
27	-	-	-
28	Infarto esplénico	Hemangiopericitoma pulmonar	N. M. abazón dcho. N. M. plexo braquial dcho. M+linfática
29	-	-	N. M. intestinal
30	-	-	-
31	-	NF torácico NF de hocico	-

TABLA 8. HAMSTER MACHOS INTOXICADOS CON ENU (N= 31)

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	N. M. plexo sacro
5	-	NF costal	GN. M. plexo sacro
6	-	Ad. suprarrenal	-
7	-	Ad. suprarrenal	N. M. retroperitoneal
8	Atrofia testicular	NF n. trigémino izq.	-
9	-	T. Névico supraciliar	-
10	-	NF pata ant. izq.	N. M. retroperitoneal
11	-	-	NFS abazón izq. NFS abdominal M+ retro y peritoneal
12	-	-	Ca. hipófisis
13	Atrofia testis dcho.	-	N. M. abdominal
14	-	NF cervicodorsal Hemangioperocitoma torácico	-
15	-	NF mesentérico	Ca. suprarrenal dcha.
16	-	-	N. M. pata ant. izq. Melanoma M. ulcerado M+ ren. pul. gang.
17	-	NF maxilar dcho. NF mandibular izq. NF pared intest. grueso	N. M. dorsal N. M. cadera dcha. N. M. perivesical Ameloblastoma mandibular
18	-	NF abazón izq.	Melanoma Maligno M+ renal, pulm.
19	-	-	N. M. subcut. torácico N. M. plexo sacro M+ hepáticas
20	-	NF intestinal	Ca suprarrenal dcho.
21	Quistes hepáticos	-	-
22	Bronconeumonía aspirativa	NF cervical Ad. suprarrenal	-
23	-	NF n. trigémino i. c.	-
24	-	-	-

TABLA 8 (Cont.). HAMSTER MACHOS INTOXICADOS CON ENU (n= 31)

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
25	-	-	N.M. subcutáneo dorsal
26	Atrofia testicular	Ad. suprarrenal	N.M. cervical
27	-	GNF mandibular izq.	N.M. n. maxilar dcho. N.M. pata post. izq.
28	-	-	Melanoma M. dorsal M+ pulmonares
29	-	-	N.M. ceervical
30	-	NF mediastino post. Ad. pulmonar	-
31	-	NF sacro Ad. pulmonar	N.M. dorsal

**TABLA 9. HAMSTER HEMBRAS INTOXICADAS CON ENU+DES (n= 22)**

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
1	-	Ad. renal NF Ad. Corticosuprarrenal izq.	NFB-like (BL)
2	HCl DTR	NF n. maxilar	-
3	HCl	NF retroperitoneal	NFB-like (BL, HP) Tumorlets renales
4	-	-	NFB-like (NEC. NEN. AD)
5	-	-	NFB-like (BL) NF M. retroperitoneal
6	HCl	-	NFB-like (BL. AD. SAR. NEC) Tumorlets renales
7	-	-	NFB-like (BL. HP. AD.)
8	-	-	NFB-like (BL. NEC.) M+ pulm. hepát. diafrag. mesent. Ca. papilar pelvis renal Ca. ductal de mama
9	-	-	NFB-like (AD. BL. HP)
10	-	Microad. renal	NFB-like (BL) Tumorlets renales
11	-	-	Adenoca. renal NFB-like (BL)
12	-	NF n. maxilar dcho.	NFB-like (BL)
13	HCl Nefritis intersticial ag. Nefroptosis	-	Tumorlets renales Melanoma maligno M+ pulmonares
14	-	-	NFB-Like
15	-	NF cervical	M. M. cervicodorsal izq. M+ pulmonares
16	-	Ad. pulmonar	Adenoca. renal NFB-like (BL. HP. NEN. SAR. NEC)
17	DTR	-	NFB-like (BL. HP. SAR)
18	HCl	-	Tumorlets renales NFB-like (BL)
19	-	-	Ca. hipofisis NFB-like (BL. HP. SAR. NEC)
20	-	NF plexo sacro	N. M. n. trigémino i. c. NFB-like (BL. HP. SAR)
21	-	-	NFB-like (BL)
22	-	-	N. M. n. mandibular NFB-like (BL. HP)

TABLA 10. HAMSTER MACHOS INTOXICADOS CON ENU+DES (n=30)

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
1	Abcesosubhepático y pélvico	-	-
2	-	-	-
3	-	Hemangioendotelioma epiteloide-like	-
4	HCI	-	-
5	HCI	NF costal	-
6	HCI. DTR	-	-
7	-	-	Leucemia/linfoma NFB-like (BL)
8	DTR	Microad. suprarrenal	GN M. Cervical
9	-	-	Ca. suprarrenal dcho.
10	-	-	NFB-like (BL. SAR. AD.) Infiltración musc. hepat. retroperit. y diafrag.
11	-	-	N.M. dorsal NFB-like (BL. HP. NEC)
12	-	Ad. hipófisis NF cervical NF intramuscular retroperit. con M+ por tumor renal	N.M. n. trigémino i.c. NFB-like (BL. AD. HP. NEC)
13	-	Adenomatosis pulmonar Ad. suprarrenal	Ca. hipófisis NFB-like (BL. HP. SAR)
14	-	Astrocitoma Prolactinoma hipófisis	M. M. con M+ pulmonares NFB-like (BL. NEC. NEN)
15	HIC. DTR Hematopoyesis hepática y ganglionar	Ad. suprarrenal dcha. NF abazón izq.	Tumorlets renales M. M. supraciliar dcho. Tumorlet pulmonar dcho.
16	HCI. DTR	-	Tumorlet renal (AD) GN. M. retroperitoneal GN M. cervical
17	-	Ad. suprarrenal	GN M. n. trigémino i.c. NFB-like (BL. HP. AD)
18	-	Ad. pulmonar Prolactinoma hipófisis Ad. renal	N.M. pata ant. dcha. NFB-like (BL. HP)
19	-	Ad. pulmonar Prolactinoma hipófisis	NFB-like (BL. AD. SAR. NEC) M+ pulm. y mesentéricas.
20	-	-	M. M. malar dcho. M+ pulm. NFB-like (BL. HP. NEC. SAR) M+ hepat. espl. diaf. mesent.
21	-	NF dorsal	Tumorlets renales (BL. HP) M. M. cervical izq. M. M. sacro. M+ linfáticas GN M. retroperitoneal



**TABLA 10 (Cont.). HAMSTER MACHOS INTOXICADOS CON ENU+DES (n= 30)**

Nº ANIMAL	LESION NO NEOPLASICA	LESION NEOPLASICA	
		BENIGNA	MALIGNA
22	Atrofia y fibrosis renal	-	-
23	HCI	Ad. suprarrenal NF abazón izq.	Tumorites renales
24	-	Ad. hipofisis NF pata ant. dcha.	Tumorlets renales Adenoca.renal
25	DTR	NF pata ant. dcha NF pata ant. izq.	M.M.toracodorsal N.M.cervical
26	-	Ad. suprarrenal NF dorsal	NFB-like (BL. SAR. HP)
27	-	-	Sarcoma M. abdominal M+ hepát. y pulm.
28	HCI	-	NF M. retroperitoneal M+ pulmonares
29	DTR	Ad. suprarrenal Ad. mucoso gland. salivar	-
30	HCI.DTR	Ad. suprarrenal Ad. pulmonar NF intraabdominal	N.M. abazón dcho.



GRUPOS EXPERIMENTALES	N° ANIMALES EFECTIVO	TRATAMIENTO	SEXO	ANIMALES CON TUMOR(%)	N° TOTAL TUMORES	TIEMPO LATENCIA MINIMO	SNP RINON	SNC(1)	NEVICOS SNP+RINON	OTROS
1	20	DES+Gonad	H	3 (15)	3	304	-	-	-	3(a)
2	36	DES+Gonad	M	8 (22.22)	10	180	-	7	2(b)	1(a)
3	12	ENU+Gonad	H	9 (75)	20	182	14	-	4(e)	2(d)
4	19	ENU	H	15 (78.95)	38	78	32	-	1(e)	1(f)
5	14	ENU+Gonad	M	14 (100)	28	180	19	-	1(h)	2(i)
6	17	ENU	M	12 (70.59)	21	400	13	-	2(k)	2(l)
7	22	ENU+DES+Gonad	H	22 (100)	41	R194/125 SNP69/0	8	25	2(m)	3(f)
8	30	ENU+DES+Gonad	M	26 (86.67)	71	R327/259 SNP306/239	20	18	9(o)	6(f)
										11
										18
										11
										11

OTROS: (a) Adenomas suprarrenal; (b) adenomas hipofisis; (c) 2 tumores névicos y 2 melanomas malignos; (d) 2 carcinomas suprarrenal; (e) ganglioneurofibroma trigémico intracraeal; (f) melanoma maligno; (g) leiomiosarcoma útero, hemangiopericitoma pulmonar, 2 adenomas suprarrenal; (h) carcinoma hipofisis; (i) tumor névico y melanoma maligno; (j) 3 adenomas suprarrenal, 2 carcinomas suprarrenal, ameloblastoma; (k) 2 neurofibromas trigémico intracraeal; (l) hemangiopericitoma, adenoma suprarrenal, 2 adenomas pulmonar; (m) neurinoma maligno trigémico intracraeal, carcinoma hipofisis; (n) adenoma hipofisis, carcinoma ductal mama, adenoma pulmonar; (o) neurofibroma y ganglioneurofibroma maligno trigémico, 4 adenomas hipofisis, prolatinoma, carcinoma hipofisis, astrocitoma; (p) hemangiopericitoma epitelioide-like, leucemia/linfoma, 9 adenoma suprarrenal, carcinoma suprarrenal, adenomatosis pulmonar, tumorlet pulmonar, 3 adenomas pulmonar, adenoma salivar.

(1) Intracraeales.

**TABLA 12. INCIDENCIA DE TUMORES INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACION DE ENU Y DES**

GRUPO	Nº HAMSTERS EFECTIVO	Nº HAMSTERS (%) CON TUMOR EN:					
		SNP	INTRACRANEALES	RIÑON	PIEL	SUPRARRENAL	PULMON
DES H Gx	20	-	-	-	-	3 (15)	-
DES M Gx	36	-	2 (5.55)	7 (19.44)	-	1 (2.78)	-
ENU H Gx	12	9 (75)	-	-	3 (25)	2 (16.67)	-
ENU H noGx	19	14 (73.68)	1 (5.26)	-	1 (5.26)	2 (10.53)	1 (5.26)
ENU M Gx	14	11 (78.57)	1 (7.14)	-	2 (14.29)	5 (35.71)	-
ENU M noGx	17	10 (58.82)	2 (11.76)	-	2 (11.76)	1 (5.88)	2 (11.76)
E+D H Gx	22	8 (36.36)	2 (9.09)	20 (90.91)	3 (13.64)	3 (13.64)	1 (4.55)
E+D M Gx	30	14 (46.67)	9 (30)	16 (53.33)	6 (20)	10 (33.33)	5 (16.66)

**TABLA 13. MULTIPLICIDAD DE TUMORES DE SNP Y RENALES EN HAMSTERS TRATADOS CON ENU Y/O DES.**

GRUPO	Nº EFECTIVO HAMSTERS	Nº HAMSTER (%) CON T. SNP	Nº HAMSTERS (%) CON T. RENAL	MULTIPLICIDAD DE TUMORES			
				Nº T. SNP/ Nº EFECT. HAMSTER	Nº T. SNP/ Nº HAMST. CON T. SNP	Nº T. RENAL/ Nº EFECT. HAMSTERS	Nº T. RENAL/ Nº HAMST. CON T. RENAL
DES H Gx	20	-	-	-	-	-	-
DES M Gx	36	-	7 (19.44)	-	-	7/36 (0.19)	7/7 (1.00)
ENU H Gx	12	9 (75)	-	14/12 (1.17)	14/9 (1.55)	-	-
ENU H noGx	19	14 (73.68)	-	32/19 (1.68)	32/14 (2.28)	-	-
ENU M Gx	14	11 (78.57)	-	20/14 (1.42)	20/11 (1.81)	-	-
ENU M noGx	17	10 (58.82)	-	12/17 (0.71)	12/10 (1.2)	-	-
E+D H Gx	22	8 (36.36)	20 (90.91)	8/22 (0.36)	8/8 (1.00)	25/22 (1.14)	25/20 (1.25)
E+D M Gx	30	14 (46.67)	16 (53.33)	20/30 (0.67)	20/14 (1.43)	18/30 (0.6)	18/16 (1.13)

TABLA 14. INMUNOHISTOQUIMICA: TSNP/ ENU MACHOS-HEMBRAS

CASO Nº	DT	VIM	S-100	HNK	NSE	NF	EMA
9		75/++	25/+	--	--	--	--
10 (nº1)	+	75/++	25/+	--	--	--	--
10 (nº2)		75/++	75/+	--	--	--	--
11 (nº1)		75/+++	50/+	--	--	--	--
12		75/+	25/+	--	--	--	--
13 (nº1)		50/++	25/++	1/+	--	--	--
13 (nº2)	+	75/+++	50/++	--	--	--	--
14 (nº1)		75/++	<25/+	--	<25/+	<25/++	--
15		<25/+	<25/+	--	--	--	--
16 (T. sacro)		75/+++	75/++	--	50/++	--	--
16 (T. trig.)		75/+++	25/++	--	<25/+	--	--
18 (nº1)			<25/++	--	25/++	1/++	--
18 (nº2)			75/++	--	25/+++	--	--
20			50/++	--	<25/++	--	--
21		75/++	50/+++	--	<25/++	--	--
22 (nº2)		50/++	25/++	--	<25/++	--	--
22 (nº3)		50/++	50/+++	--	<25/++	--	--
22 (nº5)		75/++	75/++	--	<25/++	--	--
23 (nº1)		50/++	25/++	1/+++	<25/++	--	--
23 (nº2)		50/++	75/++	1/++	<25/++	--	--
23 (nº3)		50/+++	75/+++	--	<25/++	--	--
25		75/+++	25/++	--	<25/++	--	--
26		75/+++	<25/++	--	>25/++	NV	--
27 (nº3)		75/+++	<25/++	--	<25/++	--	--
27 (nº4)		75/++	75/++	--	<25/++	--	--
28 (nº1)		25/++	50/++	--	--	--	--
28 (nº2)		25/++	25/++	--	<25/+++	--	--
29 (nº3)		50/+	25/+	--	--	--	--
30		>25/++	NV	--	--	--	--
32		1/+	75/++	--	1/++	--	--
33		NV	75/++	1/++	50/++	<25/+++	<25/+
35		75/+++	50/++	--	--	--	--
36		75/+++	25/++	<25/++	<25/++	--	--
37 (nº1)		75/+++	75/++	--	25/++	<25/+++	--
37 (nº4)		50/+++	75/+++	--	<25/+++	--	--

**TABLA 14 (Cont.). INMUNOHISTOQUIMICA: TSNP/ ENU MACHOS-HEMBRAS**

CASO Nº	DT	VIM	S-100	HNK	NSE	NF	EMA
38 (nº2)			50/+++	--	25/++	--	--
38 (nº3)		75/+++	50/++		75/++	--	--
38 (nº4)				--	50/++	--	--
38 (nº5)			75/++		50/+++		--
39		75/++			<25/++	--	--
40		50/++	75/+++	--	<25/++	--	--
41 (nº2)		75/+++	75/++	--	1/++	--	--
42		--	50/++	--	<25/++	--	--
44		25/++	50/+++	<25/++	<25/++	--	--
45		NV	25/++	--	<25/++	--	--
46 (nº1)		50/++	>75/++	--	<25/++		
48		75/++	50/++	--	1/++	--	
50		50/++	75/++	--	25/++	--	
51		50/++	25/++	--	<25/+	--	
53 (nº1)		75/+++	50/+++	--	50/++	--	--
53 (nº2)		50/+++	50/+++	5/++	5/+++	--	--
54		50/+++	50/+++	>25/+++	25/++	--	--
55 (nº1)		75/+++	50/+	--	<25/++	--	--
56 (nº1)		25/+++	NV	--	<25/++	--	--
56 (nº2)		75/+++	75/+++	--	<25/++	--	--
56 (nº3)		75/+++	50/+++	25/++	25/++	--	--
58 (nº1)		75/+++	50/++	5/++	<25/++	--	--
60 (nº1)		>25/++	50/+++	--	<25/++	--	--
60 (nº2)		75/+++	75/+++	--	75/++	--	--
61		--	<5/+	--	<5/+	--	--
62 (nº1)		<25/++	<5/++	--	--	--	--
62 (nº2)		--	--	--	NV	--	--

**TABLA 15. INMUNOHISTOQUIMICA: TSNP/E+D. HEMBRAS**

CASON°	DT	VIM	S-100	HNK	NSE	SINAP	NF	DES	CEA	EMA	UEA-I	aQT	GFAP
1	--	95/+++	95/++		<25/++(2)	--	--		--	--	--	--	--
2	+	90/++	95/+++	--	<25/+(2)		--		--	--	--	--	--
3			50/+										
5-1		<5/++	50/++	--	1-5/+(2)								
5-2		>95/+++	>95/+++	--	10/++(2)		--			--	--	--	--
12-1	+	100/+++	100/+++	--	10/++(2)	NV	--		--	--	--	--	NV
12-2	++	50/+++	50/+++	--	+	--	--		--	--	--	--	80/+++
15		80/+++	95/+++	--	10/++(2)	--	--		--	--	--	--	--
19(1)		1/++	1/+	--	1/+	--	--	--	--				
20-1		75/++	5/++	--	75/++	--	--		--	--	--	--	--
20-2		75/+++	50/+++	--	50/++	--	--		--	--	--	--	--
22		50/++	90/+++	--	<25/++(2)	--	--		--	--	--	--	--

(1) Tumor hipofisario. ACT --, ACTH --, CROM --. (2) Neurofibrillas, citoplasmico granular.

5-1. - Areas indiferenciadas de células pequeñas y redondas separadas por estroma laxo. 5-2. - Areas diferenciadas de células de amplio citoplasma estrellado.

12-1. - Neurofibroma maxilar. 12-2. - Glioma SNC.

20-1. - Tumor trigémino. 20-2. - Tumor neural sacro.



**TABLA 16. INMUNOHISTOQUIMICA: TSNP / E+D. MACHOS.**

CASO Nº	VIM	S-100	HNK	NSE	SINAP	NF	DES	CEA	EMA	UEA-1	a-QT	GFAP
5	75/+++	75/++	-	25/++(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
8	75/+++	75/+++	10/+++	50/++(1)	-	-	-	-	-	-	-	NV
11	30/+++ (2)	40/++	1/++	5/+(1)	-	-	-	-	-	-	-	NV
12 (nº3)	50/+++	50/++	1/+	10/++	-	-	-	-	-	-	-	NV
14 (3)	50/+++	75/++	>75/+++	1/+(4)	-	25/++(5)	-	-	-	-	-	75/+++
15	50/++	90/+++	-	10/++(1,4)	-	-	-	-	-	-	-	+(4)
16 (nº1)	25/+	75/+++	NV	10/++(1,4)	-	-	-	-	-	-	-	-
16 (nº3)	75/+++	75/++	1/++(4)	5/++(1,4)	-	-	-	-	-	-	-	-
17	75/++	75/+++	<5/+	1/+(1,4,6)	-	<5/+++	-	-	<5/+++	-	-	<5/+
18	10/++	25/++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NV
20	50/++	75/+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 (nº4)	10/+	25/++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 (nº5)	75/+++	25/++	-	10/++	-	-	-	-	-	-	-	-
23	75/+++	75/+++	-	-	-	NV	-	-	-	-	-	25/++
24	50/++	75/+++	-	25/++	-	-	-	-	-	-	-	-
25 (nº3)	>75/+++	>75/+++	++	25/++	-	-	-	-	-	-	-	-
25 (nº5)	75/+++	75/+++	++	10/++	-	-	-	-	-	-	-	-
26	75/+++	75/+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27 (7)	75/+++	50/++	-	-	-	-	50/+++	-	-	-	-	50/++
28	75/+++	50/+++	50/++	1/+(1,4,6)	-	-	-	-	-	-	-	-
30	75/+++	75/+++	25/++	1/+	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Células aisladas, intracitoplásmico granular. (2) Negativo en áreas de células pequeñas indiferenciadas.

(3) Tumor glial. (4) Células aisladas. (5) Citoplásmico granular. (6) Positivo en células ganglionares.

(7) Sarcoma abdominal: ACT -, a-AT -, CAM - y CK -.

**TABLA 17. INMUNOHISTOQUIMICA: T. RENALES/ DES. MACHOS.**

CASON <sup>o</sup>	DT	VIM	S-100	HNK	NSE	DES	ACT	13E10	CEA	EMA	SINAP	UEA-1	FVIII-RA	NF
11		10/+	10/++	-	5/+	10/++	-	-	-		-	-		
16	-	NV	NV	NV	NV	NV	-	-				-		
17		10/+	10/++	-	5/+	10/++	-	-	-		-	-		
20	-/+	10/++	75/+++	-	-	10/++	1/+	-	1/++		NV	-	-	-
24		NT	25/++	-	1/++	5/+++	-			-	-	-		
27		75/+++	75/+++	-	-	25/++	NV	-	-	-	-	-	-	-
28		-	5/++	-				-	+		-	-	-	-
29		25/+++	10/++	-	-	-	-			-	-	-	-	-

NV: no valorable. NT: no tumor.



**TABLA 18. INMUNOHISTOQUIMICA: T. RENALES/ E+D. HEMBRAS.**

CASONº	DT	VIM	S-100	HNK	NSE	DES	ACT	K	CK	CAM	CEA	EMA	SINAP	UEA-1	FVIII-RA	a-QT	NF
1	-	50/++	98/+++	-	10/+	2-5/+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 (11)		+/-	50/+	-	<10/+	25/++		-	-	-	+/-	-	NV	-	-	-	-
3	-	(1)75/++	90/+++	-	5/+	50/++(2)		+/-	-	-	-	-	NV	-	-	-	-
4 (12)	-	80/++	90/+++	-	25/++	50/+++		-	-	-	-	-	NV	-	-	-	-
5 (3)	-	90/+++	90/+++	-	10/+	>90/+++		-	-	-	-	-	NV	-	NV	-	-
6 (4)	NV	90/+++	80/+++	1/+	50/++			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+/-	75/++	90/++	-	-	50/++		-	-	-	-	-	-	-	-	NV	-
8 (6)	-	75/++	90/++	-	5/+	5/++		-	-	-	- (5)	-	-	- (5)	NV	-	-
9	-	80/++	90/++	-	-	5/++	5/+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+/-	50/++	95/+++	-	-	1/++	1/++	-	-	-	-	-	NV	-	-	-	-
11 (13)	NV	80/++	95/+++	-	-	50/+++	25/+++	1/+	-	-	-	-	NV	-	-	-	-
12		95/++	95/+++	-	5/++	25/+++	25/+++	-	-	-	-	-	NV	-	-	-	-
13		95/+++	95/+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		75/+++	90/++	-	-	5/+	5/+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 (8)		80/+++	90/+++	5/++(7)	5/+(7)	25/++	1/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Más intensa y constante en células periféricas de los nódulos tumorales. (2) Células de citoplasma claro también positivas. (3) 13E10 -. GFAP -. (4) 13E10 -. (5) Asociado tumor urotelial, CEA +, UEA-I +. (6) Metástasis por NFB-like: VIM ++, S-100 ++, NSE +, HNK -, EMA -. Tumor urotelial pelvis: VIM -, S-100 -, CEA +, UEA-I -. Asociado tumor mama: VIM -, S-100 -, HNK +focal, K100/+++, CK -, CAM 5.2 -, EMA -, CEA 80/+++, UEA-I 50/+++, DES -, ACT -, DT +. (7) Area fusocelular. (8) Adenocarcinoma: CEA +, UEA-I -. (11) Displasia tubular renal: VIM -, S-100 -, HNK -, DES -, K >75/+++, CAM 5.2 -, CK -, UEA-I >75/+++, FVIIIIRA -. (12) Tumor urotelial pelvis: VIM -, S-100 -, HNK <5/+++, NSE -, DES -, CAM 5.2 -. (13) Adenocarcinoma renal: VIM -, S-100 -, DES -, ACT -, K +, CK -, EMA -, CEA +, UEA-I +.

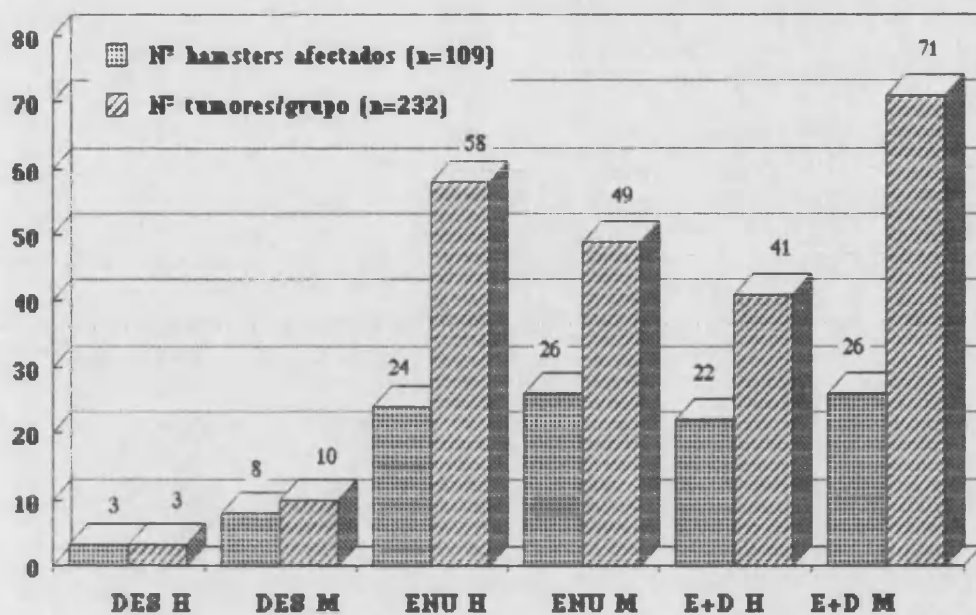
**TABLA 18 (Cont.) INMUNOHISTOQUIMICA: T. RENALES/ E+D. HEMBRAS**

CASON°	DT	VIM	S-100	HNK	NSE	DES	ACT	K	CK	CAM	CEA	EMA	SINAP	UEA-I	FVIII	IRA	aQT	NF
17		90/+++	95/+++	--	5/+	25/+++	1/++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
18		90/+++	95/+++	--	1/+	25/+++	25/+++ (9)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	NV
19		90/+++	90/+++	--	25/++	5/++	5/+++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
20		50/+++	90/+++	1/++ (10)	25/++	1/++	1/++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
21		90/+++	90/+++	--	--	5/+++	1/++ (focal)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
22		90/+++	90/+++	--	--	NV	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

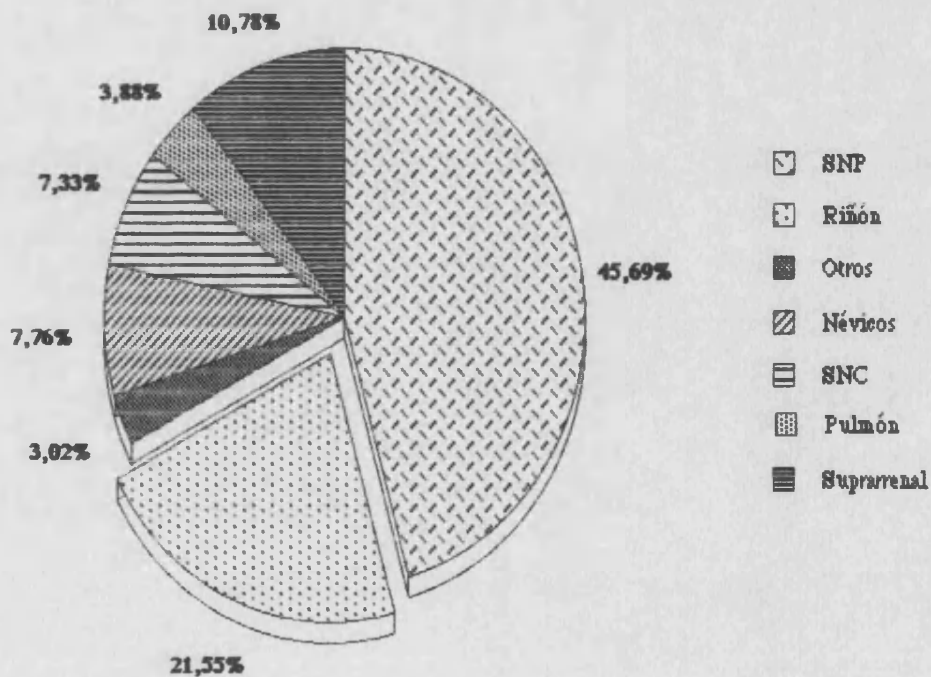
(9) Positivo en células aisladas y en grupos (focal). Citoplásmico difuso.

(10) Células aisladas, citoplásmico difuso.

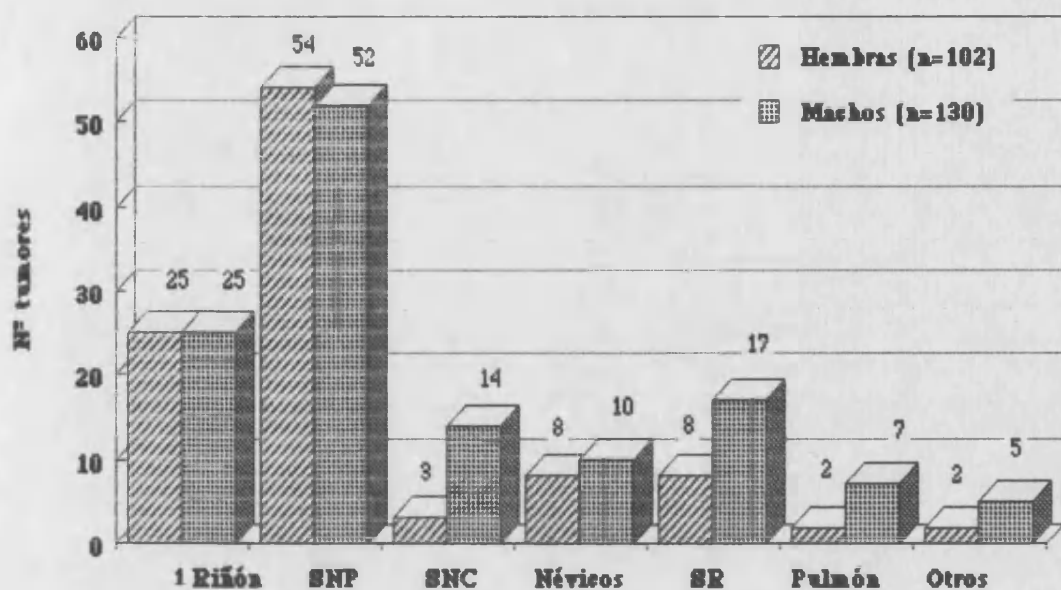
**GRAFICA 1. HAMSTER AFECTADOS/Nº TOTAL TUMORES/GRUPO**



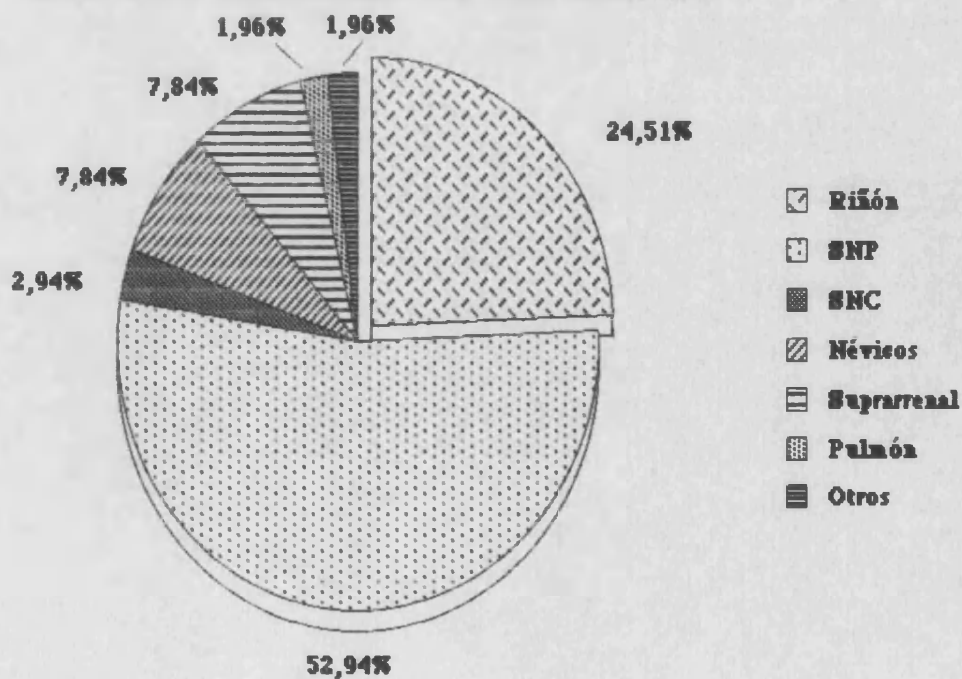
**GRAFICA 2. LOCALIZACION TUMORES**



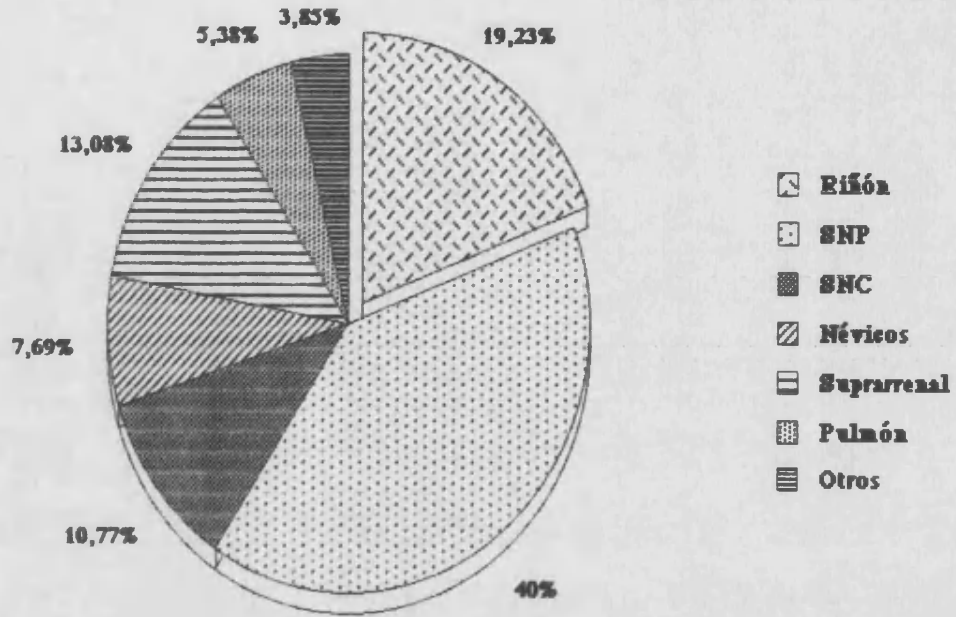
**GRAFICA 3. INCIDENCIA (%) / LOCALIZACION TUMORES POR SEXO**



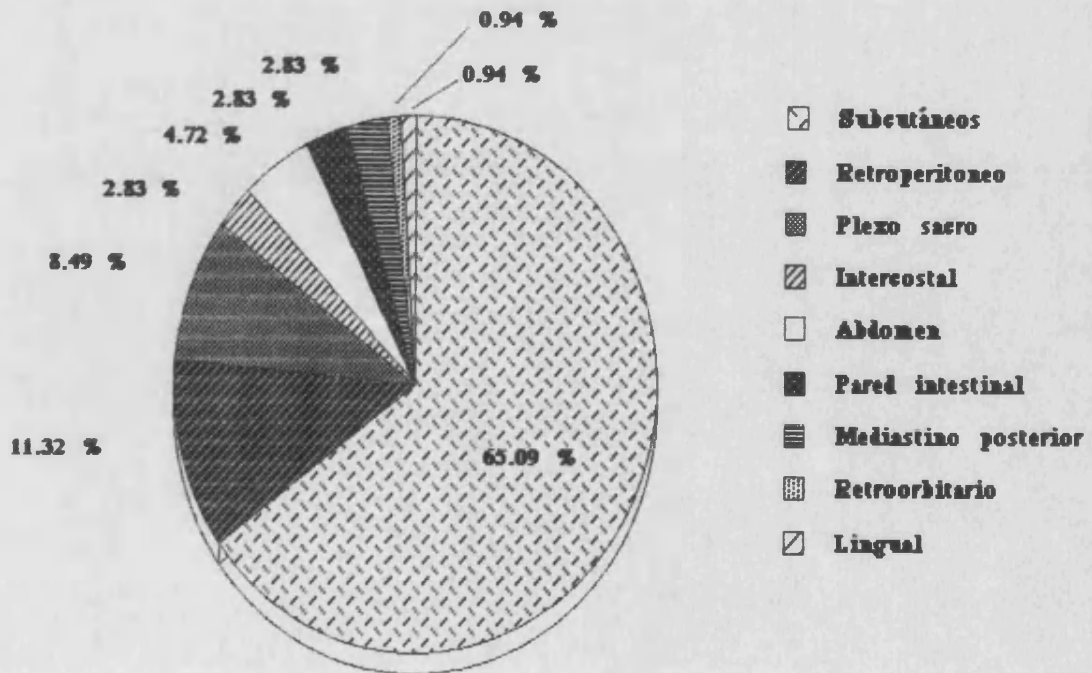
**GRAFICA 4. INCIDENCIA TUMORES HEMBRAS**



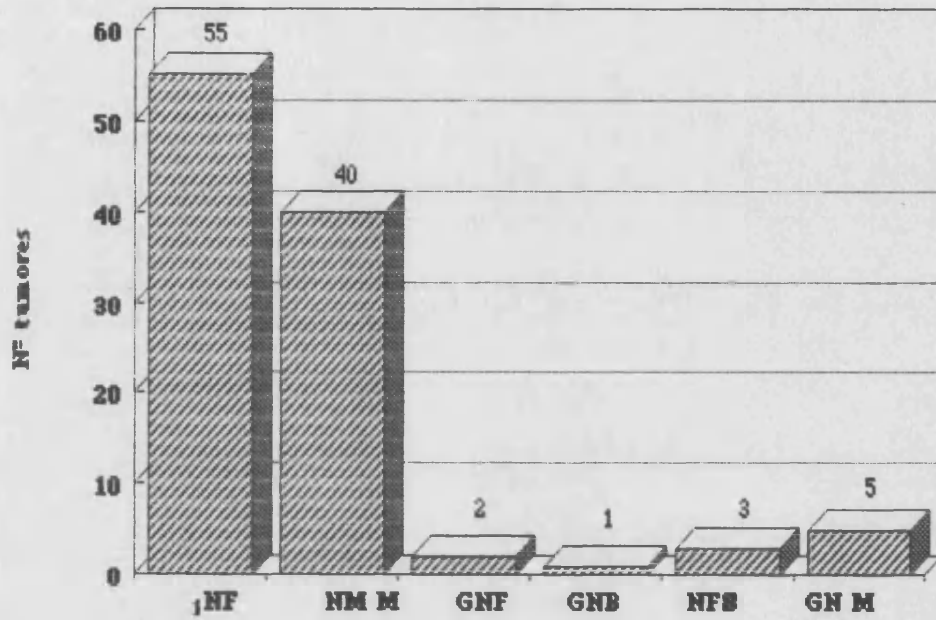
GRAFICA 4 (CONT). INCIDENCIA TUMORES MACHOS



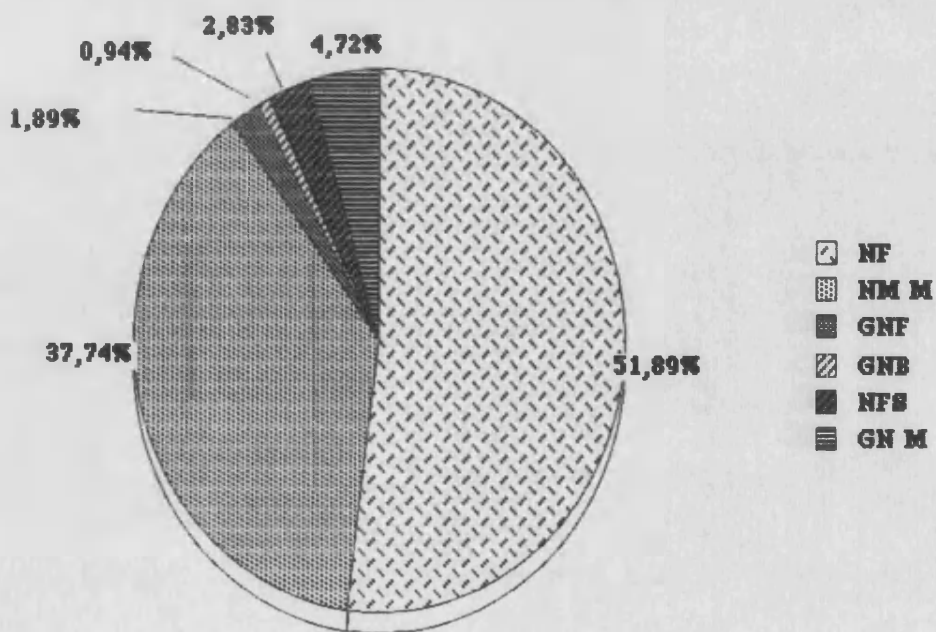
GRAFICA 5. LOCALIZACION TUMORES SNP (n=106)



GRAFICA 6. TOTAL TSNP/TIPO HISTOLOGICO

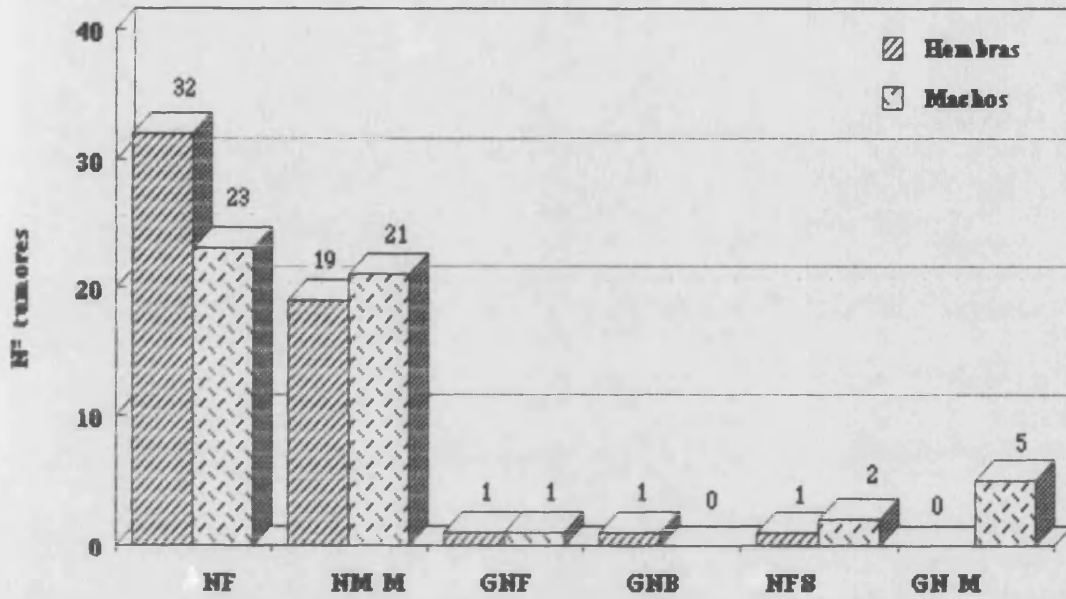


GRAFICA 7. TOTAL TSNP/TIPO HISTOLOGICO

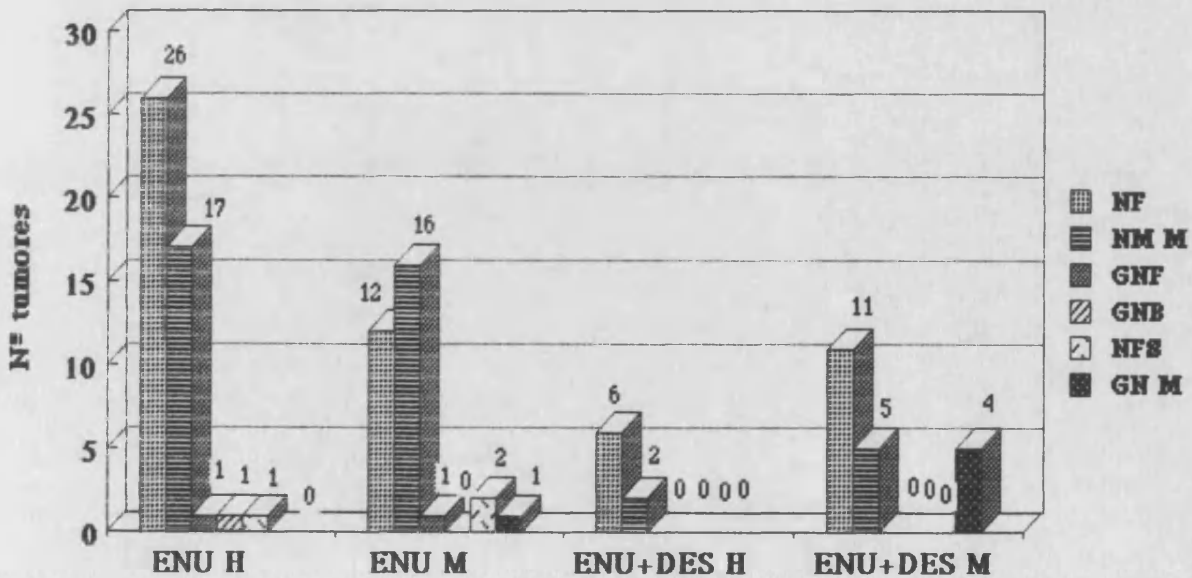




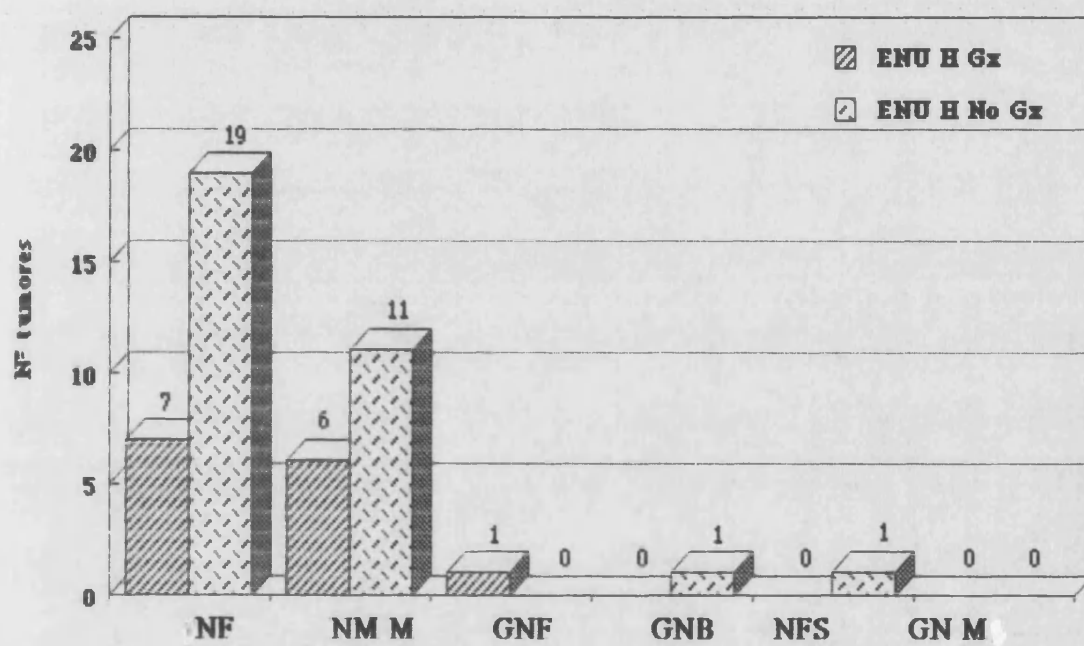
GRAFICA 8. TSNP/DISTRIBUCION SEXOS/TIPO HISTOLOGICO



GRAFICA 9. TSNP/HISTOLOGIA/GRUPO

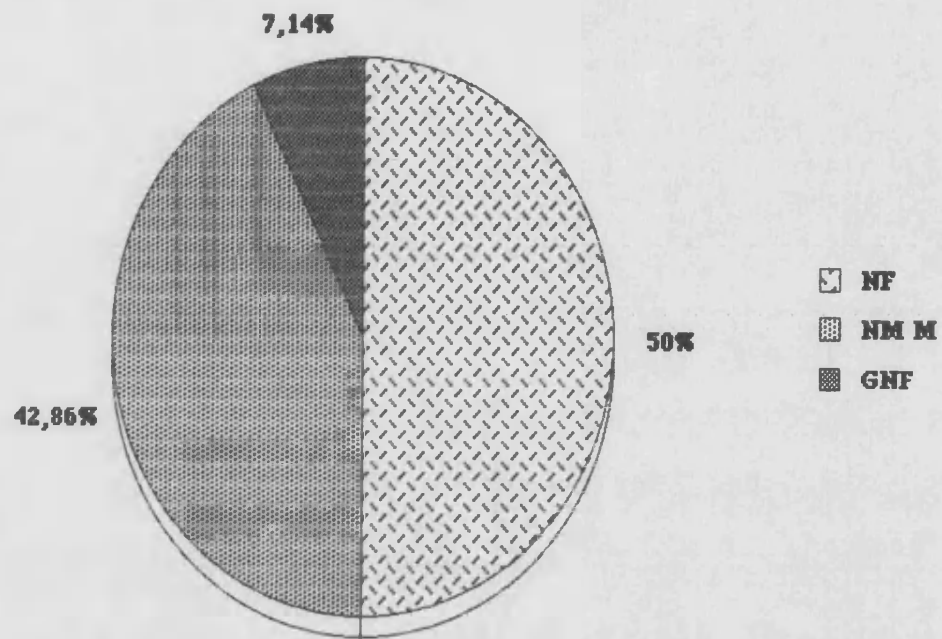


GRAFICA 10. INCIDENCIA TSNP ENU H Gx/No Gx

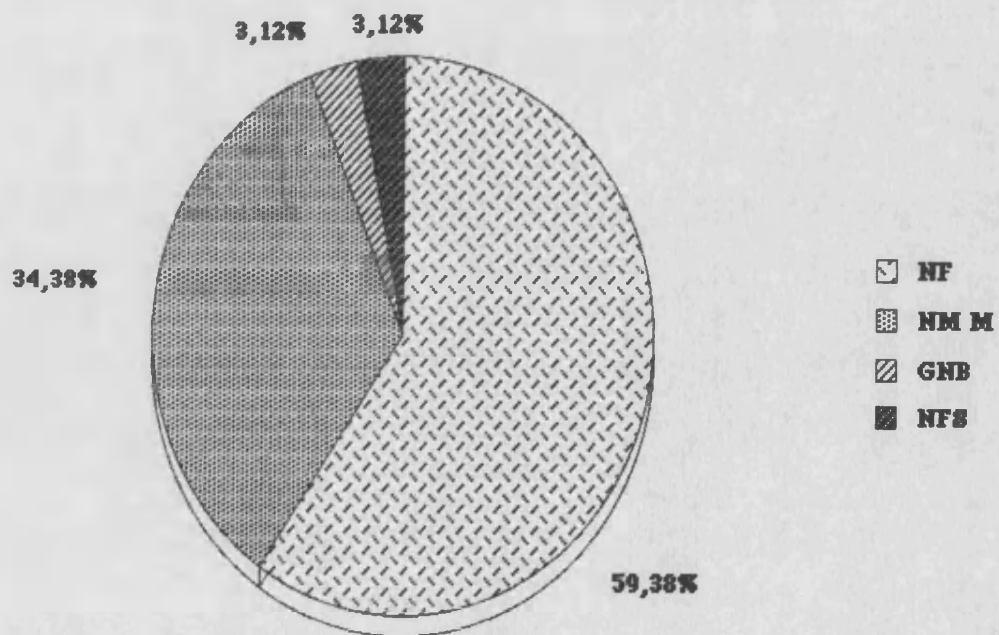




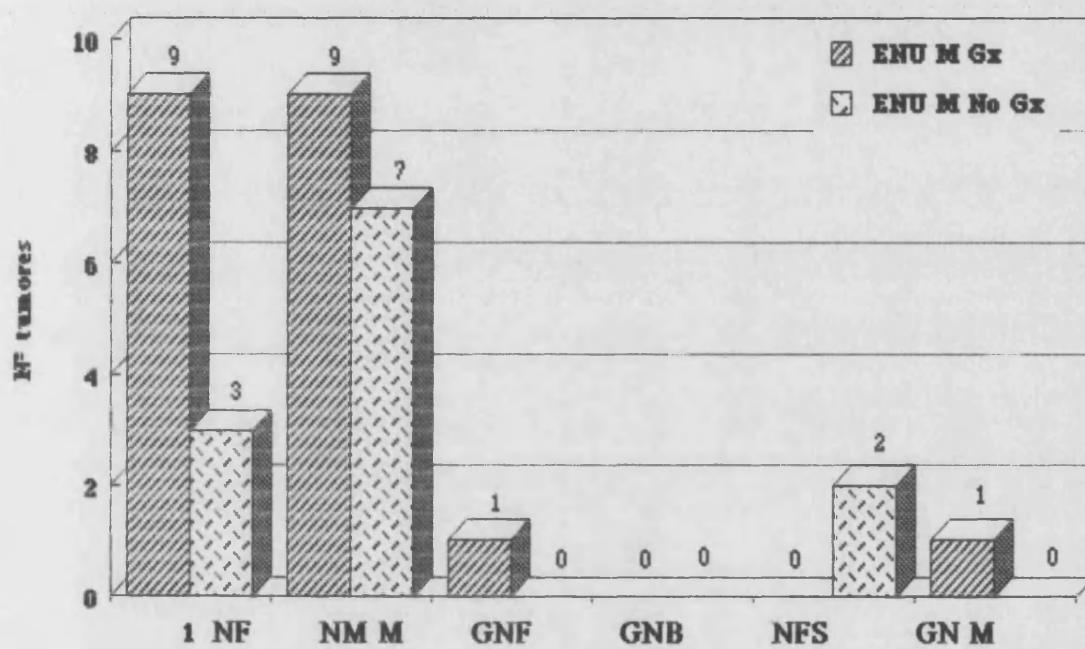
GRAFICA 11. INCIDENCIA TSNP/ENU H Gx



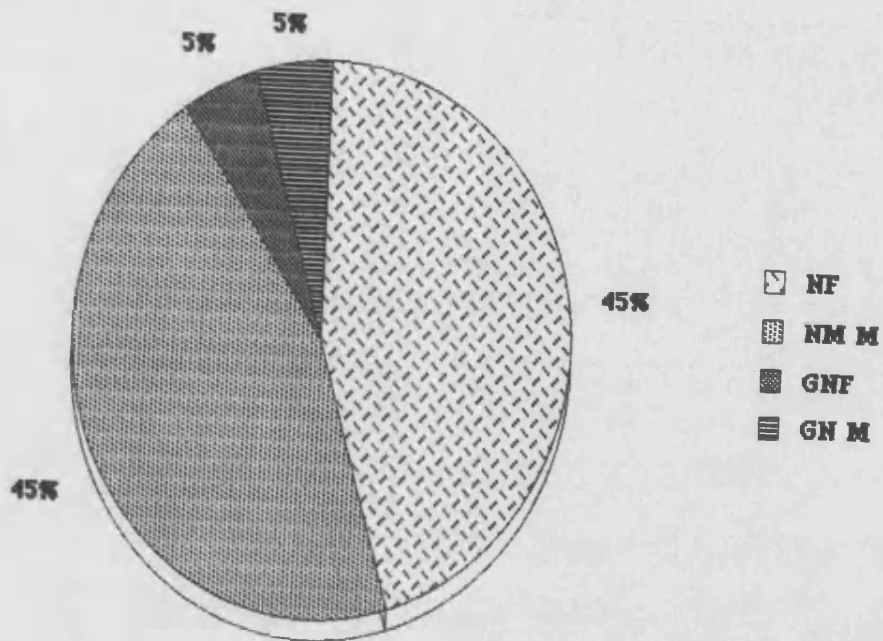
GRAFICA 11 (CONT). INCIDENCIA TSNP/ENU H No Gx



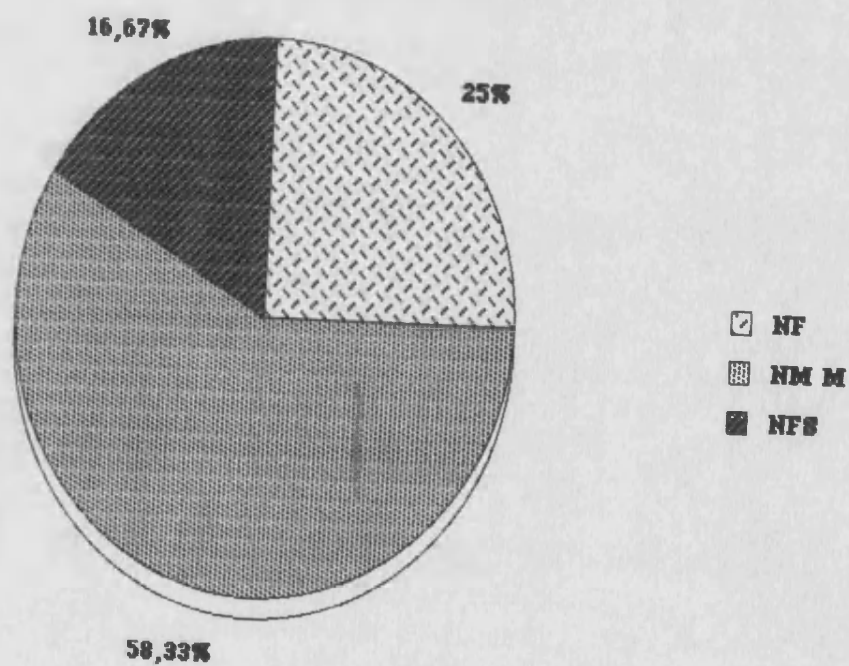
GRAFICA 12. INCIDENCIA TSNP ENU M Gx/No Gx



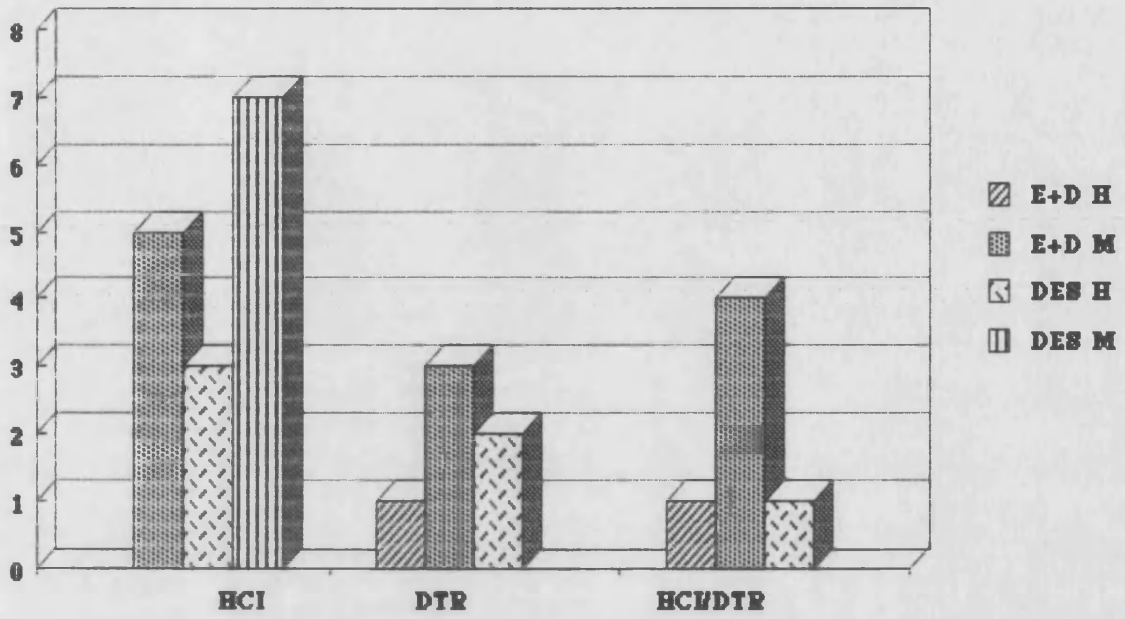
GRAFICA 13. INCIDENCIA TSNP/ENU M Gx



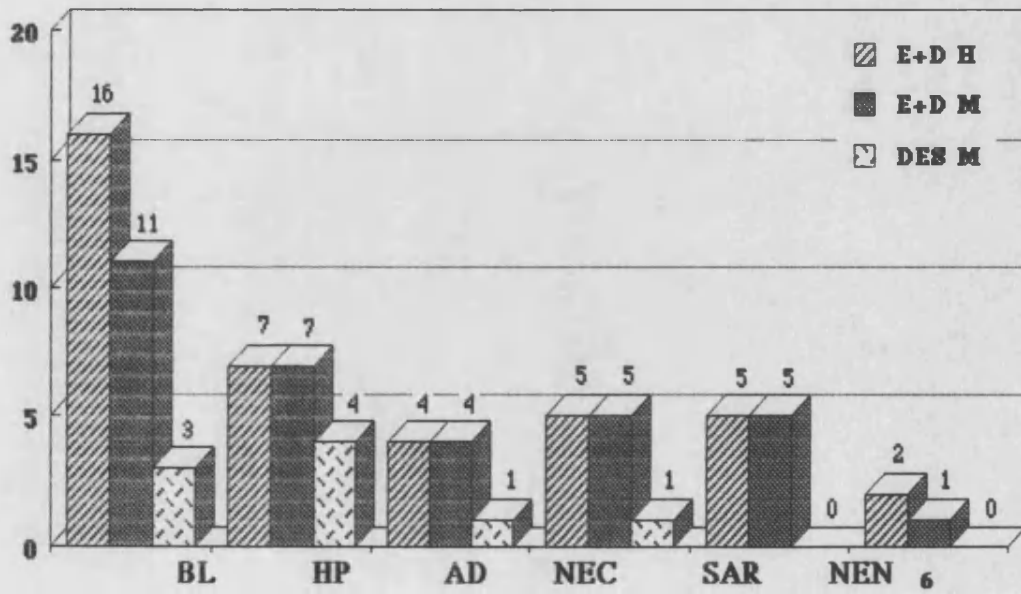
GRAFICA 13 (CONT). INCIDENCIA TSNP/ENU M No Gx



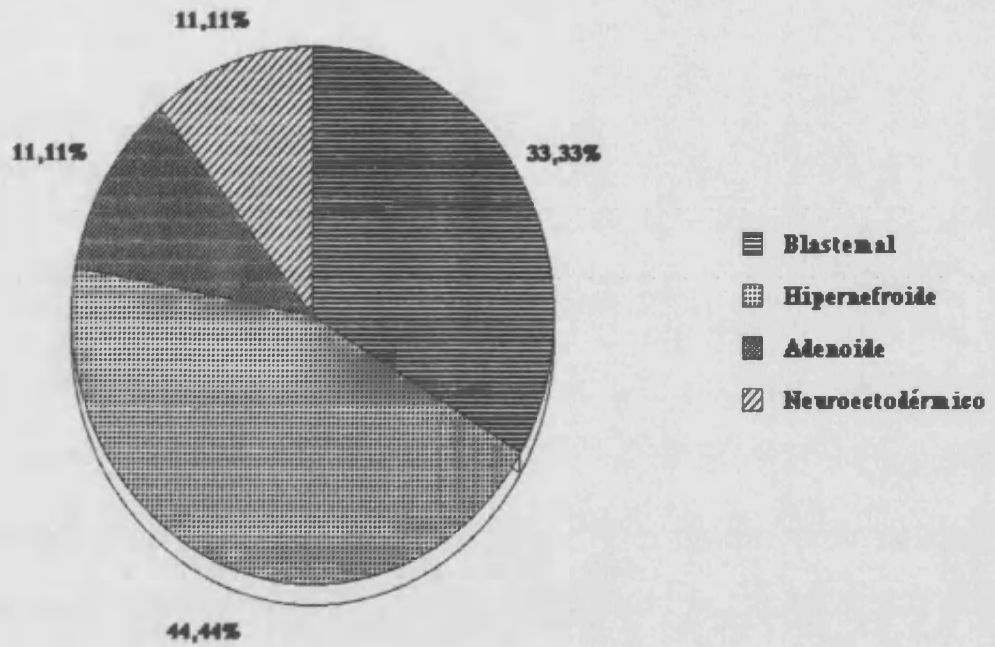
**GRAFICA 14. DISPLASIAS/GRUPO**



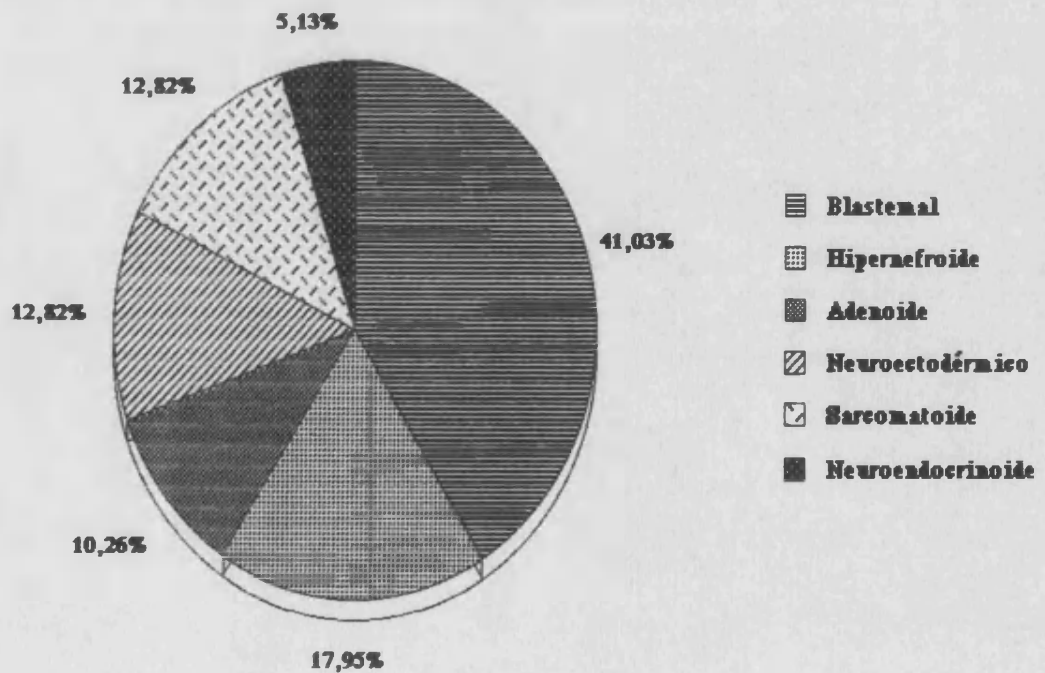
**GRAFICA 15. NEFROBLASTOMA-LIKE/PATRONES**



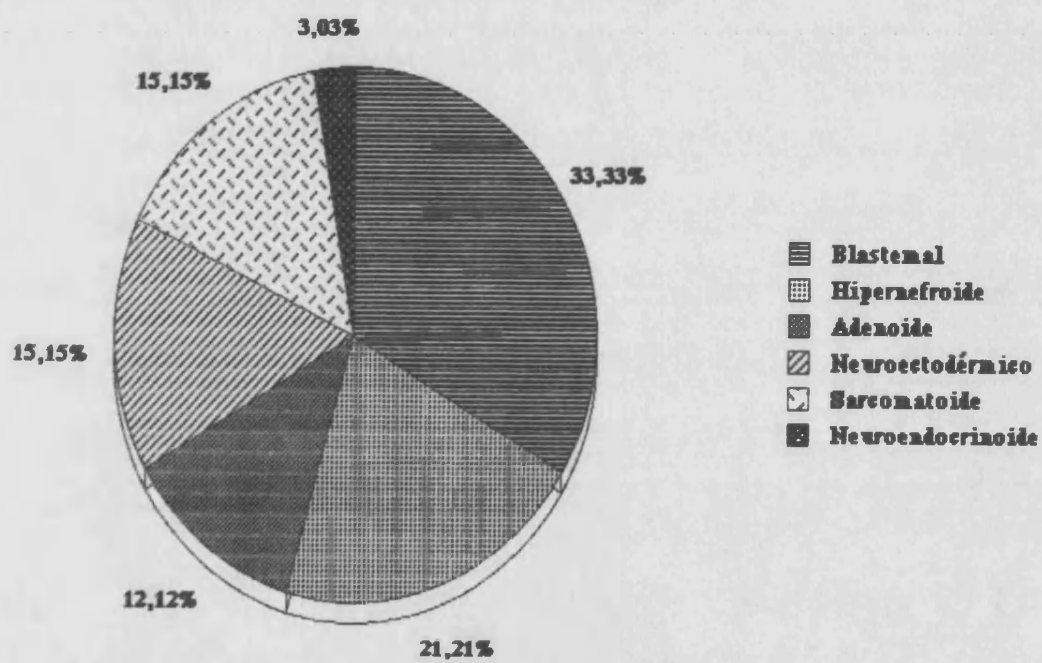
**GRAFICA 16. DES M/PATRONES NEFROBLASTOMA-LIKE**



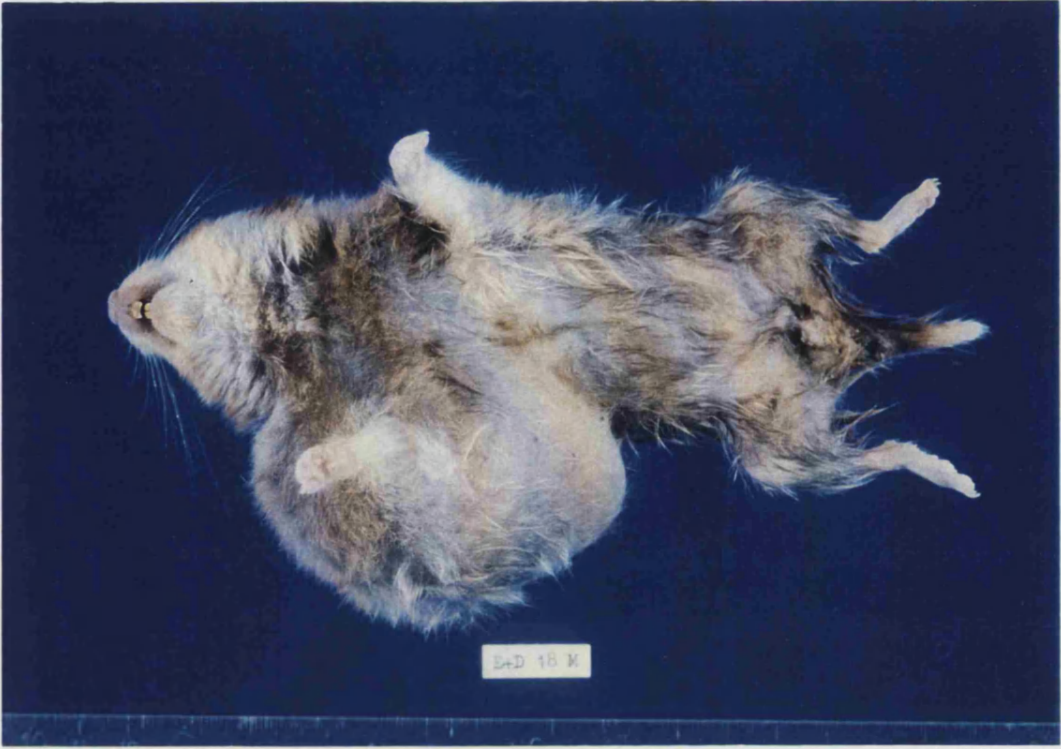
**GRAFICA 17. E+D H/PATRONES NEFROBLASTOMA-LIKE**



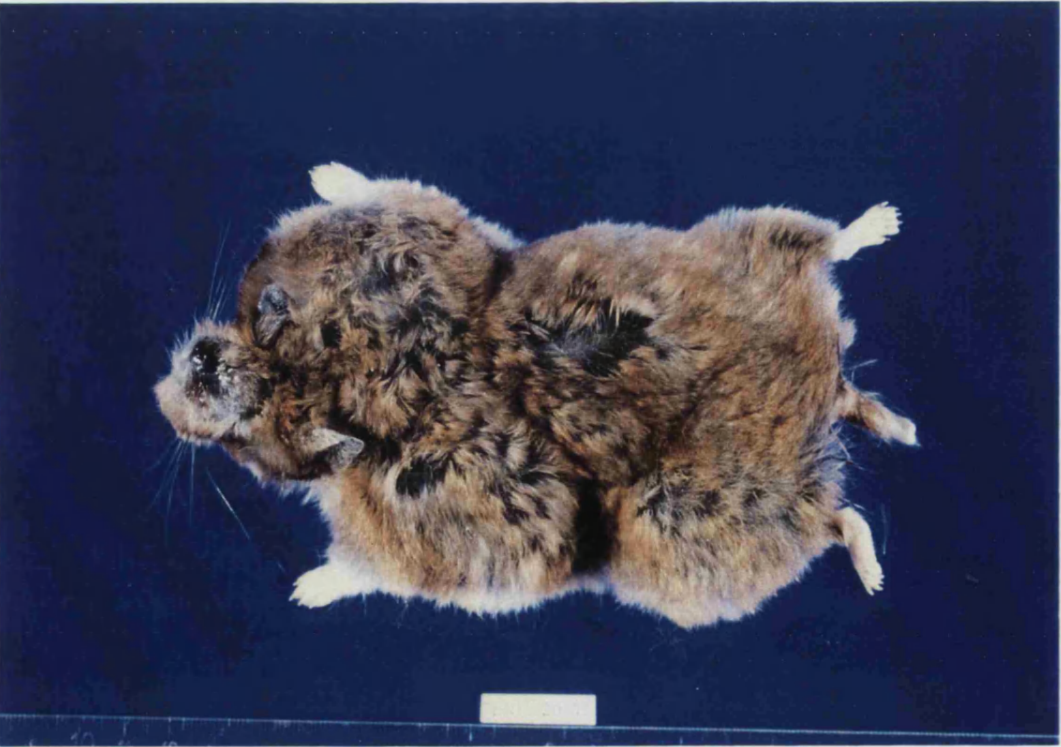
**GRAFICA 18. E+D M/PATRONES NEFROBLASTOMA-LIKE**







1



2

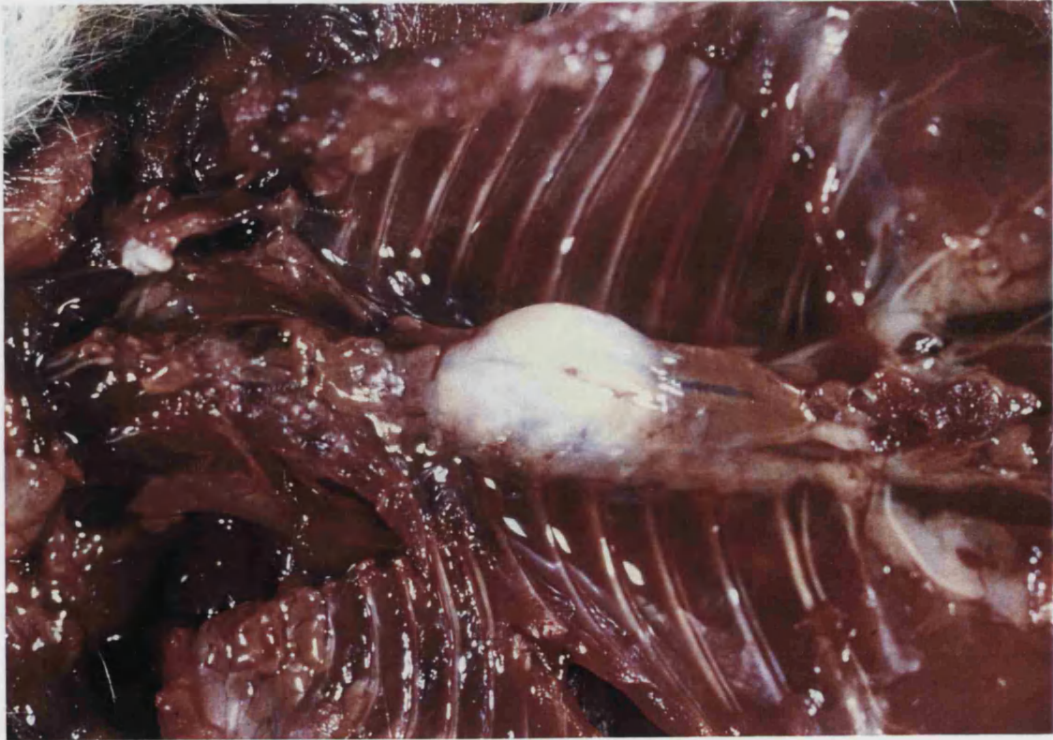
**Figura 1:** E+D 18 M. Tumoración neural subcutánea en pata anterior derecha.

**Figura 2:** ENU 22. Múltiples tumoraciones neurales subcutáneas en extremidades y dorso. Lesión cutánea pigmentada y ulcerada en cabeza.





3



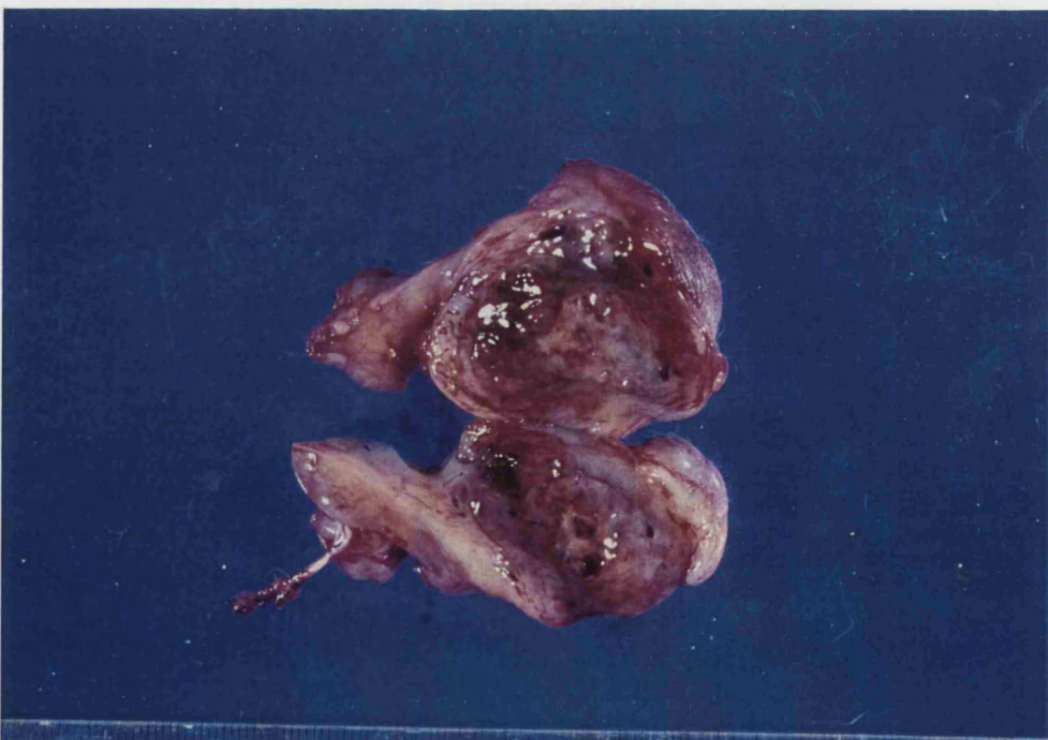
4

**Figura 3:** ENU 11. Nódulo subcutáneo bien delimitado, de coloración blanquecina y consistencia firme.

**Figura 4:** ENU 10. Neoformación localizada en mediastino posterior.



5A

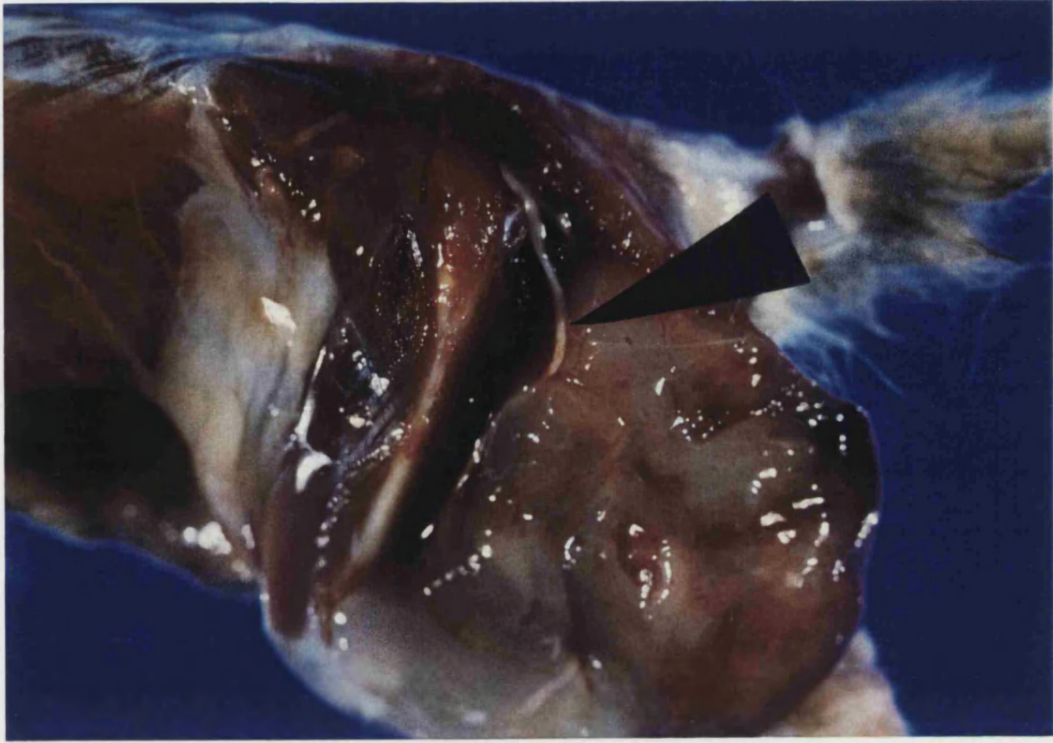


5B

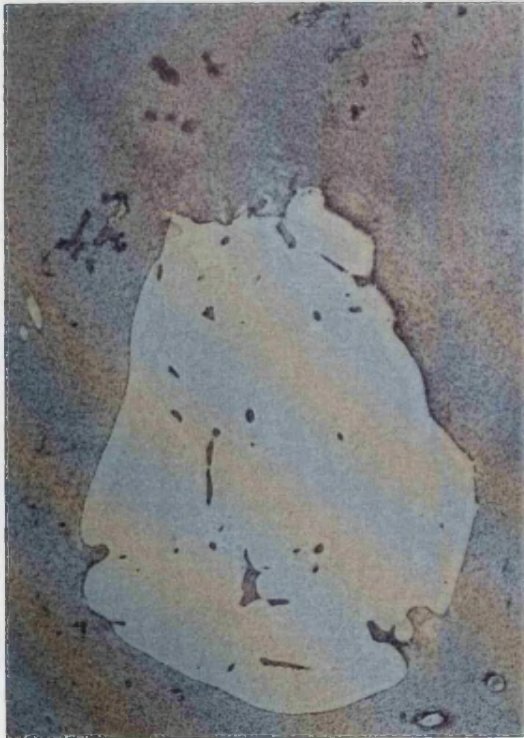
**Figura 5 A:** ENU 9 (Corresponde a ENU 10 H en protocolos). Tumoración en región axilar dependiente de plexo braquial.

**Figura 5 B:** Tumor neural maligno. Se observa rama nerviosa englobada por la tumoración. A la sección se aprecia áreas de necrosis, hemorrágicas y quísticas.





6



7

A



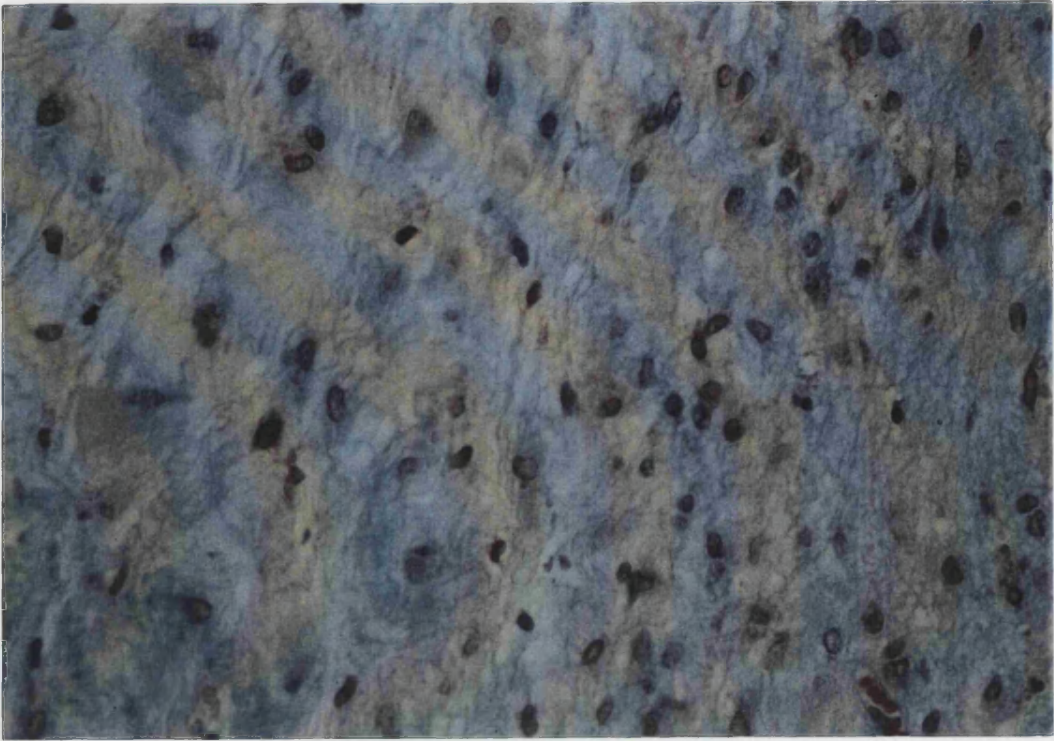
B

**Figura 6:** ENU 56. Tumoración de pata posterior izquierda dependiente del nervio ciático.

**Figura 7:** E+D 26 M. **A)** Neurofibroma dorsal subcutáneo.

La tumoración mostró áreas de degeneración quística.

H-E; x 4. **B)** El epitelio de revestimiento era plano o cúbico, conteniendo un material amorfo granular. H-E; x 10.



8



9

A

E+D 5

**Figura 8:** E+D 5H. Neurofibroma retroperitoneal.

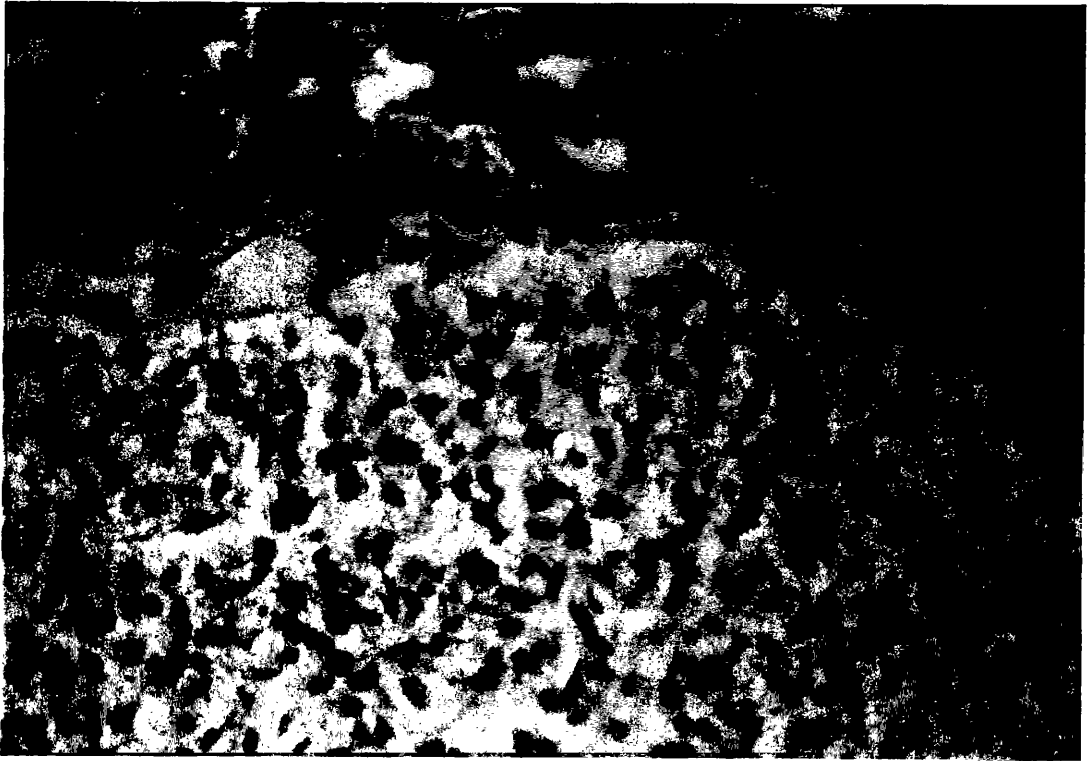
Tricrómico de Masson; x 25.

**Figura 9 A:** E+D 5H. Neurofibroma retroperitoneal.

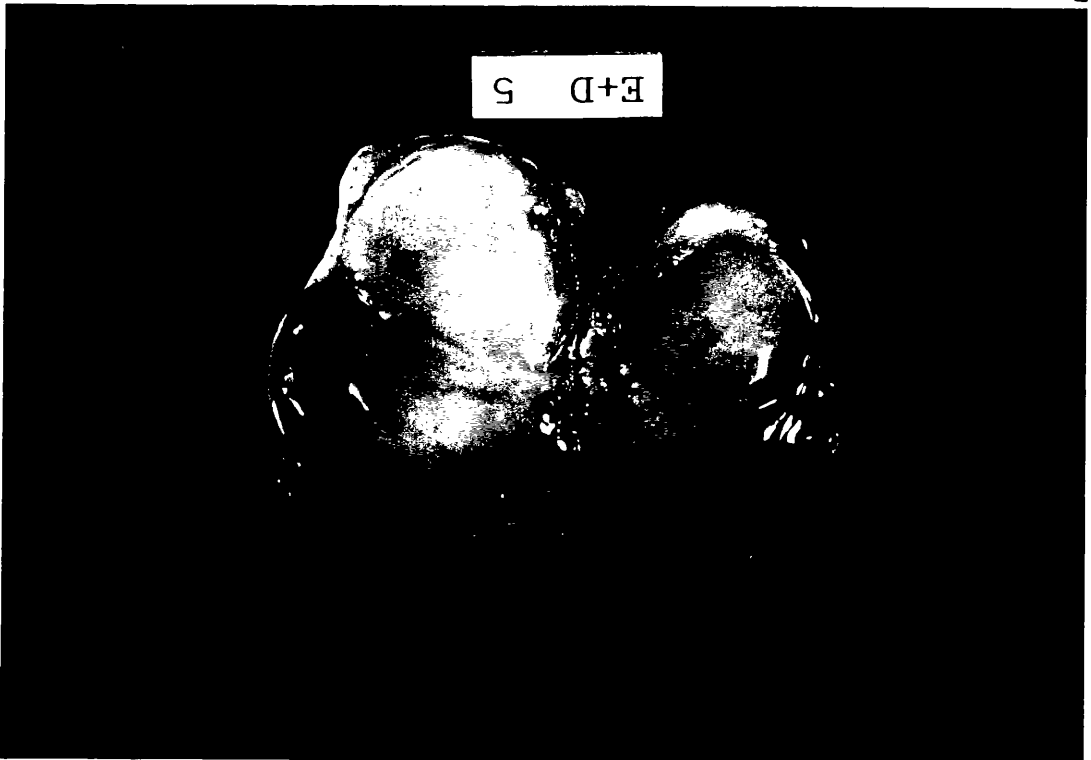
Tumoración que desplaza, sin infiltrar, riñón izquierdo,

dependiente de raíces lumbares.





10



B

9

**Figura 9 B:** E+D 5 H. Neurofibroma retroperitoneal.  
Neoformación de consistencia blanda, coloración blanco-  
grisácea mixoide.

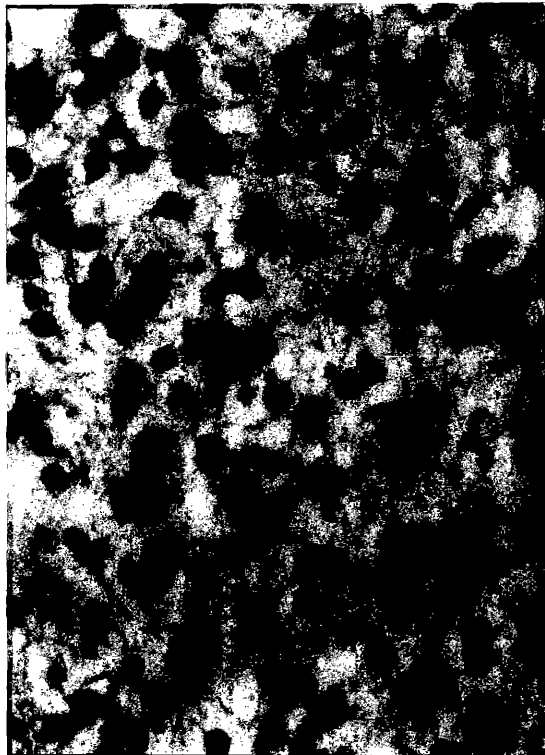
**Figura 10:** ENU 41. Metástasis hepáticas por neurinoma  
maligno. H-E; x 25.



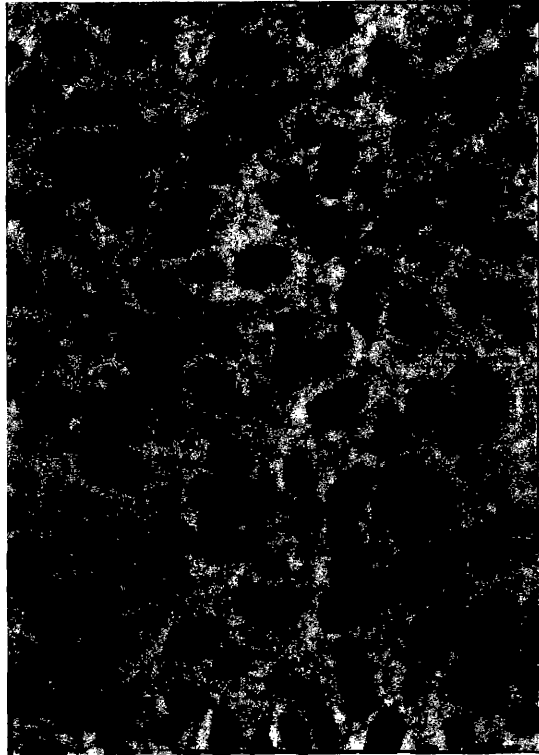
A



C



B

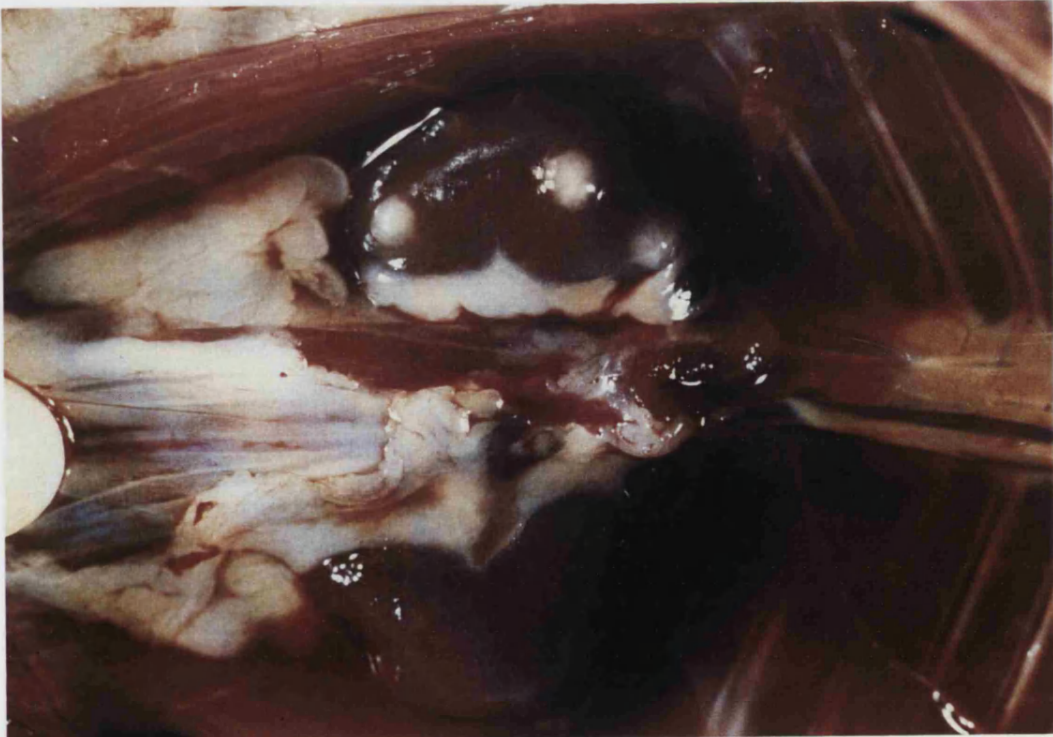


D

**Figura 11: ENU 56. Neurofibroma maligno. A)**  
Tumoración encapsulada con áreas celulares, mixoides y  
quísticas. H-E; x4. **B)** Areas con predominio de matriz  
extracelular y moderada celularidad con citoplasma eosinófilo.  
**C)** Area densamente celular con moderado pleomorfismo  
celular y nuclear, formación de rosetas. H-E; x40 **D)**  
Células neoplásicas PAS+. PAS; x 50.



12  
A



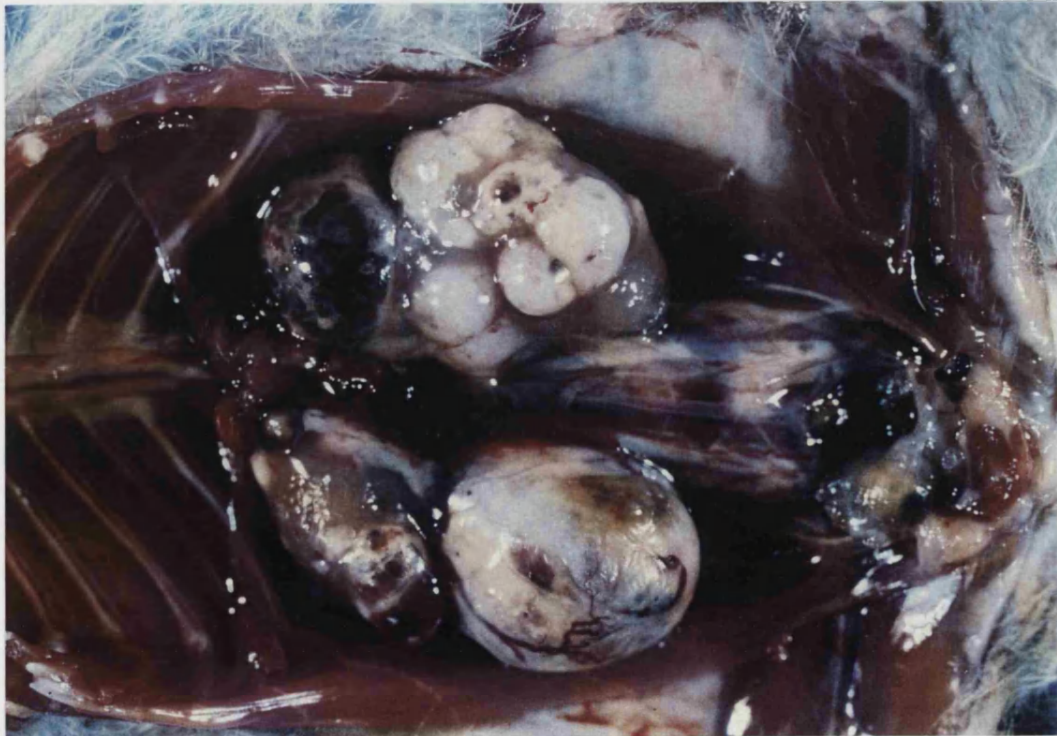
12  
B

**Figura 12:** DES 24 M. **A)** Fase macroscópica precoz de "tumores pequeños" renales. **B)** Detalle de cavidad abdominal. Riñón derecho con 3 pequeños nódulos tumorales bien delimitados, blanquecinos.





13  
A



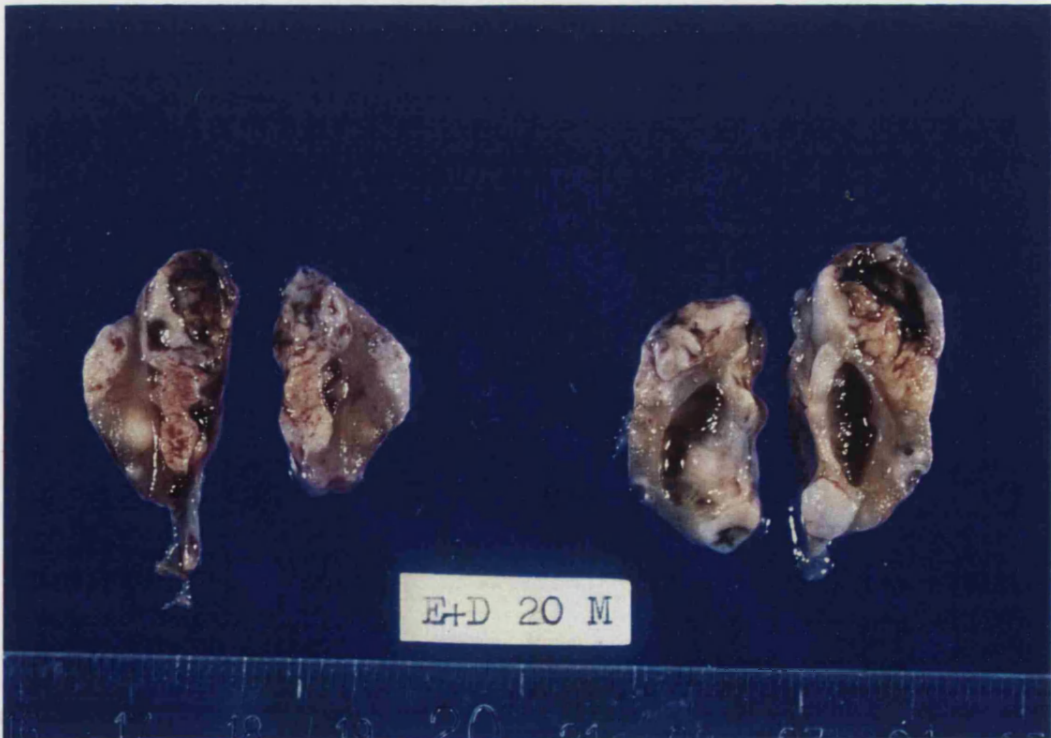
13  
B

**Figura 13:** E+D 19 M. **A)** Fase macroscópica avanzada de "tumores grandes". **B)** Detalle de cavidad abdominal mostrando ambos riñones aumentados de tamaño y deformados con aspecto polilobulado.



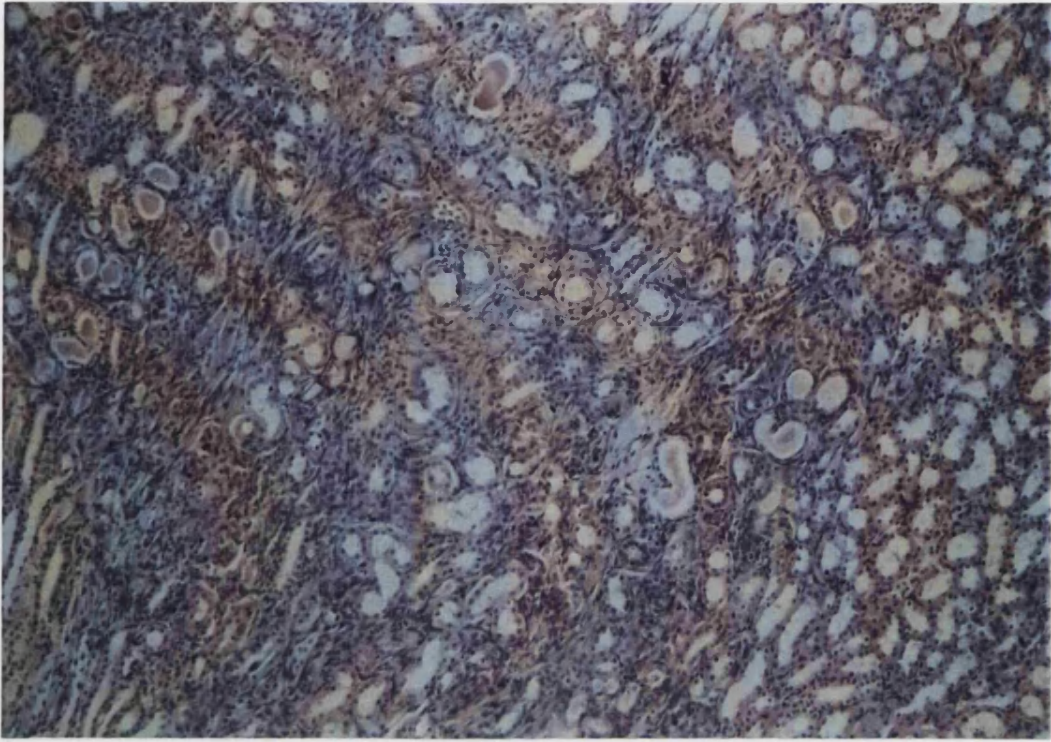


14  
A

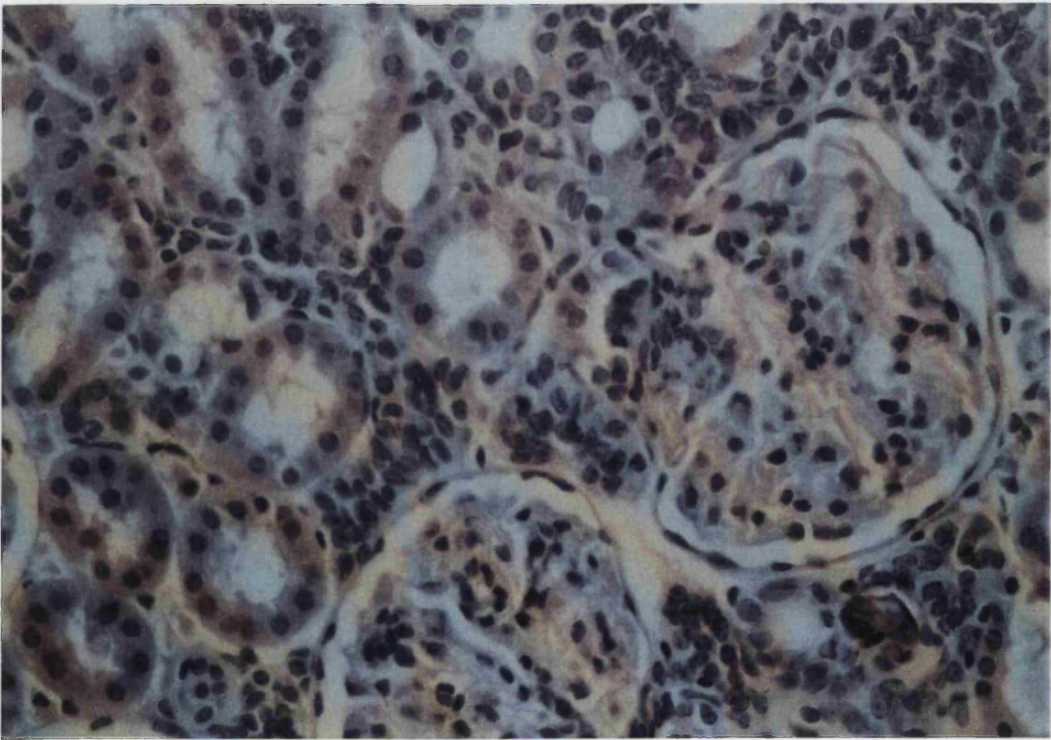


14  
B

**Figura 14:** E+D 20 M. **A)** Fase tardía de crecimiento tumoral renal con quistificación y confluencia de nódulos tumorales. **B)** A la sección se observa claramente las áreas de necrosis, hemorragia y quistificación.



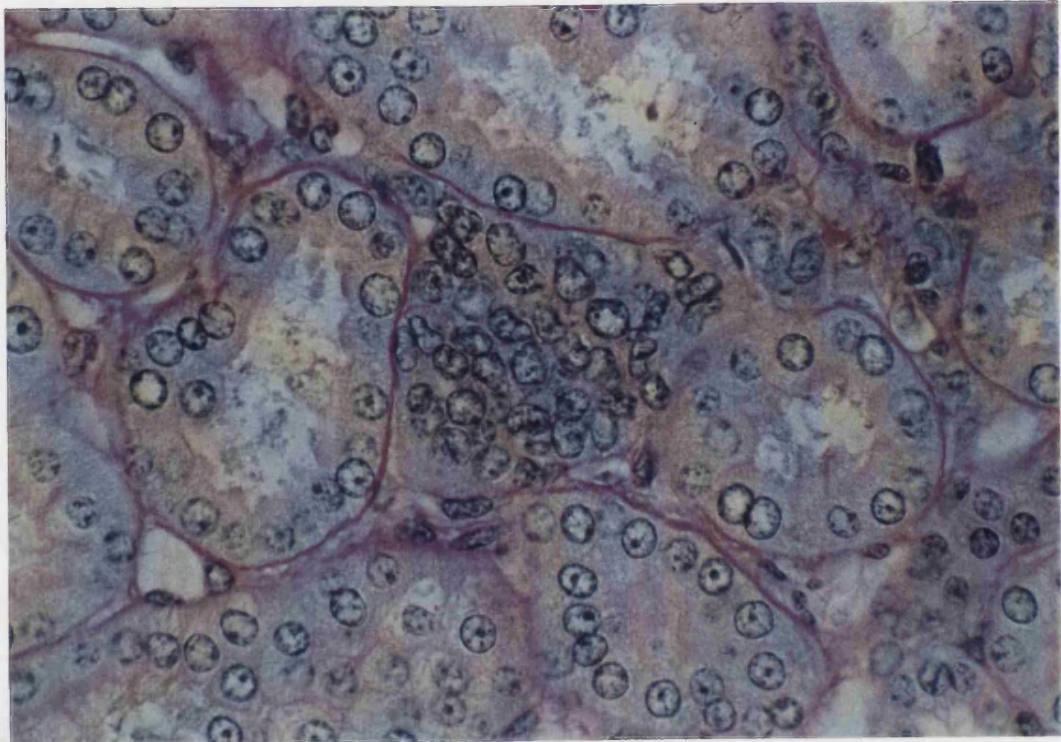
15  
A



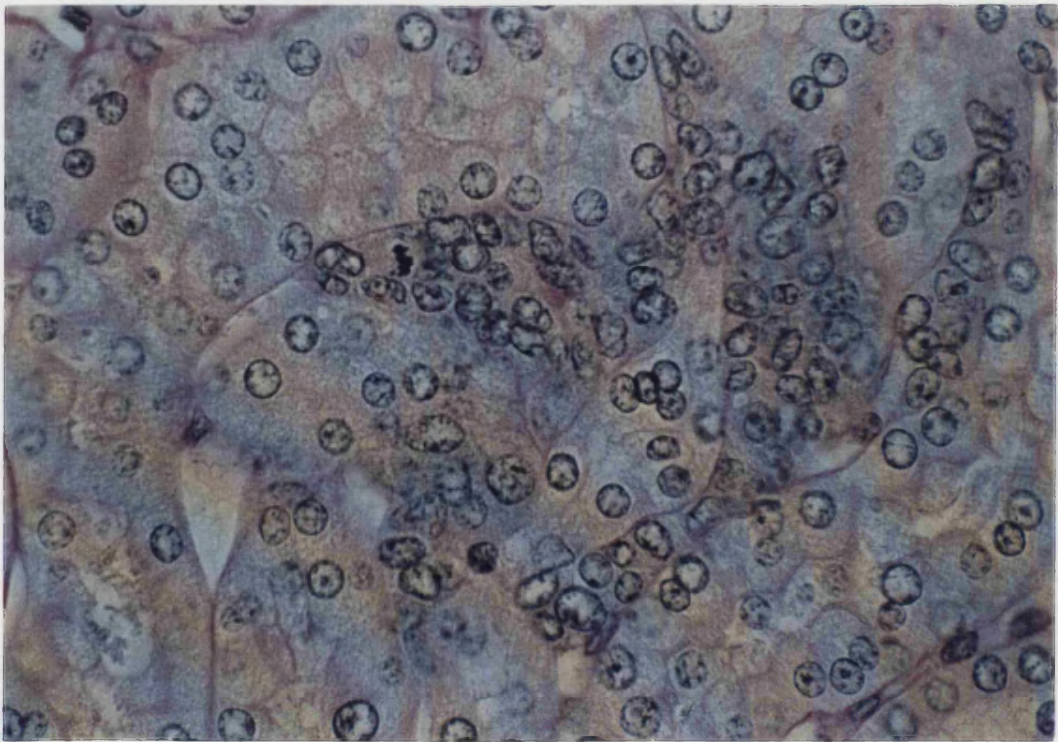
15  
B

**Figura 15:** E+D 26 M. **A)** Hiperplasia de células intersticiales a nivel medular renal. H-E; x 10. **B)** Hiperplasia de células intersticiales periglomerular. H-E; x 25.





16  
A

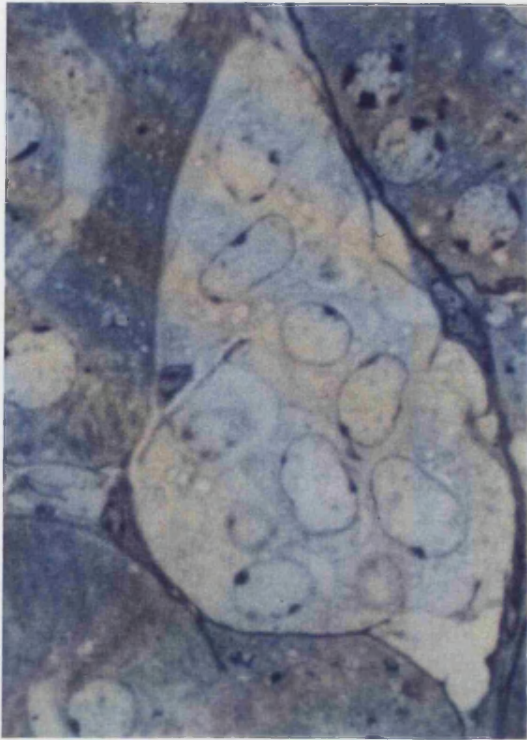


16  
B

**Figura 16:** DES 17 M. **A)** Hiperplasia de células intersticiales PAS-, formando un nido sólido. PAS; x 50.

**B)** Pequeños cordones sólidos de células intersticiales, observándose una mitosis y pequeños nucleolos. PAS; x 50.



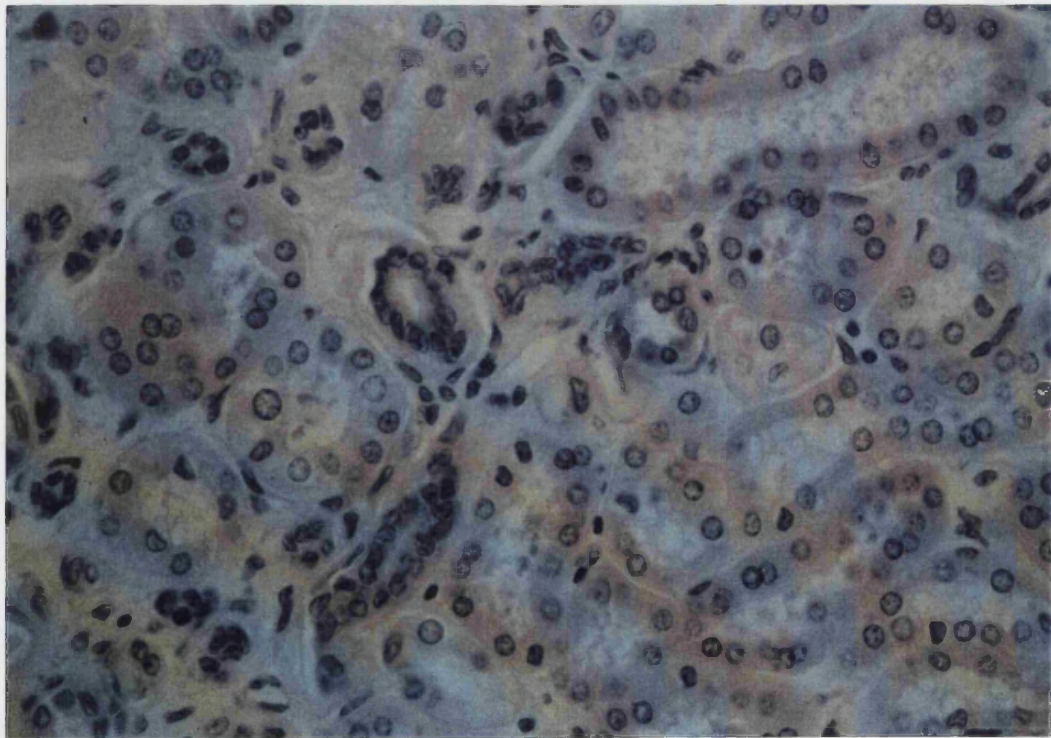


17

A



B

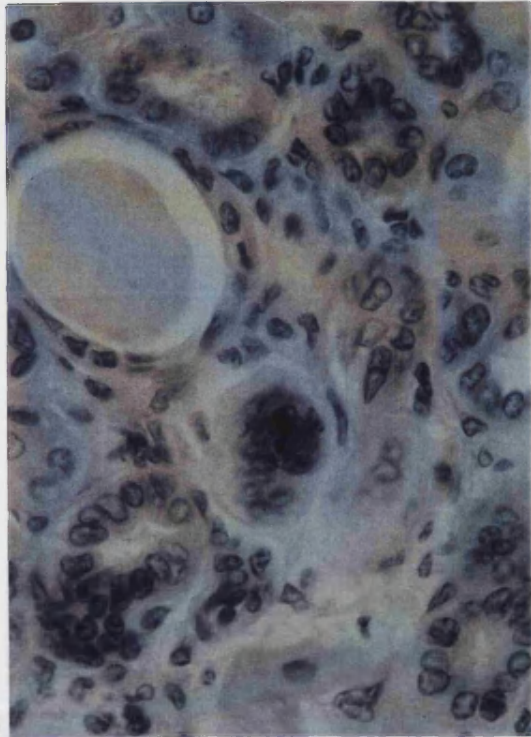


18

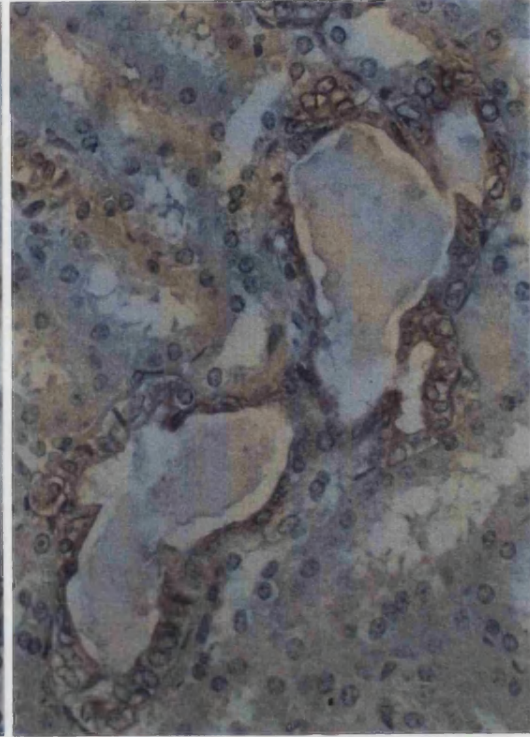
**Figura 17:** Hiperplasia células intersticiales. **A)** DES 17 M. Corte semifino. Nido de células indiferenciadas de citoplasma pálido localizadas en el espacio intertubular. Azul de toluidina; x 100. **B)** E+D 5 H. Hiperplasia de células intersticiales mostrando positividad nuclear y citoplásmica a la proteína S-100. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 25.

**Figura 18:** ENU 44 H. Area de displasia tubular renal en hámster intoxicado con etilnitrosourea. H-E; x 25.

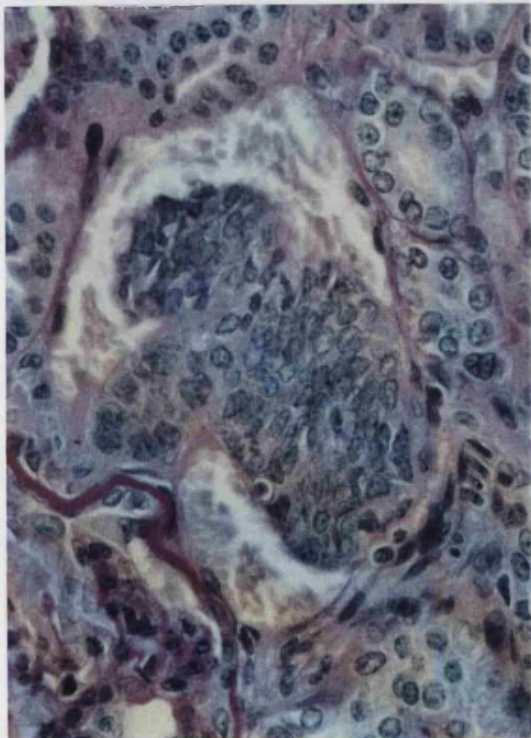




19

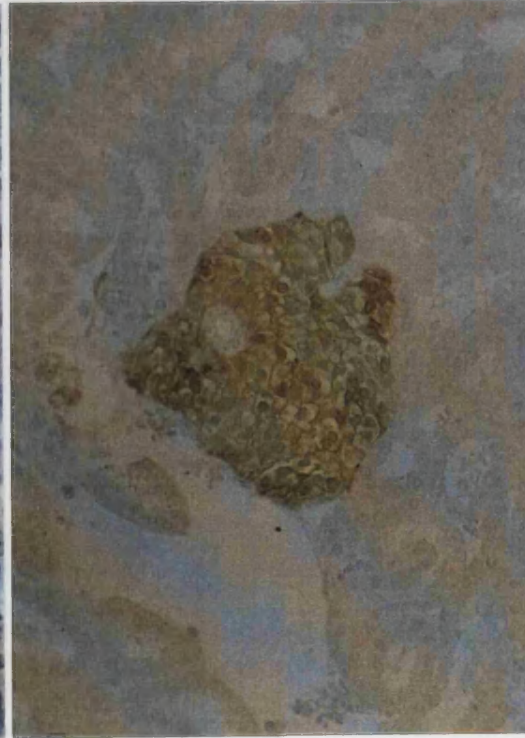


20



21

A



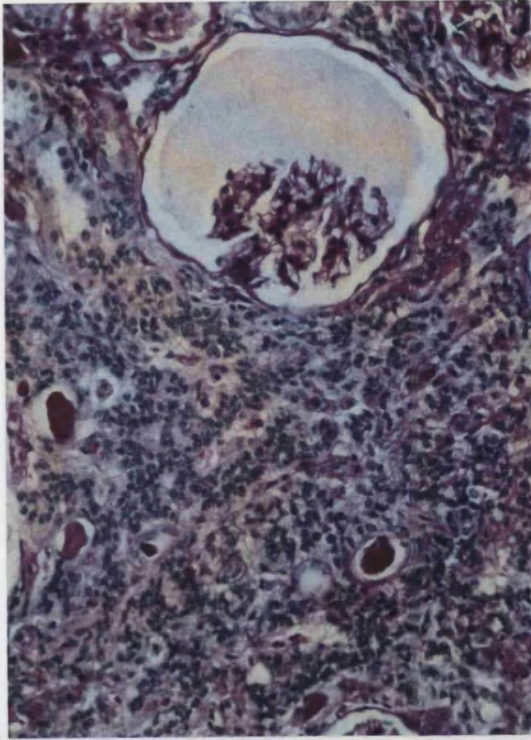
B

**Figura 19:** ENU 44 H. Displasia tubular con reducción del tamaño de los túbulos y aumento de la relación nucleocitoplásmica. H-E; x25.

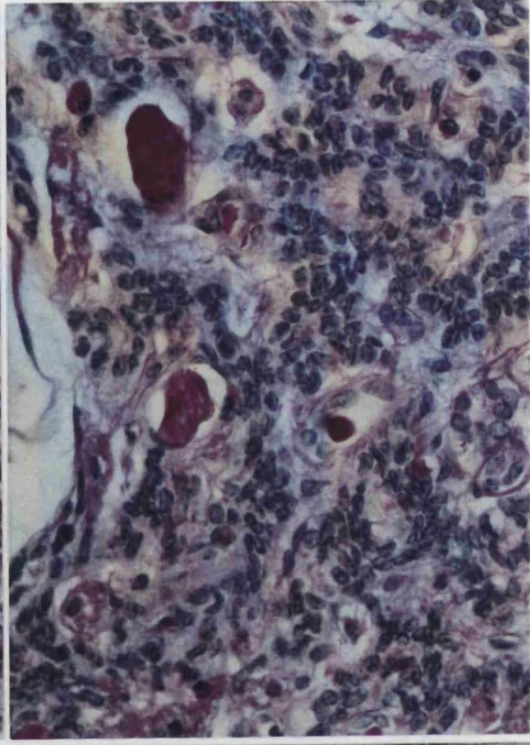
**Figura 20:** E+D 2 H. Displasia tubular con quistificación y positividad del epitelio a la queratina policlonal. Fosfatasa alcalina; x 25.

**Figura 21:** Tumoriets. **A)** E+D 5 H. Tumorlet perivascular constituido por células indiferenciadas de escaso citoplasma. PAS; x 25. **B)** E+D 6 H. Tumorlet intensamente positivo frente a la proteína S-100 (nuclear y citoplásmica). Peroxidasa-antiperoxidasa; x 16.

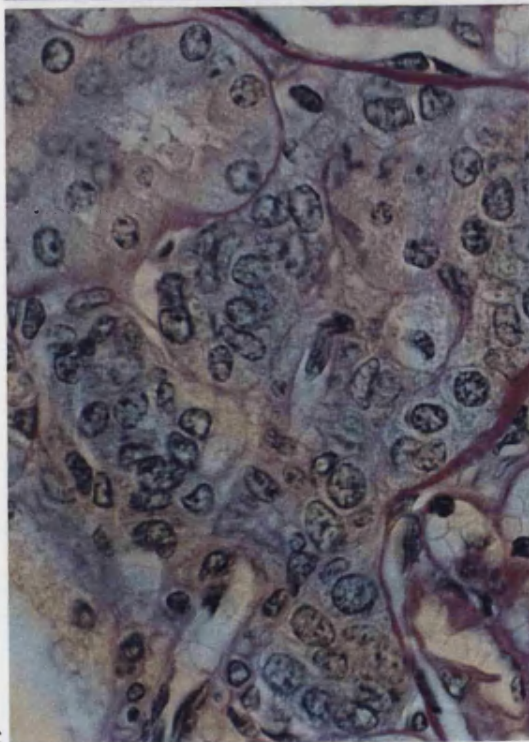




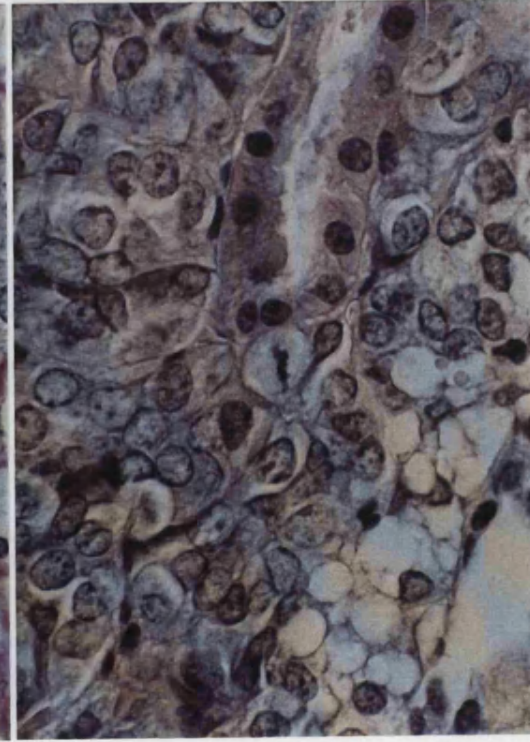
A



B



C



D

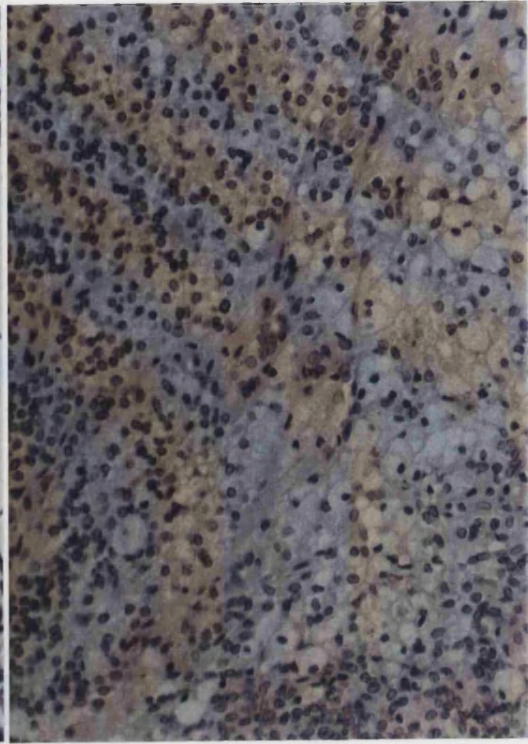
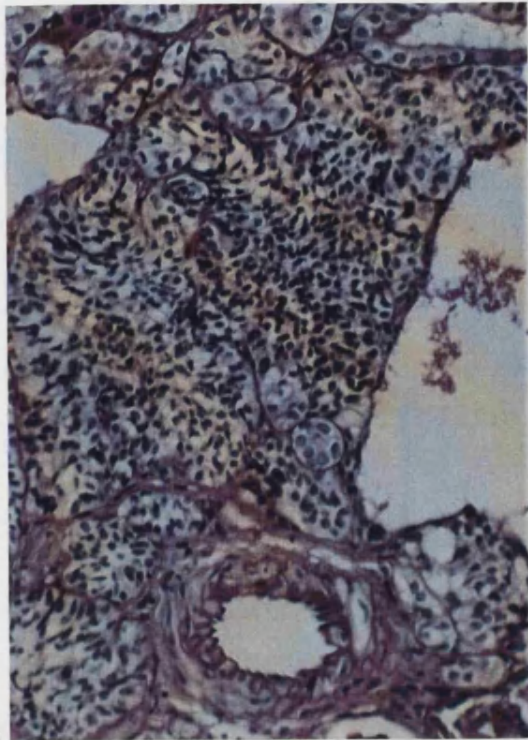
**Figura 22: Tumor nefroblastoma-like. Patrón blastemal.**

**A) E+D 26 H.** Nidos y cordones sólidos de células pequeñas indiferenciadas de localización periglomerular. PAS; x 10.

**B) E+D 26 H.** Patrón blastemal tumoral con englobamiento y colapso de estructuras tubulares. PAS; x 25. **C) DES 17 M.** Nidos y cordones de células indiferenciadas localizadas en el intersticio renal con escaso citoplasma. PAS; x 50. **D) E+D 20 M.** Area tumoral con tumoración blastemal-hiper nefroide.

H-E; x 16

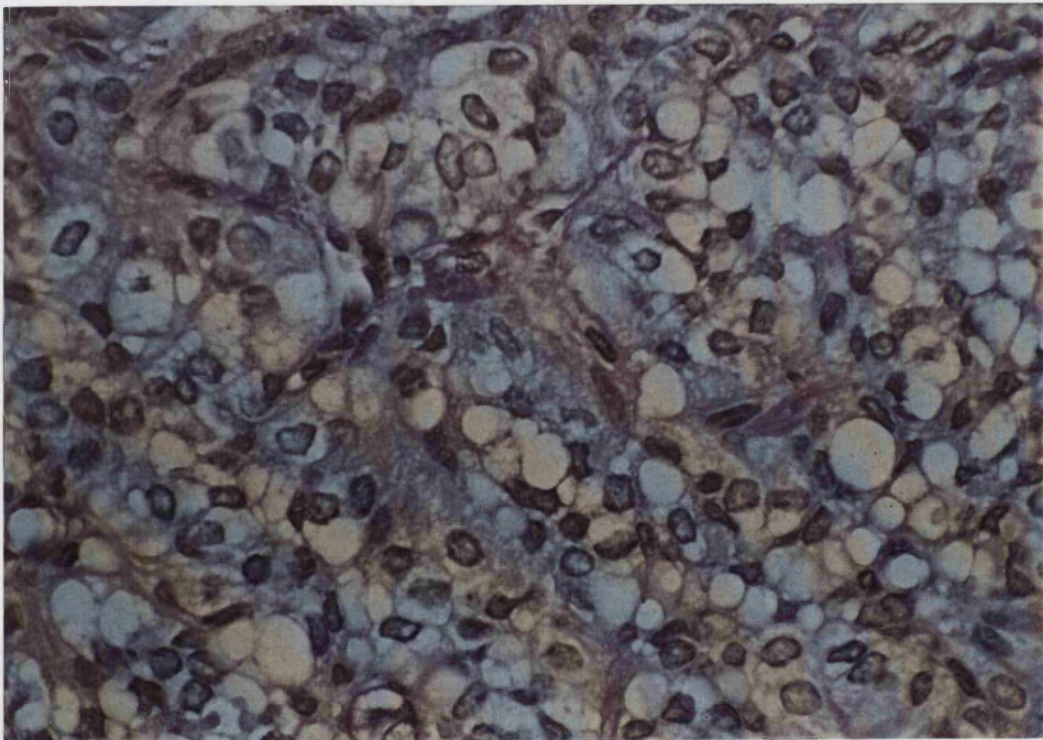




A

B

23



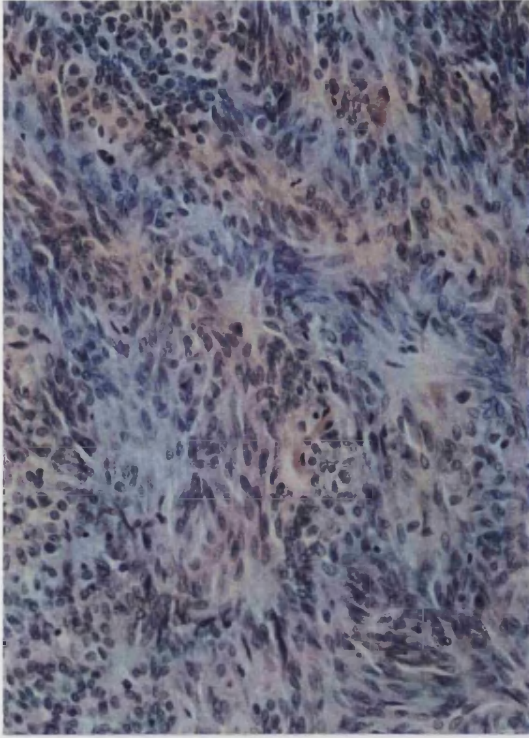
24

**Figura 23:** Patrón hipernefroide. **A)** E+D 13 H. Nidos sólidos de células de citoplasma claro PAS-. PAS; x 16.

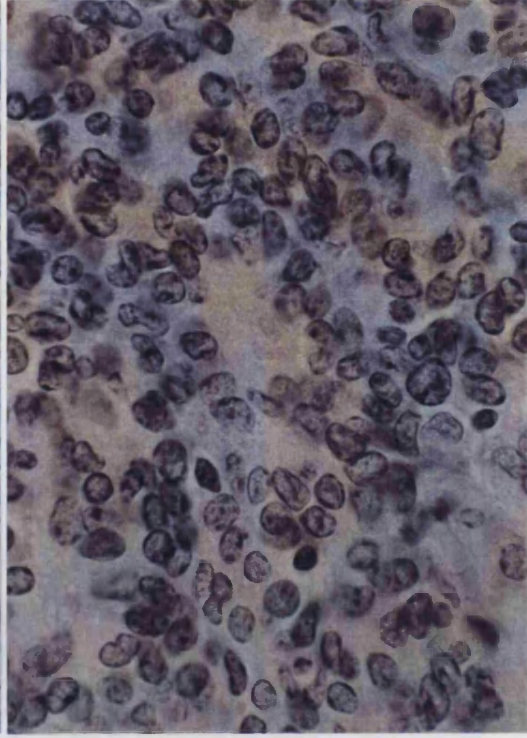
**B)** E+D 19 H. Area sólida hipernefroide. H-E; x 16

**Figura 24:** DES 11 M. Patrón hipernefroide con formación de luces y negatividad al PAS. PAS; x 50.

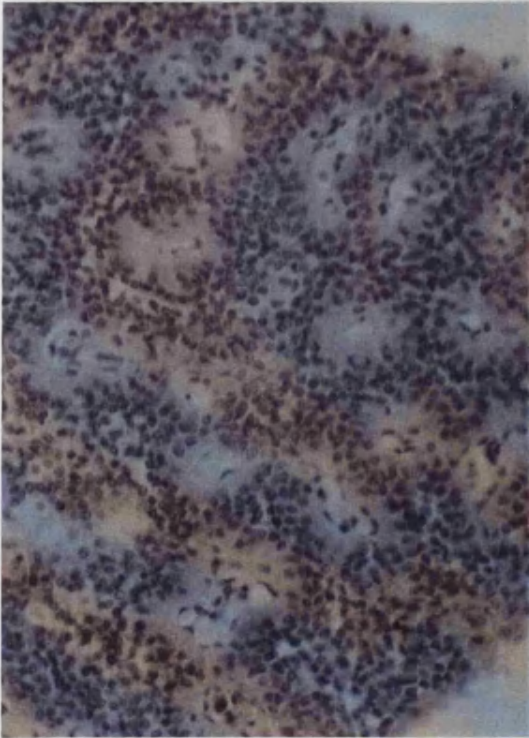




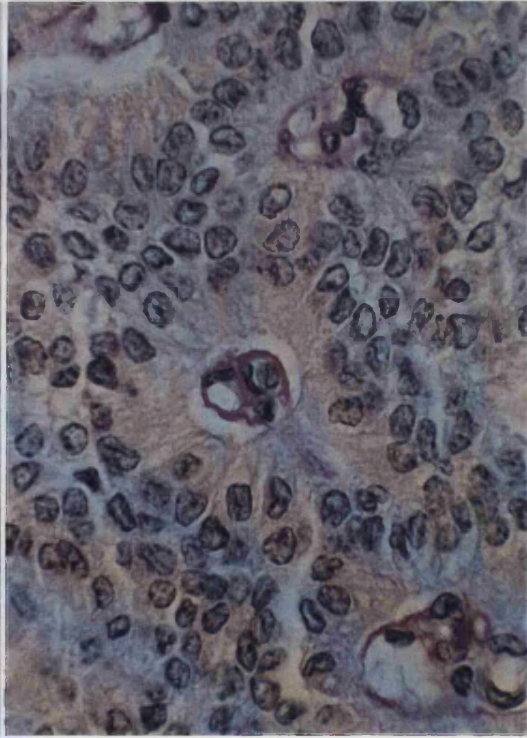
A



B



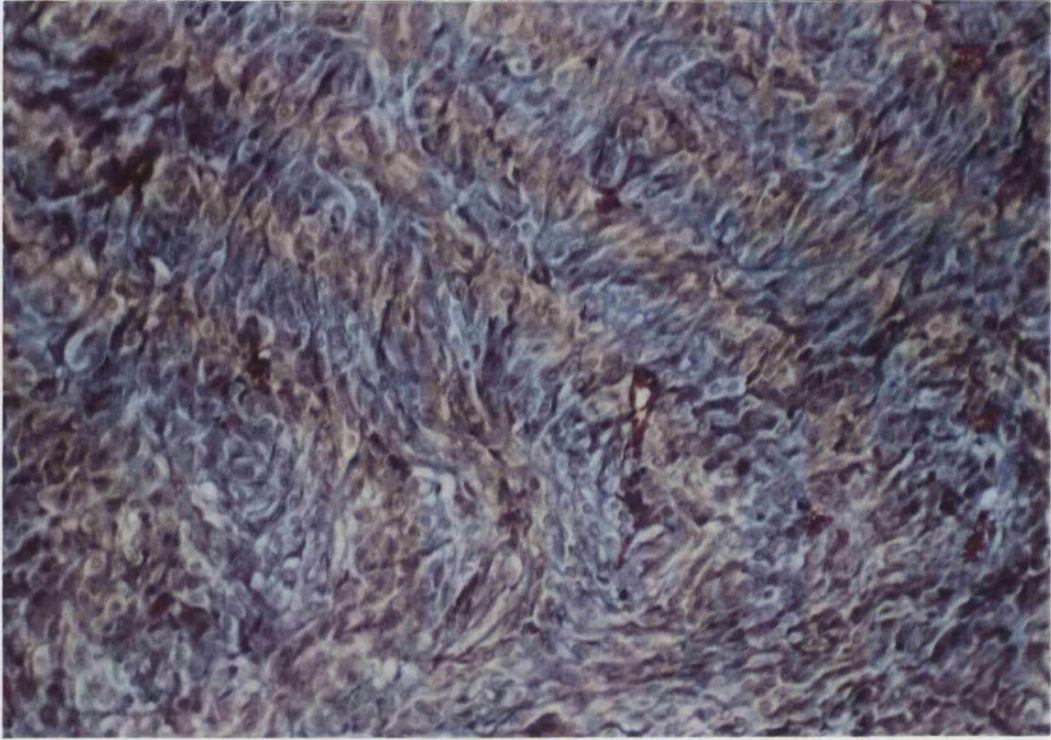
C



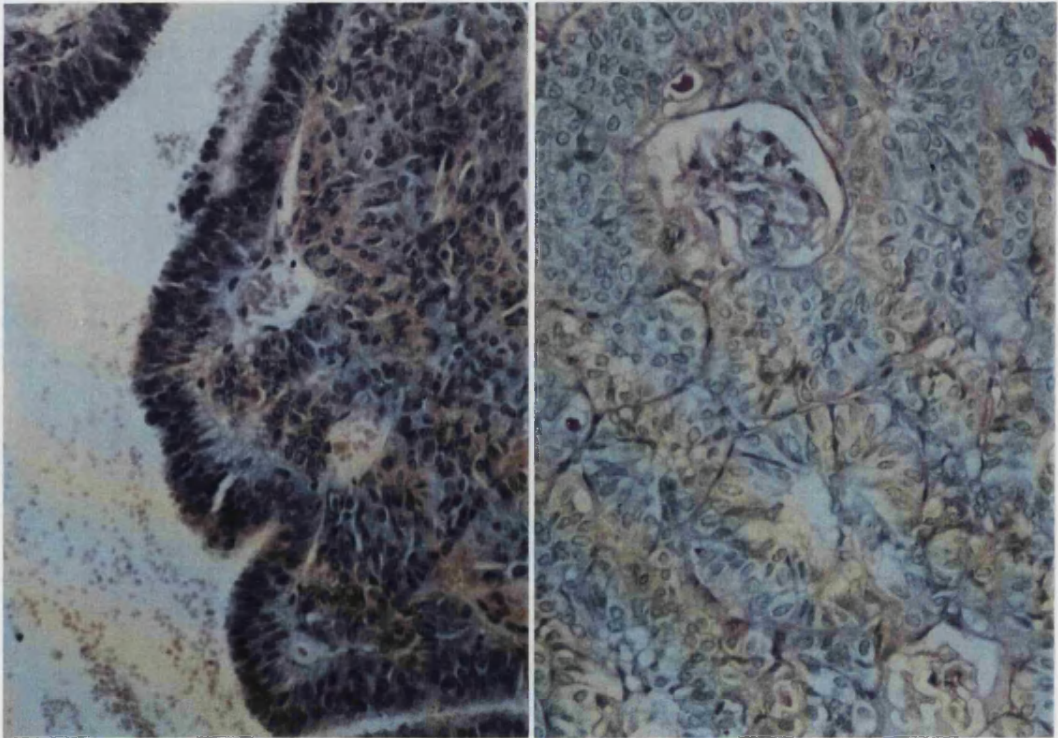
D

**Figura 25:** Tumor nefroblastoma-like. Patrón neuroectodérmico. **A)** E+D 4 H. Células alargadas, fusiformes con formación de rosetas. H-E; x 16. **B)** E+D 19 H. Rosetas. H-E; x 50. **C)** E+D16 H. Pseudorrosetas perivasculares. H-E; x 16. **D)** E+D 16 H. Detalle de pseudorrosetas perivasculares. PAS; x 50.





26



A

27

B

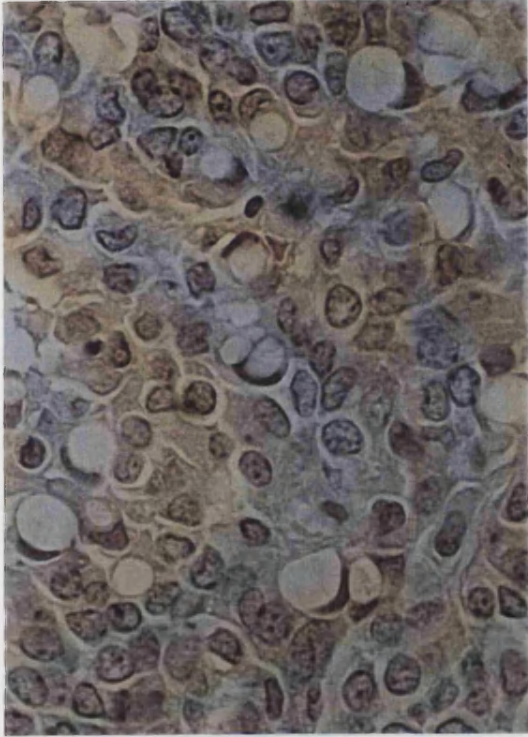
**Figura 26:** E+D 4 H. Tumor nefroblastoma-like. Patrón sarcomatoide. Células fusiformes irregularmente distribuidas.

Tricrómico de Masson; x 16.

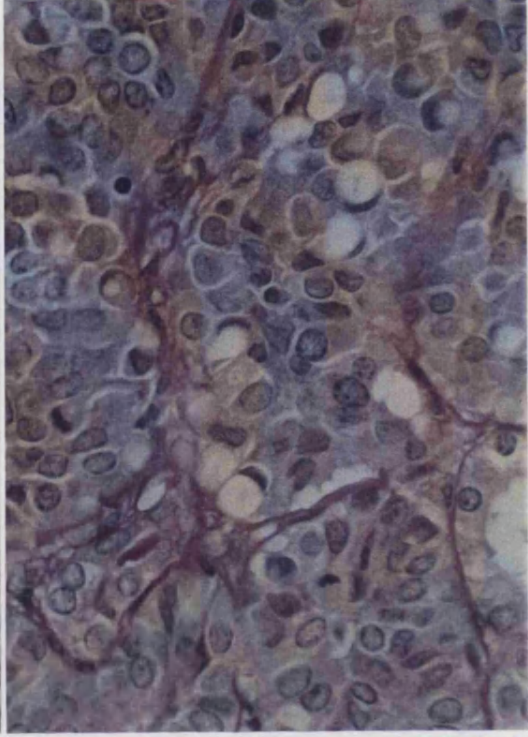
**Figura 27:** Tumor nefroblastoma-like. Patrón adenoide. **A)** E+D 19 M. Area quística tapizada por epitelio estratificado.

H-E; x 16. **B)** E+D 5 H. Formación de estructuras pseudotubulares. PAS; x 16.

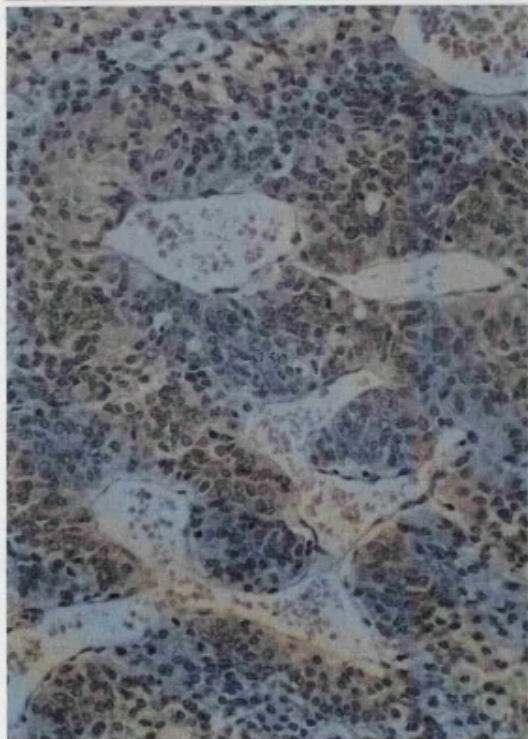




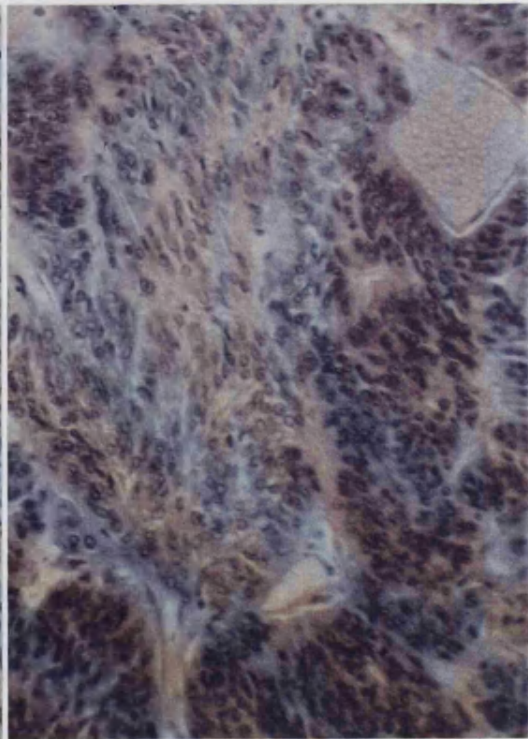
28A



B



29A

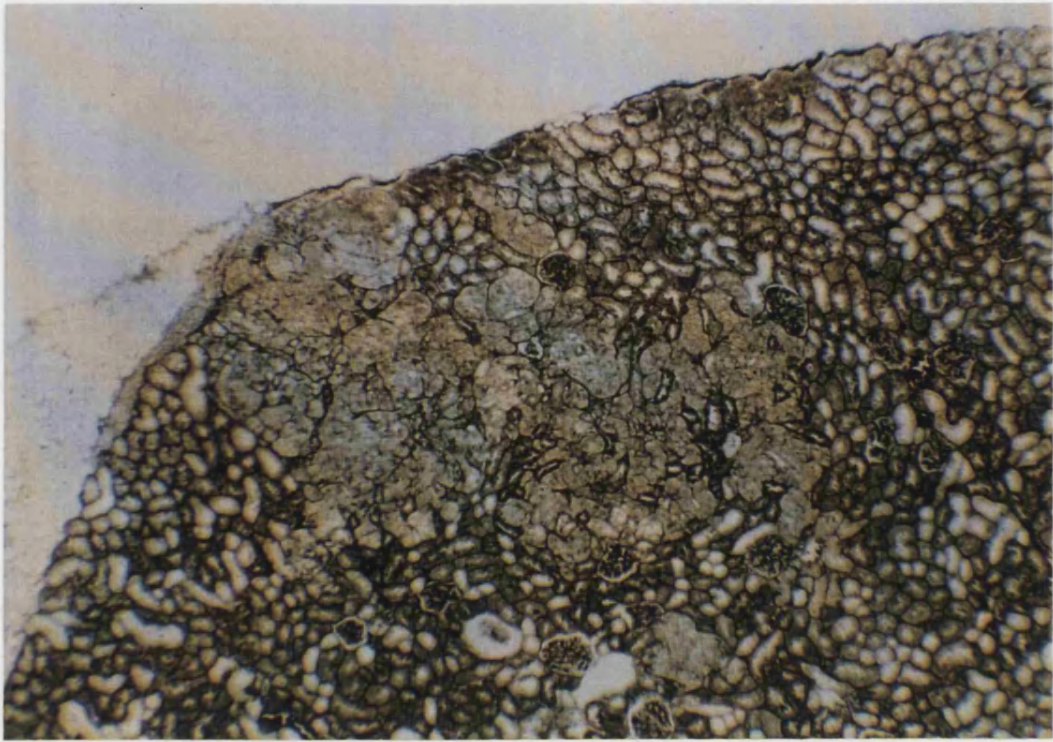


B

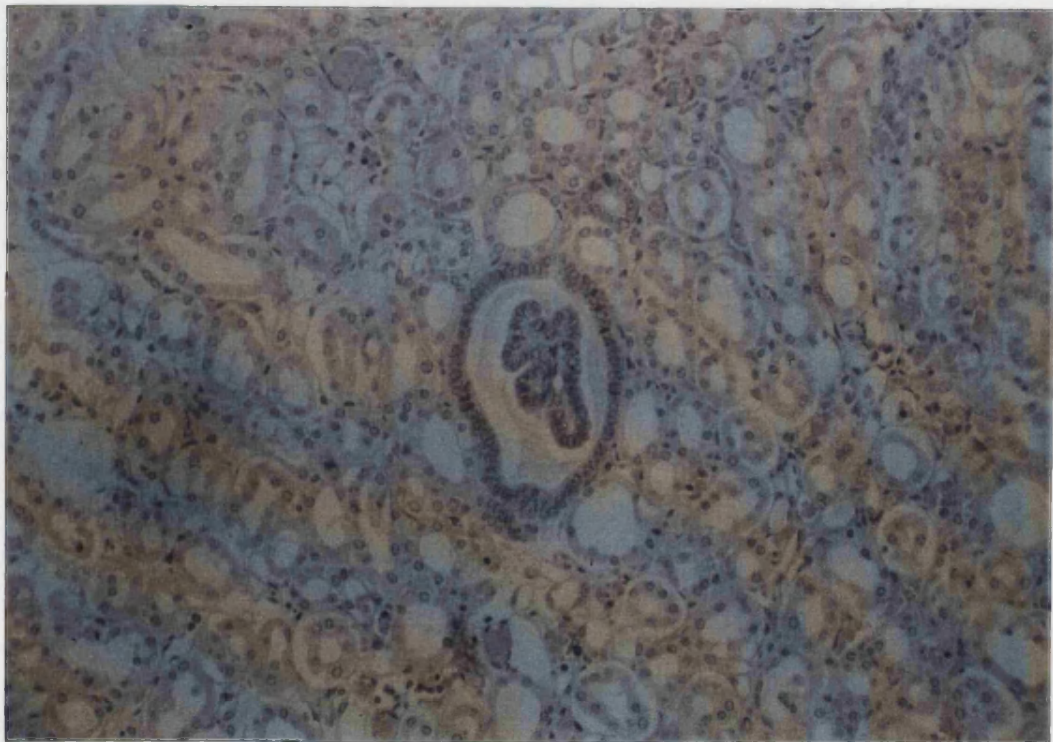
**Figura 28:** Patrón adenoide. **A)** E+D 4H. Células en anillo de sello/ luces intracitoplásmicas. H-E; x 40. **B)** Negatividad frente al PAS. PAS; x 40.

**Figura 29:** Patrón neuroendocrinoide. **A)** E+D 12 M. Patrón de crecimiento "organoide". H-E; x 16. **B)** E+D 16H. Zona de transición fusocelular-endocrinoide. H-E; x 16.





30

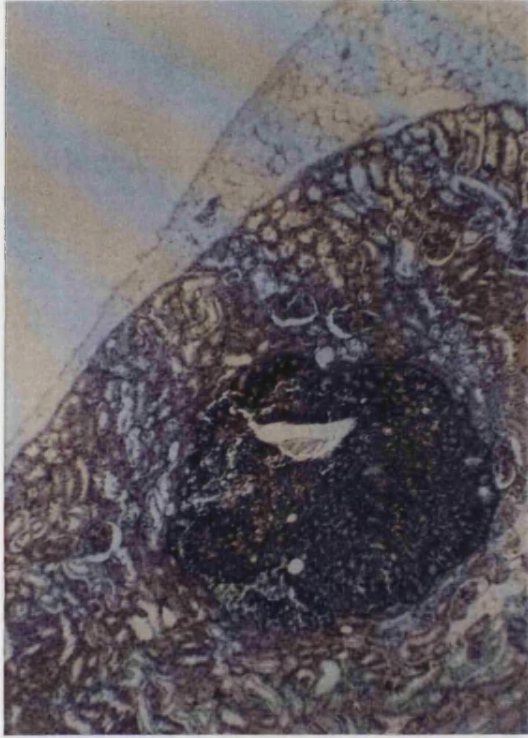


31

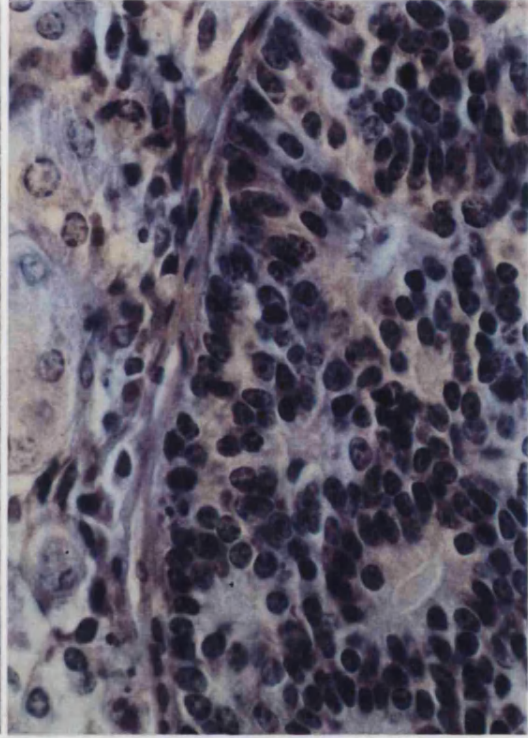
**Figura 30:** E+D 6 H. Tumor cortical con desorganización del patrón reticulínico y prácticamente nula reacción estrómic. Reticulina de Gomori; x 4.

**Figura 31:** E+D 10 H. Microadenoma papilarrenal.  
H-E; x 16.

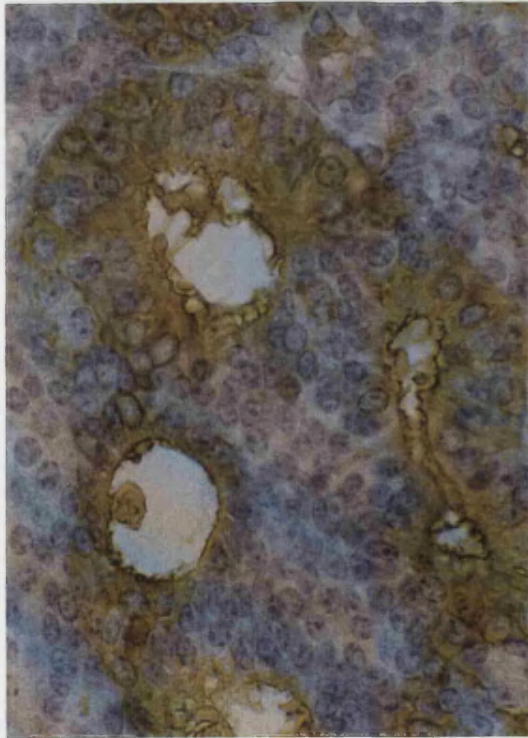




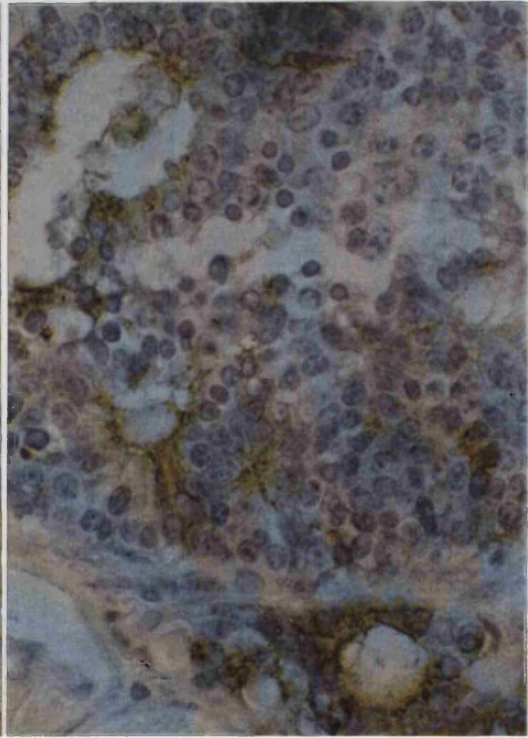
A



B



C



D

**Figura 32:** E+D 11 H. Adenocarcinoma cortical renal.

**A)** Tumoración cortical bien delimitada, sólida con áreas quísticas. H-E; x 4. **B)** Detalle que permite apreciar la presencia de una cápsula rodeando el tumor y la formación de estructuras pseudo-tubulares. H-E; x 50. **C)** Las células tumorales mostraron positividad frente al CEA. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 50. **D)** Positividad frente a UEA-I; x 50.





A



B



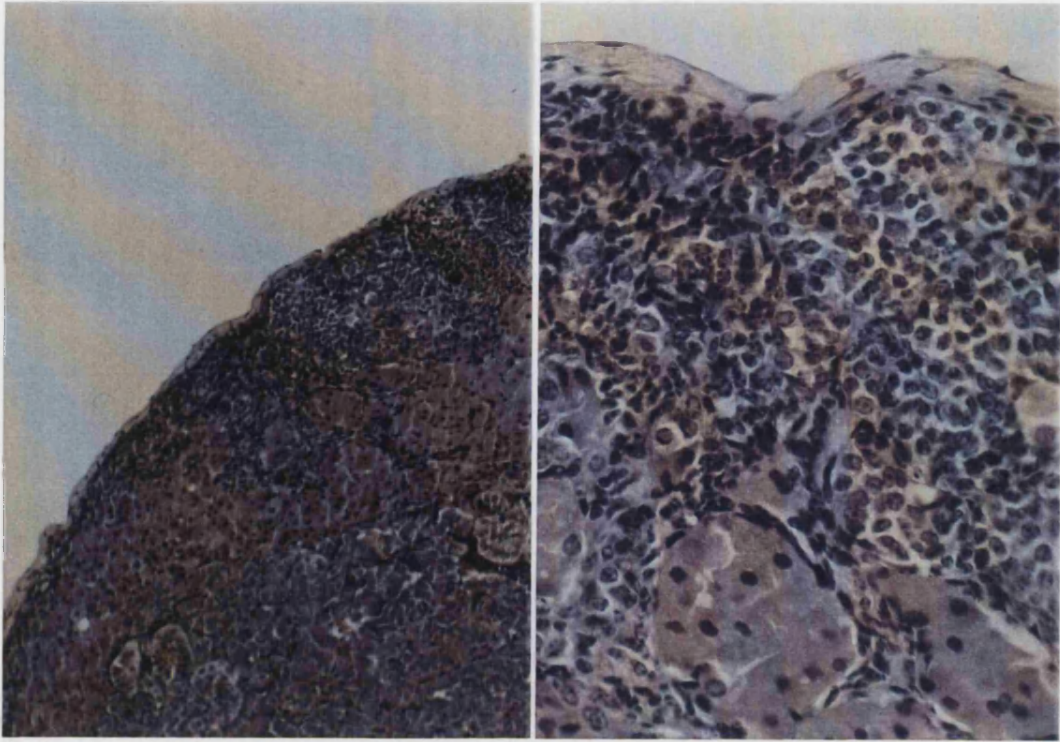
C



D

**Figura 33:** E+D 8H. Carcinoma de pelvis renal. **A)** La tumoración ocupa parcialmente la pelvis renal. Tricrómico de Masson; x 4. **B)** Patrón de crecimiento papilar con ejes conectivo-vasculares tapizados por urotelio. Tricrómico de Masson; x 16. **C)** Positividad frente a CEA. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 16. **D)** Positividad frente a UEA-I. x 16.

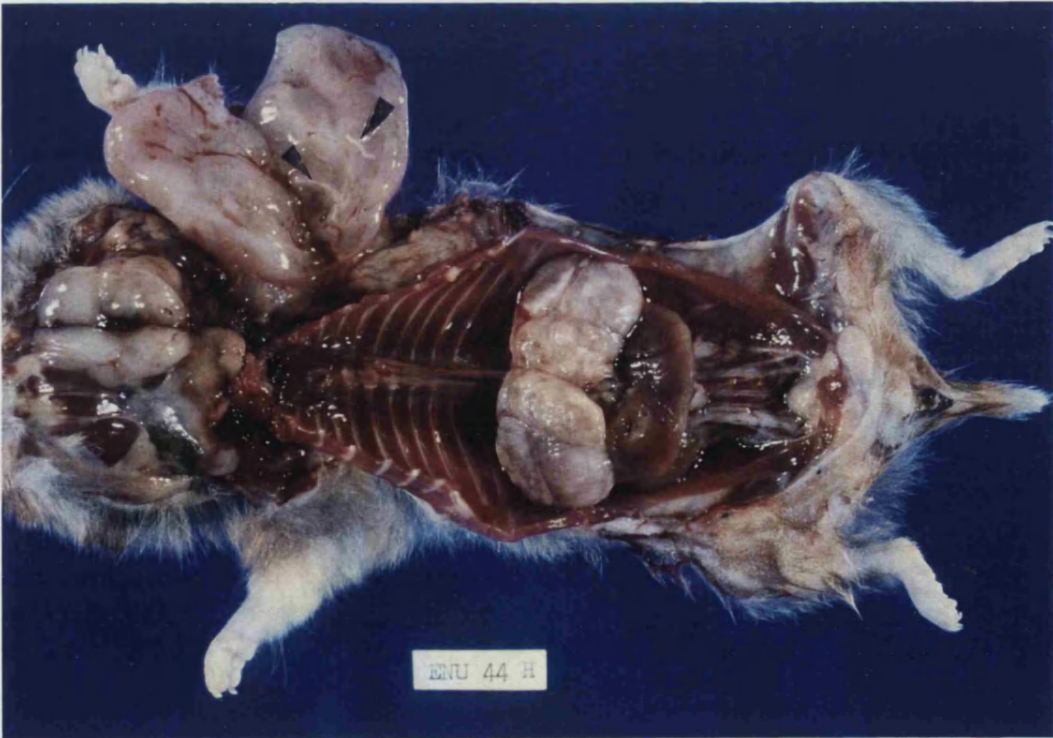




A

B

34

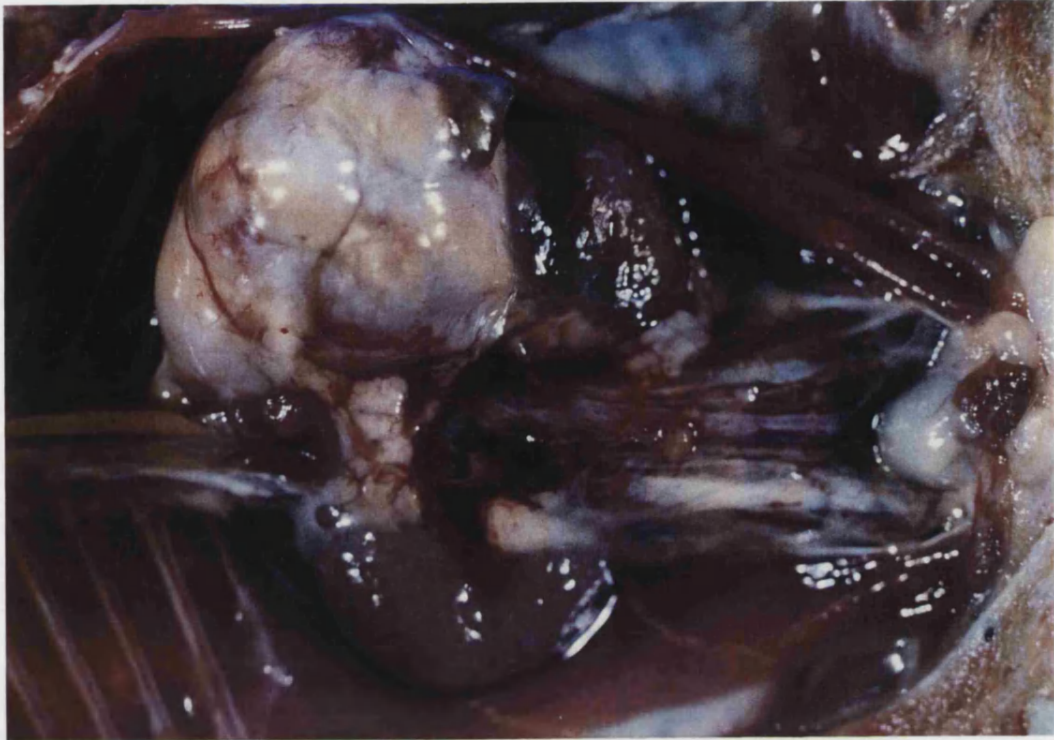


35

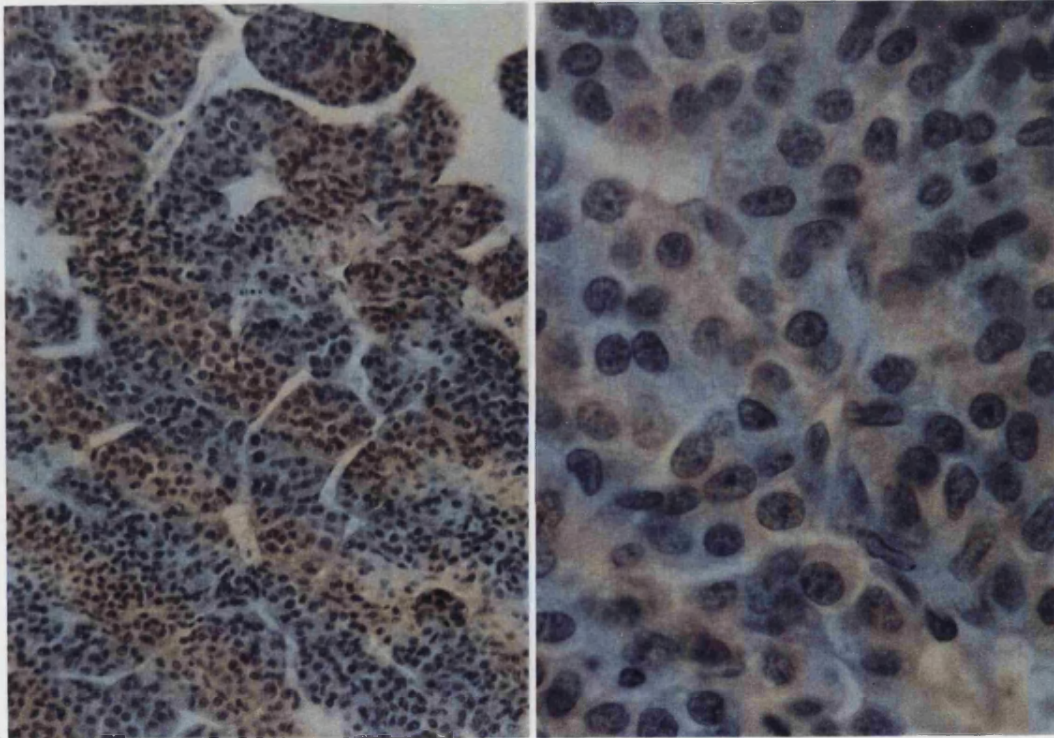
**Figura 34:** DES 15 H. **A)** Adenoma cortical mal delimitado. H-E; x 6.3. **B)** Se observa como las células tumorales se extienden a través de las capas de la cortical. H-E; x 25.

**Figura 35:** ENU 44 H. (Corresponde a ENU 46 H en protocolos). Se pueden distinguir dos tumoraciones de carácter neural en región cervical ventral y axilar izquierda, esta última englobando filetes nerviosos en su seno (flechas).  
Gran tumoración suprarrenal izquierda.





36



A

37

B

**Figura 36:** ENU 44 H. (Corresponde a ENU 46 H en protocolo). Tumoración suprarrenal izquierda que deforma y desplaza riñón izquierdo.

**Figura 37:** ENU 44H. Carcinoma suprarrenal. **A)** Numerosas formaciones papilares. H-E; x 16. **B)** Moderado polimorfismo celular y nuclear. H-E; x 40.



38



39

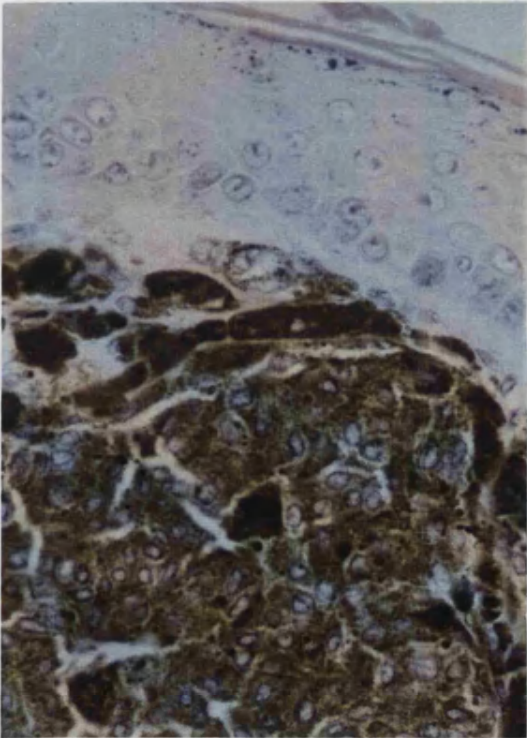
**Figura 38:** ENU 36 M. Lesión cutánea dorsolateral derecha, de 4x2 cm, pigmentada y ulcerada centralmente.

**Figura 39:** ENU 36 M. Detalle de la lesión de la figura anterior.

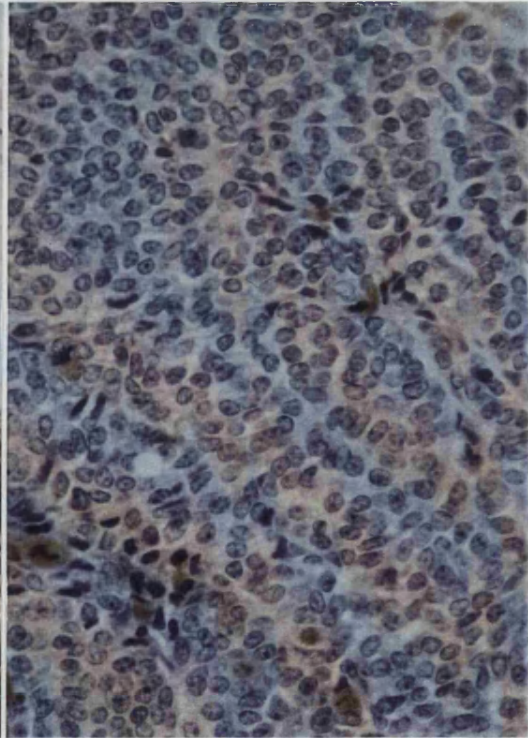




40



41



42

**Figura 40:** ENU 36 M. Melanoma maligno con ulceración epidérmica y áreas pigmentadas y no pigmentadas. H-E; x 2.5.

**Figura 41:** ENU 36 M. Detalle de la figura anterior mostrando las áreas tumorales pigmentadas. H-E; x 25.

**Figura 42:** ENU 36 M. Area tumoral no pigmentada mostrando cierto monomorfismo celular. H-E; x 25





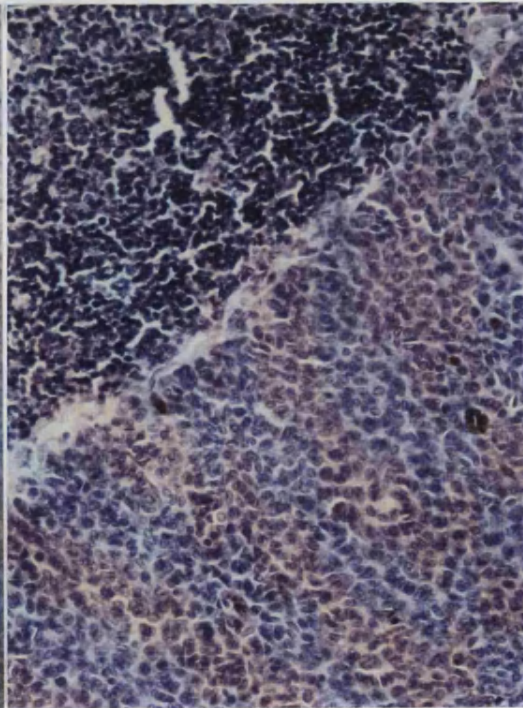
A



B

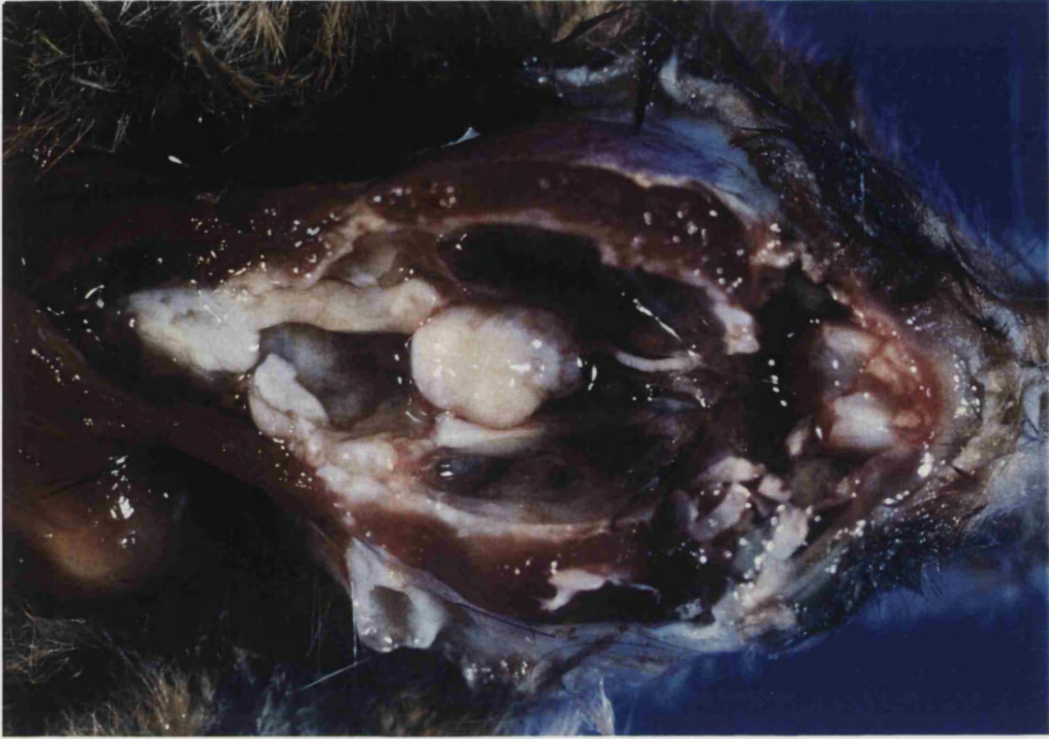


C

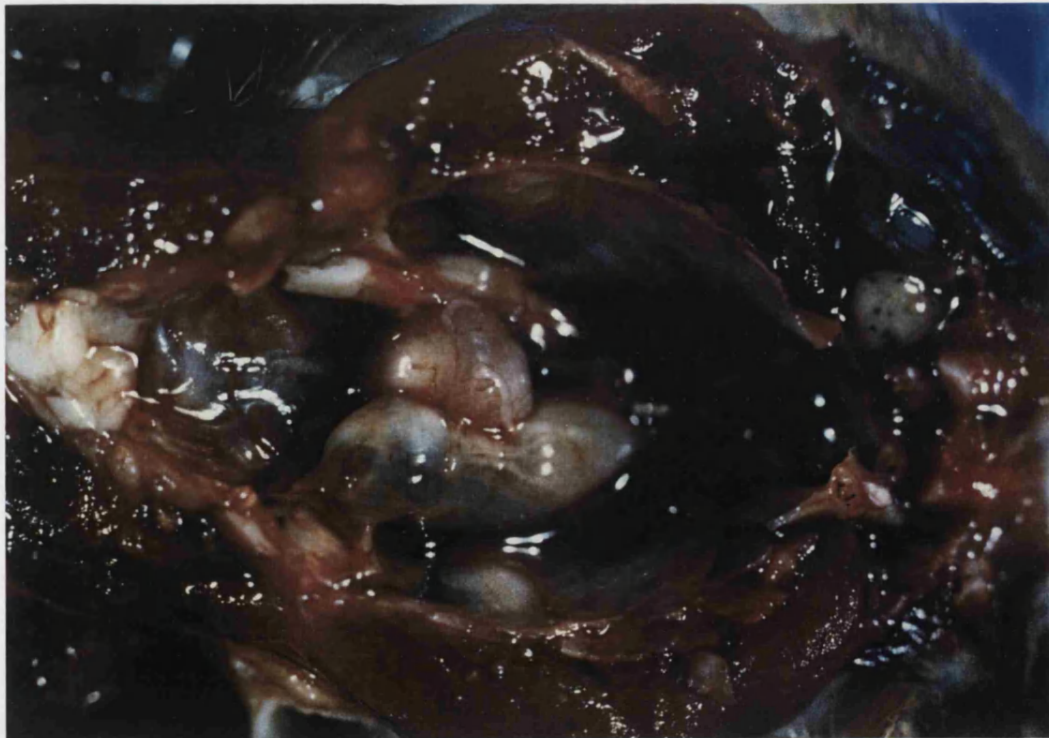


D

**Figura 43:** ENU 36 M. Melanoma maligno. **A)** Metástasis pulmonares. **B)** Metástasis parenquimatosas pulmonares múltiples. H-E; x 4. **C)** Metástasis renales. H-E; x 10. **D)** Metástasis ganglionar. H-E; x 16.



44

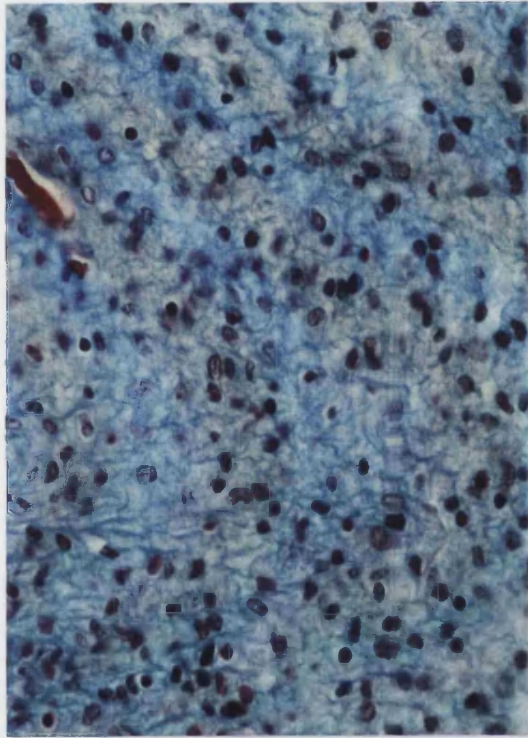


45

**Figura 44:** E+D 20 M. Hipófisis aumentada de tamaño,  
bien delimitada y coloración blanquecina.

**Figura 45:** E+D 12 M. Adenoma hipofisario junto con  
engrosamiento fusiforme de rama trigeminal intracraneal  
derecha. (neurinoma maligno).

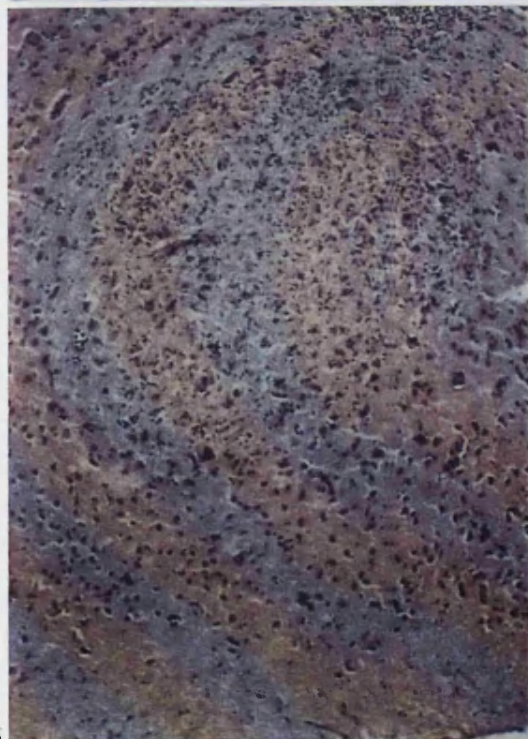




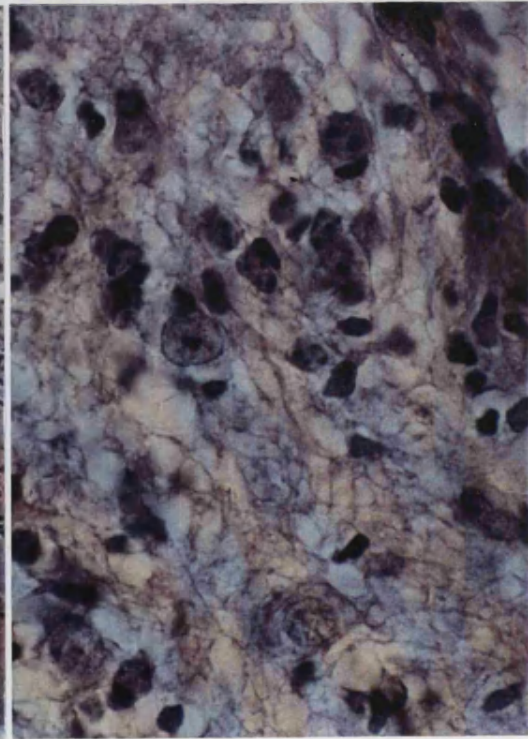
46A



B



47A

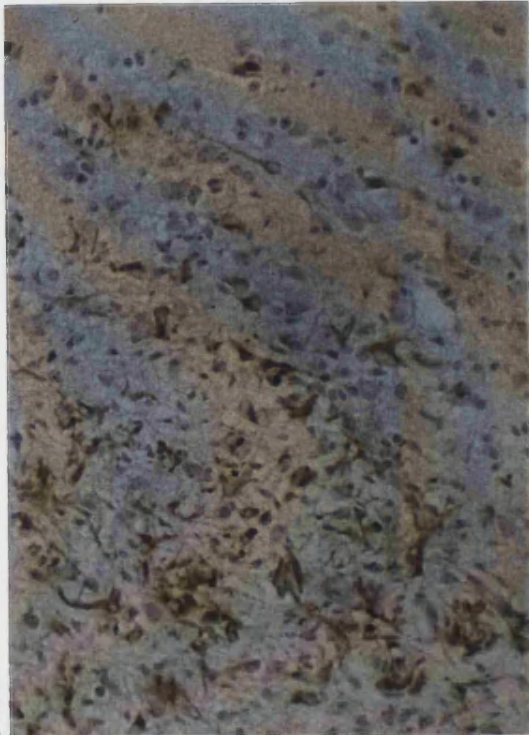


B

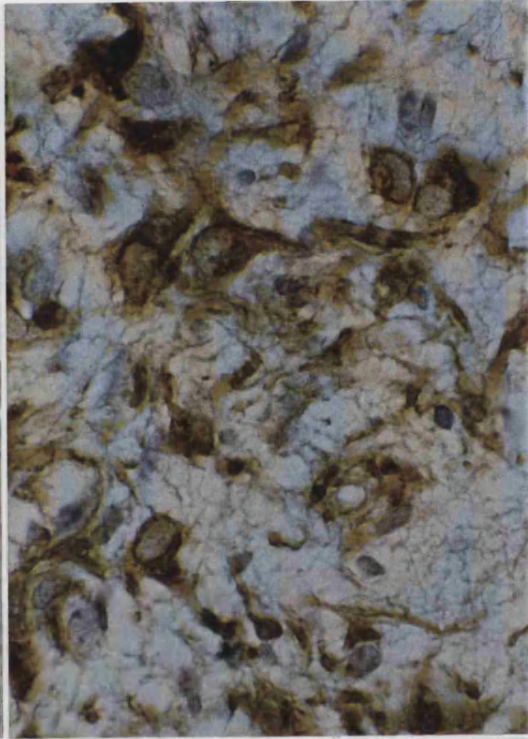
**Figura 46:** E+D 12 M. Neurinoma maligno de trigémino intracraneal. **A)** Células tumorales con moderado polimorfismo nuclear, separadas por abundante matriz extracelular. Tricrómico de Masson; x 25. **B)** Area tumoral densamente celular tipo Antoni A con cuerpo de Verocay.  
H-E; x 16.

**Figura 47:** E+D 12 H. Tumoración glial de SNC. **A)** Area tumoral de aspecto medular mal delimitada. H-E; x 6.3. **B)** Población polimorfa de células de aspecto astrocítico.  
H-E; x 50.

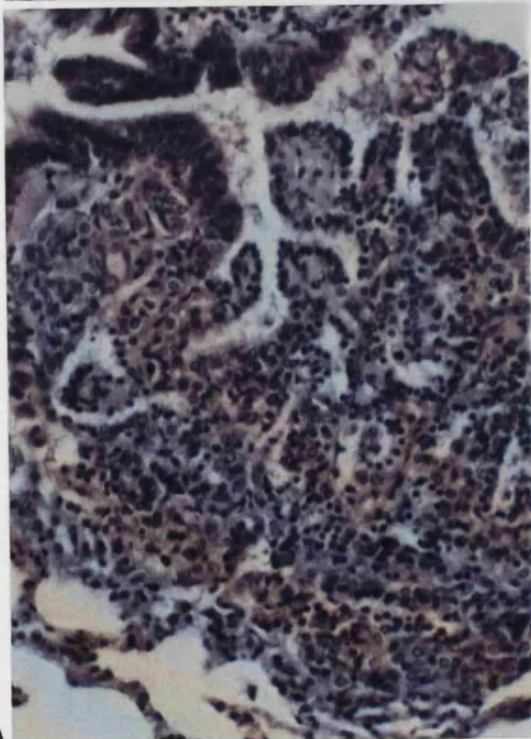




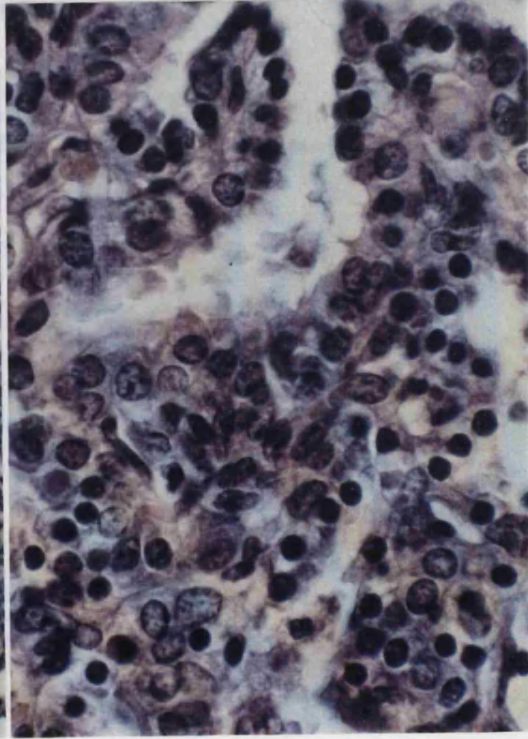
48A



B



49A



B

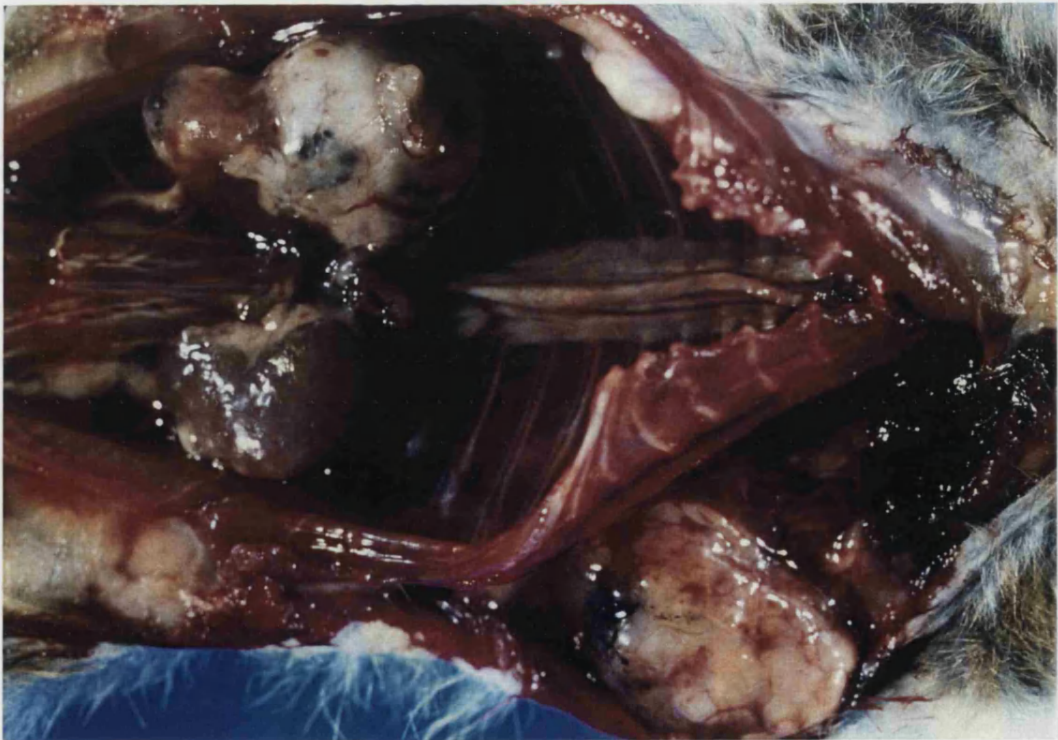
**Figura 48:** E+D 12 H. Tumoración glial de SNC. **A)** Reactividad de las células tumorales frente a vimentina. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 16. **B)** Intensa positividad citoplásmica frente a GFAP. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 50.

**Figura 49:** E+D 16 H. Adenoma pulmonar. **A)** Neoformación que muestra un patrón de crecimiento tubular o trabecular. H-E; x 16. **B)** Estructuras tubulares tapizadas por epitelio cuboidal que presenta monomorfismo. H-E; x 50.





50



51

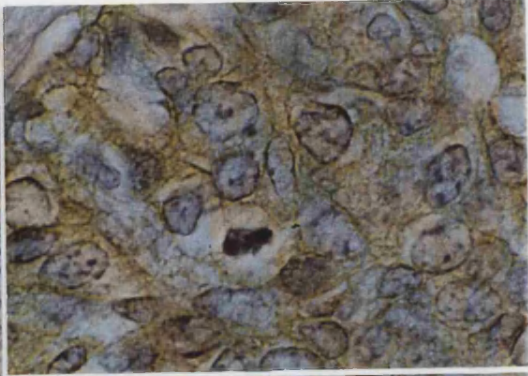
**Figura 50:** E+D 8 H. Carcinoma ductal de mama. También se puede distinguir una tumoración en polo superior de riñón derecho.

**Figura 51:** E+D 8 H. Detalle de las tumoraciones mamaria y renal.

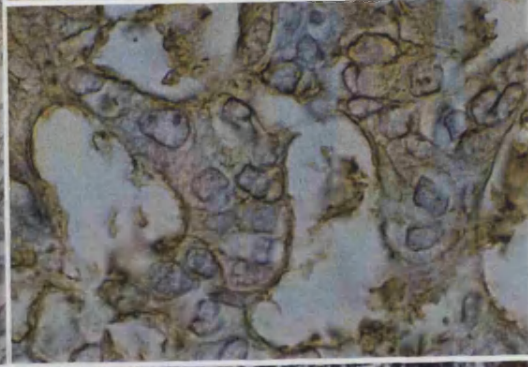




52A



B



C



53A



B

**Figura 52:** E+D 8H. Carcinoma de glándula mamaria.

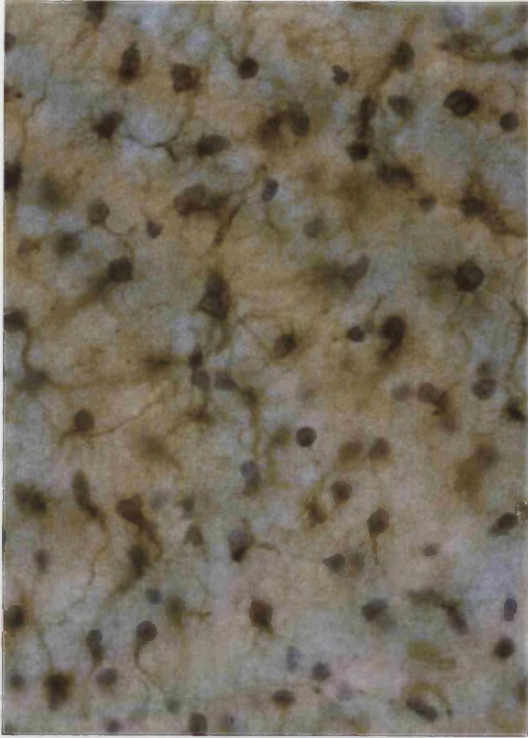
**A)** Crecimiento intraductal con patrón de glándulas dentro de glándulas, típico del carcinoma cribiforme. PAS; x 16.

**B)** Positividad de las células tumorales frente a queratina policlonal. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 50. **C)** Inmunotinción frente a CEA. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 50.

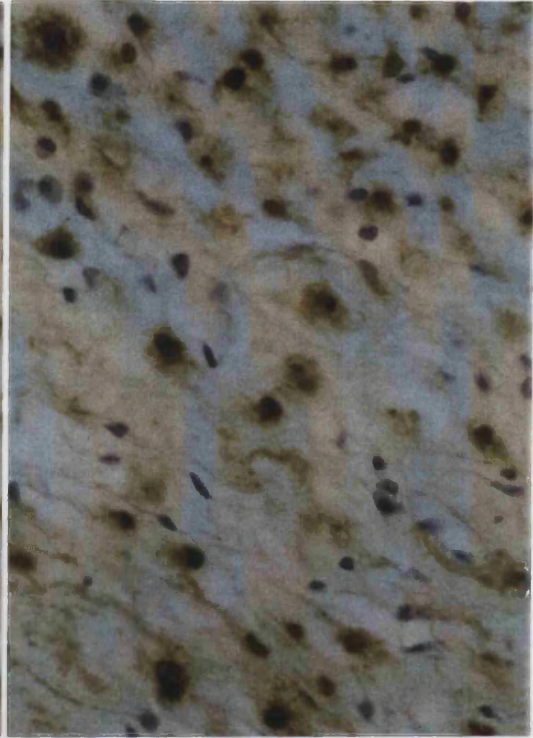
**Figura 53:** ENU 37M. Tumoración tipo ameloblastoma de

maxilar inferior. **A)** Area tumoral con destrucción de trabéculas óseas. H-E; x 4. **B)** Nidos de células epiteliales neoplásicas dispuestas periféricamente en empalizada junto con otras de apariencia estrellada, dispuestas laxamente alrededor. H-E; x 16.

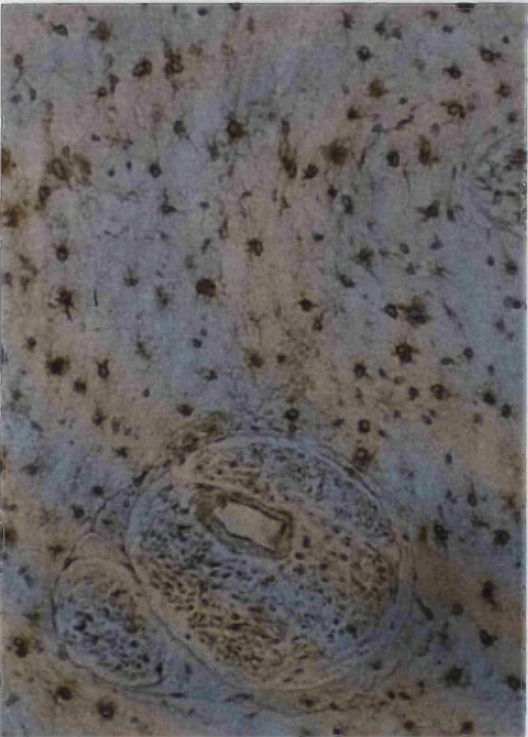




54A



B



55A



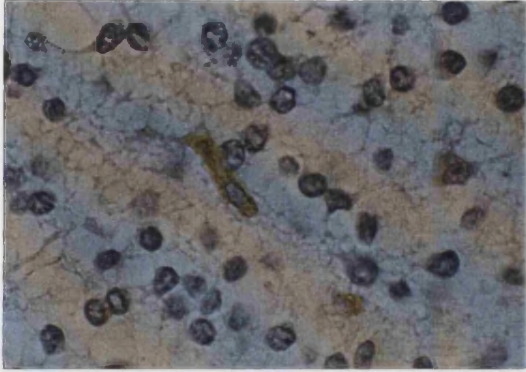
B

**Figura 54:** E+D 26 M. Neurofibroma subcutáneo dorsal.  
**A)** Intensa positividad citoplásmica a vimentina. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 16. **B)** Inmunotinción citoplásmica y nuclear frente a proteína S-100. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 40.

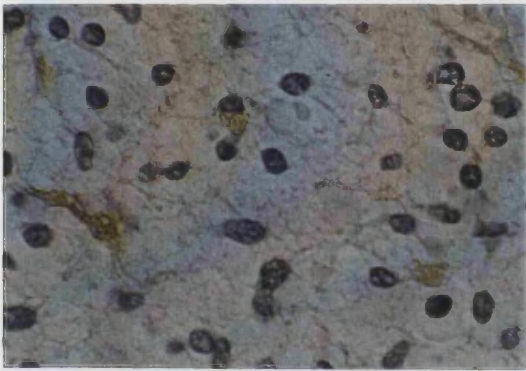
**Figura 55:** E+D 5 H. Neurofibroma maligno retroperitoneal.  
**A)** Positividad citoplásmica frente a vimentina. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 16. **B)** Inmunoreactividad frente a vimentina con claro refuerzo perinuclear. Peroxidasa-antiperoxidasa; x 50.



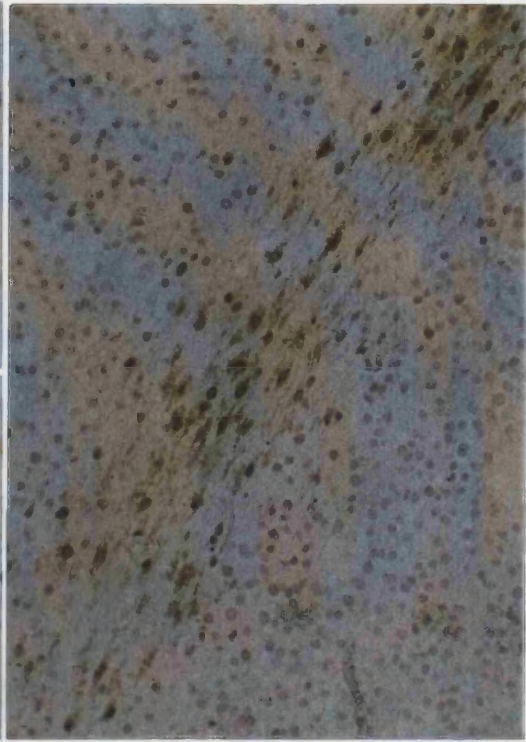
56



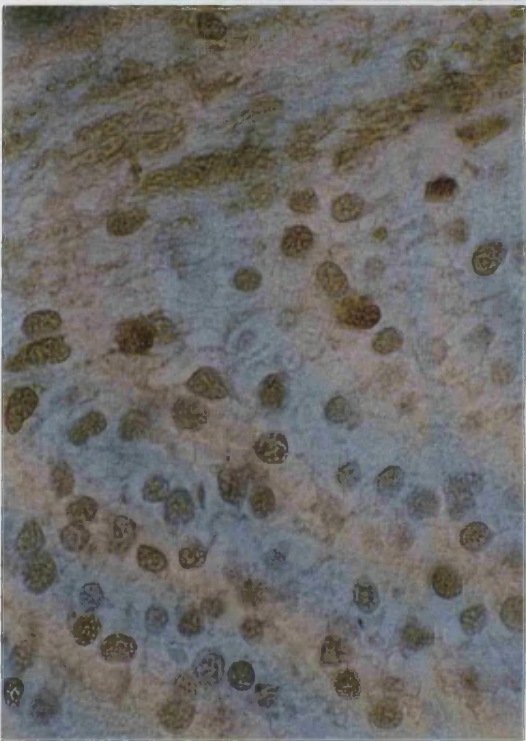
57



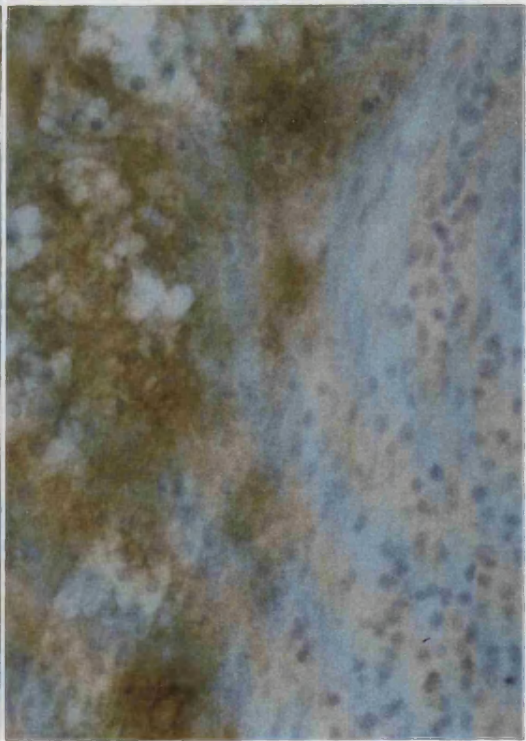
58



59



60



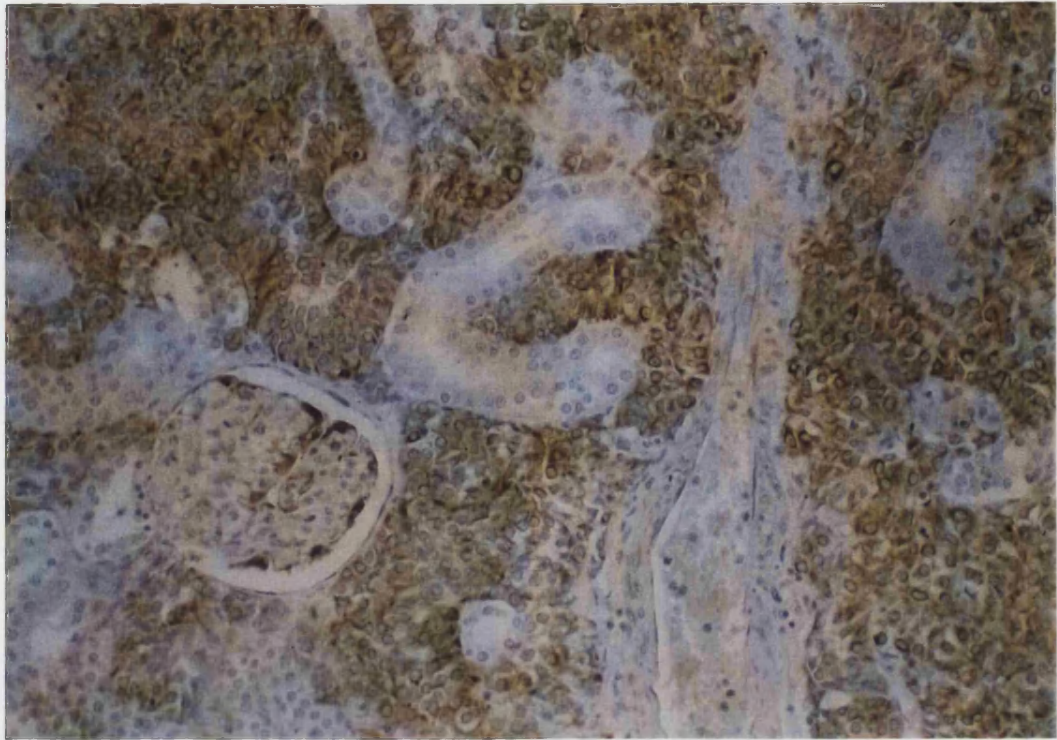
**Figura 56 y 57:** E+D 5 H. Neurofibroma maligno retroperitoneal. Areas indiferenciadas de células pequeñas mostrando aisladas células tumorales positivas frente a la vimentina. PAP; x 50.

**Figura 58:** E+D 5 H. Neurofibroma maligno retroperitoneal. Poblaciones de células tumorales con positividad frente a la proteína S-100, adyacentes a otras negativas. PAP; x 16.

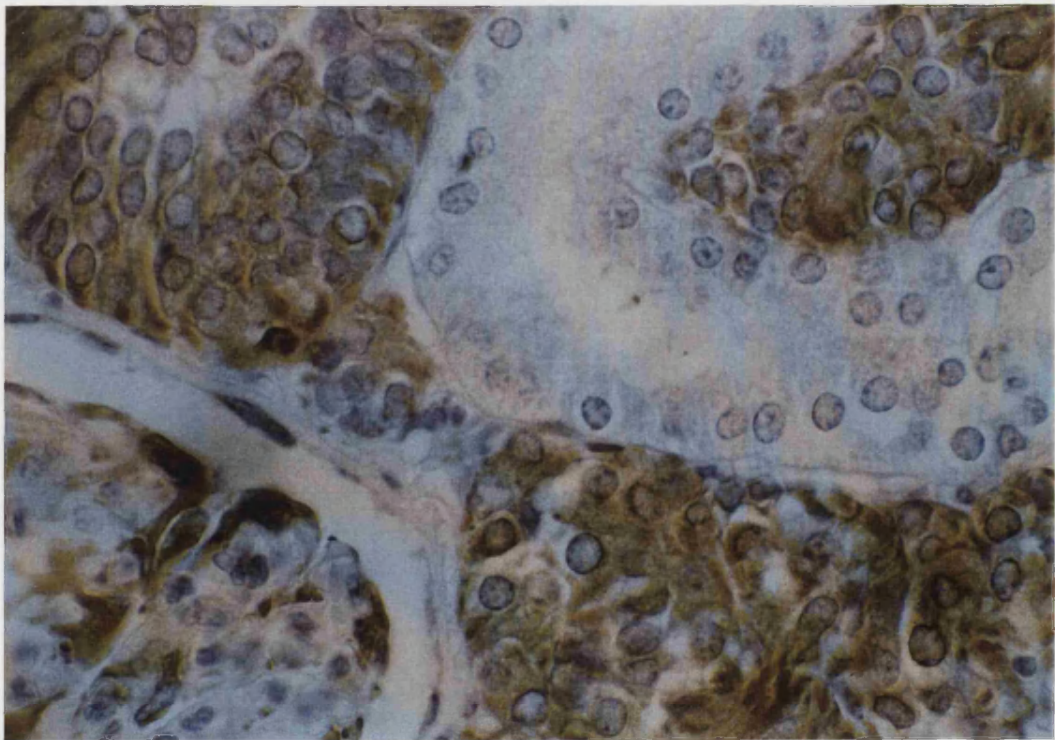
**Figura 59:** E+D 5 H. Positividad citoplásmica y nuclear a proteína S-100 y únicamente inmunotinción nuclear en áreas menos diferenciadas. PAP; x 50.

**Figura 60:** ENU 54 H. Neurinoma maligno intestinal. Inmunoreactividad citoplásmica difusa frente a HNK-1. Negatividad en elementos celulares poco diferenciados. PAP; x 40.





A



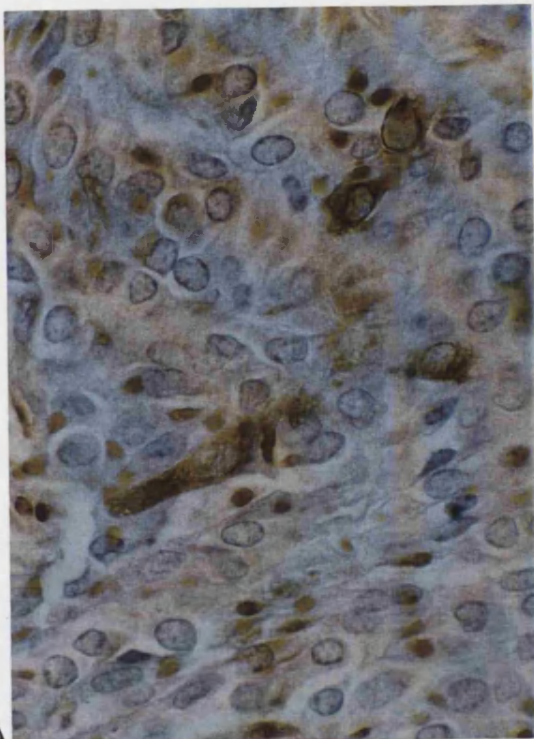
B

61

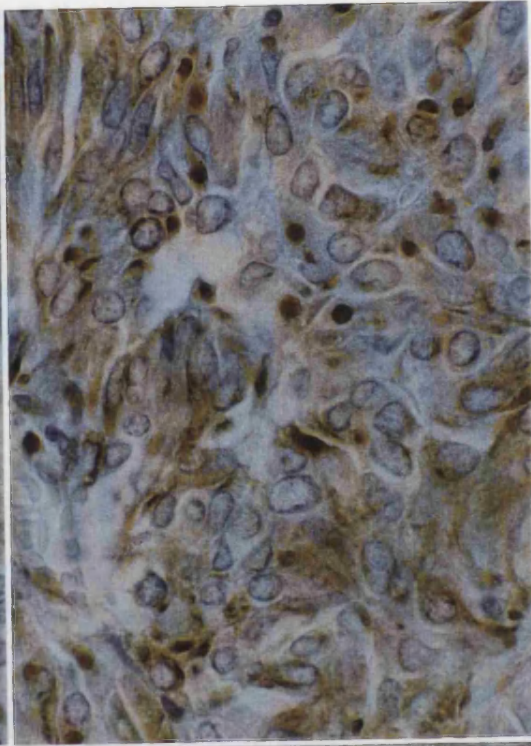
**Figura 61:** E+D 4H. Tumor renal tipo nefroblastoma.

**A)** Cordones tumorales intersticiales positivos frente a vimentina, delineando perfectamente las estructuras normales renales. PAP; x 16. **B)** Detalle del mismo caso anterior mostrando las células neoplásicas una intensa positividad citoplásmica a vimentina. También se aprecia células del epitelio visceral glomerular positivas. PAP; x 50.

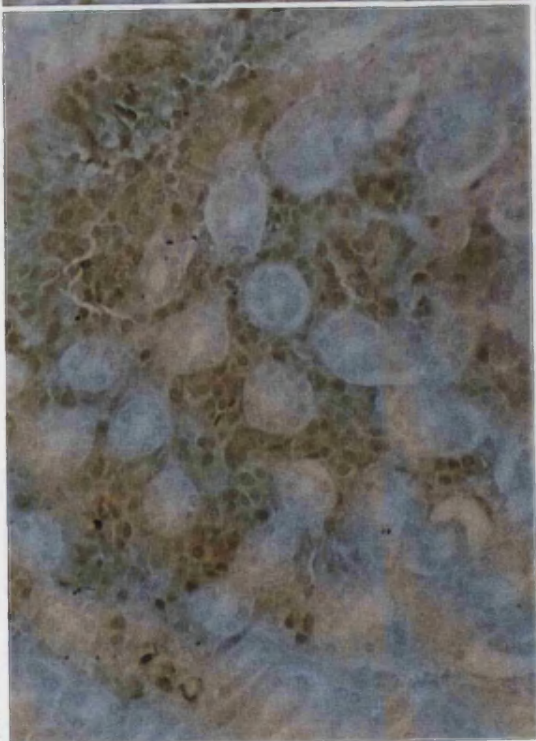




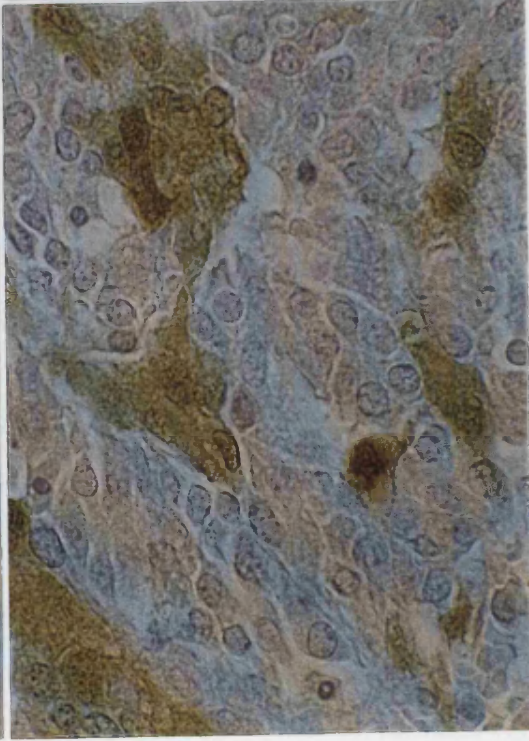
62A



B



63



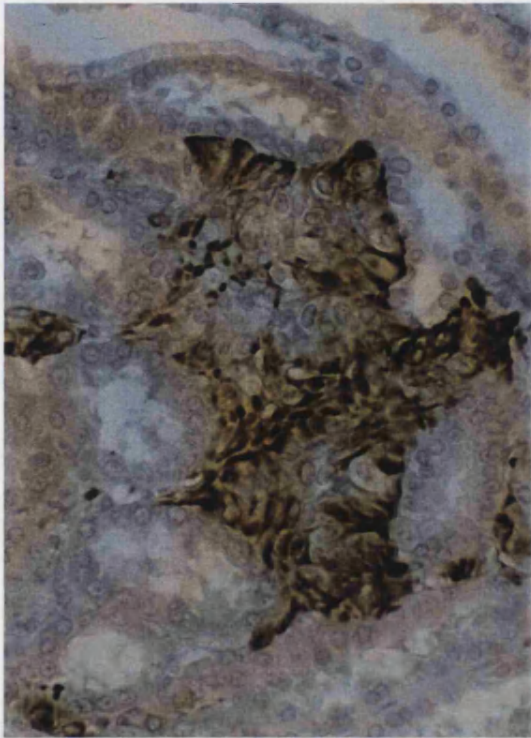
64

**Figura 62:** E+D 4 H. Tumor renal tipo nefroblastoma. **A y B)** Distintos tipos de tinción de las células tumorales a vimentina. PAP; x 50.

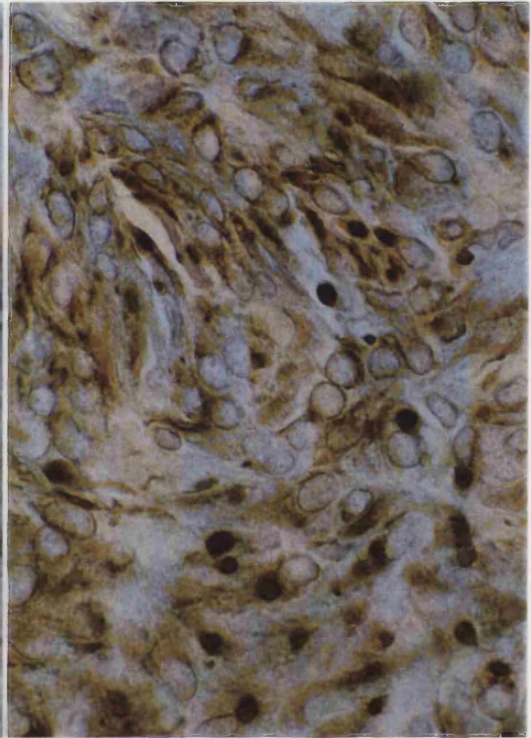
**Figura 63:** E+D 4 H. Mismo caso anterior mostrando reactividad citoplásmica y nuclear frente a proteína S-100. PAP; x 16.

**Figura 64:** E+D 17 H. Heterogeneidad inmunofenotípica de las poblaciones celulares tumorales frente a la proteína S-100. PAP; x 50.

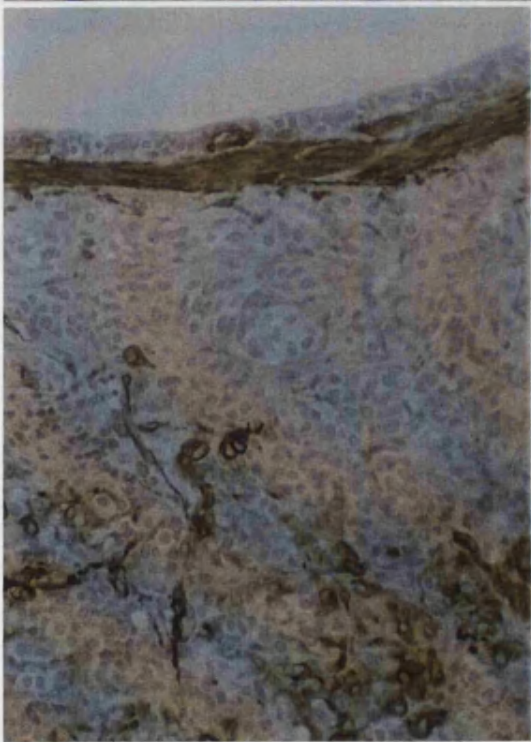




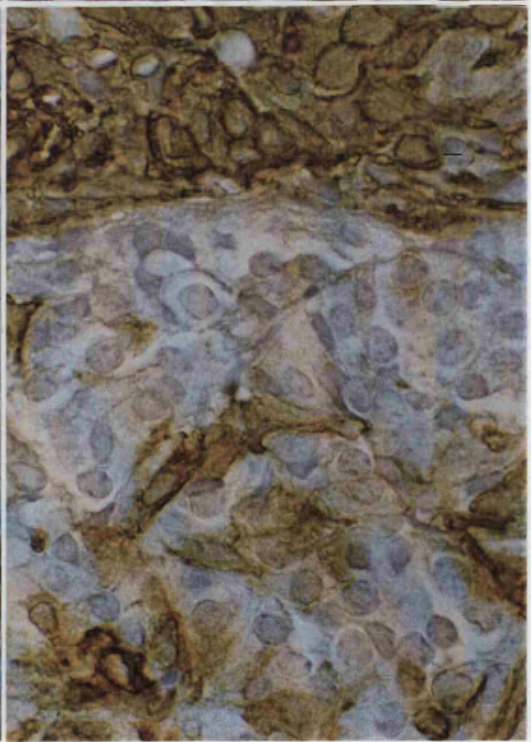
65



66



67



68

**Figura 65:** E+D 3 H. Tumor renal tipo nefroblastoma. Las células tumorales presentaron una intensa reactividad citoplásmica a la desmina. PAP; x 25.

**Figura 66:** E+D 4 H. Tumor renal tipo nefroblastoma. Area fusocelular con distintos patrones de inmunotinción frente a la desmina. PAP; x 50.

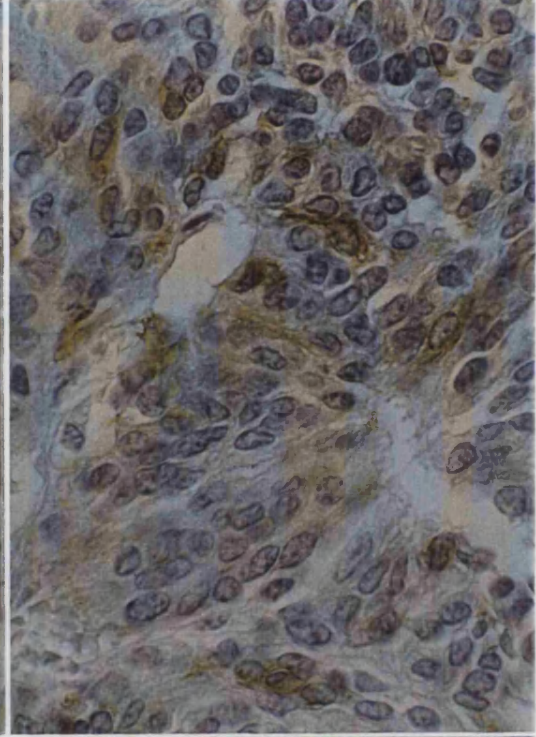
**Figura 67:** E+D 12 H. Tumor renal tipo nefroblastoma. Heterogeneidad tumoral a la tinción con actina de músculo liso. Músculo liso de pelvis renal positivo. PAP; x 16.

**Figura 68:** E+D 9 H. Tumor renal. Actina de músculo liso. Areas tumorales intensamente positivas de forma difusa junto a otras con positividad en células aisladas. PAP; x 50.

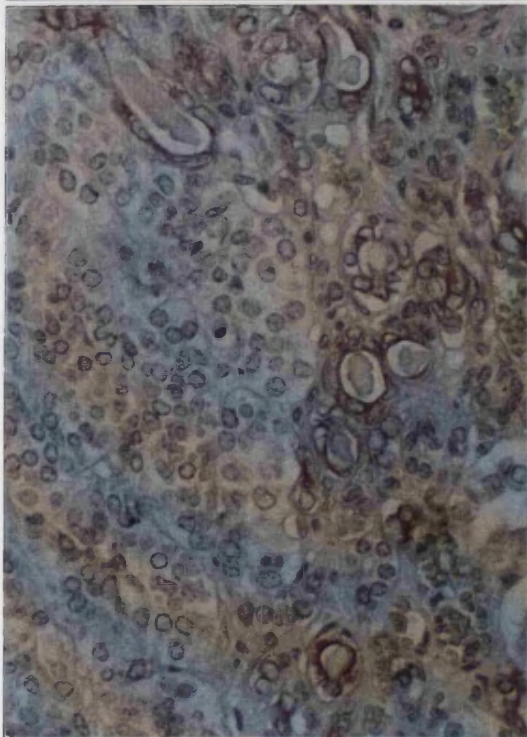




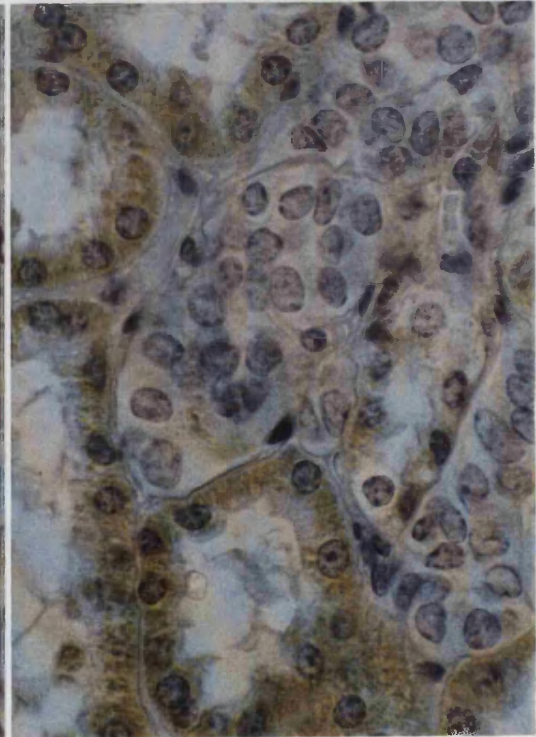
69



70



71



72

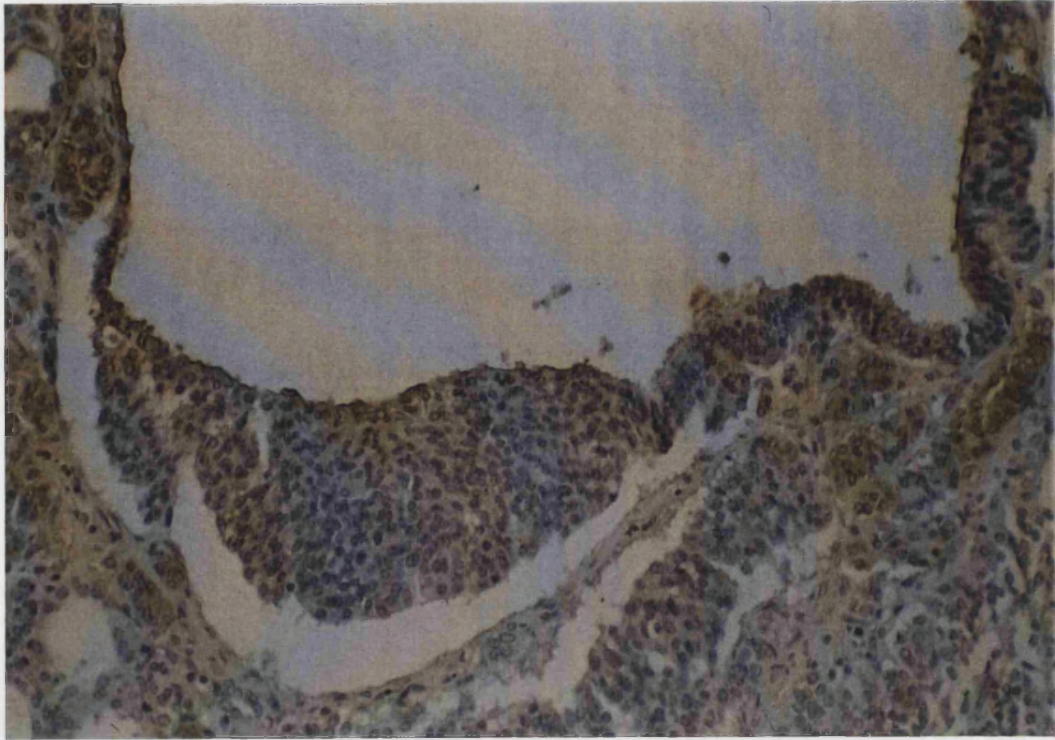
**Figura 69:** E+D 6 H. Tumor renal. Positividad difusa citoplásmica frente a NSE. PAP; x 50.

**Figura 70:** E+D 16 H. Tumor renal. Inmunotinción citoplásmica de células tumorales aisladas frente a HNK-1. PAP; x 50.

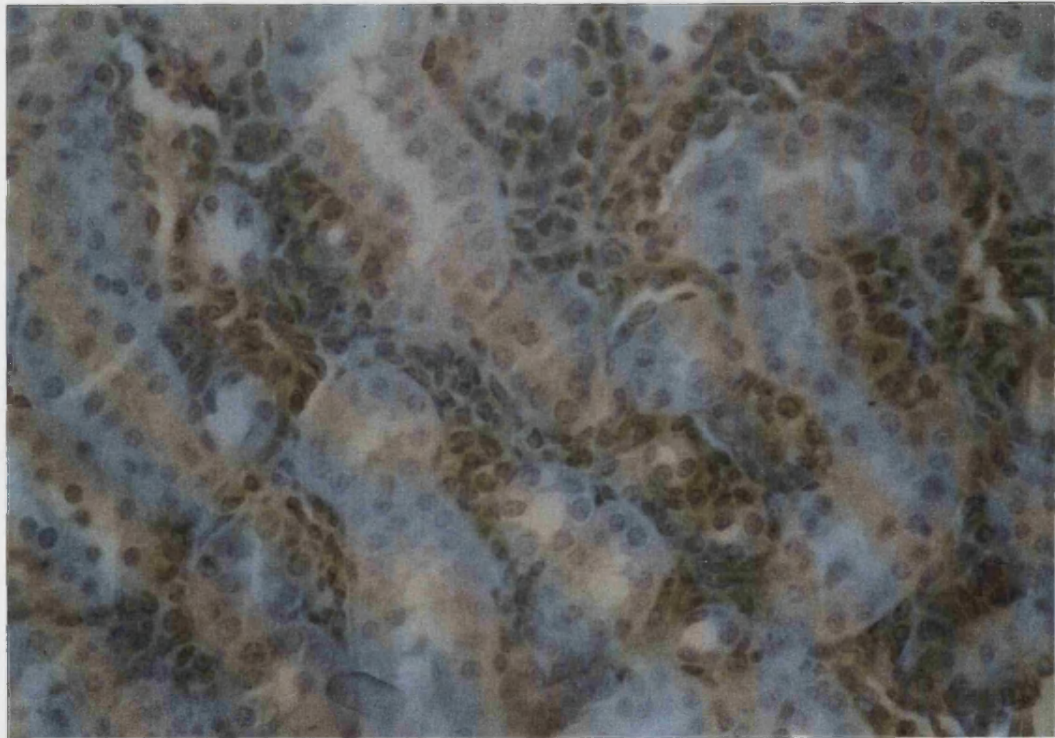
**Figura 71:** E+D 4 H. Tumor renal. Negatividad de las células neoplásicas frente a queratina policlonal. FA; x 25.

**Figura 72:** E+D 5 H. Tumor renal. Células neoplásicas negativas a CAM 5.2. PAP; x 50.





73



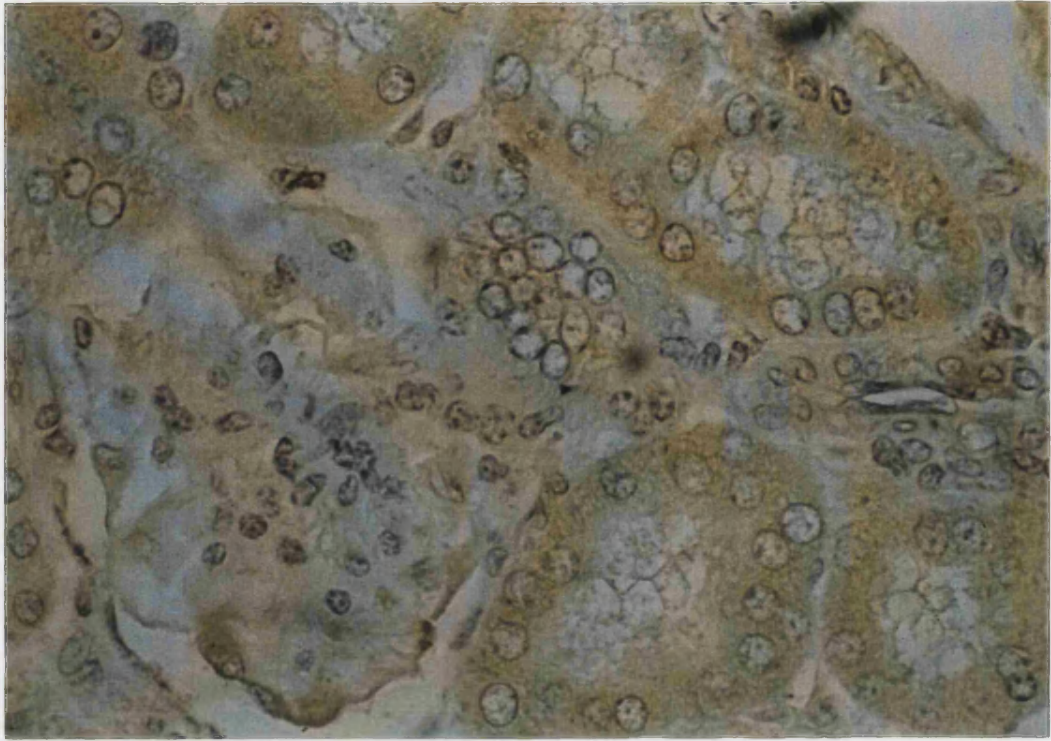
74

**Figura 73:** E+D 16 H. Tumor renal. Area quística  
mostrando positividad del epitelio de revestimiento a CEA.

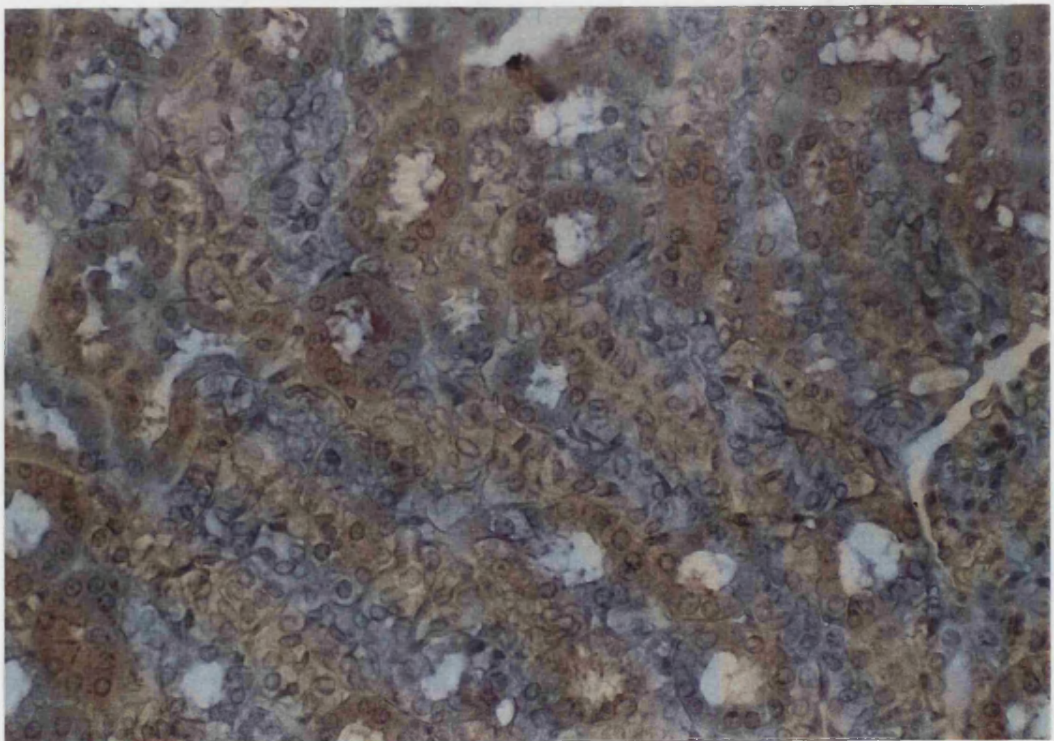
PAP; x 16.

**Figura 74:** E+D 26 H. Tumor renal. Area tumoral blastemal  
con positividad difusa frente a GFAP. PAP; x 25.





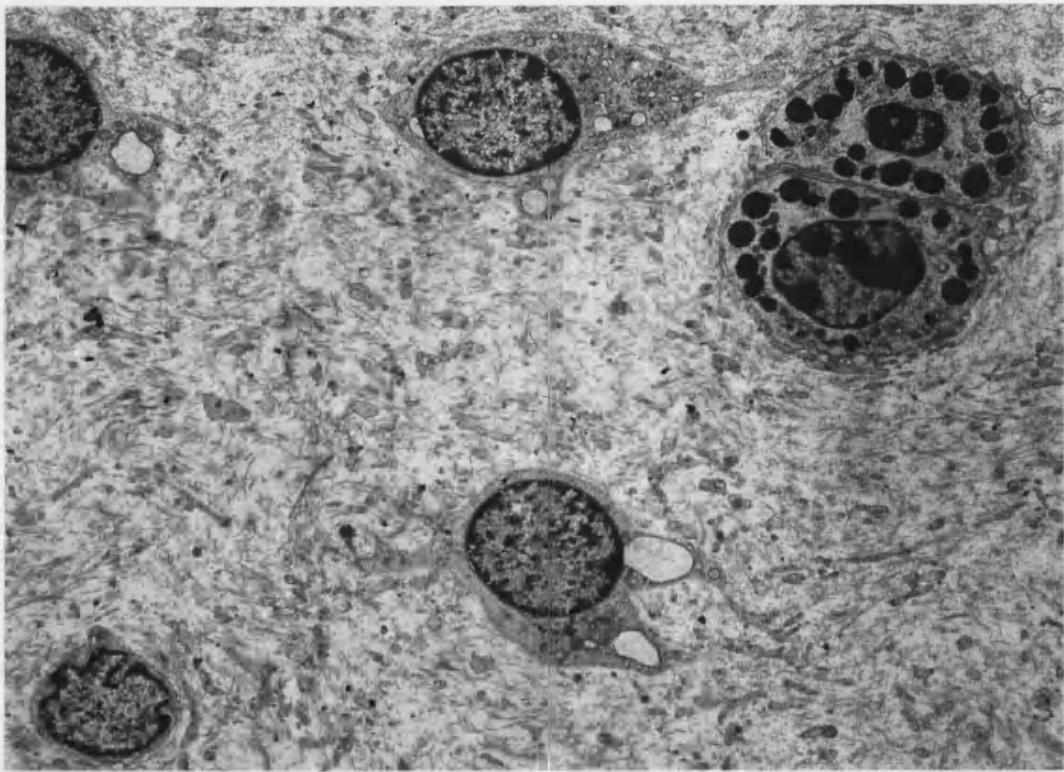
75



76

**Figura 75:** E+D 8 H. Pequeño nido sólido de células intersticiales negativo a la DT-diaforasa. PAP; x 40.

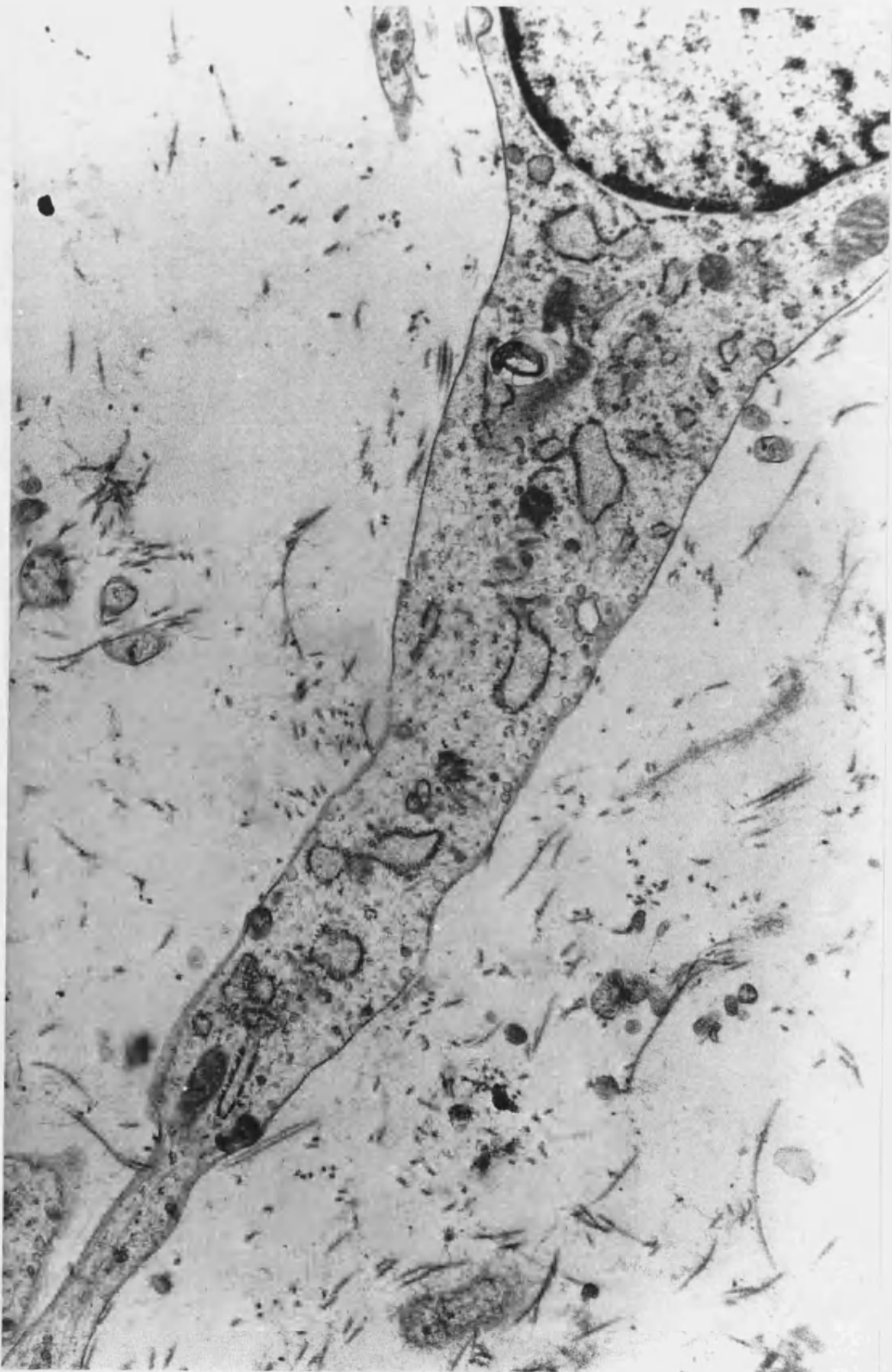
**Figura 76:** E+D 3 H. Tumor renal. Negatividad de células neoplásicas a DT- diaforasa. FA; x 25.



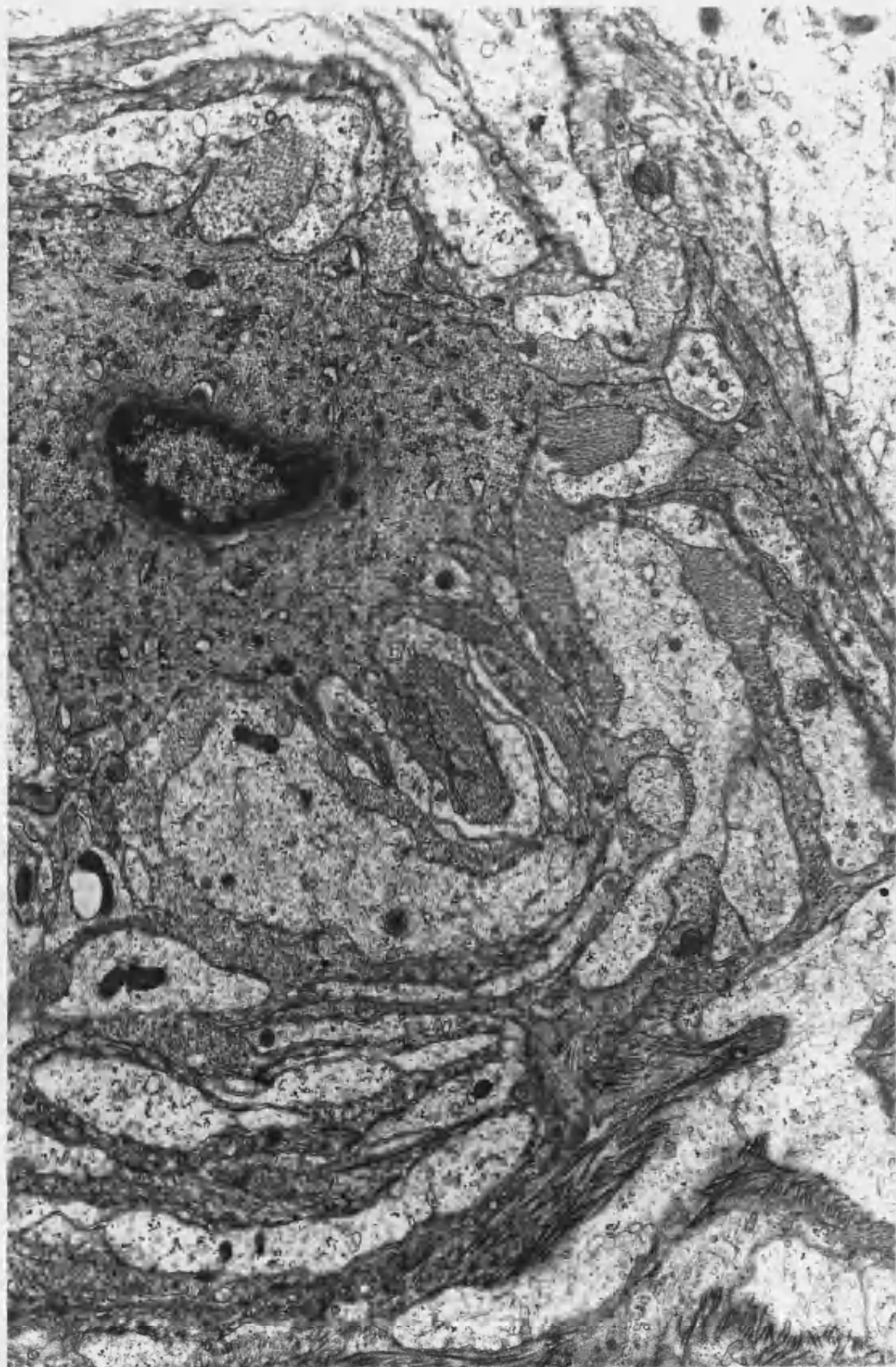
77

**Figura 77:** E+D 1H. Neurofibroma. Abundante matriz extracelular con colágena, células tumorales schwannianas dispersas y mastocitos.

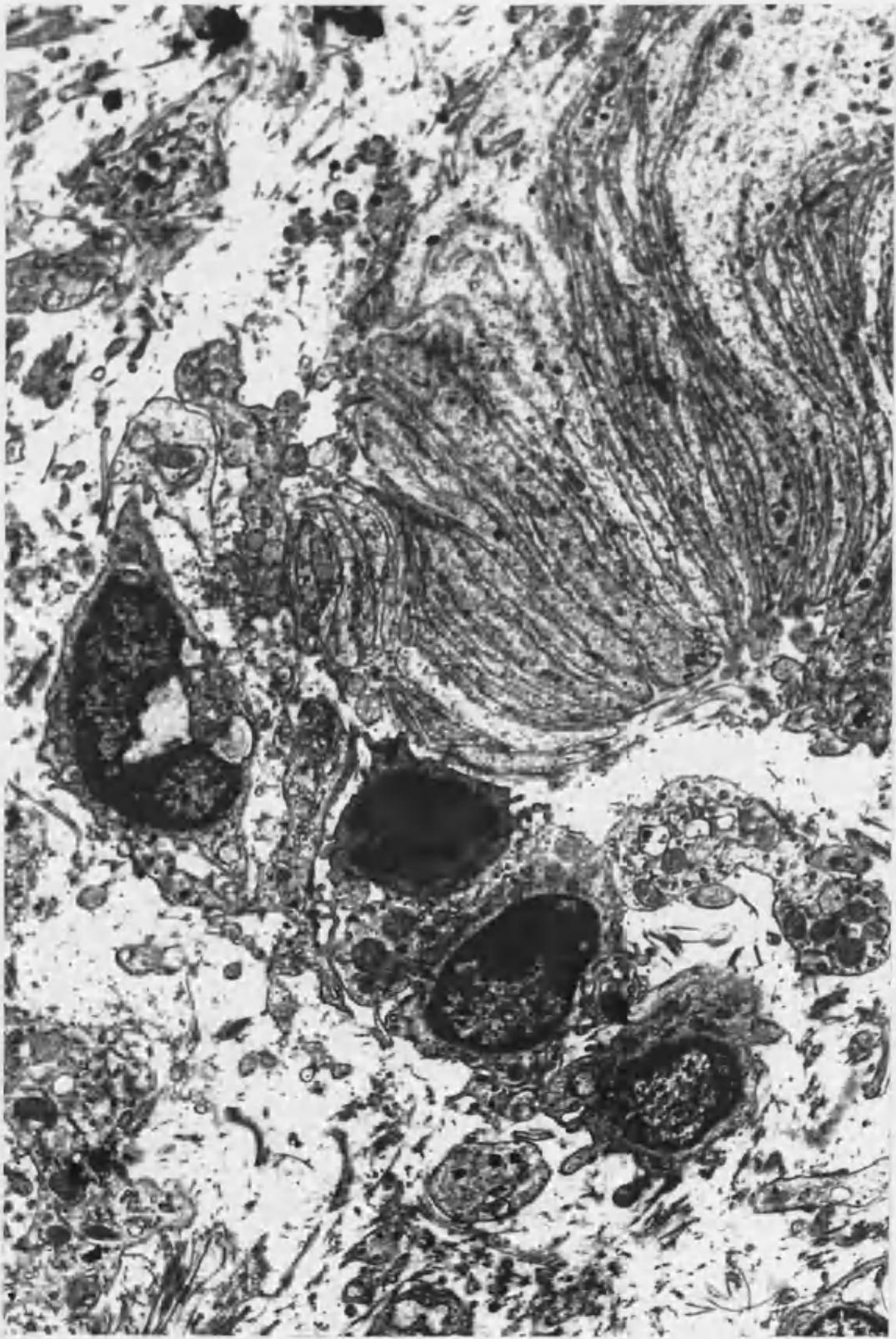




**Figura 78:** E+D 21M. Neurofibroma. Largos procesos citoplásmicos rodeados por membrana basal y mostrando vesículas pinocíticas.

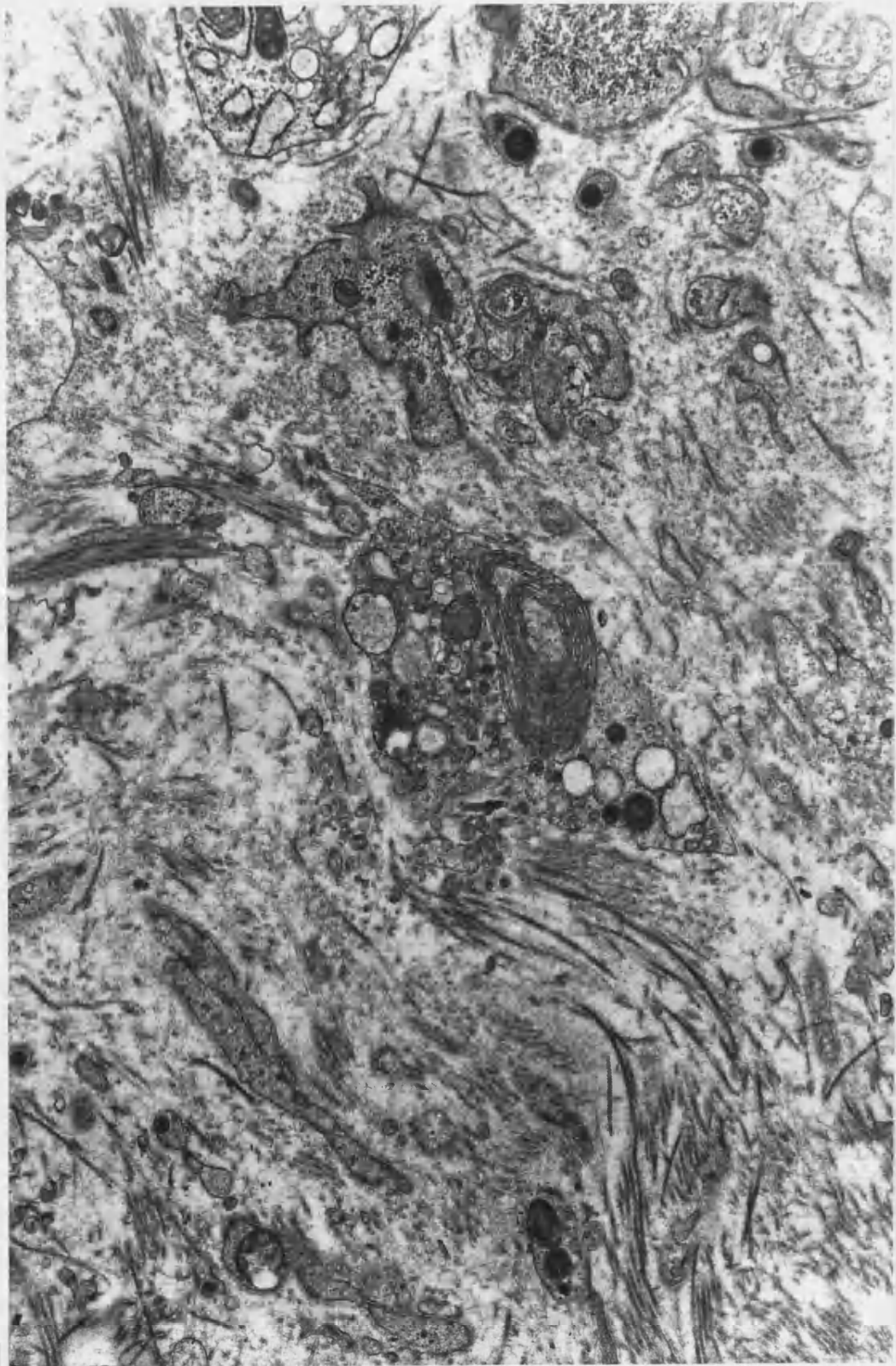


**Figura 79:** ENU 12H. Newurofibroma. Complejas prolongaciones citoplásmicas y abundantes haces de colágena.



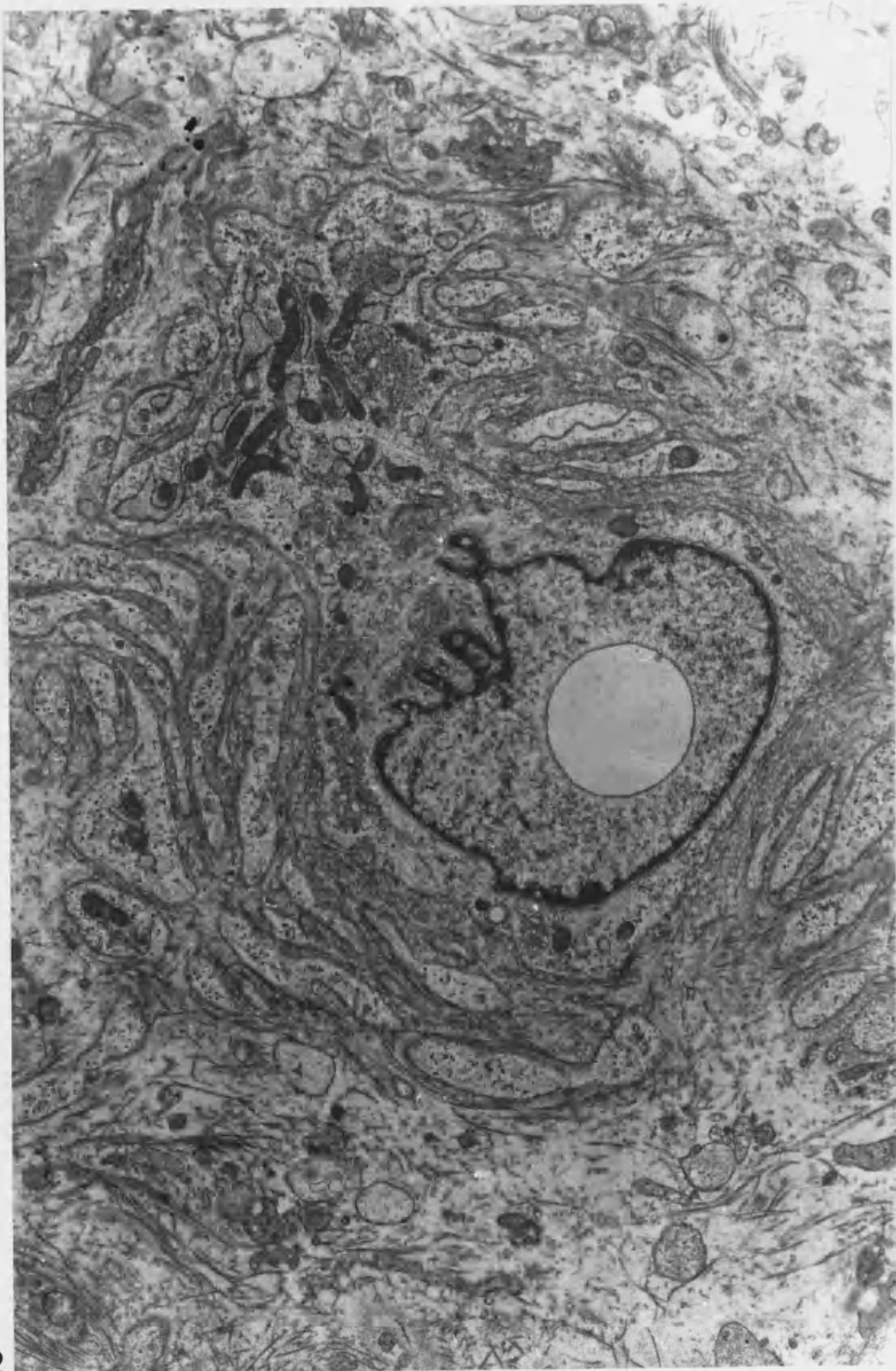
**Figura 80: ENU 30H. Ganglioneurofibroma retroperitoneal.**

**Estructurameisniforme.**



**Figura 81: ENU 12H. Neurofibroma. Formaciones lamelares.**

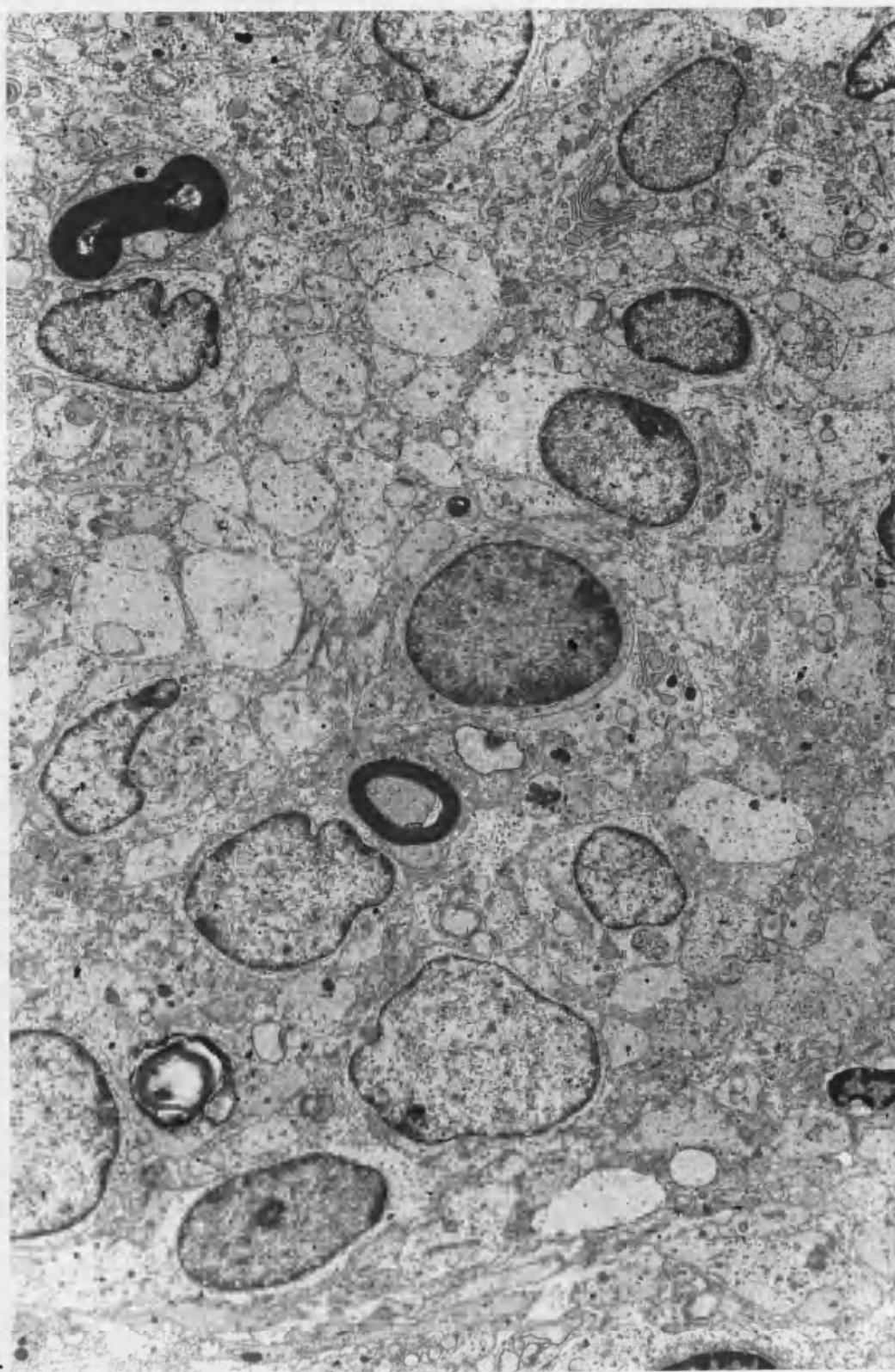




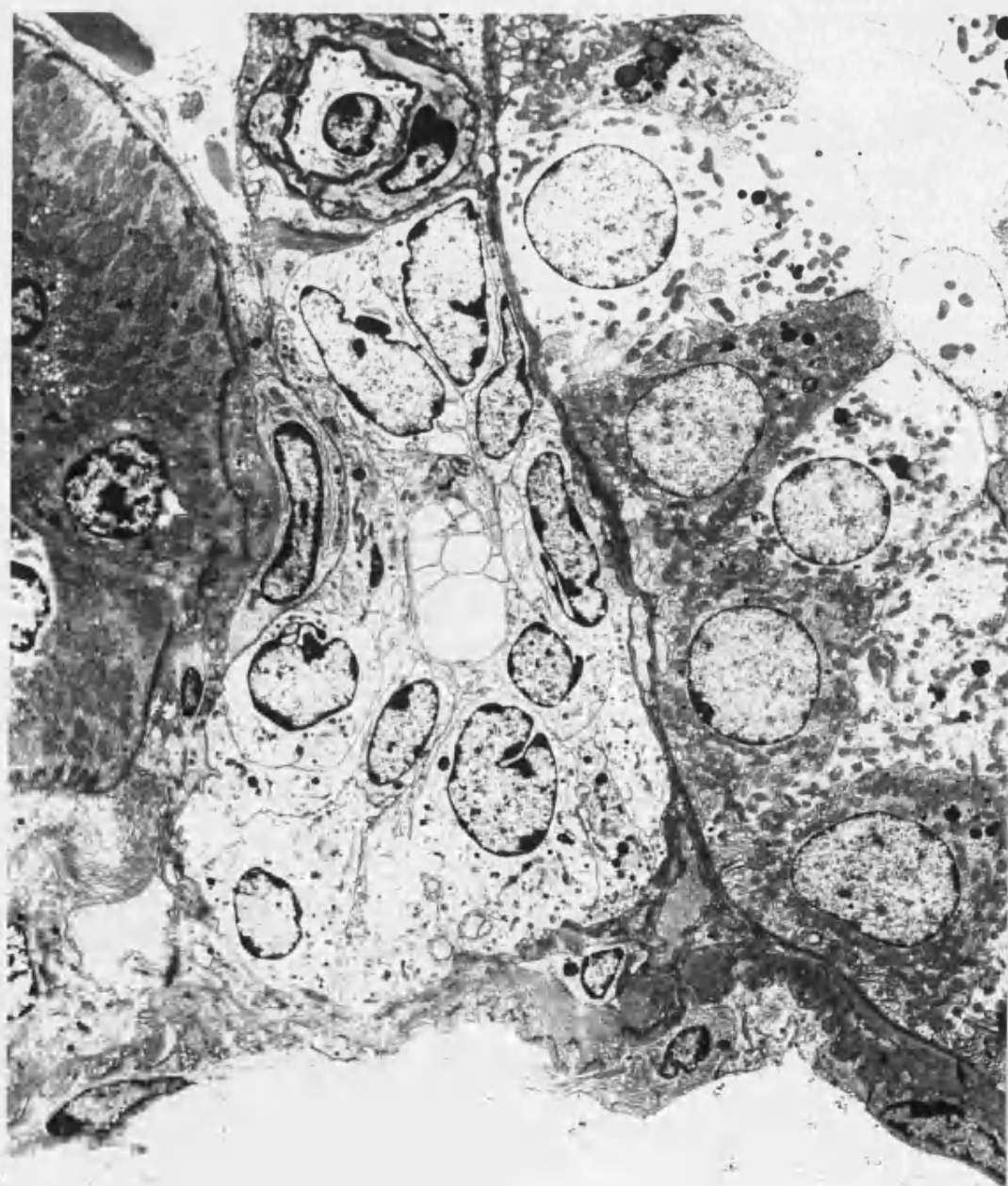
**Figura 82: ENU 12H. Neurofibroma. Vacuolas intranucleares.**



**Figura 83:** E+D20H. Neurinoma maligno del trigémino intracraneal. Cuerpo de Verocay.

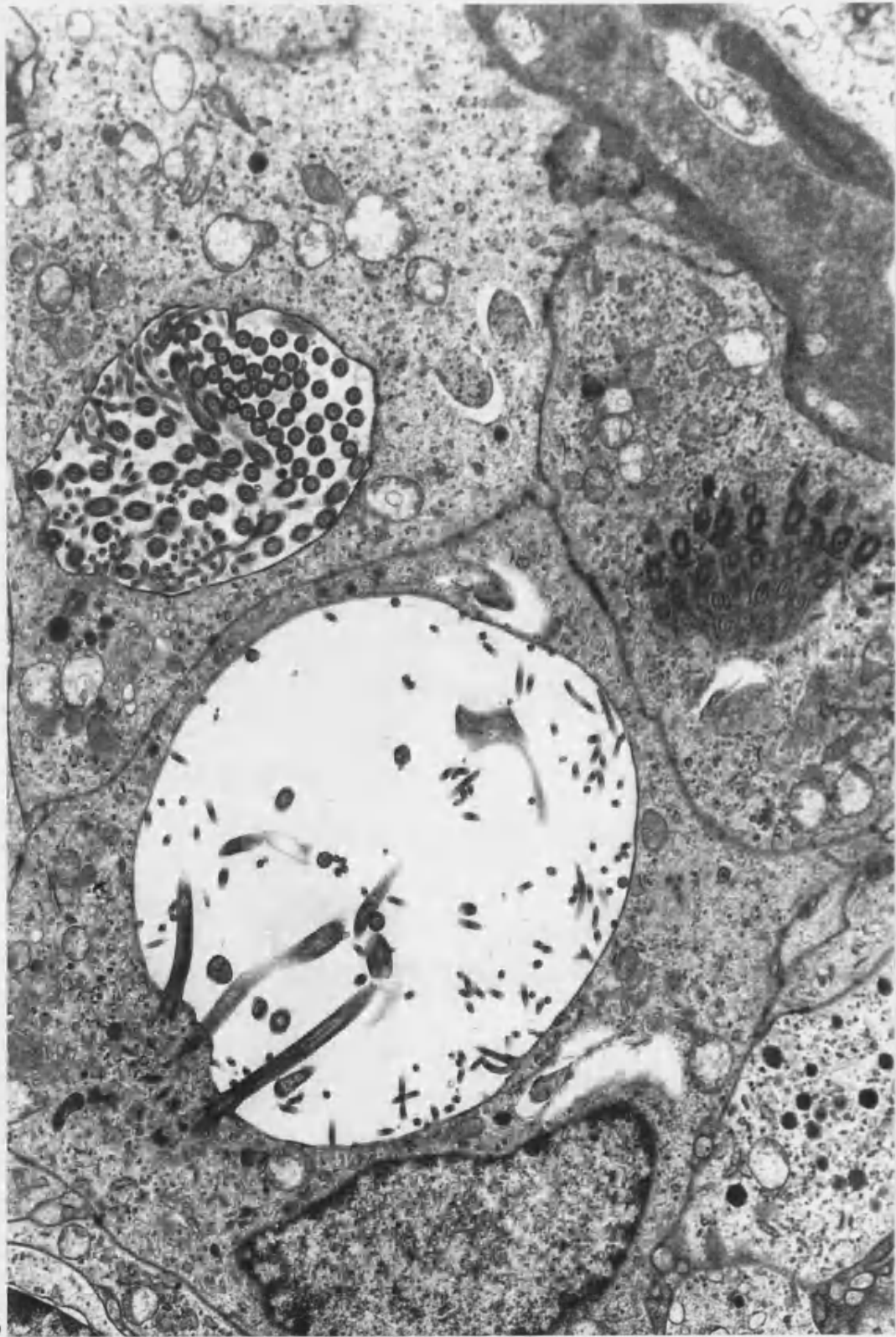


**Figura 84:** E+D 20H. Neurinoma maligno trigémino intracraneal. Areas indiferenciadas de células pequeñas con escaso citoplasma, apreciándose fibras mielinizadas entre ellas.

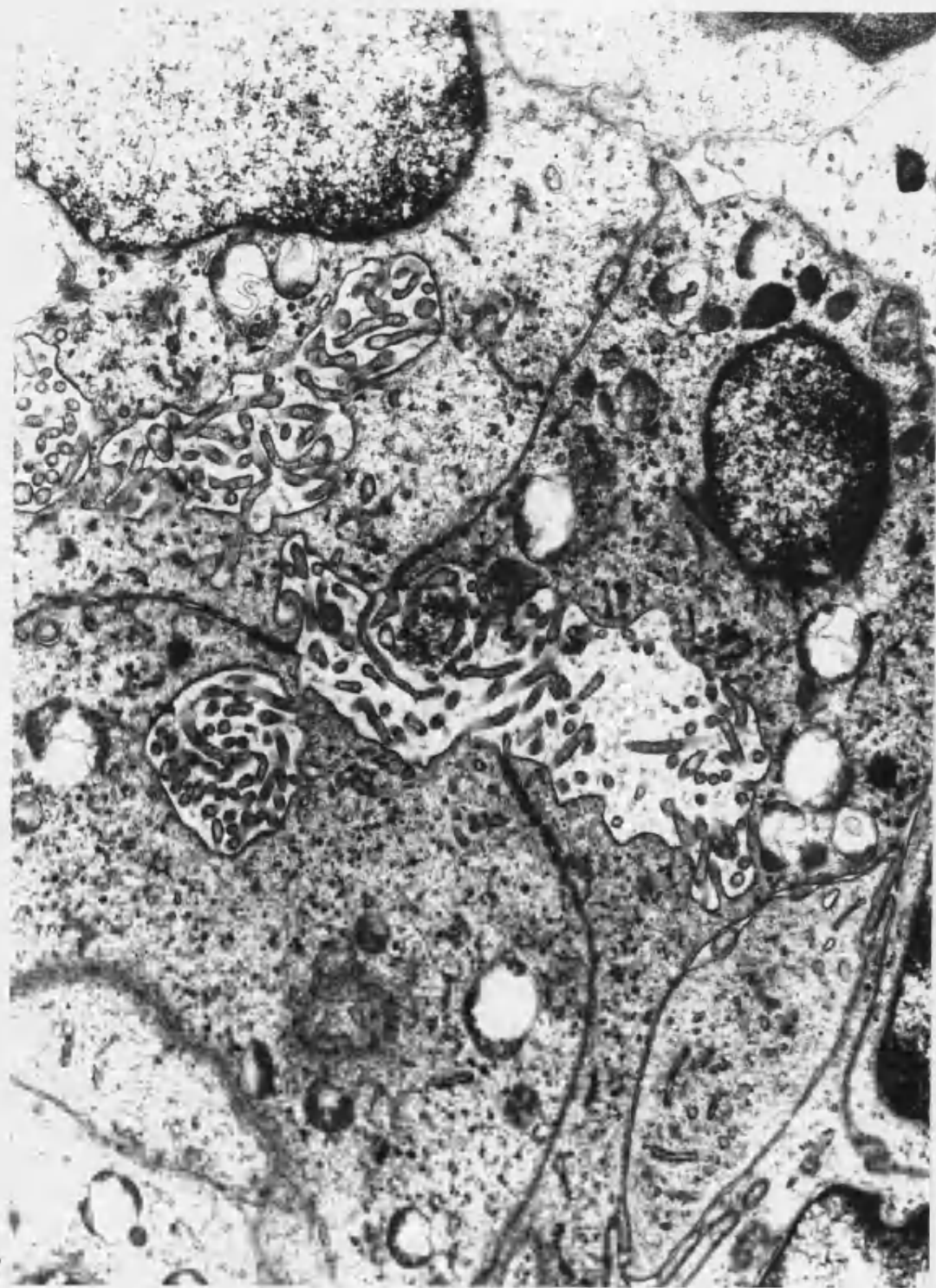


**Figura 85:** Tumorrenal. Patrónepitelial. Célulaspoligonalesde  
citoplasma pálido yvacuolización.

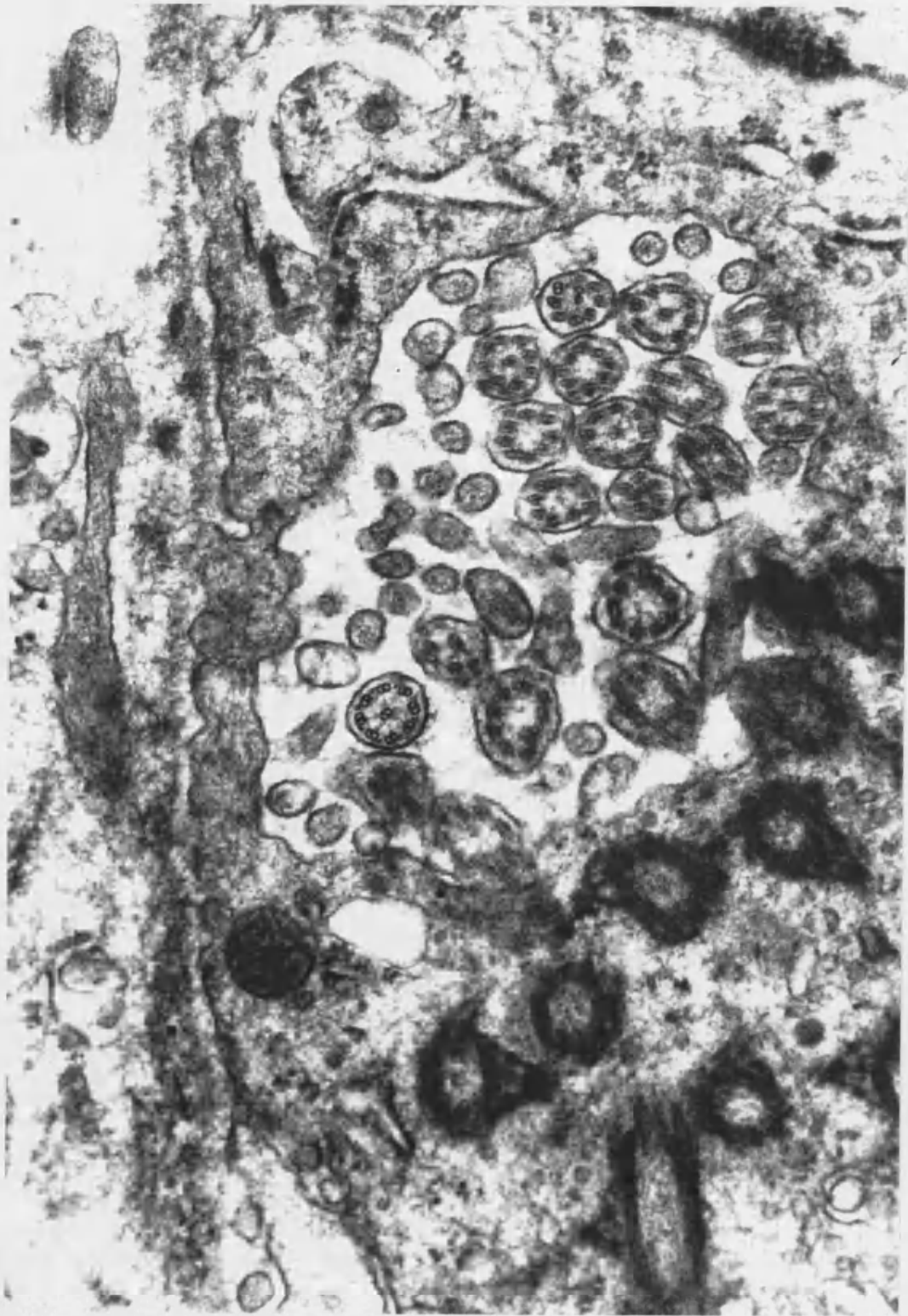




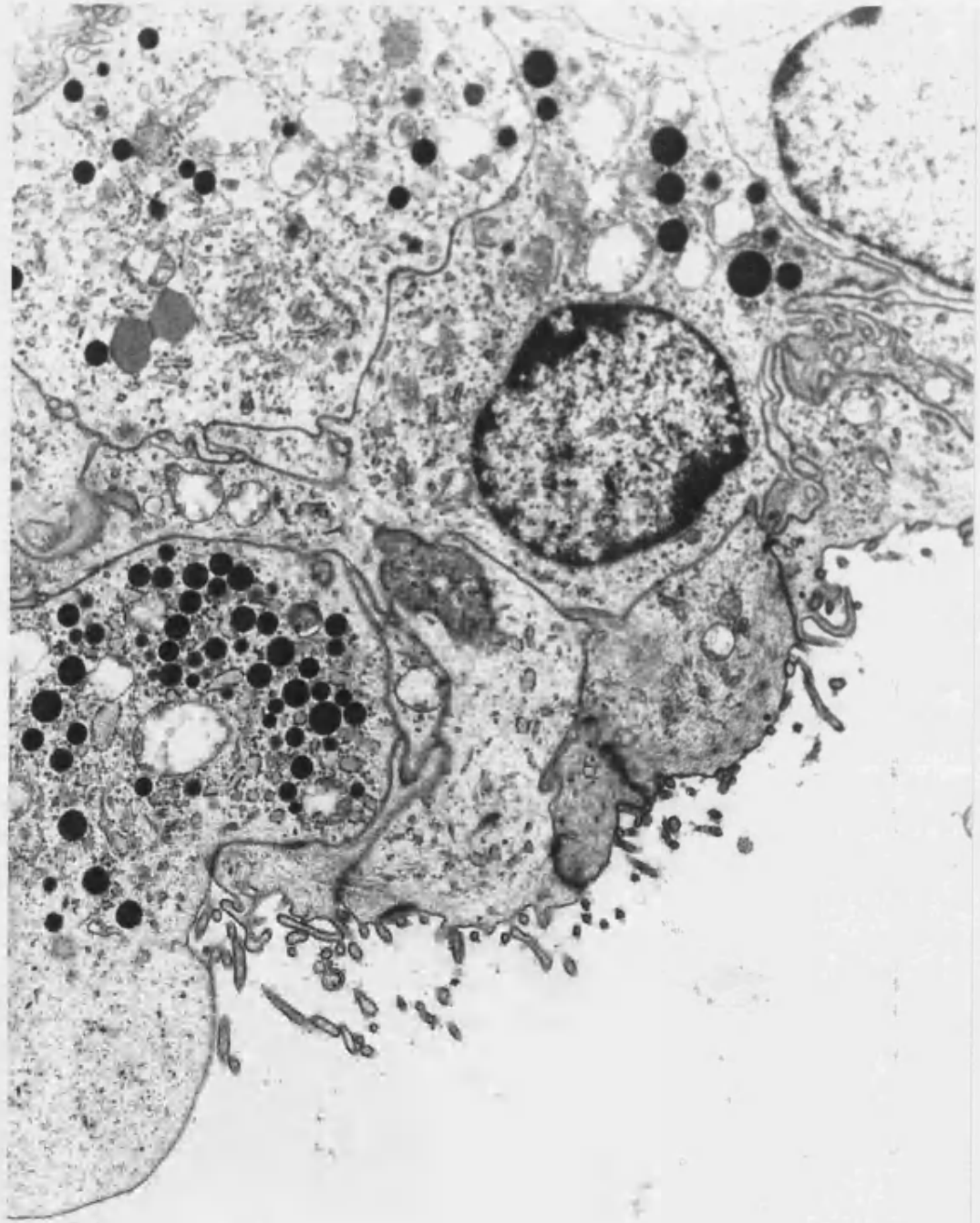
**Figura 36:** E+D5H. Tumorrenal. Diferenciación epitelial.  
Luces intracelulares con microvellosidades y cilios.



**Figura 87: E+D26H. Tumorrenal. Diferenciaciónepitelial.**  
**Lucesintercelularesconmicrovellosidades. Unionesintercelulares**  
**desarrolladas.**

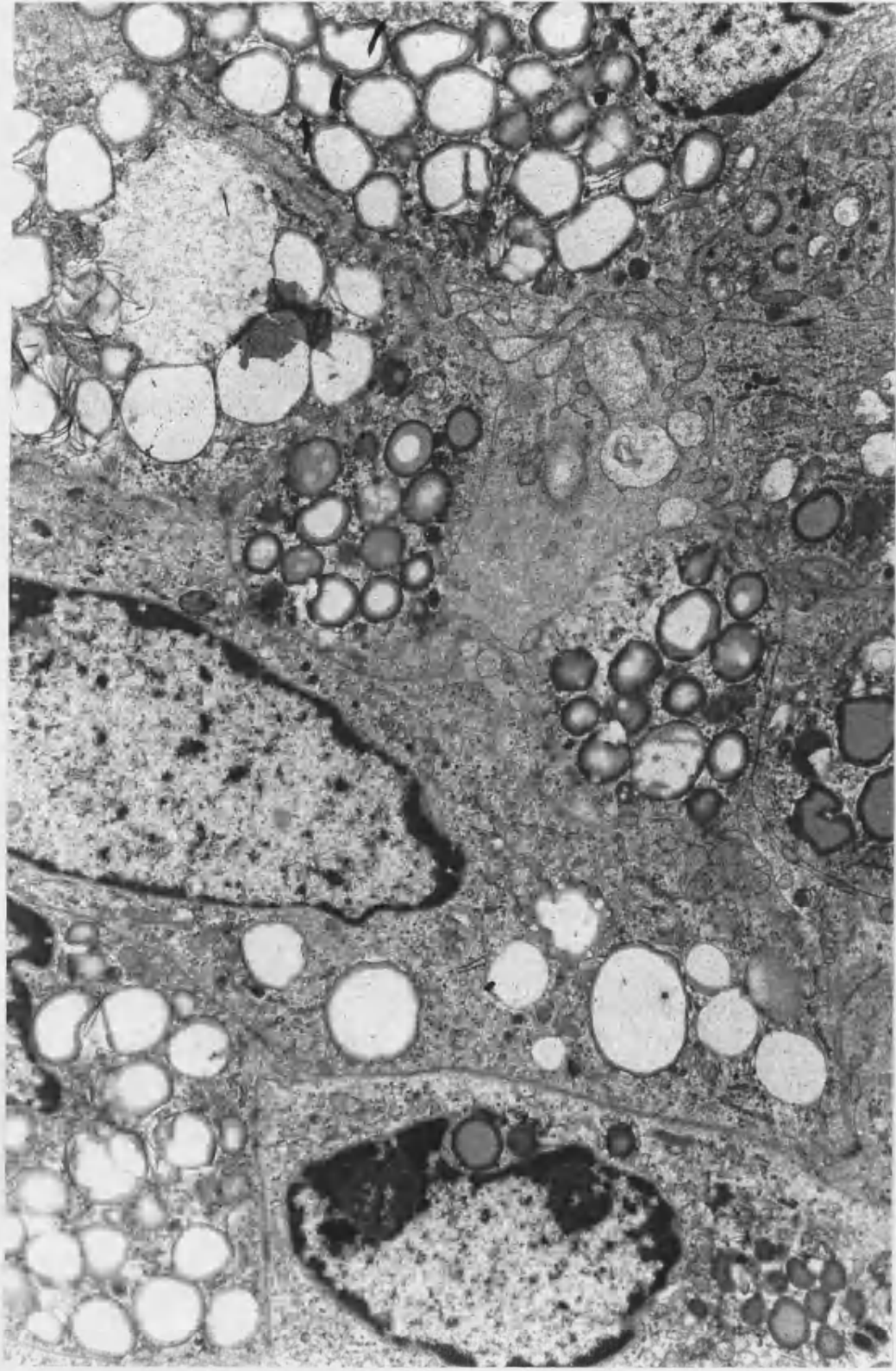


**Figura 88:** E+D8H. Tumorrenal. Diferenciaciónepitelial.  
Ciliosintracelulares, distinguiéndose en alguno de ellos la pérdida  
de los dos microtúbulos centrales.

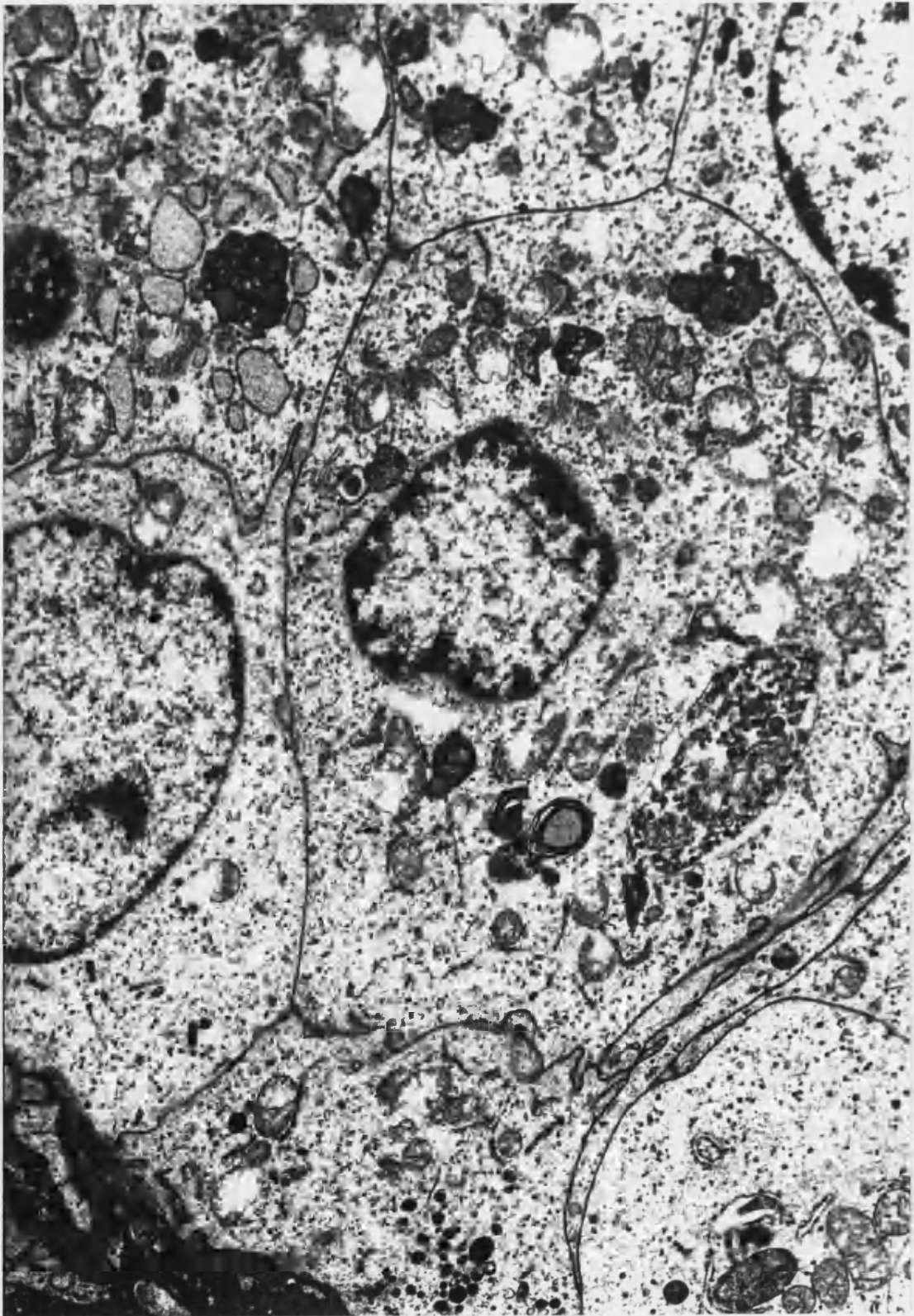


**Figura 89:** E+D 14M. Tumorrenal. Areaquística con microvellosidadesenlaluz.

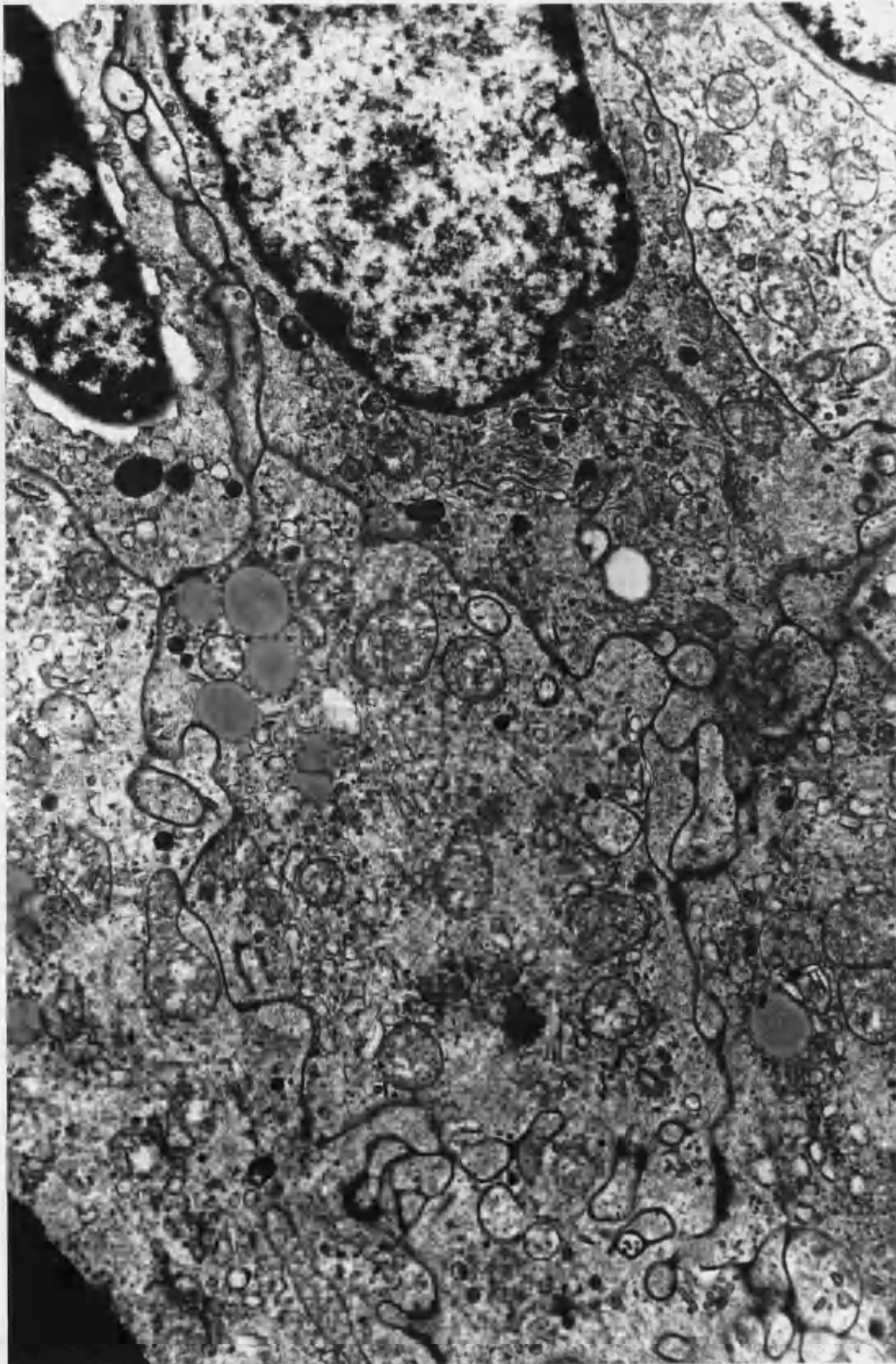




**Figura 90:** DES 17M. Tumorrenal. Gotas lipídicas  
citoplásmicas.

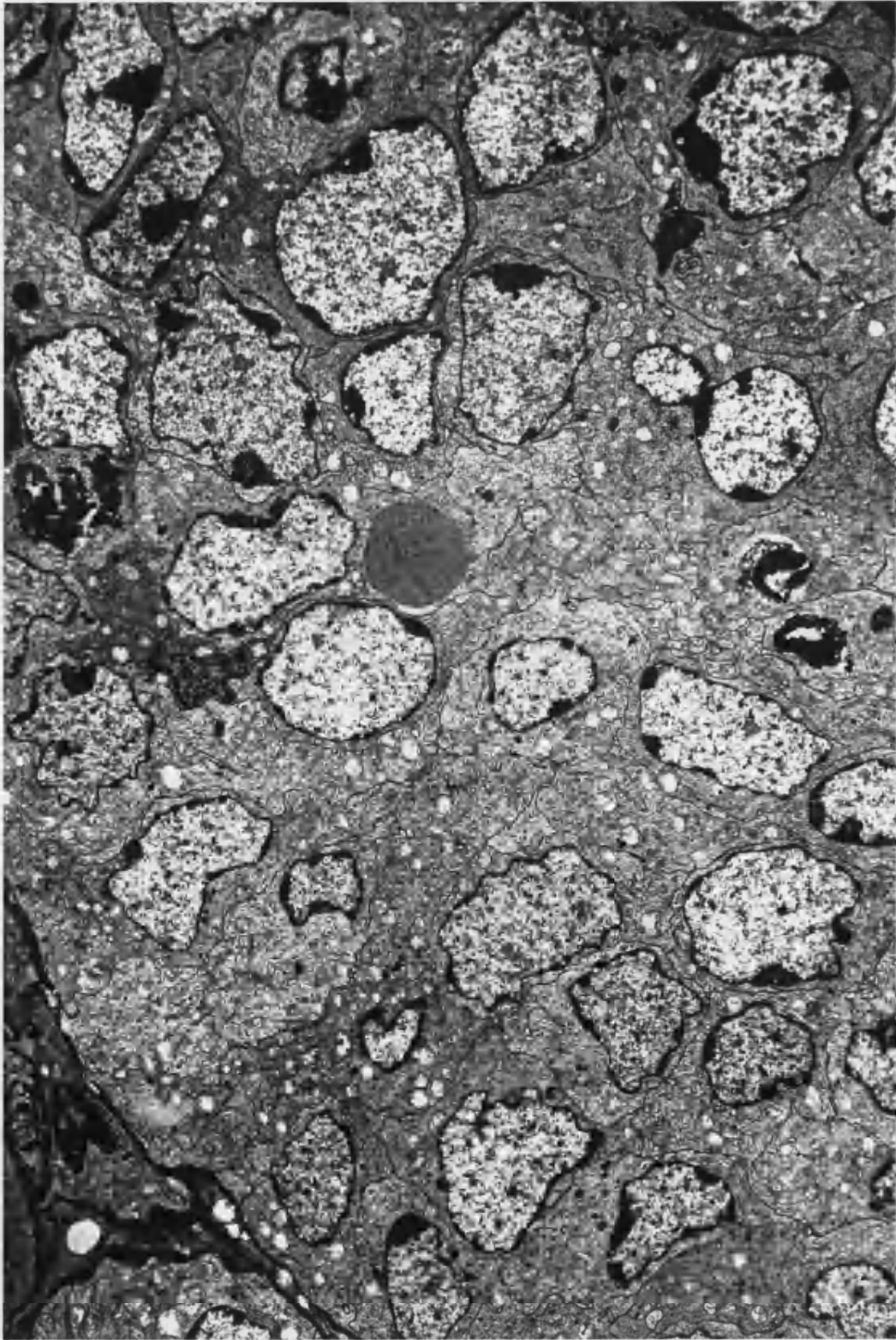


**Figura 91:** E+D 5H. Tumor renal. Presencia de cuerpos  
lipídicos.



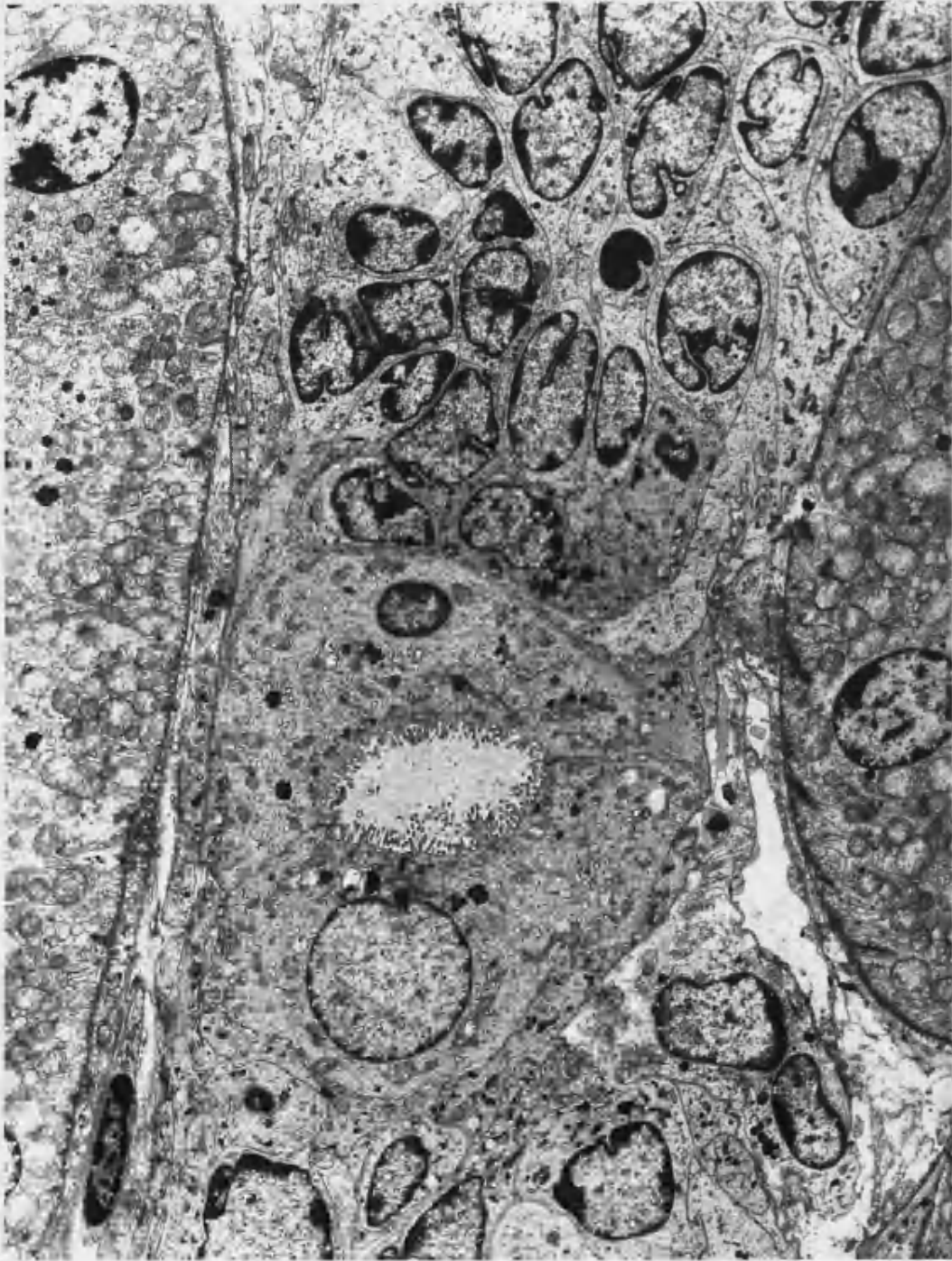
**Figura 92:** E+D 16H. Tumorrenal. Diferenciaciónepitelial con interdigitacionesyunionesintercelularesevidentes.



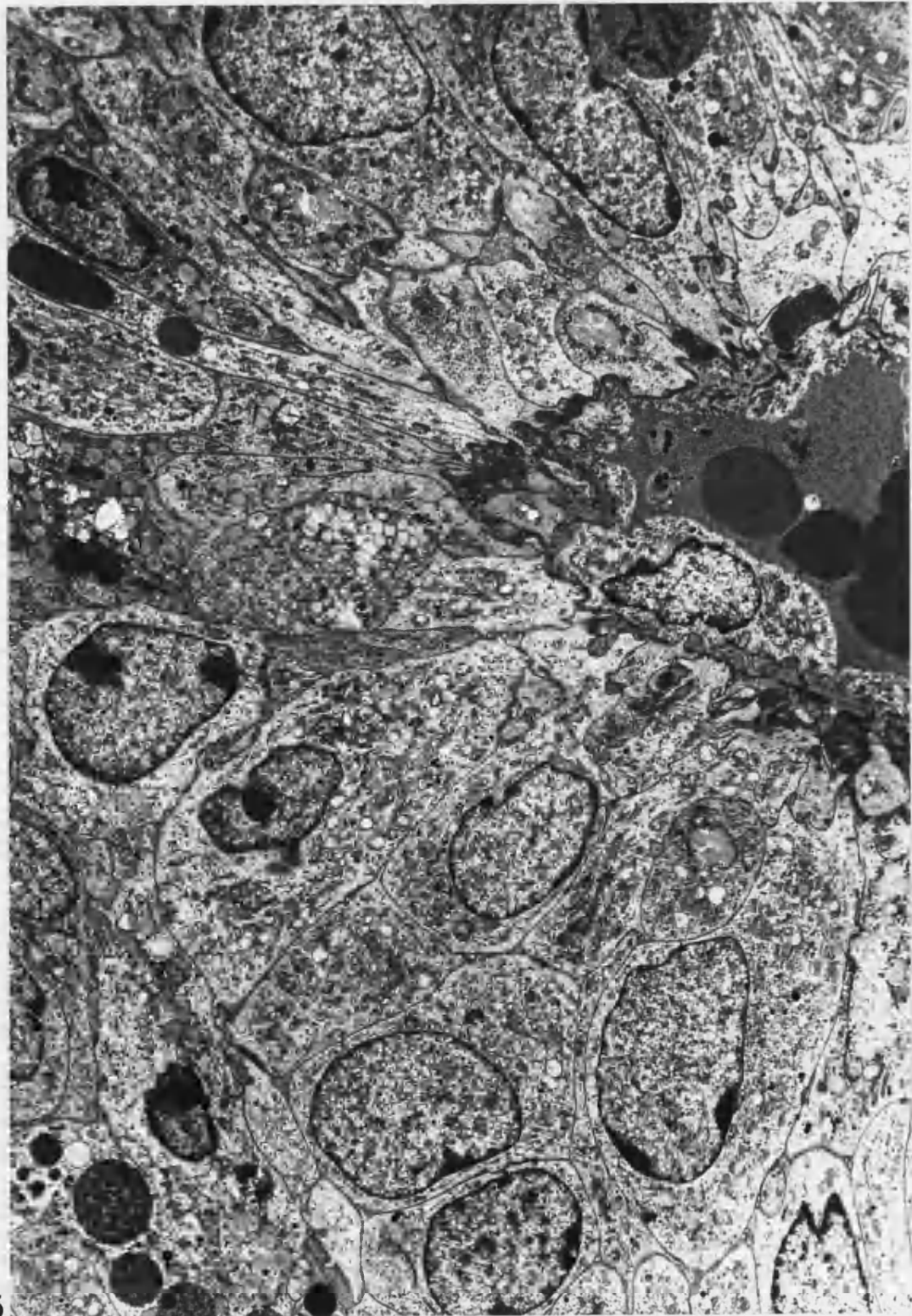


**Figura 93:** E+D 9H. Tumorrenal. Patrón blastemal.

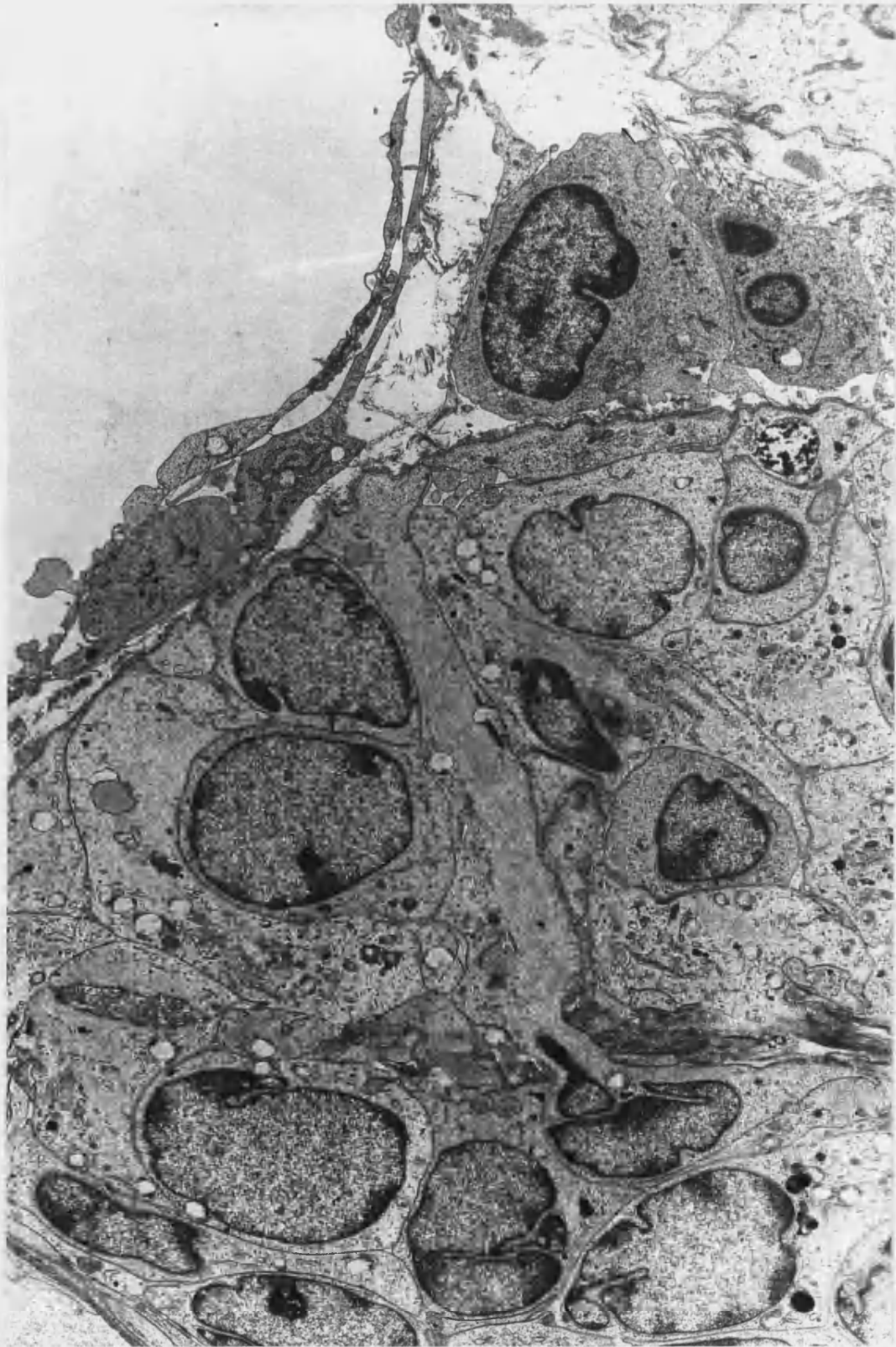




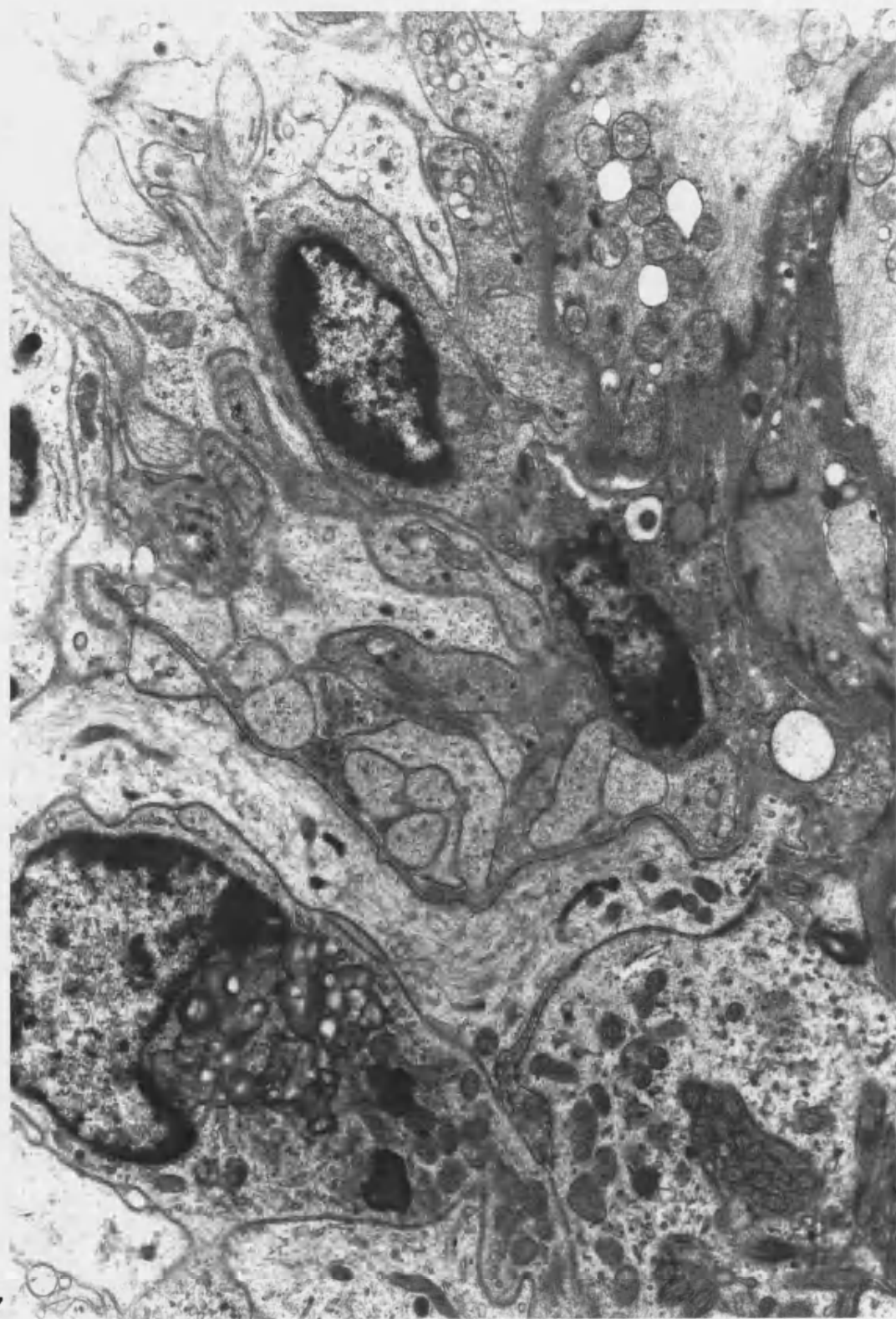
**Figura 94:** E+D26M. Tumor renal. Transición patrón blastemal-epitelial con presencia de un túbulo primitivo.



**Figura 95:** E+D 20H. Tumor renal. Pseudorroseta perivascular.



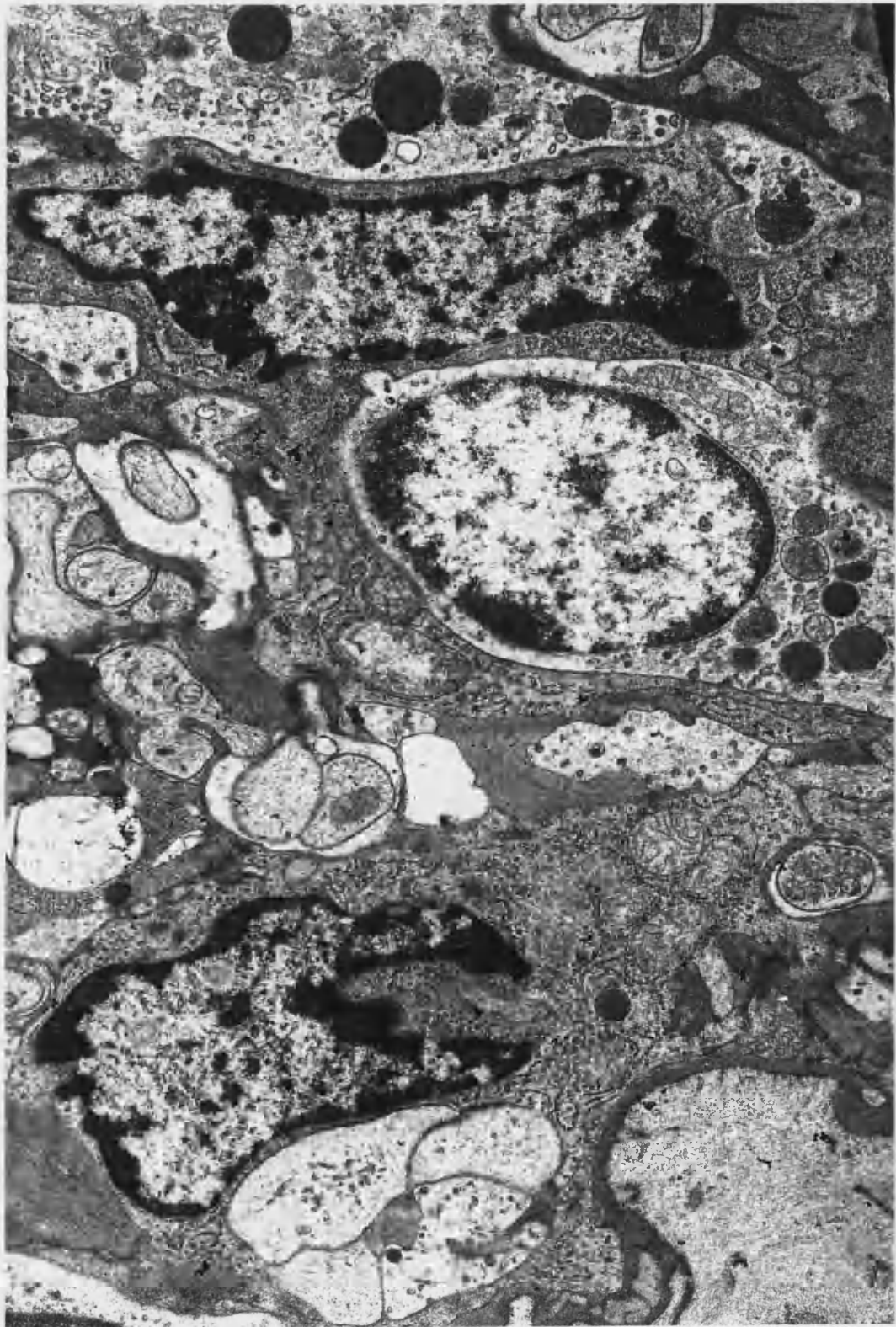
**Figura 96:** E+D 26M. Tumorrenal. Presencia de abundantes filamentosintermedios.



**Figura 97:** E+D26M. Tumorrenal. Diferenciación neural.

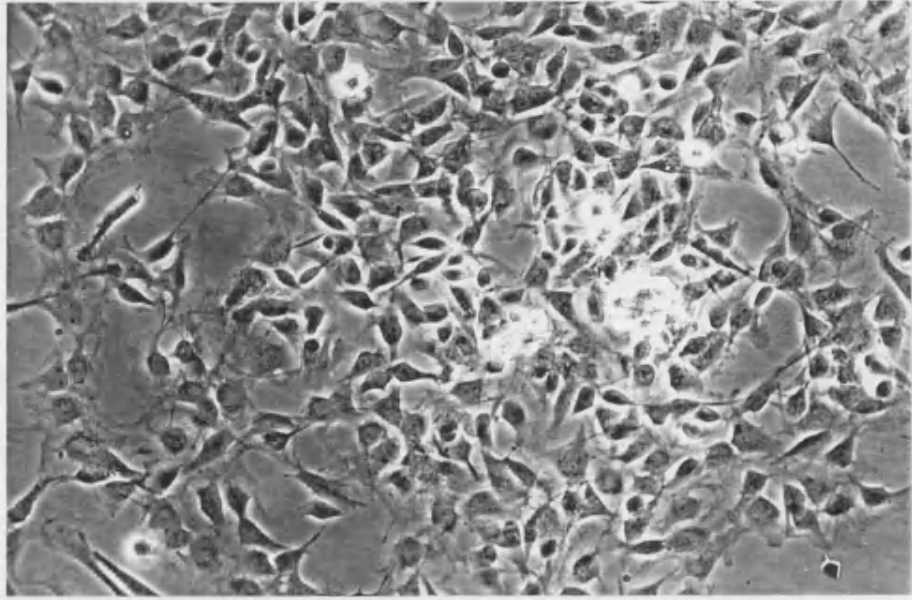
Proceso citoplásmicos complejos que tienden a rodear estructuras de aspecto neural y estando rodeadas por membrana basal.



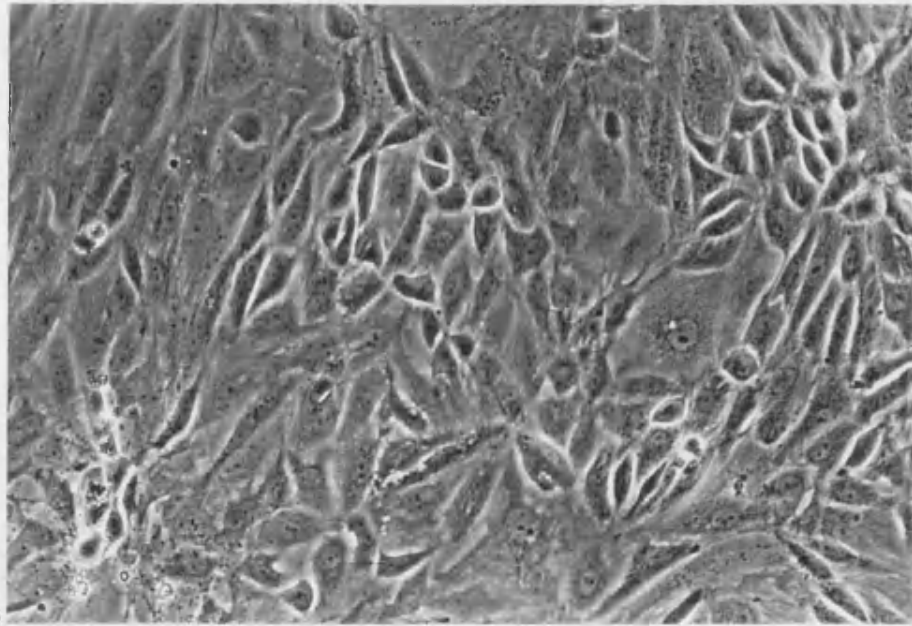


**Figura 98:** E+D 5H. Tumorrenal. Diferenciación neural.

Presencia de estructuras pseudomesoaxónicas.

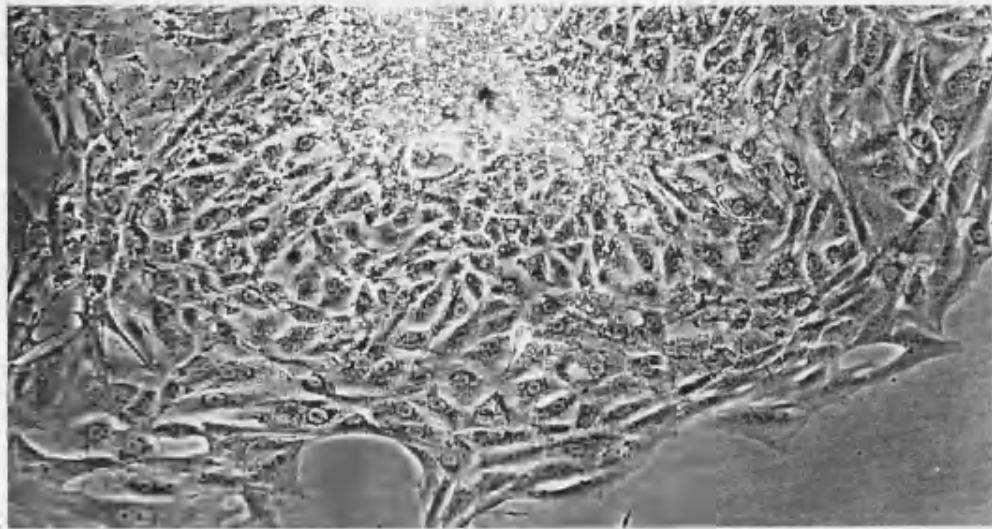


A

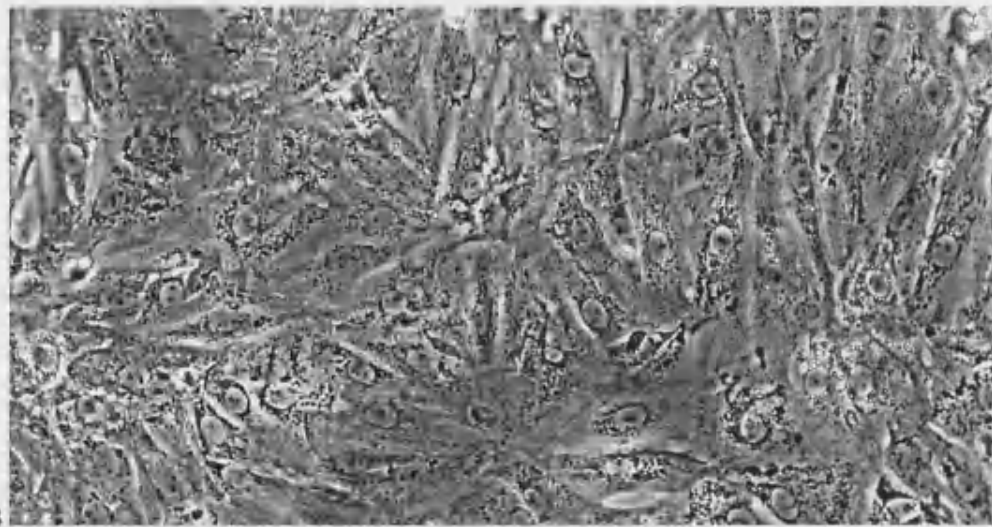


B

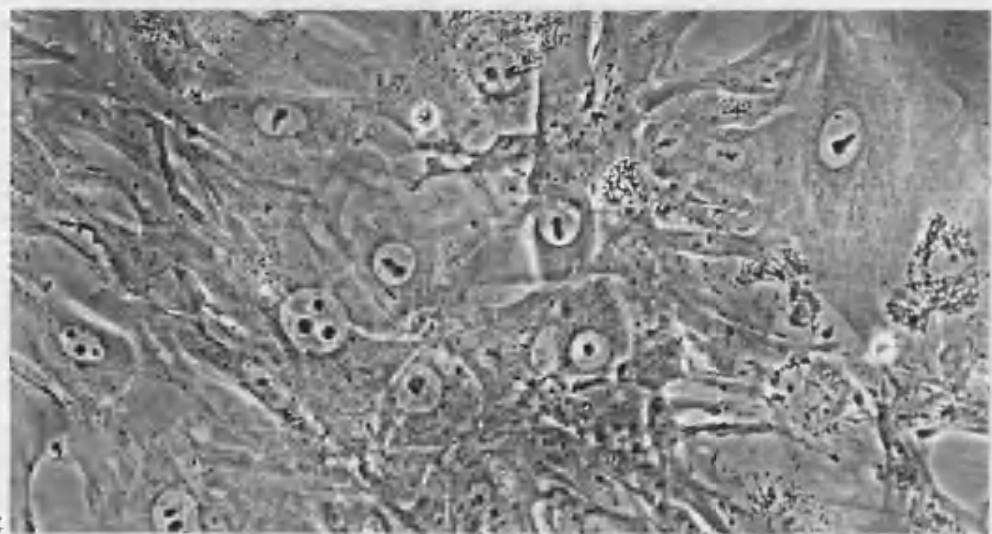
**Figura 99:** DES 20M. Tumor renal. Cultivo. A) Grupos de células pequeñas de aspecto epitelioide, presentando prolongaciones citoplásmicas. B) Células tumorales fusiformes.



A



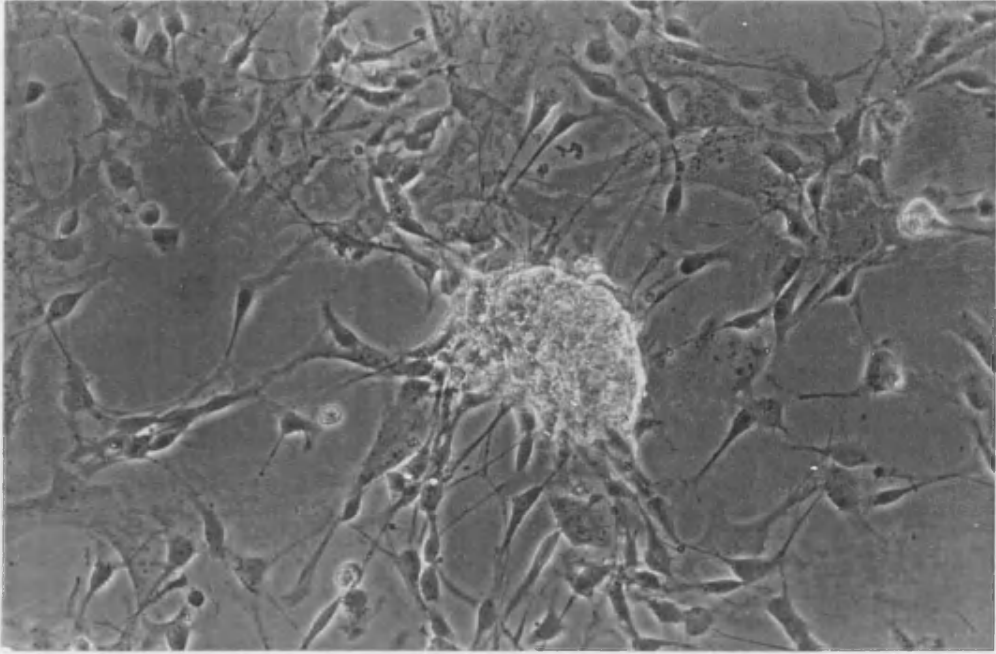
B



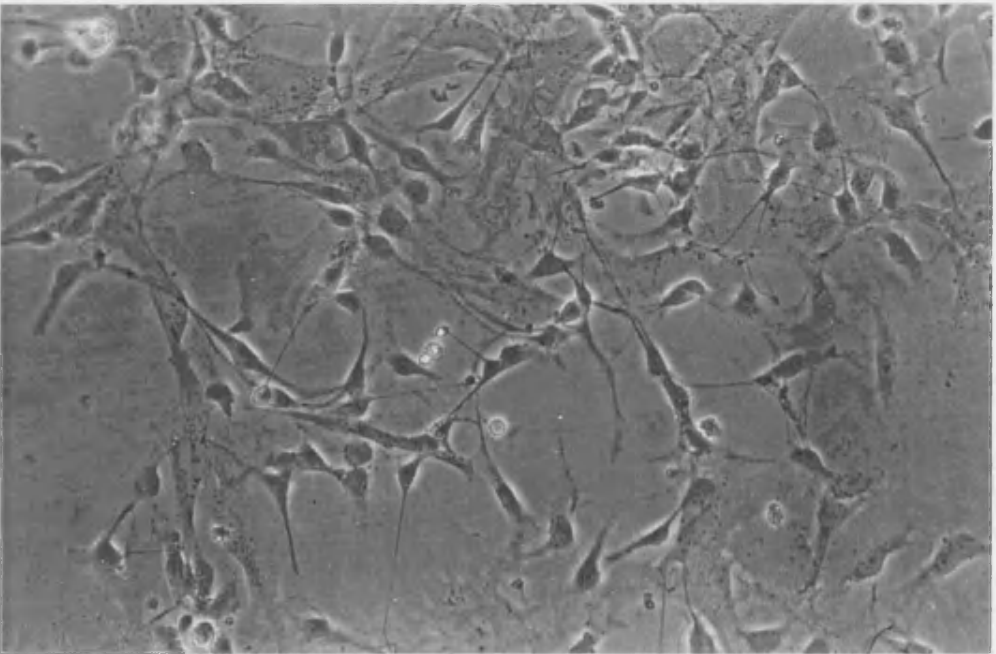
C

100

**Figura 100:** E+D 19H. Tumor renal. Cultivo. A) Grupos de células de aspecto epitelioide con numerosas vacuolas. B) Areas de células con predominio de granulaciones. C) Evidente variación de forma y tamaño celular y nuclear.



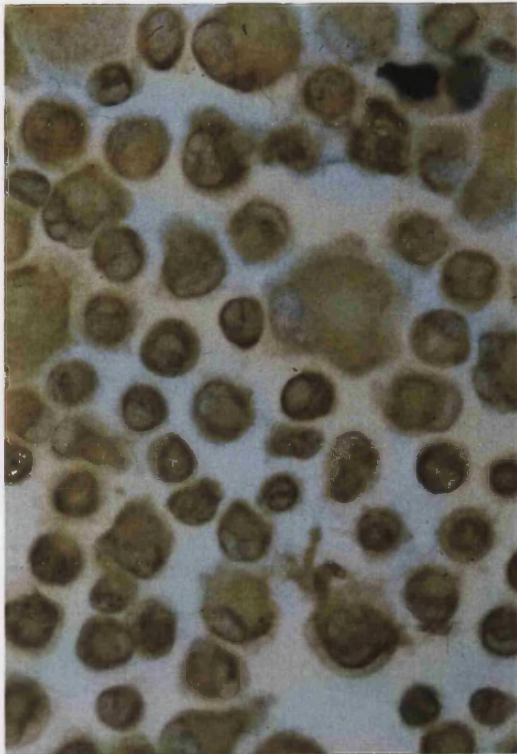
101  
B



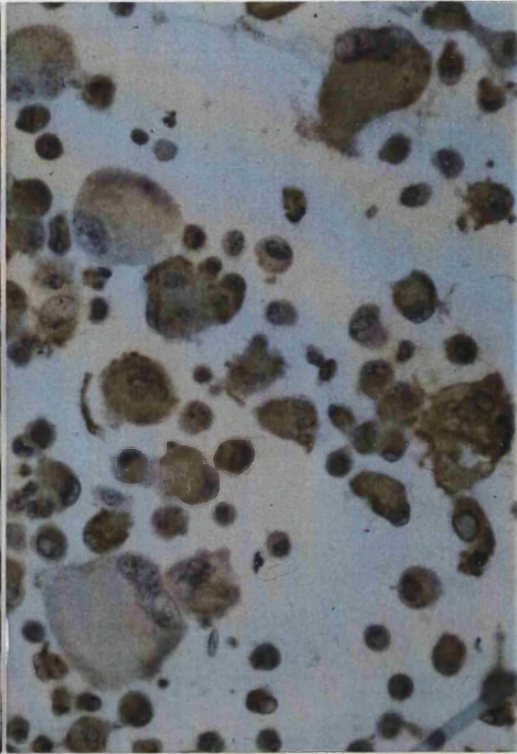
A

**Figura 101:** ENU 60H. Tumor neural. Cultivo. A y B) Células con numerosas prolongaciones citoplásmicas, estableciendo contactos entre las distintas células.

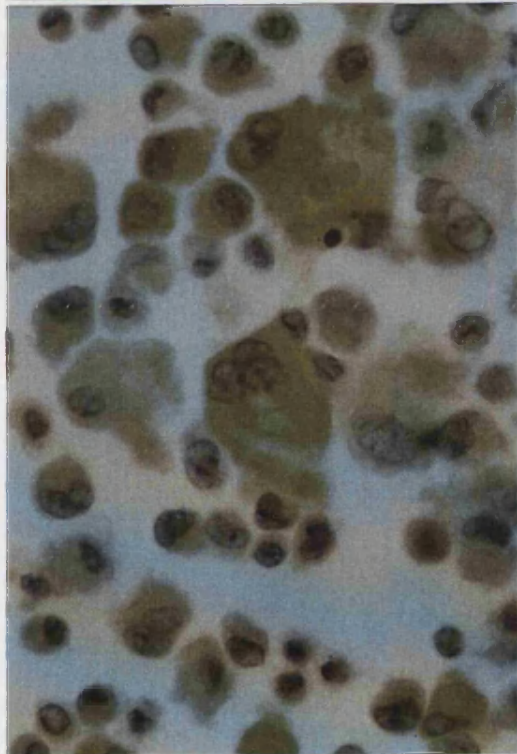




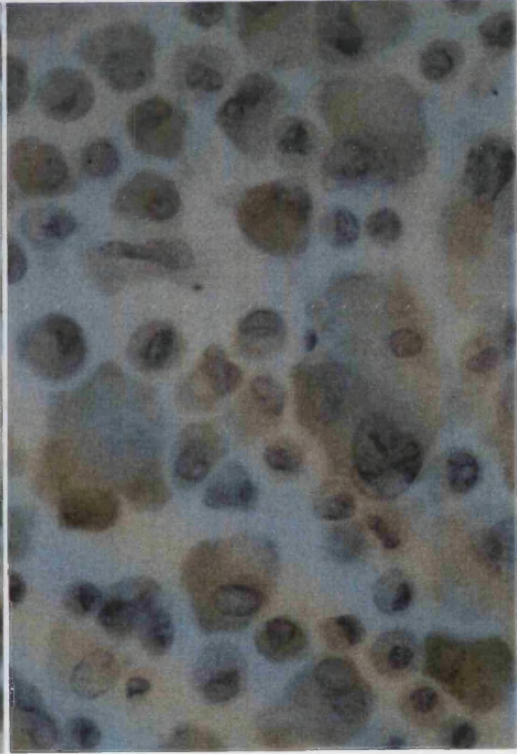
A



B

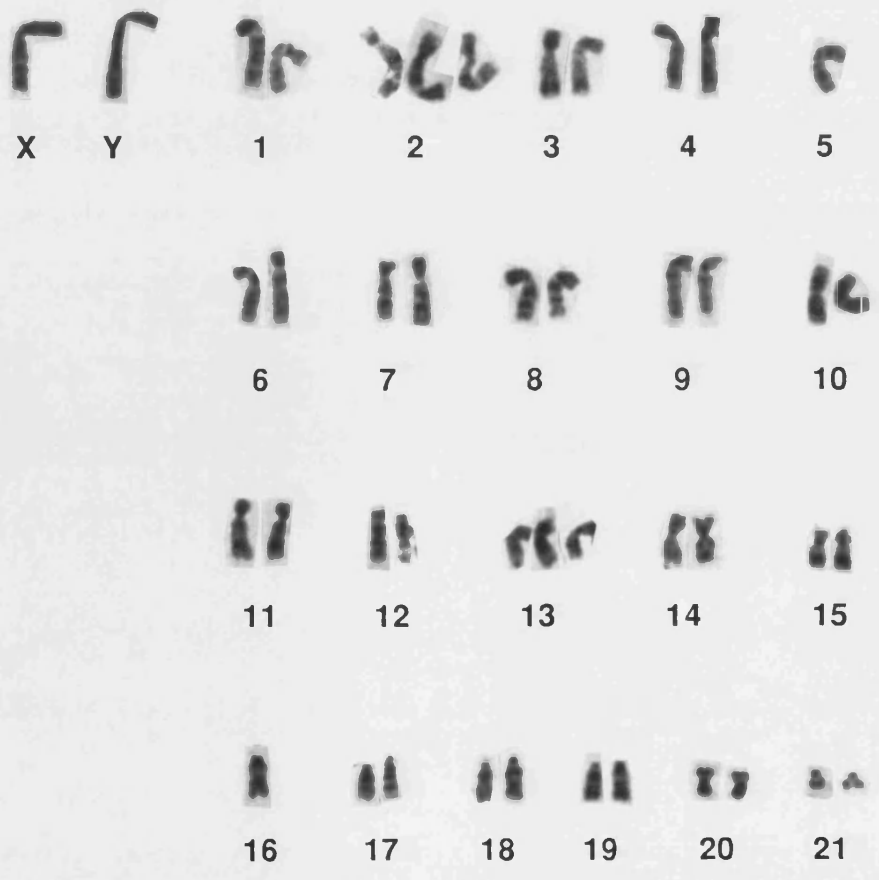
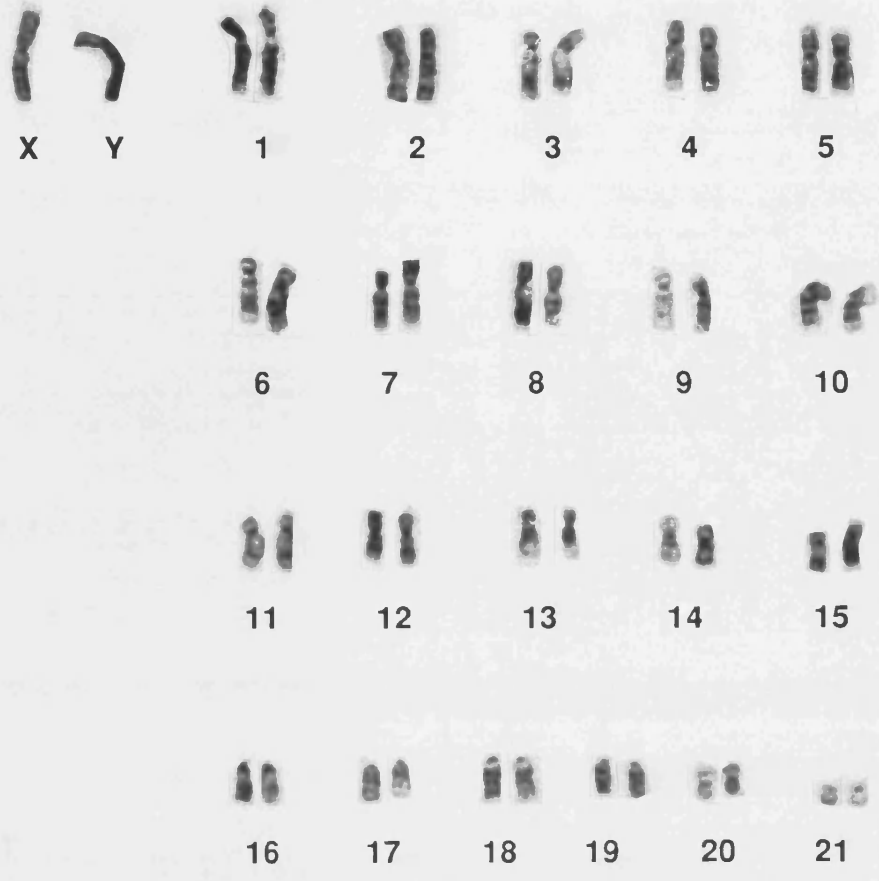


C

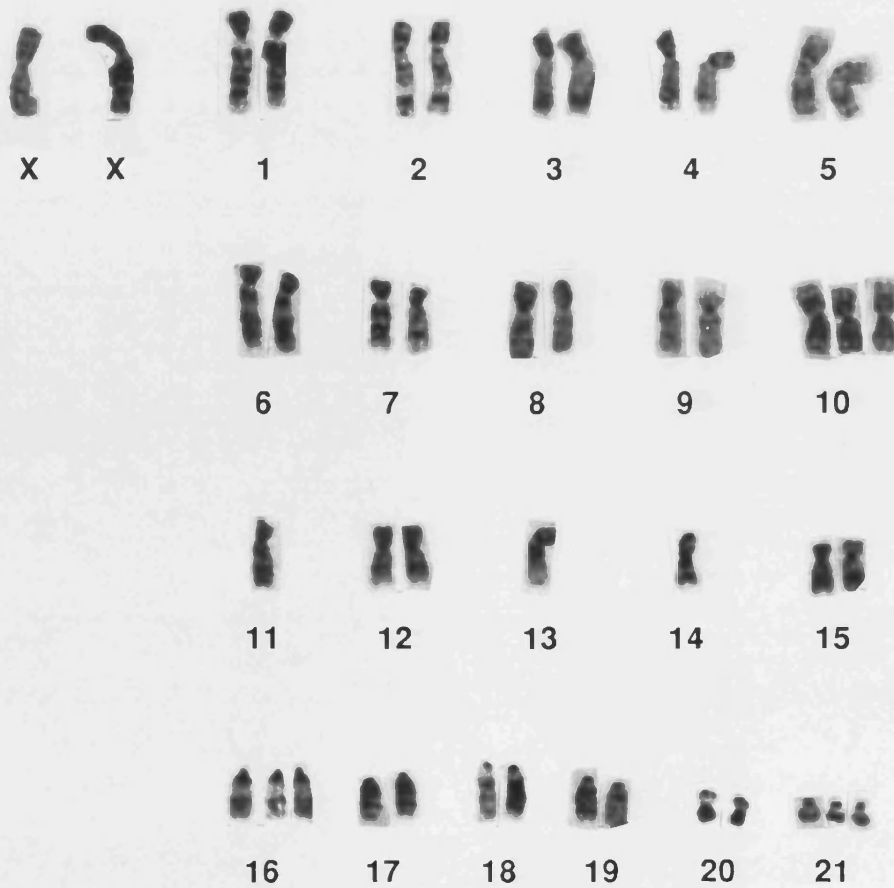
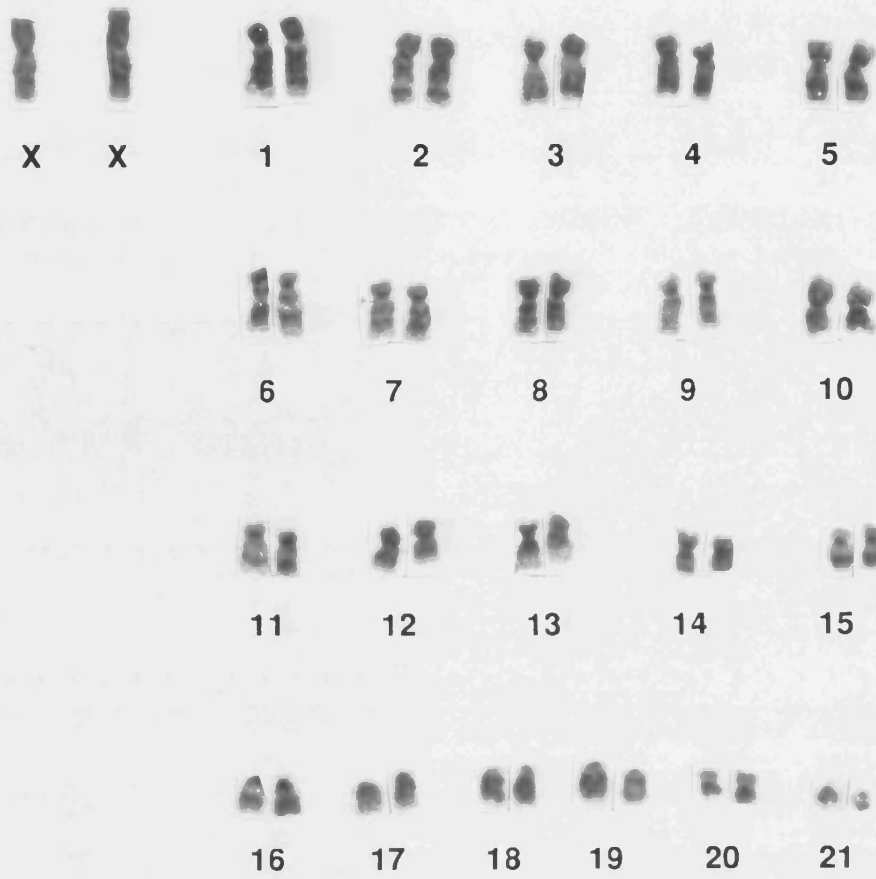


D

**Figura 102:** E+D 19M. Cultivo tumor renal.  
Inmunohistoquímica. A) Vimentina. Positividad citoplásmica difusa en prácticamente todas las células. B) Citoqueratina. Existen células neoplásicas que no la expresan. C) S-100. Tinción citoplásmica con variación de la intensidad de una células a otras.  
D) NSE. Débil tinción citoplásmica.



**Figura 103:** DES 24M. Cariotipo tumor renal. Superior:  
cariotipo 44, XY. Inferior: cariotipo 44, XY, +2, -5, +13, -16.



**Figura 104:** E+D 19H. Cariotipo tumor renal. Superior:  
cariotipo 44, XX. Inferior: cariòtipo 44, XX, +10, -11, -13, -14,  
+16, +21.

**Hamster E+D 1H**

Fecha nacimiento 27/6/90 Fecha gonadectomía 24/8/90 Fecha sacrificio 11/2/91  
 Tiempo exposición DEM 157 días Inicio intoxicación 6/9/90 Final intoxicación 11/2/91

Exposición EMU SI

Técnicas especiales SI BQ SI BQ SI IBQ SI TEM 10463 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

- A) Tumor pata posterior derecha de 2'5x1'5 cm, bien delimitado, pseudocapsulado y blanquecino y elástico a la sección, localizado en región de nervio cístico.
- B) Ambos riñones con varios nódulos blanquecinos bien delimitados, corticales, entre 0'1 y 0'2 cm, localizados preferentemente en las caras posteriores.
- C) Nervio cístico izquierdo sin lesiones macroscópicas.
- D) Glándula suprarrenal izquierda aumentada de tamaño, 0'4 cm de diámetro mayor, de coloración parda a la sección.
- E) Cuerno uerino izquierdo mostrando dilatación quística de 3x2 cm, conteniendo material cremoso de coloración negraza, observándose engrosamiento parietal focal y superficie interna rugosa.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** Hiperplasia de células intersticiales.

-Múltiples nódulos tumorales de pequeño tamaño (tumoretas) corticales y yuxtacorticales. Patrón de crecimiento blastomal y trabecular, ocasionalmente con áreas de células claras (PAS -) y estralladas. Citoplasma escaso basófilo, focalmente presencia de material hialino intracitoplásmico. Núcleos redondos u ovoides, nucleolo pequeño. Mitosis numerosas. Ausencia de necrosis. Ausencia de reacción estromal peritumoral. Presencia de un foco quístico-tubular.

-Microadenoma renal.

**PATA POSTERIOR DERECHA:** Proliferación neoplásica pseudocapsulada, constituida por células elongadas, de escaso citoplasma con ocasionales prolongaciones, existiendo abundante material mixoide intertubular. Ausencia de inclusiones citoplásmicas intranucleares. Se observa ocasionales estructuras orgánicas distorsionadas parecidas a corpúsculos de Wagner-Meisner (cuerpos tactoides o meissneriformes). No existe degeneración quística, necrosis ni mitosis. Vasculización moderada. Filotes nerviosos englobados en la periferia del tumor. Presencia en el estroma de abundantes mastocitos.

**GLÁNDULA SUPRARRENAL IZQ:** adenoma cortical.

**UTERO:** Absente.

**Immuno-histoquímica**

**TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE:** DT -; VIM ++/50%; S-100 +++/98%; NSE +/10%; HNK -; EMA -; K-; CK-; CAM 5.2-; CEA-; FVIIIa-; UEA-I-; DES+/5%; MIOG-; S1N-; aQT-; NF-.

**ADENOMA RENAL:** UEA-I +++.

**TUMOR PATA POST DERECHA:** DT-; VIM +++/95%; S-100 ++/95%; NSE++/ <25%(1); HNK -; EMA -; GFAP-; CEA-; S1N-; NF-; UEA-I-; aQT-.

**M. electrónica**

**T. RENAL:** P. epitelial sólido y blastomal indiferenciado. Células claras poligonales de disposición compacta. Transición epitelial-blastomal. Transición entre células oscuras y claras. Núcleos redondos/ovales con ocasional escotadura. Cromatina condensada periféricamente. Uniones intertubulares desarrolladas. Microvelosidades y cilios. Gotas lipídicas. Gránulos neurosecretores. Luces inter e intracelulares. Plas basales diferenciados. Interdigitaciones. Gránulos de Birbeck-like. T. SNP: Matriz extracelular abundante, escasa y dispersa celularidad, mastocitos.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

- 1) Tumor renal tipo nefroblastoma-like
- 2) Adenoma renal
- 3) Neurofibroma de pata posterior derecha en región de nervio cístico.
- 4) Adenoma cortical suprarrenal izquierda

**Notas**

Inicio tumor pata posterior: 6/9/90. (1) citoplasma granular y en fibras nerviosas englobadas.



Hamster E+D 2H

Fecha nacimiento 27/6/90 Fecha gonadectomía 24/8/90 Fecha sacrificio 11/2/91  
Tiempo exposición DES 157 días Inicio intoxicación 6/9/90 Final intoxicación 11/2/91  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10464 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Riñón derecho mostrando pequeño nódulo cortical de 0'1 cm blanquecino.

PIEL: nódulo subcutáneo en morro de 1 cm de diámetro, bien delimitado, de coloración blanco-anaranjada a la sección y de consistencia elástica.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Restos nefrogénicos. Quistes simples. Hiperplasia de células intersticiales. Displasia epitelial tubular.

PIEL: Neoformación pseudoencapsulada constituida por células elongadas con ocasionales prolongaciones citoplásmicas separadas entre sí por abundante material mixoide estrómicio. Se observa focalmente la presencia de cuerpos tactoides. No existe degeneración quística, necrosis, mitosis ni atipia nuclear. Hay englobamiento de filetes nerviosos central y periféricamente.

**Imunohistoquímica**

RIÑÓN (hiperplasia de células intersticiales): DT NR; VIM +/-; S-100 +/50%; NSE +/ < 10%; HNK -; EMA -; DES++/25%; MIOG NV; K-; CK-; CAM 5.2-; CEA-/+; SIN NV; UEA-I-; FVIIIIRA-; sQT-; NF-.

RIÑÓN (displasia epitelial tubular): VIM-; S-100-; NSE-; HNK-; DES-; K+ +/ > 75%; CAM 5.2-; CK-; UEA-I + + + / > 75%; FVIIIIRA-.

TUMOR MORRO: DT+; VIM + + / > 75%; S-100 + + + / > 75%; HNK -; NSE + / < 25%(1); EMA -; GFAP-; NF-; UEA-I -; sQT-.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

Displasia epitelial tubular.

Neurofibroma (en región trigeminal, rama maxilar)

**Notas**

Inicio tumor del morro: 18/10/90. (1) citoplásmico granular y en fibras nerviosas englobadas.



Hamster E+D 3H

Fecha nacimiento 29/6/90 Fecha gonadectomía 23/8/90 Fecha sacrificio 11/2/91  
Tiempo exposición DES 157 días Inicio intoxicación 6/9/90 Final intoxicación 11/2/90  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10465 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Varios nódulos corticales, entre 0'1 y 0'3cm, en cara posterior de ambos riñones, bien delimitados, blanquecinos.  
SUPRARRENAL: Suprarrenal derecha discretamente aumentada de tamaño, 0'3 cm de diámetro, de color blanquecino.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Quistes simples. Restos nefrogénicos. Hiperplasia de células intersticiales. Tumores pequeños corticales con focal presencia de células claras y células en anillo de sello. Tumorlets.  
SUPRARRENAL: Tumoración periférica de carácter neval, pseudoencapsulada, rodeando parcialmente la glándula suprarrenal y englobando filates nerviosos. No se observa degeneración quística, necrosis, mitosis ni cuerpos meissniformes.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL: DT-; VIM ++/50-75% (1); S-100 +++/ >75%; HNK -; NSE +/ <25%; DES ++/50% (2); K +/-; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SYN NV; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -; MIOG NV.  
TUMORACION RETROPERITONEAL: S-100 +/50%.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido y blastemal. Polimorfismo celular y nuclear. Heterocromatina. Uniones intercelulares desarrolladas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Transición células claras-oscuroas. Luces inter e intracelulares. Interdigitaciones. Granulos neurosecretorios.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal tipo nefroblastoma-like. Tumorlets.  
Hiperplasia de células intersticiales renales.  
Newofibroma retroperitoneal.

**Notas**

(1) Más intensa y constante en células periféricas de los nódulos tumorales. (2) También positividad en células de citoplasma claro.

**Hamster E+D 4H**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	24/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	12/3/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	186 días	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	12/3/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Múltiples nódulos bilaterales entre 0'5 y 0'8 cm, corticales y de coloración blancoamarillenta.

Ausencia de tumores de sistema nervioso periférico y central.

**Hallazgos microscópicos**

Quistes simples corticales.

Hiperplasia de células intersticiales.

Proliferación neoplásica constituida por células de escaso citoplasma basófilo dispuestas en nidos y cordones sólidos separados por un fino estroma conectivo-vascular (patrón endocrinoide). Focalmente, estas células, adoptan una morfología fusiforme conformando haces paralelos irregularmente dispuestos con formación ocasional de rosetas (patrón neuroectodérmico), o bien, muestran la aparición de vacuolas intracitoplásmicas de gran tamaño recordando células en anillo de sello (PAS -). Presencia de gránulos hialinos intracitoplásmicos PAS+, VIM + y DES +. Existen áreas de necrosis tumoral, las mitosis son numerosas y hay rotura capsular y extensión a la grasa perirrenal.

Carcinoma urotelial papilar de pelvis renal.

**Imunohistoquímica**

NEFROBLASTOMA-LIKE: DT -; VIM ++/80%; S-100 +++/90%; NSE ++/25%; HNK -; DES +++/50%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; CROM NV; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

CARCINOMA UROTELIAL: VIM -; S-100 -; HNK ++/<5%; NSE -; DES -; CAM 5.2 -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal tipo nefroblastoma-like con focal diferenciación neuroectodérmica, endocrinoide y secretora (adenoida).  
Carcinoma urotelial de pelvis renal.

**Notas**

Patrones histológicos blastemal, endocrinoide, neuroectodérmico y secretor.

Hamster E+D 5H

Fecha nacimiento	28/6/90	Fecha gonadectomía	28/8/90	Fecha sacrificio	13/3/91	
Tiempo exposición DES	187 días	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	13/3/90	
Exposición ENU	Si					
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10527(A y B) Cultivo	No Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

- A) RIÑÓN: Múltiples nódulos blancoamarillentos bilaterales entre 0'1 y 0'3 cm, corticales, bien delimitados.  
B) RETROPERITONEO: Tumorción de 5x4 cm que envuelve parcialmente al riñón izquierdo, sin infiltrarlo, y desplazándolo anteriormente, dependiente de raíces vertebrales lumbares de donde se despega, de consistencia blanda, coloración blanco-grisácea y mixoide a la sección.  
C) MEDIASTINO POSTERIOR: Tumorción de 1x1 cm adherida a cuerpos vertebrales y primeras costillas torácicas izquierdas, bien delimitado, de coloración blanquecina y consistencia elástica.

**Hallazgos microscópicos**

- A) RIÑÓN: Restos nefrogénicos  
Quistes simples  
Hiperplasia de células intersticiales  
Tumores pequeños corticales con focal presencia de células blastemales estrelladas PAS - y VIM +. Aisladas células tumorales conteniendo en sus citoplasmas cuerpos hialinos. Necrosis focal.  
B) RETROPERITONEO: Neoformación, no encapsulada, constituida por células de escaso citoplasma estrellado con abundante material mixoide interpuesto entre las mismas, presentando áreas sólidas muy celulares con atipias nucleares y contabilizándose 2-3 mitosis por 10 HPF, en íntima relación con espacios quísticos tapizados por células cuboidales y con ocasional presencia de hemátias en su luz. Leve infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario junto con mastocitos. Aisladas células de núcleo bizarro, cromatina grosera y nucleolo prominente.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE: DT -; VIM +++/90%; S-100 +++/90%; NSE +/ <25% (focal); HNK -; DES +++/ >90%; K -; CK -; CAM 5.2 -; EMA -; CROM -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -; MIOG -; 13E10 -; GFAP -.

TUMOR RETROPERITONEAL:

a) Áreas indiferenciadas de células pequeñas y redondas: VIM ++/ <5%; S-100 ++/50% (nuclear); HNK -; NSE +/ <5% (1); NF -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

b) Áreas diferenciadas de células de amplio citoplasma estrellado: VIM +++/ >95%; S-100 +++/ >95%; NSE ++/10% (1); HNK -; NF -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

**M. electrónica**

T. RENAL: P. epitelial sólido y blastemal. Polimorfismo celular y nuclear. Condensación periférica de la cromatina. Uniones intercelulares bien desarrolladas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Granulos neurosecretorios. Transición epitelial-blastemal. Procesos nevríticos. Filamentos intermedios. Colágena. Luces inter e intracelulares. Interdigitaciones. Membranas basales limitantes. Activación del RER. T. SNP: Prolongaciones citoplásmicas anchas. Núcleos irregulares. Heterocromatina. Nucleolos. Membrana basal discontinua. Matriz extracelular rica en colágena.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal predominante.  
Newofibroma maligno retroperitoneal.

**Notas**

(1) Citoplásmico granular y en fibras nerviosas englobadas.

**Hamster E+D 6H**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	28/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	13/3/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	187	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	13/3/91
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10528 Cultivo	Si Citogenética Si

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Nódulos múltiples bilaterales entre 0'1 y 0'5 cm bien delimitados, confluentes, y de coloración blanquecina.

Ausencia de tumores en SNP y SNC.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Neoformación constituida por nidos y cordones sólidos de células de escaso citoplasma basófilo (patrón blastemal), apreciándose áreas tumorales con células claras y formación de estructuras pseudotubulares (patrón adenóide), células en anillo de sello PAS -, células fusiformes (patrón sarcomatoide) y formación de rosetas y pseudorosetas perivasculares (patrón neuroectodérmico). En vecindad a zonas nefrogénicas existe hiperplasia de células intersticiales y tumorlets.

**Inmunohistoquímica**

DT NV; VIM +++/90% (1); S-100 +++/80%; NSE +/50%; HNK +/-25%(células aisladas); K -; CK -; EMA -; UEA-I -; 13E10 -.

**M. electrónica****Cultivo celular**

Buen crecimiento conformando placas bi y tridimensionales de células de aspecto epitelioide con presencia de granulaciones intracitoplásmicas. A dos de los frascos les añado al medio habitual DES 1 nM y 17betaestradiol 1 nM no observándose diferencias en la velocidad de crecimiento ni en la morfología celular. Se obtienen fotografías de todos los frascos.

ME frasco F2 17E2 n° 10543. Congelación frascos F1 DES y F.

**Diagnóstico**

Tumor renal tipo nefroblastoma-like con áreas blastemal, secretora (adenóide), fusocelular (sarcomatoide) y neuroectodérmica. Tumorlets. Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**

(1) Más intensa y constante en células periféricas de los nódulos tumorales.

Hamster E+D 7H

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	24/8/90	Fecha sacrificio	4/4/91
Tiempo exposición DES	208	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	4/4/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM 10573(A y B)	Cultivo No	Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Varios nódulos corticales bilaterales de coloración blanquecina bien delimitados, entre 0'1 y 0'2 cm.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets corticales.

Tumores pequeños corticales constituidos por células de escaso citoplasma basófilo y núcleos redondos u ovales con uno o dos nucleolos (patrón blastemal). Focalmente se observan estructuras pseudotubulares y células en anillo de sello aisladas (PAN -, VIM +) (patrón adenóide), y nidos sólidos de células de hábito epitelial con citoplasma claro (patrón hipernefroide).

**Inmunohistoquímica**

DT +/-; VIM ++/75%; S-100 ++/90%; HNK -; NSE -; DES ++/50%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; CROM -; UEA-I -; FVIII/RA NV; aQT -; NF -; MIOG -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal tipo nefroblastoma-like con patrón blastemal, focal diferenciación adenóide e hipernefroide.

**Notas**

Tomo nervio ciático para formol y ME.



Hamster E+D 8H

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	24/8/90	Fecha sacrificio	4/4/91						
Tiempo exposición DES	208	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	4/4/91						
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10574(A y B)	Cultivo	Si	Citogenética	Si

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Riñón derecho mostrando nódulo de 1x1.5cm de consistencia blanda, con áreas hemorrágicas y quísticas, junto con otros nódulos confluentes entre 0.5 y 1 cm, algunos hemorrágicos. Riñón izquierdo con varios nódulos blanquecinos entre 0.3 y 0.5 cm. Metástasis diafragmáticas, hepáticas y mesentéricas.

Abcesos en ambos restos de cuernos uterinos.

REGION VENTRAL TORACICA: Nódulo encapsulado subcutáneo de 2x1 cm de coloración blancogrisácea con áreas hemorrágicas, de consistencia dura a la sección.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Quistes simples. Zonas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Pequeños y grandes tumores constituidos por células de escaso citoplasma basófilo con núcleo redondo u oval y uno o dos nucleolos de pequeño tamaño (patrón blastemal). Estas células se disponen formando nidos o cordones sólidos o bien con un crecimiento trabecular. Existen focos de células de citoplasma claro (PAS -) y áreas fusocelulares con formación de rosetas y pseudorosetas perivasculares (patrón neuroectodérmico). Existe necrosis tumoral. Hay rotura de cápsula renal y extensión a la grasa perirrenal y peripancreática.

Carcinoma papilar de células transicionales de pelvis renal.

Metástasis pulmonares, diafragmáticas, mesentéricas y en hilio hepático por carcinoma renal.

REGION TORACICA: Carcinoma ductal de mama.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR NEFROBLASTOMA-LIKE: DT -; VIM ++/75%; S-100 ++/90%; HNK -; NSE +/5%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; CROM -; UEA-I -; FVIIIa NV; aQT -; NF -; MIOG -.

CARCINOMA PAPILAR UROTELIAL: CEA +; UEA-I +; VIM -; S-100 -.

CARCINOMA DE MAMA: VIM -; S-100 -; HNK + (focal); K +++/100%; CK -; CAM 5.2 -; EMA -; CEA +++/80%; UEA-I ++/50%; DES -; MIOG NV; ACT -; DT +.

METASTASIS: VIM ++; S-100 ++; NSE +; HNK -; EMA -.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones intercelulares desarrolladas. Gotas lipídicas. Células fusiformes. Filamentos intermedios. Luces inter e intracelulares. Interdigitaciones. Membranas basales limitantes.

**Cultivo celular**

Abundante celularidad en todos los frascos en monocapa o en placas tridimensionales, de aspecto epitelioide y fusiforme con granulaciones perinucleares y vacuolas citoplásmicas. Añadido en algunos frascos DES y 17 E2 no observándose diferencias notables. Fotografía todos los frascos. ME n° 10598 A y B. ME n° 10628. Congelación frasco E+D 8H 17 E2.

**Diagnóstico**

Tumor renal tipo nefroblastoma-like con patrón blastemal y patrón neuroectodérmico, con metástasis pulmonares, hepáticas, diafragmáticas y mesentéricas.

Carcinoma papilar de pelvis renal.

Carcinoma ductal de mama.

**Notas**

Hamster E+D 9H

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	24/8/90	Fecha sacrificio	4/4/91
Tiempo exposición DES	208	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	4/4/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ Si IHQ Si TEM	10575	Cultivo	Si	Citogenética Si

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑON: Múltiples nódulos corticales bilaterales blanquecinos, bien delimitados, entre 0'2 y 0'6 cm.

Abcesos en cuernos uterinos.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑON: Restos nefrogénicos. Quistes simples. Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.

Tumores pequeños constituidos por nidos y cordones sólidos de células poligonales de escaso citoplasma basófilo (patrón blastemal), con moderado polimorfismo, observándose áreas de células claras (patrón hipernefroide) junto con células en anillo de sello. Así mismo, aparecen células de citoplasma acidófilo fusiforme aisladamente.

**Imunohistoquímica**

DT -; VIM ++/90%; S-100 ++/90%; NSE -; HNK -; DES ++/5%; ACT +++/5%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; CROM -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -; MIOG NV.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido y blastemal. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Transición blastemal epitelial. Células fusiformes. Filamentos intermedios. Luces intracelulares. Interdigitaciones. Membranas basales limitantes.

**Cultivo celular**

Morfología epitelioide con crecimiento en monocapa y conformando placas tridimensionales. Presentan granulaciones y vacuolas intracitoplásmicas. Se añade en dos frascos DES 1 nM y 17 E2 no observándose diferencias. Se fotografian todos los frascos. ME n° 10599 frasco FP1 17 E2. ME n° 10629 frasco P2 S. CONGELACION: frasco DES FP2

**Diagnóstico**

Tumor renal tipo nefroblastoma-like con áreas adenoides, patrón blastemal e hipernefroide.

**Hamster E+D 10H**

<b>Fecha nacimiento</b>	29/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	23/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	12/4/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	216	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	12/4/91						
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Varios nódulos corticales bilaterales entre 0'1 y 0'2 cm, de coloración blanquecina y bien delimitados.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Quistes simples. Microadenoma renal.

Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.

Tumores pequeños constituidos por células de escaso citoplasma basófilo (patrón blastemal), de límites mal definidos, con presencia de aisladas células en anillo de sello.

**Inmunohistoquímica**

DT +/-; VIM ++/50%; S-100 +++/95%; NSE -; HNK -; DES ++/1%; ACT ++/1%; K -; CK -; CAM 5.2 -; EMA -; SINAP NV;  
UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumorlets.

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal predominante.

Microadenoma renal.

**Notas**

Animal muerto menos de 12 horas.



Hamster E+D 11H

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	24/8/90	Fecha sacrificio	12/4/91						
Tiempo exposición DES	216	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	12/4/91						
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10591	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

RIÑÓN: Varios nódulos bien delimitados corticales entre 0'1 y 0'2 cm de coloración blanquecina.  
Absceso peritoneal.

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.  
Tumores pequeños constituidos por nidos y cordones sólidos de células con escaso citoplasma basófilo, núcleos redondos u ovales, mostrando uno o más nucleolos de pequeño tamaño, y baja actividad mitótica. Existen aisladas y escasas células en anillo de sello. No se observa reacción estrómicia ni necrosis tumoral.  
Adenocarcinoma renal.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE: DT NV; VIM ++/80%; S-100 +++/95%; HNK -; NSE -; DES +++/50%; ACT +++/25%; K +/1%; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP NV; UEA-I -; FVIIIIRA -; αQT -; NF -.

ADENOCARCINOMA RENAL: VIM -; S-100 -; DES -; ACT -; K +; CK -; EMA -; CEA +; UEA-I +.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido y blastemal. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Microvellosidades y cilios. Heterocromatina. Gotas lipídicas. Luces intracelulares. Interdigitaciones. Gránulos neurosecretorios. Activación del RER. Filamentos intermedios.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal.  
Adenocarcinoma renal.

**Notas**

Hamster E+D 12H

Fecha nacimiento	29/6/90	Fecha gonadectomía	23/8/90	Fecha sacrificio	22/4/91
Tiempo exposición DES	226	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	22/4/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10610	Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

En región maxilar derecha aparece tumoración encapsulada subcutánea bien delimitada, de 2x2 cm. de consistencia elástica y blanconacarada a la sección.

Cavidad peritoneal ocupada por aproximadamente 5 cc de líquido purulento.

RIÑÓN: Ambos riñones muestran dos o tres nódulos corticales de 0'1-0'2 cm de diámetro, bien delimitados y blanquecinos.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Quistes simples. Displasia tubular. Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.

Tumores pequeños corticales constituidos por nidos y cordones sólidos de células de escaso citoplasma basófilo (patrón blastemal).

REGION MAXILAR DERECHA: Neoformación constituida por células de escaso citoplasma estrellado o fusiforme, separadas entre sí por abundante material mixoide, existiendo focalmente áreas de mayor densidad celular. Aislados cuerpos tactoides. Aislados mastocitos y focal infiltrado inflamatorio crónico. La tumoración infiltra displacerando fibras musculares estriadas y los acinos de glándula salivar. No existen necrosis ni se observan mitosis. No encapsulado. Englobamiento de filetes nerviosos. Presencia de vacuolas citoplásmicas intranucleares.

Tumorlet de SNC.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE: VIM ++/95%; S-100 +++/95%; NSE ++/5%; HNK -; DES +++/25%; ACT ++/25%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP NV; UEA-I -; FVIIIIRA -; NF -.

NEUROFIBROMA: DT +; VIM +++/100%; S-100 +++/100%; NSE ++/10% (1); HNK -; SINAP NV; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; \*QT-

TUMORLET SNC: VIM +++/50%; S-100 +++/50%; HNK -; NSE +; GFAP +++/80%; SINAP -; NF -; CEA -; DT ++; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal.

Neurofibroma de maxilar derecho (región trigeminal).

Tumorlet SNC.

**Notas**

Congelación: tumor renal maxilar. (1) Citoplásmico granular y en fibras nerviosas englobadas.

Hamster E+D 13H

Fecha nacimiento	28/6/90	Fecha gonadectomía	23/8/90	Fecha sacrificio	2/5/91						
Tiempo exposición DES	236	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	2/5/91						
Exposición ENU	Sí										
Técnicas especiales	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	10626	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Tumoración cutánea en región cervicodorsal derecha de 2 cm de diámetro máximo, pigmentada y ulcerada centralmente.

RIÑÓN: Riñones de volumen disminuido, de coloración parda sucia y con aislados nódulos corticales blanquecinos bilaterales de 0'1 cm.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Dilatación quística de túbulos renales (Nefronoptosis?).

Zonas nefrogénicas.

Focal infiltrado inflamatorio agudo intersticial (Nefritis intersticial aguda?).

Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets (patrón blastemal).

TUMOR CUTÁNEO: Neoformación con patrón de crecimiento sólido, constituida por células de hábito epitelial mostrando pigmento osuro intracitoplásmico y moderada atipia nuclear. Escasas mitosis. Existen amplias áreas de necrosis tumoral e infiltración y ulceración epidérmica.

PULMÓN: Metástasis por melanoma (parenquimatosas y pleurales).

**Inmunohistoquímica**

TUMORLETS RENALES: VIM +++/95%; S-100 +++/95%; HNK -; NSE -; DES -; ACT -; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT - NF -.

MELANOMA MALIGNO: VIM-; S-100 +++/90%; HNK -; NKI-C3 -; HMB-45 +/-; K -; CK -; CAM 5.2 -.

METASTASIS PULMONARES: VIM -; NKI-C3 -; HMB-45 +/-.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células renales intersticiales. Tumorlets renales. Nefritis intersticial aguda. Nefronoptosis.

Melanoma maligno con metástasis pulmonares.

**Notas**

**Hamster E+D 14H**

<b>Fecha nacimiento</b>	29/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	23/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	14/5/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	248	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	14/5/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Abdomen voluminoso, dilatado, estando la cavidad peritoneal ocupada por gran cantidad de líquido purulento.  
Riñones con múltiples nódulos corticales entre 0.5 y 1 cm, en riñón derecho existe un gran nódulo de 2 cm de diámetro de aspecto hemorrágico.

**Hallazgos microscópicos**

Autólisis avanzada.  
Tumores pequeños y grandes. No valoración de patrones. Tipo nefroblastoma-like.

**Inmunohistoquímica**

RIÑÓN: VIM ++/75%; S-100 ++/90%; NSE -; HNK -; DES +/5%; ACT +++/5%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -;  
UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like. No posibilidad de valoración de patrones.

**Notas**

Animal muerto menos de 12 horas.

		Hamster		E+D 15H	
Fecha nacimiento	28/6/90	Fecha gonadectomía	23/8/90	Fecha sacrificio	15/5/91
Tiempo exposición DEG	240	Inicio intoxicación	0/9/90	Final intoxicación	15/5/91

Exposición ENU      RÍ

Técnicas especiales      RÍ    BQ    RÍ    IBQ    RÍ    TEM    No    Cultivo    No    Citogenética    No

#### Hallazgos macroscópicos

En región cervical dorsal izquierda se observan dos tumores ovales pigmentados de 1x1.5 cm. y de 0.5 cm de diámetro, ulcerados centralmente (nº 1 y 2 respectivamente). También en región cervical aparece una tumoración subcutánea bien delimitada, de consistencia elástica y blanda adherida a la sección, de 1 cm de diámetro máximo. (nº 3)

Absceso peritoneal.

Petequias hemorrágicas en miembros superiores e inferiores.

#### Hallazgos microscópicos

RINÓN: Zonas nefrogénicas. Quitres simples tapizados por epitelio columnar.

Nº 1 y 2: Neoforaciones independientes que presentan una imagen histológica pareja, estando constituidas por elementos celulares de carácter epitelioide con presencia de pigmento oscuro en su citoplasma. Ambas muestran infiltración y ulceración de la epidermis y extensión en profundidad con áreas de diferenciación neural y fusocelular e infiltración de músculo estriado en la de mayor tamaño. Existen metástasis pulmonares por elementos celulares de las mismas características.

Nº 3: Tumoración pseudocapsulada ovoidal formada por células de escaso citoplasma estrellado o fusiforme, mostrando abundante material miscible entre las mismas, junto con aisladas áreas con un patrón más sólido y celular. Aislados cuerpos tactoides (pseudomestiser). No se observan necrosis ni atipia nuclear. Focal infiltrado inflamatorio eróico intratumoral con numerosos mastocitos. El tumor se extiende englobando y destruyendo fibras musculares estriadas.

#### Imunohistoquímica

Nº 1 y 2: VIM ++/5%; S-100 +++/95%; HNK -;NSE -;K -;CK -;CAM 5.2 -;NKI-C3 -;HMB-45 -+.

Nº 3: VIM +++/80%; S-100 +++/95%; HNK -;NSE ++/10% (1); S100AP -;NF -;CEA -;EMA -;VEA-1 -;QIT -;GFAP -.

#### M. electrónica

#### Cultivo celular

#### Diagnóstico

Nº 1 y 2: melanomas malignos en región cervical dorsal izquierda con metástasis pulmonares.

Nº 3: Neurofibroma cervical.

#### Notas

Animal muerto a los 12 días. (1) Citoplasma granular y fibras nerviosas englobadas.



## Hamster E+D 16H

Fecha nacimiento	28/6/90	Fecha gonadectomía	23/8/90	Fecha sacrificio	15/5/91
Tiempo exposición DES	249	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	15/5/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10646 Cultivo	No Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Morfología renal distorsionada por la presencia de múltiples nódulos tumorales de carácter confluyente con áreas hemorrágicas y quísticas.

### Hallazgos microscópicos

**RIÑÓN:** Neoformaciones renales constituidas por células de pequeño/mediano tamaño, de escaso citoplasma basófilo (patrón blastemal), adoptando ocasionalmente un patrón sólido trabecular con una fina trama conectivovascular (patrón endocrinoide). Existen áreas donde las células tumorales adoptan una morfología fusiforme (patrón sarcomatoide), disponiéndose irregularmente, o bien, presentan un citoplasma amplio y pálido con núcleo localizado centralmente (patrón hipernefroide). Estas últimas células pueden presentar en su citoplasma gránulos hialinos que se tiñen con el PAS. Así mismo, se observa formación de rosetas y pseudorosetas perivasculares (patrón neuroectodérmico). La actividad mitótica es elevada, contabilizándose 6-7 mitosis por 10 campos de gran aumento, y existe necrosis tumoral importante.

Microscópicamente también llama la atención la aparición de una neoplasia cortical quística tapizada por un epitelio estratificado cuboidal, con formación de estructuras pseudoglandulares, aumento de la relación nucleocitoplásmica y actividad mitótica elevada.

**PULMÓN:** A nivel pulmonar, en región bronquioloalveolar, se aprecia una tumoración con patrón de crecimiento nodular, que comprime el parénquima pulmonar adyacente, constituida por cordones de una o dos capas de células tumorales separadas por un delicado estroma conectivovascular. Estas células forman estructuras tubulares o trabeculares y son cuboidales y uniformes en tamaño. No se observan mitosis.

### Inmunoistoquímica

**TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE:** VIM +++/80%; S-100 +++/90%; NSE +/5% (1); HNK ++/5% (1); DES ++/25%; ACT +/1%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**ADENOCARCINOMA RENAL:** CEA +; UEA-I -.

### M. electrónica

P. epitelial sólido, blastemal y neuroectodérmico. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones intercelulares desarrolladas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Gránulos neurosecretorios. Formación de pseudomesoxones. Procesos neuríticos. Interdigitaciones. Filamentos intermedios. Transición blastemal-epitelial y entre células claras y oscuras. Luces intracelulares.

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal, hipernefroide, endocrinoide, neuroectodérmico y sarcomatoide.  
Adenocarcinoma renal.  
Adenoma pulmonar tipo bronquiolar.

### Notas

(1) Positividad en áreas fusocelulares.

**Hamster E+D 17H**

<b>Fecha nacimiento</b>	29/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	23/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	16/5/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	250 días	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	16/5/91						
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Petequias hemorrágicas en miembros inferiores y superiores.  
Abscesos en ambos cuernos uterinos.  
Riñones con nódulos corticales confluentes, blanquecinos y con áreas hemorrágicas entre 0'2 y 1 cm.

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia de células intersticiales. Tumoriets.  
Múltiples nódulos tumorales de pequeño y gran tamaño sin provocar reacción esclerosa, y presentando áreas sólidas de células de pequeño tamaño con escaso citoplasma (patrón blastemal), focos de células claras (patrón hipernefroide y áreas de células elongadas, fusiformes (patrón sarcomatoide). Hay importante hemorragia y necrosis tumoral. Focalmente se observa hiperplasia epitelial tubular (CEA +).  
Peritonitis purulenta.

**Inmunohistoquímica**

VIM +++/90%; S-100 +++/95%; HNK -; NSE +/5%; DES +++/25%; ACT ++/1%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroide y sarcomatoide.  
Displasia tubular.

**Notas**

**Hamster E+D 18H**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	24/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	23/5/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	257 días	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	23/5/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Petequias hemorrágicas en miembros superiores e inferiores.  
Riñones con varios nódulos corticales de coloración blanquecina entre 0'1 y 0'2 cm.

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.  
Nódulos tumorales corticales con extensa necrosis mostrando un patrón de crecimiento sólido/trabecular de células de escaso citoplasma basófilo y núcleo redondo u oval (patrón blastemal).  
Infarto esplénico.

**Imunohistoquímica**

VIM +++/90%; S-100 +++/95%; HNK -; NSE +/1%; DES +++/25%; ACT +++/25% (1); K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -;  
SINAP -; FVIIIIRA -; aQT -; NF NV.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.  
Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal.

**Notas**

(1) Citoplásmico difuso



### Hamster E+D 19H

Fecha nacimiento 29/6/90 Fecha gonadectomía 28/8/90 Fecha sacrificio 31/5/91  
Tiempo exposición DES 265 días Inicio intoxicación 6/9/90 Final intoxicación 31/5/91  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí EQ Sí IQ Sí TEM 10695 Cultivo Sí Citogenética Sí

#### Hallazgos macroscópicos

Nódulos corticales renales bilaterales entre 0'5 y 1 cm, de coloración blanquecina presentando áreas hemorrágicas y quísticas (tumores grandes y pequeños).

Abscesos en cuernos uterinos.

tumoración hipofisaria. No tumores de SNP.

#### Hallazgos microscópicos

Neoformaciones renales múltiples mostrando áreas sólidas trabeculares de células de escaso citoplasma basófilo, con núcleos redondos u ovales, separadas por escaso estroma conectivovascular (patrón blastemal). Existen así mismo áreas quísticas, de células fusiformes dispuestas irregularmente (patrón sarcomatoide), de células claras (patrón hipernefroide), formación ocasional de estructuras rosetoides (patrón neuroendocrino) y aparición focal de células tumorales con amplio citoplasma en el que aparecen acúmulos granulales lisalinos de diverso tamaño. Existe rotura de cápsula renal e infiltración de la grasa perirenal.

Carcinoma de hipófisis en el que se observa necrosis tumoral y actividad mitótica elevada con presencia de mitosis atípicas.

#### Immunoistoquímica

VIM +++/90%; S-100 +++/90%; NSE ++/25%; HNK -; DES ++/5%; ACT +++/5%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-1 -; FVIIIIR -; QT -; NF -.

#### M. electrónica

#### Cultivo celular

CreCIMiento en monocapa y en agrupaciones tridimensionales de células de hábito epitelioide con granulaciones y vacuolas citoplásmicas. En dos frascos aÑado DES y E2 (1 nM), observándose un crecimiento más acusado en frasco con DES. SE SOSPECHA CONTAMINACION POR MICOPLASMA TRATANDOSE CON MYKELIN (0'2 ML/100cc).

ME n° 10834 (frascos P4-1 y P4-3). Congelación en pozos 10 frascos P4-2 y P4-4. Fotografías: Sí.

#### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroide, sarcomatoide y neuroendocrino.  
Carcinoma de hipófisis.

#### Notas

## Hamster E+D 20H

Fecha nacimiento	29/6/90	Fecha gonadectomía	23/8/90	Fecha sacrificio	31/5/91
Tiempo exposición DES	265 días	Inicio intoxicación	6/9/90	Final intoxicación	31/5/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10696(A y B) Cultivo	Si Citogenética Si

### Hallazgos macroscópicos

**RIÑONES:** Riñón izquierdo con varios nódulos corticales entre 0'1 y 0'3 cm, bien delimitados y de coloración blanquecina. Riñón derecho con nódulo de 1'5 cm de diámetro máximo, con áreas hemorrágicas y mostrando adherencias a retroperitoneo y diafragma.  
**REGION SACRA:** Tumoraación bien delimitada de 2x1 cm, dependiente del plexo sacro, de coloración blanquecina, consistencia elástica y mixoide a la sección.  
**TRIGEMINO INTRACRANEAL:** Engrosamiento tumoral de rama trigeminal de 2x0'5 cm, que se extiende por la base del esfenoides, llegando a techo del paladar y provocando protrusión del globo ocular.

### Hallazgos microscópicos

**RIÑÓN:** Hiperplasia de células intersticiales. Tumoretas. Tumores renales pequeños y grandes constituidos por células de escaso citoplasma dispuestas en nidos o cordones sólidos (patrón blastemal), áreas sólidas de células de amplio citoplasma claro conteniendo ocasionalmente acúmulos hialinos PAS + de diverso tamaño (patrón hipernefroide), y focalmente existiendo grupos de células fusiformes dispuestas irregularmente (patrón sarcomatoide).  
**SNC:** Neoformación constituida por células redondas o fusiformes, con predominio de áreas densas celulares tipo A de Antoni y formación de cuerpos de Verocay. Se observa englobamiento del ganglio de Gasser y actividad mitótica elevada con presencia de mitosis atípicas.  
**RETROPERITONEO:** Neoformación no encapsulada constituida por células de forma estrellada, separadas por una abundante matriz amorfa. Hay un predominio de áreas laxas y quísticas, observándose numerosos cuerpos pseudo-Meissner e infiltración difusa de mastocitos. No se observa actividad mitótica ni focos de necrosis.

### Inmunohistoquímica

**TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE:** VIM ++/50%; S-100 +++/90%; NSE ++/25%; HNK ++/1% (1); DES ++/1%; ACT ++/1%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.  
**NEURINOMA MALIGNO TRIGEMINO:** VIM +++/75%; S-100 +++/5%; NSE +/75%; HNK -; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.  
**NEUROFIBROMA SACRO:** VIM +++/75%; S-100 +++/50%; NSE ++/50%; HNK -; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

### M. electrónica

**T. RENAL:** Células poligonales de disposición compacta. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Granulos neurosecretores. Células fusiformes. Colágena. Pies basales diferenciados. Luces inter e intracelulares. Interdigitaciones. Membranas basales limitantes. T. SNP: Muy celular. Difícil distinción membrana basal. Polimorfismo celular y nuclear. Englobamiento fibras mielínicas y amielínicas. Cuerpos lamelares. Matriz extracelular escasa con colágena. Procesos citoplásmicos abundantes. Microfilamentos y microtúbulos. Células fusiformes ordenadas: cuerpo de Verocay en área Antoni tipo A.

### Cultivo celular

Crecimiento en monocapa y en estructuras tridimensionales, células de hábito epitelioide con abundantes granulaciones y vacuolas citoplásmicas. Fotografío: Si

### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroide y sarcomatoide.  
Neurinoma maligno del trigemino intracraneal.  
Neurofibroma retroperitoneal del plexo sacro.

### Notas

(1) Citoplásmico difuso y en células aisladas.

**Hamster E+D 21H**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	24/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	3/6/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	268 días	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	3/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Múltiples nódulos corticales bilaterales entre 0'2 y 0'5 cm bien delimitados, confluentes y de coloración blanquecina.

**Hallazgos microscópicos**

Neoformaciones renales con predominio de células pequeñas indiferenciadas dispuestas en nidos sólidos o cordones (patrón blastemal), con ocasionales células en anillo de sello (PAS -) y necrosis tumoral focal.

**Inmunohistoquímica**

VIM +++/90%; S-100 +++/90%; HNK -; NSE -; DES +++/5%; ACT ++/1%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal.

**Notas**

**Hamster E+D 22H**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	28/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	17/7/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	287 días	<b>Inicio intoxicación</b>	6/9/90	<b>Final intoxicación</b>	22/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñón derecho mostrando en polo inferior nódulo blanquecino bien delimitado de 0'1 cm.  
Región submandibular derecha: Nódulo encapsulado blanquecino de 2x1'5 cm de consistencia elástica.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: Zonas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Tumores corticales.  
Neoformación cortical con patrón sólido trabecular de células pequeñas indiferenciadas redondas u ovals (patrón blastemal) con áreas hipernefroides.

Neurinoma maligno de rama submandibular trigeminal derecha. Atipia nuclear, 1-2 mitosis x 10 HPF, presencia de mastocitos.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE: VIM +++/90%; S-100 +++/90%; NSE -; HNK -; ACT -; DES NV; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

NEURINOMA MALIGNO: VIM ++/50%; S-100 +++/90%; HNK -; NSE ++/25% (1); SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal e hipernefroides.  
Neurinoma maligno de rama trigeminal submandibular derecha.

**Notas**

(1) Citoplásmico granular y en axones atrapados.

**Hamster E+D 1M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	7/2/91					
<b>Tiempo exposición DES</b>	125 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	7/2/91					
<b>Exposición ENU</b>	Si									
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	No	TEM	No	Cultivo	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Abceso subhepático encapsulado relacionado con vesícula biliar, ocasionando fibrosis peritoneal y adherencias. Existe un segundo abceso en pelvis de 1'5 cm encapsulado.  
Riñones sin alteraciones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: Zonas nefrogénicas. No lesiones tumorales.  
Abceso subhepático, englobando páncreas con fibrosis y atrofia parcial de la glándula, y pélvico.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Abcesos subhepático y pélvico.  
Ausencia de lesiones neoplásicas renales.

**Notas**

**Hamster E+D 2M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 30/8/90      **Fecha sacrificio** 7/2/91  
**Tiempo exposición DES** 125 días      **Inicio intoxicación** 5/9/90      **Final intoxicación** 7/2/91  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10456    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

**RIÑONES:** Ambos riñones muestran un fino puntado blanquecino miliar superficial.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑONES:** Quistes simples. Zonas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

Quistes simples renales: VIM -; S-100 -; CEA -; K +; UEA-I +.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Ausencia de lesiones tumorales renales.

**Notas**



**Hamster E+D 3M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	26/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	7/2/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	125	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	7/2/91
<b>Exposición ENU</b>	226				
<b>Técnicas especiales</b>	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10457	Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Tumoración subcutánea de 1'5 cm de diámetro máximo, localizada en pata posterior izquierda, de consistencia elástica y de coloración parda oscura. Intento disecarla y separar del músculo de la pierna pero no se pudo por no existir unos límites netos ni la presencia de cápsula. No afecta hueso. No parece depender de fascículos nerviosos y se extiende a piel.  
Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor pata posterior izquierda: Neoformación de carácter vascular constituida por estructuras vasculares de diverso calibre, tapizadas por un endotelio prominente y con atipias nucleares. Junto a ello existen áreas sólidas de células poligonales acidófilas o bien mostrando ocasionalmente un citoplasma espumoso. Los núcleos presentan variación en su forma y tamaño con cromatina gruesa e irregularmente distribuida, con nucleolos prominentes. Se observan de 1 a 3 mitosis por 10 HPF. Existen áreas tumorales donde entre los elementos vasculares se interponen numerosos haces celulares de características neurales o conectivos (?). Hay focos de necrosis tumoral y abscesificación.

Ausencia de lesiones neoplásicas renales.

**Inmunohistoquímica**

VIM +++/100%; S-100 -; HNK -; NSE ++/50% (1); DES ++/50%; K -; CK -; CEA -; EMA -; SINAP -; CROM -; UEA-I -; FVIIIIR - (2); aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor vascular tipo hemangioendotelioma epitelióide-like.

**Notas**

Inicio tumor: 31/1/91. (1) Focal y citoplásmico difuso. (2) Endotelio vascular positivo.

**Hamster E+D 4M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 30/8/90      **Fecha sacrificio** 4/4/91  
**Tiempo exposición DES** 181 días      **Inicio intoxicación** 5/9/90      **Final intoxicación** 4/4/91  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    **HQ**    Sí    **IHQ**    No    **TEM**    No    **Cultivo**    No    **Citogenética**    No

**Hallazgos macroscópicos**

No hallazgos de interés.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑONES:** Quistes simples.  
Hiperplasia de células intersticiales.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**



			<b>Hamster</b>		<b>E+D 5M</b>	
<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	4/4/91	
<b>Tiempo exposición DES</b>	181 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	4/4/91	

**Exposición KNU** SI

**Tránsenes especiales** SI EQ SI IEQ SI TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Tumoración de 1'5x1 cm en región lateroventral inferior izquierda de consistencia elástica y coloración blanquecina.  
Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑONES:** Hiperplasia de células intersticiales (esceso citoplasma claro).  
**REGION TORACICA:** Neoformación pseudopapilar constituida por células de citoplasma estrellado separadas por abundante material mucoso intercelular. Se observan venulas citoplasmicas intravacuolares, leve atipia celular y nuclear, moderada vascularización, no apreciándose diferenciación ganglionar. Aparecen aislados cuerpos cartilagos (pseudo-Matsuzoi) y numerosos mastocitos en el estroma. No existe neovascularización y la actividad mitótica es baja (< 1 mitosis/10 HPF). La tumoreación engloba aislados fileres nervrosos. Infiltración y disociación de fibras musculares estriadas.

**Imunohistoquímica**

**TUMOR TORACICO:** VIM +++/75%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/25% (1); SYPAP -; NF -; DES -; CEA -; EMA -; UEA-1 -; \*QT -; GFAP INV.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**  
Hiperplasia de células intersticiales renales.  
Neurofibroma costal.

**Notas**  
(1) Células aisladas, citoplasma rico granular.

**Hamster E+D 6M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	4/4/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	181 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	4/4/91						
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	No	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Sin hallazgos de interés.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑONES: Quistes simples. Displasias tubulares epiteliales. Hiperplasia de células intersticiales.

HIGADO: Quistes hepáticos biliares.

**Imuno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Displasias epiteliales tubulares renales.

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**

**Hamster E+D 7M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	27/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	24/5/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	231 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	24/5/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10675(A y B)	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Edema en cuello y patas anteriores, piel de cuello y tórax superior tensa y brillante, mostrando ulceración en región axilar izquierda. Ganglios linfáticos de cadenas cervical, axilar, mediastínica e inguinal aumentados de tamaño (entre 0.5 y 2 cm). A la sección muestran un característico aspecto en carne de pescado con aisladas y pequeñas áreas periféricas de color pardo oscuro. Hepatoesplenomegalia (bazo de 5x1.5 cm).  
RIÑONES: En ambos riñones existe un nódulo cortical de 0.1 cm de coloración blanquecina.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑONES: Quistes simples. Zonas nefrogénicas de carácter lobular. Hiperplasia de células intersticiales (PAS + focal). Tumores pequeños de localización cortical con patrón trabecular (blastemal) o bien formando nidos sólidos con aisladas células claras.  
ADENOPATIAS: Pérdida de la arquitectura mostrando infiltrado por células de hábito plasmocitoide/inmunoblástico, con actividad mitótica elevada y necrosis focal. Existe infiltración por este mismo tipo de células de hígado, bazo y sistema nervioso central (plexos coroides de ventrículos laterales).

**Inmunohistoquímica**

HIPERPLASIA DE CELULAS INTERSTICIALES: VIM +++/90%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE NV; DES ++/25%, K -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; \*QT -; NF -; CROM -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrón blastemal.  
Leucemia/Linfoma.

**Notas**

Hamster E+D 8M

Fecha nacimiento	28/6/90	Fecha gonadectomía	30/8/90	Fecha sacrificio	24/5/91						
Tiempo exposición DES	231 días	Inicio intoxicación	5/9/90	Final intoxicación	24/5/91						
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10676	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Tumoración de 8x5 cm, encapsulada, en región cervical izquierda que desplaza globo ocular, mostrando a la sección áreas quísticas de contenido hemático y necrosis.

Nódulo en región inguinal derecha de 1 cm de diámetro máximo de coloración blanquecina y consistencia elástica.

Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: zonas nefrogénicas. Dilatación quística tubular. Displasia tubular.

SUPRARRENAL: microadenoma cortical.

TUMOR CERVICAL: neoformación no encapsulada constituida por células de citoplasma estrellado con abundante material mixoide intercelular, o bien por células de escaso citoplasma dispuestas densamente, observándose atipia celular y nuclear moderada, vacuolas citoplásmicas intranucleares, actividad mitótica elevada (2-3 mitosis/10 HPF), necrosis e infiltración de músculo estriado. En el estroma aparecen numerosos mastocitos. La vascularización es moderada. Existe diferenciación ganglionar y presencia de cuerpos tactoides. Las áreas quísticas están revestidas por epitelio simple cúbico.

**Inmunoquímica**

TUMOR CERVICAL: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK +++/10%; NSE ++/50%(1); SINAP -; NF -; DES -; CEA -; EMA -; UEA-I -; aQT -; GFAP NV.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Displasia tubular renal.

Ganglioneuroma maligno cervical.

Microadenoma cortical suprarrenal.

**Notas**

(1) Células aisladas, citoplásmico granular.

**Hamster E+D 9M**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 27/8/90      **Fecha sacrificio** 31/5/91  
**Tiempo exposición DES** 240 días      **Inicio intoxicación** 5/9/90      **Final intoxicación** 31/5/91  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10694    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Glándula suprarrenal derecha mostrando área nodular de 0.5 cm de diámetro máximo, blancoamarillenta a la sección.  
Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

**SUPRARRENAL DERECHA:** neoformación con patrón de crecimiento sólido constituido por células de amplio citoplasma acidófilo, aumento de la relación nucleocitoplásmica y actividad mitótica elevada.

**RIÑONES:** Áreas nefrogénicas. Ausencia de tumorações renales.

**Inmunohistoquímica**

Carcinoma suprarrenal: VIM ++/25%; S-100 -; SINAP -; CROM NV; CEA -; NSE -; NF -; UEA-I -; HNK -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Carcinoma de suprarrenal derecha.

**Notas**

**Hamster E+D 10M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	11/6/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	276 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	11/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñón izquierdo de superficie pálida con nódulo cortical de 0.3 cm blanquecino.

Riñón derecho con gran masa tumoral hemorrágica de 3 cm de diametro máximo, adherida a hígado y diafragma, no pudiéndose separar del mismo y presentando a la sección extensa necrosis. En pared muscular retroperitoneal también existe infiltración tumoral.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: Hiperplasia de células intersticiales. Tumores grandes, muy vascularizados con áreas de necrosis. Se observan patrones sólido trabecular (blastemal), fusocelular (sarcomatoide) y papilar (adenoide). Existen así mismo áreas de calcificación. Infiltración por contigüidad de hígado, pared muscular retroperitoneal y diafragma.

**Imunohistoquímica**

Tumor renal: VIM ++/50%; S-100 -; HNK -; NSE NV; DES -; ACT -; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA + focal; EMA NV; SINAP NV; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT NV; NF -.

Metástasis diafragmática: VIM ++/50%; S-100 -; HNK -; NSE -; DES NV; ACT -; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, sarcomatoide y adenoide. Infiltración por contigüidad hepática, muscular retroperitoneal y diafragmática.

**Notas**



## Hamster B+D 11M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	28/8/90	Fecha sacrificio	28/6/91						
Tiempo exposición DES	287 días	Inicio intoxicación	5/9/90	Final intoxicación	22/6/91						
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10771	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Riñón derecho: dos nódulos corticales de 0.5 y 1 cm de diámetro máximo, el mayor de ellos con áreas hemorrágicas.

Riñón izquierdo: superficie irregular y coloración pálida, presentando tres nódulos corticales de 0.1 cm blanquecinos.

Tumor dorsal subcutáneo de 5x3x1 cm, bien delimitado, pseudoencapsulado, presentando áreas hemorrágicas y quísticas a la sección.

Quiste hepático de 0.5 cm de contenido seroso.

### Hallazgos microscópicos

Riñones: tumoraciones con rotura capsular renal e infiltración de la grasa perirrenal. Predominio de patrón sólido trabecular y en nidos sólidos (blastemal). Áreas focales hipernefroides observándose ocasionalmente a nivel intracitoplásmico material hialino PAS +. Áreas quísticas. Formación de rosetas.

Tumor subcutáneo: predominio de áreas densas celulares. No encapsulado. Abundante vascularización. Fenómenos de trombosis vascular con áreas de hemorragia y necrosis tumoral. Áreas focales microquísticas. Actividad mitótica elevada, fundamentalmente en áreas densas celulares (> 10 mitosis/10 HPF). Mastocitos escasos en el estroma.

### Inmunohistoquímica

Tumor renal: VIM ++/75%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE ++/25%; DES +++/50%; ACT +++/20%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIR -; aQT -; NF -; GFAP -.

Tumor subcutáneo: VIM +++/30% (1); S-100 ++/40%; HNK ++/1%; NSE +/5% (2); SINAP -; NF -; CEA -, EMA -; UEA-I -; GFAP NV; CROM -.

### M. electrónica

Células poligonales de disposición compacta. Células fusiformes. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas.

Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Gránulos neurosecretorios. Procesos neuríticos. Microtúbulos. Filamentos intermedios.

Luces inter e intracelulares. Colágena. Interdigitaciones. Activación del RER

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroides y neuroectodérmico.

Newinoma maligno dorsal.

### Notas

(1) Negativo en áreas densas de células pequeñas indiferenciadas. (2) Células aisladas, intracitoplásmico granular.

Hamster E+D 12 M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	30/8/90	Fecha sacrificio	10/7/91
Tiempo exposición DES	286 días	Inicio intoxicación	5/9/90	Final intoxicación	21/6/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10807 Cultivo	Si Citogenética Si

**Hallazgos macroscópicos**

Animal moribundo.

Hipófisis aumentada de tamaño (0.3 cm de diámetro) (n° 1).

Engrosamiento fusiforme de 2 x 0.4 cm de rama trigeminal derecha intracraneal (n° 2).

Nódulo de 2 x 2 cm en región cervical ventral pseudoencapsulado, bien delimitado, anacorado y de consistencia elástica (n° 3).

RIÑÓN: nódulos tumorales bilaterales grandes y confluentes, entre 0.3 y 2 cm, mostrando áreas de hemorragia, quísticas y de necrosis (n° 4).

Infiltración por contigüidad de pared muscular retroperitoneal (n° 6). Ganglios mesentéricos y gástricos de apariencia metastásica.

Varios quistes hepáticos entre 0.2 y 0.4 cm de contenido seroso.

Nódulo de 0.5 cm en pared muscular retroperitoneal izquierda, bien delimitado, elástico y blanquecino a la sección (n° 5).

Pequeño absceso en restos de vesícula seminal derecha.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN (n° 4): tumores grandes con áreas de hemorragia, necrosis y quistificación. Patrones blastemal, adenoida, hipernefroide y neuroectodérmico (presencia de rosetas y pseudorosetas perivasculares). Áreas nefrogénicas. Rotura capsular renal con extensión a grasa perirrenal y pared muscular retroperitoneal (n° 6).

Adenoma de hipófisis (n° 1).

Rama intracraneal trigemino (n° 2): neoformación no encapsulada, densamente celular, constituida por células polimorfas de escaso citoplasma y núcleos redondos u ovales de cromatina grosera. Bien vascularizado. Zonas de hemorragia central y necrosis. Actividad mitótica elevada (4-5 mitosis/10 HPF). Periféricamente aparecen células ganglionares dispersas correspondientes al ganglio de Gasser.

Tumor cervical (n° 3): neoformación no encapsulada, presentando áreas celulares densas y áreas mixoides, infiltración de músculo estriado. No mitosis ni necrosis. Numerosos mastocitos.

Pared retroperitoneal izquierda (n° 5): neoformación no encapsulada de características semejantes al anterior (n° 3), presentando como particularidad metástasis en su seno por tumor renal.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE: VIM +++/50%; S-100 ++/50%; HNK ++/5%; NSE +/15%; DES +++/25% (1); ACT ++ 20%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; αQT -; NF -; GFAP ++/25%.

TUMOR CERVICAL (n° 3): VIM +++/50%; S-100 ++/50%; HNK +/1%; NSE ++/10%; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP NV; CROM -.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido y blastemal. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Gotas lipídicas. Colágena. Interdigitaciones.

**Cultivo celular**

Buen crecimiento con formación de placas o grupos tridimensionales. Las células poseen múltiples prolongaciones finas citoplásmicas o bien adoptan una morfología de célula pequeña epitelioide. Ambos tipos poseen numerosas granuleciones citoplásmicas perinucleares y vacuolas (en menor número).

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, adenoida, hipernefroide y neuroectodérmico con extensión a grasa perirrenal y pared retroperitoneal.

Adenoma de hipófisis.

Newrinoma maligno de trigemino intracraneal.

Newofibroma cervical.

Newofibroma intramuscular retroperitoneal con metástasis por tumor renal.

**Notas**

(1) Más intensa perivascular.



**Hamster E+D 13M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	27/6/90	<b>Fecha sacrificio</b>	17/7/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10821	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñón izquierdo con 3 nódulos corticales blanquecinos de 0.1 a 0.3 cm, bien delimitados.

Riñón derecho con dos nódulos corticales de 0.1 y 0.2 cm, bien delimitados.

SNC con área hemorrágica en base de cerebro, pudiendo corresponder a tumoración hipofisaria (aproximadamente de 1 cm de diámetro).

Nódulo de 0.2 cm en lóbulo superior de pulmón derecho de coloración blanquecina.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: áreas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales.

Tumores pequeños con patrones sólido trabecular (blastemal), hipernefroide y sarcomatoide. PAS + focal.

SNC: carcinoma hipofisario con extensión a base de cerebro y tronco de encéfalo. Actividad mitótica elevada (4-5 mitosis/10 HPF).

Neerosis tumoral focal.

PULMON: varias lesiones focales no encapsuladas constituidas por células uniformes cuboidales, dispuestas en espacios tubuloacinarios.

No se observan mitosis.

SUPRARRENAL: hiperplasia nodular focal cortical.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR RENAL: VIM ++/10%; HNK -; NSE -; ACT +/1%; CEA -; UEA-I -; FVIIIIRA -; NF -.

ADENOMAS PULMON: UEA-I ++; K -; CK -; EMA +; CEA -.

CARCINOMA HIPOFISIS: ACTH + (células aisladas); PROLACT +++/1% (células aisladas); HNK ++/1% (células aisladas);

SOMAST -; GFAP -; S-100 -; NF -; NSE +.

**M. electrónica**

Células poligonales de disposición compacta y células fusiformes. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Granulos neurosecretorios. Procesos neuríticos. Filamentos intermedios. Interdigitaciones. Activación del Golgi y del RER.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroide y sarcomatoide.

Carcinoma de hipófisis.

Adenomatosis pulmonar.

Adenoma suprarrenal.

**Notas**

## Hamster E+D 14M

Fecha nacimiento 27/6/90 Fecha gonadectomía 27/8/90 Fecha sacrificio 2/8/91  
Tiempo exposición DES 286 días Inicio intoxicación 5/9/90 Final intoxicación 21/6/91

Exposición ENU Sí

Técnicas especiales Sí HQ Sí IBQ Sí TEM 10857 Cultivo No Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Tumoración en región suprarrenal de 1 cm de diámetro, sobreelevada, pigmentada y ulcerada centralmente (n° 1).

Región dorsal izquierda mostrando 3 nódulos confluentes, entre 1 y 2 cm, pigmentados y uno de ellos ulcerado centralmente (n° 2).

Riñones de superficie pálida mostrando bilateralmente varios nódulos blanquecinos corticales entre 0.1 y 0.4 cm (n° 3).

Hipófisis aumentada de tamaño, 0.4 cm de diámetro, con áreas hemorrágicas (n° 4).

Pulmones mostrando varios nódulos subpleurales de coloración oscura de 0.1 cm (n° 5).

Hígado con varias formaciones quísticas entre 0.3 y 0.6 de contenido seroso.

### Hallazgos microscópicos

TUMOR RENAL: áreas neofrénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets.

Tumores pequeños con patrones blastemal, hipernefróide, neuroectodérmico y endoconinoide. Áreas quísticas.

SNC: proliferación astronitaria focal.

HIPÓFISIS: tumor maligno hipofisario con necrosis focal y actividad mitótica elevada (6-7 mitosis/10 HPF).

TUMORES CUTÁNEOS (SUPRACILIAR Y DORSAL): tumoraciones constituidas predominantemente por células fusiformes irregularmente distribuidas, apareciendo áreas quísticas. Existe infiltración epidérmica y ulceración. Morfología nodular. Actividad mitótica elevada con mitosis atípicas (> 10 mitosis/ 10HPF). Fenómenos de trombosis vascular.

PULMONES: múltiples nódulos metastásicos constituidos por células pigmentadas.

### Imuno histoquímica

TUMOR RENAL: VIM ++/25%; B-100 ++/50%; HNK -; NSE -; ACT -; K -; CK -; CEA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIRA -; aQT -; NF -.

TUMOR GILLAL: VIM +++/50%; B-100 ++/75%; HNK +++/75%; NSE +/1% (1); NF ++/25% (2); CEA -; GFAP +++/75%; CROM -.

TUMOR HIPOFISIS: VIM -; B-100 -; HNK +/1%; NSE ++/10%; PROLACT +++/50%; SOMAT -; ACTH + (células aisladas en nódulo tumoral principal) -> 75%/+++ (pequeño nódulo próximo).

### M. electrónicas

Células poligonales de disposición compacta. Células fusiformes. Polimorfismo celular y nuclear. Células elares y osevas. Uniones primitivas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Gránulos neurosecretores. Procesos neuríticos. Filamentos intermedios. Colágena. Luces inter e intracelulares. Barras de cierre. Interdigitaciones. Activación del Golgi y del RER.

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Tumor renal neóblastoma-like con patrones blastemal, hipernefróide, neuroectodérmico y endoconinoide.

Melanoma maligno con metastasis pulmonares.

Astrocitoma.

Carcinoma de hipófisis secretor de prolactina.

### Notas

(1) Focal positividad, células aisladas.

**Hamster E+D 15M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	27/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	2/8/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10858 A, B	Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región supraciliar derecha con tumoración sobrelevada de 1.5 cm de diámetro, pigmentada y ulcerada centralmente (n° 1).

Región de abazón izquierdo mostrando nódulo subcutáneo de dos cm. de diámetro, bien delimitado, blancogrisáceo y mixoide a la sección (n° 2). Se aislan 2 adenopatías de 0.3 y 0.5 cm de coloración blancoamarillenta.

Glándula suprarrenal derecha de 1 cm de diámetro, de superficie abollonada y de coloración blancoamarillenta a la sección (n° 3).

Riñones de coloración pálida y superficie finamente granular.

Hígado mostrando lesiones quísticas entre 0.2 y 0.5 cm de contenido seroso.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Displasia tubular. Tumorlets. Dilatación quística tubular.

**SUPRARRENAL DERECHA:** hiperplasia adenomatosa.

**TUMOR REGION SUPRACILIAR:** neoformación constituida por células predominantemente fusiformes conteniendo pigmento. Ulceración epidérmica.

**TUMOR ABAZON IZQUIERDO:** neoformación no encapsulada constituida por células de escaso citoplasma sin atipias separadas por abundante material mixoide intercelular. Existen fenómenos de trombosis vascular.

**HIGADO Y GANGLIOS:** fenómenos de hematopoyesis ganglionar y hepática.

**PULMON:** neoformación no encapsulada en lóbulo superior de pulmón derecho constituida por células polimorfas de escaso citoplasma, dispuestas formando estructuras pseudoacinares o pseudotumorales. Existe aumento de la relación nucleocitoplásmica, núcleos irregulares de cromatina gruesa y nucleolo prominente. Actividad mitótica elevada.

**Imunohistoquímica**

Tumor abazón izquierdo: VIM ++/50%; S-100 +++/90%; HNK -; NSE ++/10% (1); SINAP -; NF -; DES -; CEA -; EMA -; UEA -I -; aQT -; GFAP + (2).

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Riñón: Hiperplasia de células intersticiales. Displasia tubular. Tumorlets.

Adenoma de glándula suprarrenal derecha.

Melanoma maligno en región supraciliar derecha.

Neurofibroma de abazón izquierdo.

Tumorlet lóbulo superior pulmón derecho.

Hematopoyesis hepática y ganglionar.

**Notas**

(1) Células aisladas, intracitoplásmico granular y también en neuroejes englobados.

**Hamster E+D 16M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	27/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	2/8/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal con actividad disminuida, buen estado general y tos continua.

Región de abazón derecho con tumoración subcutánea polilobulada de 3x3 cm que se extiende a cuello englobando tráquea, de consistencia elástica y blanquecino a la sección (n° 3).

Riñón derecho con nódulo cortical blanquecino de 0.1 cm (n° 2).

Retroperitoneo con tumoración polilobulada de 5x4 cm, bien delimitada, de consistencia firme y mostrando a la sección áreas quísticas de contenido seroso (n° 1).

Hígado presentando lesiones quísticas de paredes finas de contenido seroso, entre 0.5 y 1 cm de diámetro.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Hiperplasia de células transicionales. Displasia tubular. Tumorlet cortical con zonas quísticas (patrón adenoidal) (n° 2).

**ABAZON DERECHO:** neoformación no encapsulada mostrando extensa necrosis tumoral con fenómenos de trombosis vascular, coexistiendo con áreas quísticas. Constituida por células con un marcado pleomorfismo celular y nuclear, escaso citoplasma y presencia de vacuolas intranucleares PAS+. Actividad mitótica elevada (5-10 mitosis/10 HPF). Existe formación de cuerpos taotoides y diferenciación ganglionar. Englobamiento de filetes nerviosos y áreas de transición benigno/maligno. Infiltración de músculo estriado. Infiltrado inflamatorio estrómicio con presencia de mastocitos (n° 3).

**RETROPERITONEO:** neoformación no encapsulada que engloba en su seno a ureter y ganglio linfático, infiltrando músculo estriado. No se observa necrosis ni hemorragia, existiendo fenómenos de trombosis vascular. En la tumoración se alternan las áreas densas celulares con las miosoides junto con zonas quísticas. Formación de cuerpos taotoides y diferenciación ganglionar. Alta actividad mitótica (8-10 mitosis/10 HPF) en áreas densas celulares. Vacuolas intranucleares. Englobamiento de filetes nerviosos. Infiltrado inflamatorio orónico estrómicio con mastocitos (n° 1).

**Inmunohistoquímica**

**TUMORLET RENAL:** VIM ++/10%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE +/10%; DES -; ACT -; K -; CK -; CEA -; EMA +/-; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**RETROPERITONEO:** VIM +/25%; S-100 +++/75%; NSE ++/10% (1); SINAP -; NF -; DES -; CEA -; EMA -; UEA-I -; aQT -; GFAP -.

**ABAZON DERECHO:** VIM +++/75%; S-100 ++/75%; HNK ++/1% (2); NSE ++/5% (1); SINAP -; NF -; GFAP -.

**M. electrónica****Cultivo celular****Diagnóstico**

Tumorlet renal con focal patrón adenoidal. Hiperplasia de células intersticiales. Displasia tubular. Ganglionewomas malignos retroperitoneal y cervical.

**Notas**

(1) Células aisladas, citoplásmico granular. (2) Focal, células aisladas.

Hamster E+D 17M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	28/8/90	Fecha sacrificio	20/8/91
Tiempo exposición DES	287 días	Inicio intoxicación	5/9/90	Final intoxicación	22/6/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10872	Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal moribundo.

Riñones con múltiples nódulos corticales entre 0.1 y 0.3 cm de coloración blanquecina, bien delimitados.

SNC: tumoración en rama intracraneal de trigémino izquierdo de 1x0.5 cm.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑONES: zonas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Displasia tubular. Tumorlets. Tumores pequeños con patrones blastemal, hipernefroide y adenoida (diferenciación tubular). Focal PAS + (!!).

SUPRARRENAL: Hiperplasia nodular cortical focal suprarrenal. Displasia focal.

TRIGEMINO IZQUIERDO INTRACRANEAL: neoformación constituida predominantemente por células fusiformes dispuestas irregularmente con áreas de hemorragia y necrosis tumoral. Actividad mitótica elevada (4-5 mitosis/10 HPF). Existe diferenciación ganglionar, no se observa englobamiento de filetes nerviosos, vacuolas intranucleares o ovarpos tactoides.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR NEFROBLASTOMA-LIKE: VIM ++/75%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE -; DES +/ <25%; ACT +/ <25%; K -; CK -; CEA +/1%; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

TUMOR TRIGEMINO: VIM ++/75%; S-100 +++/75%; HNK +/ <5%; NSE +/1% (1); SINAP -; NF +++/ <5%; DES -; CEA -; EMA +/ <5%; UEA-I -; aQT -; GFAP +/ <5%.

**M. electrónica**

Células blastemales estrelladas. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Microvellosidades y cilios. Gotas lipídicas. Colágena. Luces inter e intracelulares.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroide y adenoida.

Ganglionewoma maligno de trigémino intracraneal (neurofibrosarcoma?).

Adenoma suprarrenal

**Notas**

(1) Células aisladas, citoplásmico granular. Células ganglionares positivas.



**Hamster E+D 18M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	21/8/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	10874	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Hipófisis de 0.2-0.3 cm de diámetro con áreas hemorrágicas (n° 1).

Pata anterior derecha mostrando tumoración subcutánea encapsulada de 7x4.5 cm, de consistencia elástica y presentando a la sección áreas quísticas y hemorrágicas (n° 2).

Riñones con nódulos corticales entre 0.1 y 0.2 cm blanquecinos bien delimitados.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Displasia tubular. Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets. Tumores pequeños presentando patrones blastemal, hipernefroide y aisladas células en anillo de sello. No reacción estrómic. Área de hiperplasia adenomatosa con fibrosis periférica (situación que no aparece en la hiperplasia de células intersticiales ni en tumores nefroblastoma-like).

**TUMOR PATA ANTERIOR:** neoformación no encapsulada mostrando áreas quísticas, mixoides y densas celulares, presentando estas últimas un alta actividad mitótica (4-5 mitosis/10 HPF). Fenómenos de trombosis vascular y necrosis focal. No se observan filetes nerviosos englobados.

**HIPOFISIS:** adenoma.

**PULMON:** adenoma.

**Inmunohistoquímica**

**TUMOR NEFROBLASTOMA-LIKE:** VIM +++/50%; S-100 +++/75%; HNK -; DES ++/5%; ACT ++/25%; K -; CK -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF +/75% (1).

**TUMOR PATA ANTERIOR:** VIM ++/10%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE -; SINAP -; NF -; DES -; CEA -; EMA -; UEA-I -; aQT -.

**HIPOFISIS:** PROLACT +++/75%; NSE ++/75%; ACTH + (focal); HNK + (focal); VIM -.

**PULMON:** UEA-I +; EMA + (focal); K -; CEA -.

**M. electrónica**

**T. RENAL:** Células poligonales y blastemales estrelladas. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones intercelulares desarrolladas. Microvellosidades. Gotas lipídicas. Transición blastemal-epitelial. Heterocromatina. Luces inter e intracelulares. Material mixoide. **T. SNP:** Matriz extracelular abundante con colágena. Polimorfismo celular y nuclear. Procesos citoplásmicos anchos. Membrana basal interrumpida. Hendiduras nucleares. Heterocromatina. Nucleolos.

**Cultivo celular****Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal e hipernefroide. Adenoma renal.

Neurinoma maligno de pata anterior derecha.

Prolactinoma de hipófisis.

Adenoma pulmonar.

**Notas**

(1) Difusa y débil.

**Hamster E+D 19M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	28/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	21/8/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	287 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	22/6/91
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10875 Cultivo	Si Citogenética Si

**Hallazgos macroscópicos**

Hipófisis aumentada de tamaño (0.3 cm de diámetro) (n° 1).

Riñones de morfología distorsionada por la presencia de múltiples nódulos entre 0.5 y 1.5 cm, mostrando a la sección áreas sólidas, quísticas y hemorrágicas.

Infiltración tumoral de la grasa mesentérica (n° 2). Derrame peritoneal hemorrágico (aprox. 3-4 cc).

Hígado con varias lesiones quísticas de contenido seroso.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Dilatación quística tubular. Tumores grandes con áreas de calcificación, PAS + focal y patrones blastemal, adenoides, sarcomatoides (fusocelular) y neuroectodérmico (presencia de rosetas y pseudorosetas perivasculares).

**HIPOFISIS:** adenoma.

**CAVIDAD PERITONEAL:** metástasis en grasa peripancreática y mesentérica por tumor renal.

**PULMON:** adenoma. Metástasis por tumor renal.

**Inmunohistoquímica**

**TUMOR NEFROBLASTOMA-LIKE:** VIM +++/50%; S-100 +++/50%; HNK ++/5%; NSE -; DES +++/ <25%; ACT ++/1%; K + (1); CK -; CAM 5.2 -; CEA + (1); EMA -; SINAP -; UEA-I + (1); FVIIIIRA -; aQT + (1); NF -; GFAP ++/5%.

**ADENOMA HIPOFISIS:** PROLACT ++/75%; HNK + (focal); ACTH + (focal); CEA + (focal); EMA -.

**ADENOMA PULMONAR:** UEA-I + (focal).

**M. electrónica**

P. epitelial con abundantes gotas lipídicas. Polimorfismo celular y nuclear. Uniones primitivas. Microvellosidades. Células blastemales estrelladas. Áreas mixoides. Colágeno. Luces inter e intracelulares. Material mixoide.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, adenoides, sarcomatoides y neuroectodérmico con metástasis pulmonares y mesentéricas.

Prolactinoma de hipófisis.

Adenoma pulmonar.

**Notas**

(1) En el epitelio de áreas quísticas.



### Hamster E+D 20M

Fecha nacimiento 27/6/90 Fecha gonadectomía 30/8/90 Fecha sacrificio 23/8/91  
Tiempo exposición DES 286 días Inicio intoxicación 5/9/90 Final intoxicación 21/6/91

Exposición ENU Sí

Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10880 Cultivo No Citogenética No

#### Hallazgos macroscópicos

Región malar derecha con tumoración pigmentada y sobrelevada de 1 cm de diámetro.  
Derivame peritoneal serohemático (aprox. 5 ml).

Riñones de morfología distorsionada por múltiples nódulos tumorales entre 0.2 y 1 cm, con áreas hemorrágicas y quísticas de contenido hemático. Existen adherencias a pared posterior retroperitoneal.

Múltiples nódulos metastásicos hepáticos, peritoneales, mesentéricos y diafragmáticos.

Hipofisis aumentada de tamaño (0.4 cm) con focos hemorrágicos.

Abceso en resto de vesícula seminal.

#### Hallazgos microscópicos

RIÑONES: Áreas nefrogénicas. Tumores grandes con áreas quísticas, hemorrágicas y necróticas. Patrones histológicos blastemal, hipernefroides, neuroectodérmico y sarcomatoide (fusocelular). Metástasis hepáticas, esplénicas, diafragmáticas y mesentéricas.

TUMOR PIGMENTADO: Neoformación dérmica densamente celular, focalmente pigmentada, bien delimitada y con escasa actividad mitótica. No necrosis.

PULMON: Metástasis parenquimatosa por melanoma.

HIPOFISIS: Adenoma.

#### Imunohistoquímica

Tumor renal: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK ++/1%; NSE -; DES ++/25%; ACT ++/1%; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA +/1;  
EMA -; SINAP -; UEA-I +/1; FVIIIa -; QT -; NF -.

#### M. electrónica

Células epiteliales con abundantes gotas lipídicas. Células blastemales estrelladas. Polimorfismo celular y nuclear. Microvellosidades y cilios. Luces intracelulares. Material mitoide.

#### Cultivo celular

#### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, hipernefroides, neuroectodérmico y sarcomatoide.

Metástasis hepáticas, esplénicas, diafragmáticas y mesentéricas.

Melanoma maligno de región malar derecha con metástasis pulmonares.

#### Notas

(1) En el epitelio de las áreas quísticas tumorales.

## Hamster E+D 21M

Fecha nacimiento 27/6/90 Fecha gonadectomía 27/8/90 Fecha sacrificio 9/9/91  
Tiempo exposición DES 286 días Inicio intoxicación 5/9/90 Final intoxicación 21/6/91

Exposición ENU SI

Técnicas especiales SI HQ SI IHQ SI TEM 1090(A,B,C) Cultivo No Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Región cervical izquierda con lesión pigmentada de 2 cm presentando umbilicación central (n° 3).

Región sacra con lesión pigmentada de 2X1 cm centralmente ulcerada (n° 2).

Región dorsal y muslo derecho mostrando masa subcutánea de 7x6x3 cm, bien delimitada de coloración grisácea y de consistencia elástica (n° 5).

Rifón izquierdo con nódulo cortical en polo superior de 0.2 cm blanquecina y bien delimitado.

Masa retroperitoneal de 8x7x6 cm multinodular bien delimitada, con áreas quísticas de contenido hemático, dependiente de raíces sacras (n° 4).

Adenopatía inguinal izquierda de 1 cm mostrando coloración negraza a la sección (n° 1).

### Hallazgos microscópicos

RIÑÓN: Zonas neoplásicas. Hiperplasia de células intersticiales. Displasia tubular. Tumoriets con patrón blastemal e hipernefroide.

LESIONES PIGMENTADAS: Melanomas malignos de región cervical izquierda y sacra, con metástasis en ganglio inguinal.

TUMOR RETROPERITONEAL: Neoformación no encapsulada, con predominio de las áreas quísticas sobre las microides celulares.

Neerosis tumoral avascular. Focal diferenciación ganglionar. Actividad mitótica elevada (3-4 mitosis/10 HPF). Presencia de mastocitos en el estroma. No englobamiento de filates nerviosos.

TUMOR REGION DORSAL: Tumorción no encapsulada con predominio de áreas quísticas y microides. Focos de neerosis. Varrolas citoplásmicas intranucleares. Filates nerviosos englobados periféricamente. Presencia de mastocitos en el estroma. Infiltración de m tésulo estriado.

### Imunohistoquímica

TUMOR NEFROBLASTOMA LIKE: VIM +++/75%; S-100 ++/50%; HNK -; NSE +/25%; DES ++/25%; ACT -; K -; CK -;  
CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIRA -; SQT -; NF -; 13E10 -.

TUMOR RETROPERITONEAL: VIM +/10%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE -; SINAP -; NF -; DES -; CEA -; EMA -; UEA-I -; SQT -; GFAP -.

TUMOR DORSAL: VIM +++/75%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE ++/10%; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -.

### M. electrónica

T. SNP DORSAL: Matriz extracelular abundante con fibras de colágena. Células fusiformes con largos procesos citoplásmicos ramificados. Membrana basal incompleta. Gránulos neurosecretores. Cuerpos de inclusión con estructuras lamelares.

T. MELANICO: Células poligonales pleomorfas con disposición compacta y prolongaciones citoplásmicas con melanosomas.

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Tumoriets con patrones blastemal e hipernefroide.

Melanomas malignos cervical izquierdo y sacro con metástasis linfáticas.

Ganglionarofibroma maligno retroperitoneal.

Neurofibroma dorsal.

### Notas

Restos de pellet de DES en dorso.

**Hamster E+D 22M**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 28/8/90      **Fecha sacrificio** 11/9/91  
**Tiempo exposición DES** 286 días      **Inicio intoxicación** 5/9/90      **Final intoxicación** 21/6/91  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    No    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñones disminuidos de tamaño, superficie granular y pálidos.  
Quistes hepáticos de contenido seroso.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: nefritis intersticial con fibrosis y atrofia parenquimatosa.  
SUPRARRENAL: hiperplasia cortical.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Fibrosis y atrofia renal.  
Adenoma suprarrenal.

**Notas**

**Hamster E+D 23M**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 28/8/90      **Fecha sacrificio** 5/10/91  
**Tiempo exposición DES** 286 días      **Inicio intoxicación** 5/9/90      **Final intoxicación** 21/6/91  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    No    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñones sin lesiones macroscópicas evidentes.

Región de abazón izquierdo con tumoración subcutánea de 5x4 cm, de apariencia encapsulada, bien delimitado, mostrando a la sección áreas quísticas de contenido serohemático y necrosis.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: áreas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Dilatación quística tubular. Tumorlets.

SUPRARRENAL: adenoma.

TUMOR ABAZON IZQUIERDO: neoformación no encapsulada con predominio de áreas fusocelulares, muy vascularizado. Focos de necrosis. No se observan mitosis.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR ABAZON: VIM +++/75%; S-100 +++/100; HNK -; NSE -; SINAP -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP ++/25%.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumorlets renales. Hiperplasia de células intersticiales.

Adenoma de suprarrenal.

Newofibroma en región abazon izquierdo.

**Notas**

**Hamster E+D 24M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	10/10/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Pata anterior derecha con tumoración subcutánea de 6x5 cm, bien delimitada y encapsulada, de consistencia elástica, coloración blanquecina y áreas quísticas y hemorrágicas a la sección.

Hipófisis aumentada de tamaño (0.5 cm de diámetro), mostrando áreas hemorrágicas a la sección.

Riñones con discreta disminución de su tamaño y superficie pálida granular.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Displasia tubular. Hiperplasia adenomatosa con atipias versus adenocarcinoma renal. Tumorlets.

**PATA ANTERIOR DERECHA:** neoformación no encapsulada, que engloba filetes nerviosos, con áreas quísticas y sólidas con abundante material mixoide intercelular.

**HIPOFISIS:** adenoma.

**Inmunoistoquímica**

**RIÑÓN:** Tumorlets: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE -; DES ++/50%; ACT -; K -; CK -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -; GFAP +++/75%.

**Adenocarcinoma:** UEA-I +++.

**TUMOR PATA ANTERIOR DERECHA:** VIM ++/50%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE ++/25%; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; GFAP -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumorlets renales.

Adenocarcinoma renal.

Adenoma de hipófisis.

Neurofibroma de pata anterior derecha.

**Notas**

Restos de pellet de DES en dorso.

**Hamster E+D 25M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	10/10/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Región torácica dorsal mostrando tumoración sobrelevada y pigmentada de 1 cm de diámetro (n° 1).

Región cervical derecha con tumoración subcutánea de 7x5 cm, dependiente de rama mandibular de trigémino, encapsulada y bien delimitada, presentando a la sección áreas quísticas y hemorrágicas (n° 5).

Pata anterior derecha con nódulo subcutáneo de 1 cm de diámetro máximo, bien delimitado, blanquecino y de consistencia elástica (n° 3).

Pata anterior izquierda con nódulo subcutáneo de 2x2.5 cm de características macroscópicas semejantes al anterior (n° 2).

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Displasia tubular focal.

**TUMOR PIGMENTADO:** neoformación constituida por elementos celulares de hábito epitelial, mostrando focalmente pigmento intracitoplásmico, pleomorfismo celular y nuclear y actividad mitótica elevada.

**TUMORES PATAS DERECHA E IZQUIERDA:** neoformaciones no encapsuladas de predominio de áreas mixoides con infiltración de músculo estriado y presencia de mastocitos en el estroma. No mitosis ni necrosis.

**TUMOR CERVICAL:** neoformación no encapsulada con áreas quísticas, mixoides y densas celulares. Existen fenómenos de trombosis vascular y necrosis tumoral. Actividad mitótica elevada. Englobamiento de filetes nerviosos.

**Inmunohistoquímica**

**TUMOR PIGMENTADO:** VIM ++/<50%; S-100 +++/>75%; HNK -; GFAP -; EMA -; CK -; NKI-C3 -; HMB-45 -.

**TUMOR PATA ANT DERCH:** VIM +++/>75%; S-100 +++/>75%; HNK ++; GFAP -; EMA + (fibras nerviosas); CK -; SINAP -; NSE ++/25%; CEA -; NF -.

**TUMOR CERVICAL:** VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK ++; NSE ++/10%; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Displasia tubular focal renal.

Melanoma maligno torácico dorsal.

Newofibromas de patas anteriores derecha e izquierda.

Newinoma maligno cervical.

**Notas**



## Hamster E+D 26M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	30/8/90	Fecha sacrificio	10/10/91
Tiempo exposición DES	286 días	Inicio intoxicación	5/9/90	Final intoxicación	21/6/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10963	Cultivo No Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Animal en mal estado general, caquéctico.

Riñones mostrando varios nódulos blanquecinos entre 0.1 y 0.3 cm, quísticos algunos de ellos en riñón derecho.

Región dorsal con tumoración subcutánea bien delimitada de 4x2 cm, de consistencia elástica y coloración blancogrisácea a la sección.

### Hallazgos microscópicos

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Hiperplasia de células intersticiales. Tumorlets con diferenciación tubular. Tumores corticales pequeños constituidos por células pequeñas basófilas dispuestas en cordones o nidos sólidos (patrón blastemal). Dilatación quística tubular en áreas tumorales, con aplanamiento de su epitelio. Área medular tumoral fusocelular.

**SUPRARRENAL:** hiperplasia focal cortical.

**TUMOR DORSAL:** neoformación encapsulada con predominio de áreas mixoides, focal quistificación, englobamiento de filetes nerviosos, ausencia de mitosis y necrosis. Mastocitos abundantes en estroma.

### Inmunohistoquímica

**TUMOR RENAL NEFROBLASTOMA-LIKE:** VIM ++/25%; S-100 +; HNK -; NSE ++/5%; DES ++/25%; ACT -; K -; CAM 5.2 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -; GFAP ++/25%; 13E10 -.

**TUMOR DORSAL:** VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE -; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

### M. electrónica

Hiperplasia células intersticiales con precoz diferenciación epitelial (luces citoplásmicas, microvellosidades y cilios). Polimorfismo celular y nuclear. Uniones intercelulares desarrolladas. Gotas lipídicas. Gránulos neurosecretorios. Transición blastemal-epitelial. Células fusiformes. Heterocromatina. Procesos neuríticos. Formación de pseudomesoaxones. Filamentos intermedios. Colágena. Cuerpos lamelares. Pies basales diferenciados. Luces inter e intracelulares. Túbulos primitivos. Interdigitaciones. Membranas basales limitantes.

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal, epitelial (diferenciación tubular) y sarcomatoide.

Adenoma suprarrenal.

Newofibroma dorsal.

### Notas



Hamster E+D 27M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	30/8/90	Fecha sacrificio	14/10/90
Tiempo exposición DES	286 días	Inicio intoxicación	5/9/90	Final intoxicación	21/6/91
Exposición ENU	Si				
Técnicas especiales	Si HQ	Si IHQ	Si TEM	10971 Cultivo	No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Pata posterior izquierda mostrando tumoración subcutánea de 3x2 cm, no encapsulada, bien delimitada, de coloración blanquecina, englobando nervio ciático.

Cavidad abdominal ocupada en su totalidad por tumoración polilobulada, que desplaza hígado y riñones, englobando epiploon y grasa mesentérica e infiltra diafragma. A la sección es sólida con áreas blanquecinas y parduzcas.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: ausencia de lesiones tumorales. Áreas nefrogénicas.

TUMOR CAVIDAD ABDOMINAL: neoformación no encapsulada, de límites imprecisos, que se extiende rodeando y desplazando a riñones sin infiltrarlos, constituida por células pleomórficas, con prolongaciones citoplásmicas o morfología fusiforme, actividad mitótica elevada y necrosis tumoral. Existen metástasis hepáticas y pulmonares.

**Imunohistoquímica**

TUMOR ABDOMINAL: VIM +++/75%; S-100 ++/50%; HNK -; SINAP -; DES +++/50%; EMA -; UEA-I -; aQT -; GFAP ++/50%; ACT -; CAM 5.2 -; CK -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Sarcoma maligno abdominal con metástasis hepáticas y pulmonares inmunohistoquímicamente positivo a VIM, S-100, DES y GFAP.

**Notas**

**Hamster E+D 28M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	2/11/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	286 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	21/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Neoformación retroperitoneal envolviendo y desplazando riñones, respetando su cápsula macroscópicamente, de consistencia elástica y coloración blanquecina.  
Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** hiperplasia de células intersticiales.

**TUMOR RETROPERITONEAL:** neoplasia no encapsulada constituida por células polimorfas separadas por abundante sustancia mixoide intercelular. Existen áreas de necrosis tumoral y hemorragia. Englobamiento de filetes nerviosos. Infiltración de pelvis renal, uréteres y músculo estriado. Metástasis pulmonares.

**Inmunohistoquímica**

**TUMOR RETROPERITONEAL:** VIM +++/75%; S-100 +++/50%; HNK ++/50%; NSE +/1% (1); SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma maligno retroperitoneal con metástasis pulmonares.

Hiperplasia de células intersticiales renal.

**Notas**

(1) Células aisladas, citoplásmico granular.

**Hamster E+D 29M**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 28/8/90      **Fecha sacrificio** 5/12/91  
**Tiempo exposición DES** 287 días      **Inicio intoxicación** 5/9/90      **Final intoxicación** 22/6/91  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    No    **TEM**    No    **Cultivo**    No    **Citogenética**    No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

**RIÑÓN:** áreas nefrogénicas. Displasia tubular.

**SUPRARRENAL:** hiperplasia focal cortical.

**GLANDULA SALIVAR:** hiperplasia adenomatosa de células de secreción mucosa.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Displasia tubular renal.

Adenoma suprarrenal.

Adenoma mucoso de glándula salivar.

**Notas**

**Hamster E+D 30M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	30/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	5/12/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	287 días	<b>Inicio intoxicación</b>	5/9/90	<b>Final intoxicación</b>	22/6/91						
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	11084	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñones sin lesiones macroscópicas evidentes.

Región de abazón derecho con tumoración subcutánea de 4x3 cm, bien delimitada, mostrando a la sección coloración blancogrisácea, consistencia mixoide y focos hemorrágicos.

Nódulo intraabdominal de 0.5 cm, bien delimitado, que engloba 1/3 inferior de uréter derecho.

Lesiones quísticas hepáticas de contenido seroso.

**Hallazgos microscópicos**

RIÑÓN: áreas nefrogénicas. Displasia tubular. Hiperplasia de células intersticiales. Dilatación quística tubular.

TUMOR ABAZON: neoformación no encapsulada con áreas celulares densas predominantes, importante atipia celular y áreas de necrosis. Inclusiones intranucleares. Presencia de mastocitos en el estroma. Englobamiento de filetes nerviosos.

SUPRARRENAL: hiperplasia cortical focal.

TUMOR INTRAABDOMINAL: neoformación no encapsulada de carácter neural englobando uréter. No atipia ni mitosis.

PULMON: hiperplasia adenomatosa focal.

**Inmunohistoquímica**

TUMOR ABAZON: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK ++/25%; NSE +/1%; SINAP -; NF -; CEA -; EMA -; UEA-I -; GFAP -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Displasia tubular renal. Hiperplasia de células intersticiales.

Neurinoma maligno de región abazon derecho.

Adenoma suprarrenal.

Adenoma pulmonar.

Neurofibroma intraabdominal.

**Notas**

**Hamster DES 1M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	24/9/90	<b>Fecha sacrificio</b>	8/11/90	
<b>Tiempo exposición DES</b>	30 días	<b>Inicio intoxicación</b>	8/10/90	<b>Final intoxicación</b>	8/11/90	
<b>Exposición ENU</b>	No					
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>IHQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 2M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	24/9/90	<b>Fecha sacrificio</b>	8/11/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	30 días	<b>Inicio intoxicación</b>	8/10/90	<b>Final intoxicación</b>	8/11/90
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>
<b>Hallazgos macroscópicos</b>					
Np lesiones					

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**



**Hamster DES 3M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/9/90      **Fecha sacrificio** 8/11/90  
**Tiempo exposición DES** 30 días      **Inicio intoxicación** 8/10/90      **Final intoxicación** 8/11/90  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**  
**Hallazgos macroscópicos**  
No lesiones

**Hallazgos microscópicos**  
No lesiones

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**



**Hamster DES 4M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/9/90      **Fecha sacrificio** 9/12/90  
**Tiempo exposición DES** 60 días      **Inicio intoxicación** 8/10/90      **Final intoxicación** 9/12/90

**Exposición ENU** No

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 5M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/9/90      **Fecha sacrificio** 9/12/90  
**Tiempo exposición DES** 60 días      **Inicio intoxicación** 8/10/90      **Final intoxicación** 9/12/90

**Exposición ENU** No

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Ian uno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 6M**

<b>Fecha nacimiento</b>	28/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	24/9/90	<b>Fecha sacrificio</b>	9/12/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	60 días	<b>Inicio intoxicación</b>	8/10/90	<b>Final intoxicación</b>	9/12/90
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>
<b>Hallazgos macroscópicos</b>	No lesiones				

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 7M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/9/90      **Fecha sacrificio** 8/9/91  
**Tiempo exposición DES** 90 días      **Inicio intoxicación** 8/10/90      **Final intoxicación** 8/1/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ No TEM 10379 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: hiperplasia de células intersticiales.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**

**Hamster DES 8M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/9/90      **Fecha sacrificio** 8/1/91  
**Tiempo exposición DES** 90 días      **Inicio intoxicación** 8/10/90      **Final intoxicación** 8/1/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10380    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Ian uno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 9M**

**Fecha nacimiento** 28/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/9/90      **Fecha sacrificio** 8/1/91  
**Tiempo exposición DES** 90 días      **Inicio intoxicación** 8/10/90      **Final intoxicación** 8/1/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    No    TEM    10381    Cultivo    No    Citogenética    NO

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Ian uno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 10M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 11/5/90      **Fecha sacrificio** 1/10/90  
**Tiempo exposición DES** 128 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 1/10/90

**Exposición ENU** No

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**



**Hamster DES 11M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 11/5/90      **Fecha sacrificio** 1/10/90  
**Tiempo exposición DES** 128 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 1/10/90  
**Exposición ENU** Mo  
**Técnicas especiales** No    HQ      IHQ      TEM      Cultivo      Citogenética  
**Hallazgos macroscópicos**  
No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 12M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	11/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	1/10/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	128 días	<b>Inicio intoxicación</b>	22/5/90	<b>Final intoxicación</b>	1/10/90
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>
<b>Hallazgos macroscópicos</b>					
No lesiones					

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 13M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	11/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	22/10/90	
<b>Tiempo exposición DES</b>	150 días	<b>Inicio intoxicación</b>	22/5/90	<b>Final intoxicación</b>	22/10/90	
<b>Exposición ENU</b>	No					
<b>Técnicas especiales</b>	No	HQ	IBQ	TEM	Cultivo	Citogenética

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 14M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	11/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	22/10/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	150 días	<b>Inicio intoxicación</b>	22/5/90	<b>Final intoxicación</b>	22/10/90
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>
<b>Hallazgos macroscópicos</b>	No lesiones				

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: hiperplasia de células intersticiales mostrando citoplasma claro vacuolizado, o bien, estrellado.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**

**Hamster DES 15M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	11/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	22/10/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	150 días	<b>Inicio intoxicación</b>	22/5/90	<b>Final intoxicación</b>	22/10/90
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	HQ	TEM	Cultivo	Citogenética
<b>Hallazgos macroscópicos</b>	No lesiones				

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: hiperplasia de células intersticiales.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**

**Hamster DES 16M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	11/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	21/4/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	180 días	<b>Inicio intoxicación</b>	22/5/90	<b>Final intoxicación</b>	21/11/90
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>
<b>Hallazgos macroscópicos</b>	No lesiones				

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: hiperplasia de células intersticiales con citoplasma pálido.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Notas**

**Hamster DES 17M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 11/5/90      **Fecha sacrificio** 21/11/90  
**Tiempo exposición DES** 180 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 21/11/90  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10281    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñón derecho: tumoración en polo superior de 0.2 cm de coloración blanquecina, bien delimitada.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: neoformación cortical con patrón sólido trabecular (blastemal) con focos de células claras (patrón hipernefroide). Hiperplasia de células intersticiales.

**Inmunohistoquímica**

Tumor renal: VIM +/10%; S-100 ++/10%; HNK -; NSE +/5%; DES ++/10%; ACT -; 13E10 -; CEA -; SINAP -; UEA-I -.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido. Transición células claras-oscuras. Transición epitelial-blastemal. Interdigitaciones. Uniones primitivas. Núcleos redondos/ovales o bien irregulares con cromatina condensada periféricamente y ocasional nucleolo. Áreas hipernefroides con gotas lipídicas. Gránulos Birbeck-like. Gránulos neurosecretorios.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal e hipernefroide.

**Notas**



**Hamster DES 18M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 11/5/90      **Fecha sacrificio** 21/11/90  
**Tiempo exposición DES** 180 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 21/11/90  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**  
**Hallazgos macroscópicos**  
No lesiones

**Hallazgos microscópicos**  
No lesiones

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 19M**

**Fecha nacimiento** 8/3/90      **Fecha gonadectomía** 15/5/90      **Fecha sacrificio** 20/12/90  
**Tiempo exposición DES** 210 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 20/12/90  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ No TEM 10353 Cultivo No Citogenética No  
**Hallazgos macroscópicos**  
No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: tumorlet con patrón en nidos sólidos (blastemal) y de células claras (hiper nefroide). Hiperplasia de células intersticiales.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumorlet renal con patrón blastemal e hiper nefroide.

**Notas**

## Hamster DES 20M

Fecha nacimiento	8/3/90	Fecha gonadectomía	15/5/90	Fecha sacrificio	20/12/90
Tiempo exposición DES	210 días	Inicio intoxicación	22/5/90	Final intoxicación	20/12/90
Exposición ENU	No				
Técnicas especiales	Sí HQ	Sí IHQ	Sí TEM	10354	Cultivo Sí Citogenética Sí

### Hallazgos macroscópicos

Riñones: múltiples nódulos bilaterales entre 0.1 y 0.3 cm, blanquecinos, bien delimitado, focalmente de carácter confluyente.

### Hallazgos microscópicos

Riñón: tumores pequeños corticales con patrón sólido trabecular (blastemal) y de células claras (hiper nefroide). Hiperplasia de células intersticiales. Metástasis pulmonares.

### Imunohistoquímica

DT +/+, VIM ++/10%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE -; DES ++/10%; ACT +/1%; 13E10 -; CEA ++/1%; SINAP NV; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT NV; NF -.

### M. electrónica

P. epitelial sólido. Areas fusiformes. Interdigitaciones. Gotas lipídicas. Núcleos redondos/ovales con hendidura ocasional. Cromatina condensada periféricamente. Heterocromatina. Gránulos neurosecretorios. Doble membrana basal limitante. Uniones intercelulares desarrolladas. Cilios.

### Cultivo celular

Placas y grupos de células poligonales epitelioideas con granulaciones citoplásmicas.

### Diagnóstico

Tumor renal nefroblastoma-like con patrones blastemal e hiper nefroide. Metástasis pulmonares.

### Notas

**Hamster DES 21M**

**Fecha nacimiento** 8/3/90      **Fecha gonadectomía** 15/5/90      **Fecha sacrificio** 20/12/90  
**Tiempo exposición DES** 210 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 20/12/90  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí    **HQ**    Sí    **IHQ**    No    **TEM** 10355(A,B)    **Cultivo** No    **Citogenética** No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales,

**Notas**

**Hamster DES 22M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 9/5/90      **Fecha sacrificio** 17/1/91  
**Tiempo exposición DES** 240 días      **Inicio intoxicación** 17/5/90      **Final intoxicación** 17/1/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí    **HQ**    Sí    **IHQ**    No    **TEM** 10400    **Cultivo** No    **Citogenética** No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia de células intersticiales renales.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales

**Notas**

**Hamster DES 23M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 9/5/90      **Fecha sacrificio** 17/1/91  
**Tiempo exposición DES** 240 días      **Inicio intoxicación** 17/5/90      **Final intoxicación** 17/1/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ No TEM 10401 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia de células intersticiales renales

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

Hiperplasia células intersticiales, patrón epitelial sólido. Doble membrana basal limitante. Núcleos de contornos irregulares y cromatina condensada periféricamente. Gotas lipídicas. Interdigitaciones. Uniones primitivas. Ciliogénesis. Luces intracelulares. Filamentos intermedios.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Hiperplasia de células intersticiales renales

**Notas**

## Hamster DES 24M

Fecha nacimiento	17/2/90	Fecha gonadectomía	9/5/90	Fecha sacrificio	17/1/91						
Tiempo exposición DES	240 días	Inicio intoxicación	17/5/90	Final intoxicación	17/1/91						
Exposición ENU	No										
Técnicas especiales	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	10402	Cultivo	Sí	Citogenética	Sí

### Hallazgos macroscópicos

Riñón: múltiples nódulos bilaterales entre 0.2 y 0.5 cm, bien delimitados, blanquecinos.

Hígado: lóbulo hepático izquierdo con quiste seroso de 0.3 cm.

SNC: hipófisis aumentada de tamaño (aprox. 0.4 cm)

### Hallazgos microscópicos

Riñón: hiperplasia de células intersticiales. Tumores pequeños con patrón sólido trabecular (blastemal). Acúmulos intracitoplásmicos PAS +.

SNC: Adenoma hipofisario.

### Inmunohistoquímica

Tumor renal: S-100 ++/25%; HNK -; NSE ++/1%; DES +++/5%; ACT -; EMA -; SINAP -; UEA-I -.

### M. electrónica

P. epitelial sólido. Células claras poligonales de disposición compacta. Interdigitaciones. Gotas lipídicas. Núcleos redondos/ovales o irregulares con escotaduras. Cromatina condensada periféricamente. Pies basales diferenciados. Gránulos neurosecretorios. Uniones celulares bien desarrolladas. Procesos neuríticos. Filamentos intermedios. Luces intracelulares. Microvellosidades. Cilios. Gránulos de Birbeck-like.

### Cultivo celular

Crecimiento lento. Escasa actividad mitótica. Células tumorales de hábito epitelioide con granulaciones citoplásmicas.

### Diagnóstico

Tumor nefroblastoma-like con patrón blastemal.

Adenoma de hipófisis.

### Notas



**Hamster DES 25M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	9/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	18/2/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	270 días	<b>Tiempo exposición DES</b>	270 días	<b>Inicio intoxicación</b>	17/5/90	<b>Final intoxicación</b>	11						
<b>Exposición ENU</b>	No	<b>Exposición ENU</b>	No										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	No	TEM	10431	Cultivo	No	Citogenética	1
<b>Hallazgos macroscópicos</b>		<b>Hallazgos macroscópicos</b>											
No lesiones		No lesiones											

<b>Hallazgos microscópicos</b>	<b>Hallazgos microscópicos</b>
no lesiones	no lesiones

<b>Imunohistoquímica</b>	<b>Imunohistoquímica</b>
--------------------------	--------------------------

<b>M. electrónica</b>	<b>M. electrónica</b>
-----------------------	-----------------------

<b>Cultivo celular</b>	<b>Cultivo celular</b>
------------------------	------------------------

<b>Diagnóstico</b>	<b>Diagnóstico</b>
--------------------	--------------------

**Notas**

**Notas**

**Hamster DES 26M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 9/5/90      **Fecha sacrificio** 18/2/91  
**Tiempo exposición DES** 270 días      **Inicio intoxicación** 17/5/90      **Final intoxicación** 18/2/91

**Exposición ENU** No

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 27M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 9/5/90      **Fecha sacrificio** 18/2/91  
**Tiempo exposición DES** 270 días      **Inicio intoxicación** 17/5/90      **Final intoxicación** 18/2/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10472    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñón derecho: nódulo cortical, blanquecino, de 0.1 cm en polo inferior.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: hiperplasia de células intersticiales con predominio de células claras. Tumor pequeño cortical con patrón sólido de células claras (Hipernefroide). PAS -.

**Inmunohistoquímica**

Tumor renal: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE -; DES ++/25%; ACT NV; 13E10 -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor nefroblastoma-like con patrón hipernefroide.

**Notas**

**Hamster DES 28M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	8/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	7/4/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	270 días	<b>Inicio intoxicación</b>	17/5/90	<b>Final intoxicación</b>	18/2/91						
<b>Exposición ENU</b>	No										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	10577	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Riñones: nódulos blanquecinos bilaterales corticales entre 0.1 y 0.2 cm.

**Hallazgos microscópicos**

Riñones: tumores pequeños con áreas de crecimiento papilar y células PAS + (patrón adenoida). Focal formación de rosetas y pseudorosetas perivasculares (patrón neuroectodérmico).

**Inmunohistoquímica**

VIM -; S-100 ++/5%; HNK -; 13E10 -; CEA + (focal); SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT NV; NF -.

**M. electrónica**

P. epitelial sólido y blastemal indiferenciado. Transición epitelial-blastemal. Polimorfismo celular y nuclear. Heterocromatina. Uniones intercelulares desarrolladas. Cilios y microvellosidades. Gotas lipídicas. Interdigitaciones. Gránulos neurosecretorios. Colágena. Luces inter e intracelulares. Barras de cierre. Túbulos primitivos. Membranas basales limitantes.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumores pequeños nefroblastoma-like con patrones adenoida y neuroectodérmico.

**Notas**

**Hamster DES 29M**

**Fecha nacimiento** 8/3/90      **Fecha gonadectomía** 15/5/90      **Fecha sacrificio** 3/6/91  
**Tiempo exposición DES** 279 días      **Inicio intoxicación** 22/5/90      **Final intoxicación** 27/2/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética NO

**Hallazgos macroscópicos**

Riñones: de coloración pálida, tamaño disminuido, mostrando varios nódulos blanquecinos corticales bilaterales entre 0.1 y 0.3 cm.

SNC: hipófisis aumentada de tamaño.

**Hallazgos microscópicos**

Riñones: hiperplasia de células intersticiales. Tumores pequeños corticales con patrón sólido de células claras (hiper nefroide). Nefropatía crónica.

Hipófisis: adenoma.

**Inmunohistoquímica**

Tumor renal: VIM +++/25%; S-100 ++/10%; HNK -; NSE -; ACT -; CEA -; EMA -; SINAP -; UEA-I -; FVIIIIRA -; aQT -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumores pequeños nefroblastoma-like con patrón hipernefroide.

Adenoma de hipófisis.

**Notas**

**Hamster DES 30M**

**Fecha nacimiento** 8/2/90      **Fecha gonadectomía** 2/5/90      **Fecha sacrificio** 17/6/91  
**Tiempo exposición DES** 282 días      **Inicio intoxicación** 15/5/90      **Final intoxicación** 27/2/91

**Exposición ENU** No

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**



**Hamster DES 31M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 8/5/90      **Fecha sacrificio** 17/6/91  
**Tiempo exposición DES** 282 días      **Inicio intoxicación** 17/5/90      **Final intoxicación** 27/2/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**  
**Hallazgos macroscópicos**  
No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**



**Hamster DES 32M**

<b>Fecha nacimiento</b>	17/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	8/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	23/9/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	282 días	<b>Inicio intoxicación</b>	17/5/90	<b>Final intoxicación</b>	27/2/91
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

Abceso abdominal.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Regresión tumoral.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Regresión tumoral renal.

Abceso abdominal.

**Notas**

**Hamster DES 33M**

**Fecha nacimiento** 8/2/90      **Fecha gonadectomía** 2/5/90      **Fecha sacrificio** 16/1/92  
**Tiempo exposición DES** 284 días      **Inicio intoxicación** 15/5/90      **Final intoxicación** 27/2/91  
**Exposición ENU** No  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ No TEM 11142 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Riñones: áreas nefrogénicas.

**Ian anohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 34M**

<b>Fecha nacimiento</b>	8/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	2/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	28/1/92
<b>Tiempo exposición DES</b>	284 días	<b>Inicio intoxicación</b>	15/5/90	<b>Final intoxicación</b>	27/2/91
<b>Exposición ENU</b>	No				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones

**Hallazgos microscópicos**

Riñones áreas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster DES 35M**

<b>Fecha nacimiento</b>	8/2/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	2/5/90	<b>Fecha sacrificio</b>	28/1/92	
<b>Tiempo exposición DES</b>	284 días	<b>Inicio intoxicación</b>	15/5/90	<b>Final intoxicación</b>	27/2/91	
<b>Exposición ENU</b>	No					
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>IBQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

Riñones: de coloración pálida y superficie finamente granular.

Suprarrenal derecha de 0.4 cm de diámetro y de coloración amarillenta.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Dilatación quística tubular. Cilindros hialinos. Nefropatía crónica.

Adenoma de suprarrenal derecha.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Adenoma suprarrenal

**Notas**

**Hamster DES 36M**

**Fecha nacimiento** 17/2/90      **Fecha gonadectomía** 8/5/90      **Fecha sacrificio** 28/1/92  
**Tiempo exposición DES** 282 días      **Inicio intoxicación** 17/5/90      **Final intoxicación** 27/2/91

**Exposición ENU** No

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñones: áreas nefrogénicas. Restos tumorales involutivos.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Restos tumorales renales involutivos.

**Notas**

**Hamster ENU 1H**

<b>Fecha nacimiento</b>	29/3/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	17/4/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas evidentes.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 2M**

<b>Fecha nacimiento</b>	29/3/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	17/4/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**  
No lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**  
No lesiones histopatológicas reseñables.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**



**Hamster ENU 3H**

<b>Fecha nacimiento</b>	29/3/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	17/4/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No alteraciones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 4H**

**Fecha nacimiento** 29/3/90      **Fecha gonadectomía** 30/5/90      **Fecha sacrificio** 7/6/90

**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**

**Exposición ENU** Si

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No alteraciones macroscópicas evidentes.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Inmuno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 5M**

**Fecha nacimiento** 10/6/90

**Fecha gonadectomía**

**Fecha sacrificio** 17/8/90

**Tiempo exposición DES**

**Inicio intoxicación**

**Final intoxicación**

**Exposición ENU** Sí

**Técnicas especiales** No HQ

**IHQ**

**TEM**

**Cultivo**

**Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No alteraciones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 6M**

**Fecha nacimiento** 10/6/90      **Fecha gonadectomía**      **Fecha sacrificio** 17/8/90

**Tiempo exposición DES**      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**

**Exposición ENU** Si

**Técnicas especiales** No    **HQ**      **IHQ**      **TEM**      **Cultivo**      **Citogenética**

**Hallazgos macroscópicos**

No alteraciones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 7H**

<b>Fecha nacimiento</b>	10/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	22/8/90
<b>Tiempo exposición DES</b>		<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas evidentes.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Ian uohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster E+D 8H**

<b>Fecha nacimiento</b>	10/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	22/8/90
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Sí				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas evidentes.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

Hamster ENU 9H

Fecha nacimiento 10/6/90 Fecha gonadectomía 22/8/90 Fecha sacrificio 27/11/90  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal moribundo.

Región cervical derecha con tumoración cutánea pigmentada de 2 cm de diámetro, sobreelevada y centralmente ulcerada.

Región maxilar izquierda con nódulo subcutáneo de 1 cm de diámetro, bien delimitada, de consistencia elástica y coloración blancogrisácea.

Riñón sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor cervical derecho: neoformación de células névicas con focal pigmentación, leve atipia celular y nuclear, con aisladas mitosis. Focal infiltración epidérmica. Buena delimitación en profundidad. Infiltrado inflamatorio crónico con reacción granulomatosa gigantocelular a cuerpo extraño en dérmis.

Tumor submaxilar izquierdo: neoformación encapsulada constituida por células redondas o fusiformes separadas por una abundante matriz mucosa intercelular. No existe hemorragia ni necrosis. Los núcleos presentan discreta variación de forma y tamaño con uno o más nucleolos de pequeño tamaño. Existen ocasionales mitosis (<1 mitosis/10 HPF).

**Imunohistoquímica**

Tumor submaxilar izquierdo: VIM ++/75%; S-100 +/25%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor névico cervical derecho.  
Neurofibroma de rama maxilar de trigémino.

**Notas**

Tumor névico: Inicio macroscópico 8.10.90.



Hamster ENU 10H

Fecha nacimiento 10/6/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 5/12/90  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10329 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región axilar y hemitórax ventral derecho: tumoración subcutánea de 4.5x3.5x1.5, no ulcerada, de consistencia blanda, pseudoencapsulada y dependiente del plexo braquial. A la sección de coloración blancogrisácea con áreas hemorrágicas y quísticas (n° 1).

Mediastino posterior: tumoración de 1x0.5 cm dependiente de raíces torácicas medias, de coloración blanca y consistencia elástica (n° 2).

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor axilar: neoformación encapsulada constituida por áreas celulares fusiformes, áreas de diferenciación epitelial y zonas quísticas. Núcleos con variación en forma y tamaño y mostrando vacuolas intranucleares. Fenómenos de trombosis vascular y necrosis tumoral. Presencia de cuerpos tactoides (pseudo-Meissner). Actividad mitótica elevada (2-3 mitosis/10 HPF).

Tumor mediastínico: neoformación constituida por células redondas o fusiformes separadas por abundante matriz intercelular. No atipia ni mitosis. Núcleos de cromatina homogénea y regularmente distribuida. Infiltración de grasa parda.

**Inmunohistoquímica**

Tumor plexo braquial: DT +; VIM ++/75%; S-100 +/25%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

Tumor mediastínico: VIM ++/75%; S-100 +/75%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

T. PLEXO BRAQUIAL: Matriz extracelular escasa con abundantes fibras de colágena. Polimorfismo celular y nuclear. Procesos citoplásmicos abundantes y anchos. Microtúbulos y microfilamentos. Granulos neurosecretorios. Membrana basal incompleta. Citoplasma perinuclear con abundancia de organelas.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinoma maligno de plexo braquial.

Newofibroma mediastínico posterior.

**Notas**

## Hamster ENU 11H

Fecha nacimiento 6/6/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 11/12/90  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación

Exposición ENU Sí

Técnicas especiales Sí HQ Sí IBQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Animal con mal estado general.

Región supraorbital izquierda: nódulo subcutáneo de 1.5x0.9 cm, bien delimitado, adherido a planos profundos, de consistencia elástica y coloración blanquecina (n° 1).

Región maxilar derecha: nódulo subcutáneo de 2x1 cm de características macroscópicas semejantes al anterior (n° 2).

Riñones sin lesiones.

### Hallazgos microscópicos

Tumoración supraorbital y maxilar: neoformaciones no encapsuladas constituidas por células de citoplasma claro separadas por abundante matriz intercelular e incluyendo gruesos filotes nerviosos. No se observan necrosis ni mitosis. Existe extensión a músculo estriado, dislacerando las fibras musculares y en la tumoración maxilar se aprecia glándula salivar menor rodeada por tumor. Ambas presentan numerosos mastocitos en el estroma.

### Imuno histoquímica

Tumor supraorbital: VIM +++75%; S-100 +50%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurofibromas supraorbital y maxilar.

### Notas

Hamster ENU 12H

Fecha nacimiento 31/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 4/1/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10372 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Pared torácica derecha 1/3 inferior: tumoración subcutánea de 1.5 cm de diametro, de coloración blanquecina y consistencia elástica. Dependiente de nervios intercostales.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor torácico: neoformación con áreas de hemorragia, necrosis y microcalcificaciones. No mitosis ni atipia celular. Fenómenos de trombosis vascular. Presencia de cuerpos tactoides. Dislaceración de fibras musculares estriadas.

**Inmunohistoquímica**

VIM +/75%; S-100 +/25%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

Matriz extracelular escasa con abundantes fibras de colágena. Polimorfismo celular y nuclear. Membrana basal incompleta. Procesos citoplásmicos gruesos con microtúbulos, microfilamentos y gránulos neurosecretorios. Cuerpos lamelares. Estructura pseudomeissneriana. Vacuolas citoplásmicas intranucleares.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newofibroma torácico.

**Notas**

Inicio tumor: 18/6/90

## Hamster ENU 13H

Fecha nacimiento	6/6/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	23/1/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10418(A,B)	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Región retroauricular derecha: tumoración subcutánea de 2x1 cm, pseudoencapsulado, de coloración blanquecina, que se continua por conducto auditivo, penetrando en cavidad craneal, comprimiendo y desplazando hemisferio cerebral derecho, dependiendo de VIII par craneal.

Región pélvica: neoformación pseudoencapsulada de 3x2.5 cm, de coloración blanquecina, localizada entre recto y vejiga, adherida a la zona de unión de cuernos uterinos, continuando con pared vaginal y posteriormente unida a cara anterior de sacro.

Derrame pleural izquierdo seroso.

Riñón derecho con quiste cortical de 0.2 cm.

### Hallazgos microscópicos

Tumor plexo sacro: neoformación encapsulada con predominio de las áreas densas celulares (células pequeñas redondas de escaso citoplasma) sobre las áreas quísticas. Extensión a grasa y estructuras adyacentes (ureteres). Actividad mitótica elevada (7-8 mitosis/10 HPF). Escaso infiltrado inflamatorio estrómic.

Tumor VIII par: neoformación encapsulada constituida por células redondas y fusiformes, de citoplasma amplio, de bordes mal definidos, con áreas densas celulares alternando con otras de abundante material mixoide intercelular. Existen fibras nerviosas englobadas y desplazadas periféricamente. Focal presencia de cuerpos tactoides. Ausencia de necrosis y mitosis. La tumoración engloba elementos glandulares sebáceos y mucosos y dislacerá fibras musculares estriadas.

Riñón: Áreas nefrogénicas. Quistes corticales.

### Inmunohistoquímica

Tumor plexo sacro: VIM ++/50%; S-100 ++/25%; HNK +/1%; NSE -; NF -; EMA -.

Tumor VIII par: DT +; VIM +++/75%; S-100 ++/50%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

### M. electrónica

T. VIII PAR: Matriz extracelular abundante. Discreto polimorfismo celular y nuclear. Hendiduras nucleares. Abundantes organelas citoplásmicas perinucleares. Membrana basal incompleta. Procesos citoplásmicos numerosos y finos. Gránulos neurosecretorios.

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurinoma maligno de plexo sacro.

Neurofibroma del VIII par.

### Notas

## Hamster ENU 14H

Fecha nacimiento	10/6/90	Fecha gonadectomía	22/8/90	Fecha sacrificio	4/3/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Sí										
Técnicas especiales	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	10503	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Tumor brazo izquierdo: neoformación subcutánea de 6x4x3 cm, de consistencia blanda, mostrando a la sección áreas sólidas blanquecinas junto con áreas quísticas y hemorrágicas (n° 1).

Tumor plexo sacro: cavidad abdominal ocupada por masa que desplaza y comprime asas intestinales de coloración blancogrisácea, que se extiende hacia región pélvica e inguinal izquierda, bien delimitada y dependiente de plexo sacro. A la sección presenta áreas sólidas de coloración blanquecina y consistencia elástica junto con zonas quísticas de contenido seroso (n° 2).

Suprarrenal derecha: aumentada de tamaño, de 1 cm de diámetro, de coloración amarillenta comprimiendo polo superior renal (n° 3).

Riñón sin lesiones macroscópicas.

### Hallazgos microscópicos

Tumor brazo izquierdo: neoformación no encapsulada, mostrando áreas densas celulares con actividad mitótica elevada (8-10 mitosis/10 HPF) con mitosis atípicas. Áreas quísticas, hemorrágicas con macrófagos cargados de hemosiderina y de necrosis. Focal presencia de cuerpos tactoides.

Tumor plexo sacro: neoformación no encapsulada mostrando áreas densas celulares con actividad mitótica elevada, infiltración de asas intestinales y músculo estriado, englobamiento de fibras nerviosas y presencia de cuerpos tactoides. Áreas de hemorragia, quísticas y de necrosis tumoral.

Suprarrenal derecha: tumoración constituida por células epiteliales de amplio citoplasma y células fusiformes. Presencia de abundantes mitosis y necrosis tumoral.

### Imunohistoquímica

Tumor brazo izquierdo: VIM ++/75%; S-100 +/ <25%; HNK -; NSE +/ <25%(1); NF ++/ <25%(2); EMA -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Newinoma maligno de brazo izquierdo.

Newinoma maligno de plexo sacro.

Carcinoma suprarrenal derecho.

### Notas

(1) Granular citoplásmico. (2) Focal. Inicio tumor brazo: 12.12.90.

**Hamster ENU 15M**

**Fecha nacimiento** 9/6/90      **Fecha gonadectomía** 17/8/90      **Fecha sacrificio** 11/3/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10517    Cultivo    No    Citogenética    NO

**Hallazgos macroscópicos**

Cavidad abdominal ocupada por tumoración de 7x5 cm, de consistencia blanda, a la sección mixoide y con áreas quísticas y hemorrágicas. Dependiente de plexo sacro.

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor abdominal: neoformación no encapsulada, con áreas celulares densas de actividad mitótica elevada (6-8 mitosis/10 HPF). Áreas de células de citoplasmas con prolongaciones y abundante material mixoide intercelular.

**Inmunohistoquímica**

VIM +/ <25%; S-100 +/ <25%; HNK -; NSE -; NF -; EMA-

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinoma maligno de plexo sacro.

**Notas**



Hamster ENU 16H

Fecha nacimiento 31/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 11/3/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Abazón izquierdo: tumoración de 3x2 cm, bien delimitada, de coloración blanquecina, consistencia elástica y presentando a la sección áreas quísticas y hemorrágicas.

Región sacra anterior: tumoración de 2 cm de diametro, blanquecino y mixoide a la sección.

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor abazón: neoformación no encapsulada mostrando ulceración superficial, áreas densas de células indiferenciadas junto con áreas mixoides, quísticas y de necrosis. Englobamiento de filetes nerviosos.

Tumor plexo sacro: neoformación no encapsulada con predominio de áreas densas de células pequeñas redondas indiferenciadas con aisladas mitosis e infiltración de músculo estriado. Áreas mixoides y quísticas. Mastocitos numerosos.

Riñón: áreas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

Tumor plexo sacro: VIM +++/75%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/50%; NF -; EMA -.

Tumor abazón: VIM +++/75%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE +/<25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinoma maligno de abazón izquierdo.

Newinoma maligno de plexo sacro.

**Notas**

Inicio tumor abazón: 18.6.90.



Hamster ENU 17H

Fecha nacimiento	6/6/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	7/4/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	No	TEM	10578	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Región submandibular izquierda: tumoración pseudoencapsulada de 3x2 cm, a la sección blanquecina con áreas quísticas de contenido seroso (n°3).

Cavidad abdominal: ocupada por tumoración de 8x5x3 cm, polilobulada, que engloba ambos riñones sin infiltrarlos y desplaza asas intestinales, bien delimitada, encapsulada, quística a la sección con áreas hemorrágicas (n° 1).

Mediastino posterior: tumoración de 1x0.5 cm, bien delimitada, blanquecina y elástica dependiente de raíces torácicas inferiores (n° 2).

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumoración submandibular y mediastínica: neoformaciones con patrón histológico semejante, mostrando áreas mixoides y fusocelulares, cuerpos tactoides y englobamiento de filetes nerviosos. Infiltración de grasa y músculo estriado.

Tumoración abdominal: neoformación no encapsulada, que infiltra músculo estriado y pelvis renal. Presenta áreas quísticas, mixoides y densas celulares con formación de estructuras rosetoides y actividad mitótica elevada. Focos de hemorragia y necrosis tumoral.

Diferenciación ganglionar. Englobamiento de fibras nerviosas. Focos de metaplasia mielóide.

**Imuno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newofibromas submandibular izquierdo y mediastínico posterior.

Ganglioneoblastoma retroperitoneal.

**Notas**

**Hamster ENU 18M**

Fecha nacimiento 29/3/90 Fecha gonadectomía 30/5/90 Fecha sacrificio 18/4/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Pared costal: tumoración de 2x1 cm, pseudoencapsulada, bien delimitada, blanquecina y elástica a la sección (n° 2).

Plexo sacro: tumoración de similares características y dimensiones al anterior (n° 1).

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor pared costal: neoformación encapsulada con predominio de áreas mixoides escasamente celulares, no necrosis ni mitosis. Numerosos mastocitos.

Tumor plexo sacro: neoformación no encapsulada que engloba filretes nerviosos. Diferenciación ganglionar. Presencia de cuerpos tactoides. Actividad mitótica elevada (2-3 mitosis/10 HPF). No necrosis.

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular.

**Inmuno histoquímica**

Tumor sacro: S-100 ++/<25%; HNK -; NSE ++/25%; NF ++/1%; EMA -.

Tumor pared costal: S-100 ++/75%; HNK -; NSE +++/25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma costal.

Ganglioneuroma maligno de plexo sacro.

**Notas**

**Hamster ENU 19M**

**Fecha nacimiento** 29/3/90      **Fecha gonadectomía** 30/5/90      **Fecha sacrificio** 18/4/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Si  
**Técnicas especiales** No    **HQ** No    **IHQ** No    **TEM** No    **Cultivo** No    **Citogenética** No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Hiperplasia suprarrenal cortical focal.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Adenoma de suprarrenal.

**Notas**

## Hamster ENU 20M

Fecha nacimiento 29/3/90      Fecha gonadectomía 30/5/90      Fecha sacrificio 18/4/91  
Tiempo exposición DES No      Inicio intoxicación      Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10600      Cultivo No      Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Cavidad abdominal: tumoración retroperitoneal de 4x3x2 cm, encapsulada y dependiente de raíces dorsales y lumbares. Engloba ambos riñones desplazándolos, no infiltrándolos. Bien delimitada, de consistencia elástica y coloración blanquecina.

Riñón sin lesiones.

### Hallazgos microscópicos

Tumor retroperitoneal: neoformación no encapsulada, constituida por células pequeñas indiferenciadas con actividad mitótica elevada (4-6 mitosis/10 HPF). Presencia de cuerpos tactoides. Infiltración de cápsula y pelvis renal y músculo estriado.

Suprarrenal: hiperplasia cortical nodular.

### Inmunohistoquímica

Tumor retroperitoneal: S-100 ++/50%; HNK -; NSE ++/ <25%; NF -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Newinoma maligno retroperitoneal.

Adenoma suprarrenal.

### Notas

Hamster ENU 21M

Fecha nacimiento 30/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 10/5/90  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10639 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal moribundo.

SNC: trigémino izquierdo intracraneal mostrando engrosamiento fusiforme de 2.5x0.5 cm, empujando y haciendo protruir a globo ocular izquierdo.

Atrofia testicular.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor trigémino: neoformación no encapsulada constituida por células con prolongaciones citoplásmicas dispuestas irregularmente, focal presencia de células en anillo de sello PAS - y cuerpos tactoides. No necrosis ni mitosis.

Atrofia testicular.

**Inmunohistoquímica**

Tumor trigémino: ++/75%; S-100 +++/50%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; DES -; CEA -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma de trigémino izquierdo.  
Atrofia testicular.

**Notas**

Hamster ENU 22H

Fecha nacimiento	10/6/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	24/5/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10668	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Múltiples tumoraciones subcutáneas localizadas en región cervical derecha (n° 1), axilar izquierda (n° 2) y pata posterior izquierda (n° 3), de 3, 4 y 4 cm de diámetro respectivamente, mostrando semejantes características macroscópicas con áreas quísticas, mixoides y hemorrágicas a la sección. La tumoración axilar presenta áreas de necrosis evidentes.

Cabeza mostrando lesión cutánea sobrelevada, pigmentada y ulcerada centralmente de 2 cm de diámetro (n° 4).

Pata anterior derecha con tumoración subcutánea de 1 cm de diámetro, encapsulada, elástica y blanquecina a la sección (n° 5).

Riñones de superficie finamente granular y coloración pálida.

Tumoración encapsulada en unión de ambos cuernos uterinos de 1.5 cm, de consistencia blanda y con áreas de necrosis a la sección.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular.

Tumores región cervical derecha (n° 2), axilar izquierda (n° 1), pata posterior izquierda (n° 3) y pata anterior derecha (n° 5): todos ellos corresponden a neoformaciones de estirpe neural con las siguientes características individuales:

(n° 1) > no encapsulado, zonas densas celulares con mitosis, áreas de necrosis tumoral.

(n° 2) > no encapsulado, áreas quísticas, vacuolas intranucleares numerosas, cuerpos taotoides.

(n° 3) > no encapsulado, áreas quísticas, vacuolas intranucleares, infiltración de grasa parda, metaplasia mielóide, dependiente de ciático.

(n° 5) > encapsulado, englobamiento de fibras nerviosas, mastocitos abundantes, infiltración de músculo y grasa, no necrosis ni mitosis.

Tumoración cutánea (n° 4): neoformación constituida por células polimorfas, presentando focalmente pigmentación, actividad mitótica elevada e infiltración epidérmica.

Suprarrenal: hiperplasia nodular cortical.

Tumor útero: sarcoma indiferenciado (n° 6).

**Inmunoquímica**

Tumor cervical derecho: VIM ++/50%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor pata posterior: VIM ++/50%; S-100 +++/50%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor pata anterior: VIM ++/75%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor útero: VIM +++/75%; DES ++/<25%; ACT -; S-100 -; NSE ++/25%; HNK -; NF -; CEA -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Displasia tubular renal.

Newinoma maligno axilar.

Newofibromas de región cervical, pata anterior derecha y ciático izquierdo.

Melanoma maligno.

Leiomiocarcoma de útero con inmunotinción para VIM, DES y NSE.

Adenoma suprarrenal.

**Notas**

Primera tumoración se observa el 7/12/90.



## Hamster ENU 23H

Fecha nacimiento	31/3/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	24/5/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	10669	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Región dorsal: tumoración subcutánea de 7x3.5 cm, encapsulada, de consistencia elástica y a la sección de coloración blanquecina con áreas mixoides (n° 1).

Trigémico izquierdo intracraneal: engrosamiento fusiforme de 2x0.5 cm, haciendo protruir globo ocular que aparece ulcerado (n° 2).

Región maxilar izquierda: nódulo subcutáneo de 1.5x1 cm, bien delimitado y de coloración blanquecina (n° 3).

Riñones sin lesiones macroscópicas.

### Hallazgos microscópicos

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular.

Tumor dorsal (n° 1): neoformación encapsulada con englobamiento de filetes nerviosos e infiltración de músculo estriado y grasa. No mitosis ni necrosis. Numerosos mastocitos. No vacuolas intranucleares ni cuerpos tactoides.

Trigémico intracraneal (n° 2): neoformación encapsulada con englobamiento de filetes nerviosos, infiltración muscular y fenómenos de trombosis vascular. No mitosis ni necrosis. No vacuolas intranucleares ni cuerpos tactoides. Mastocitos numerosos. Diferenciación ganglionar focal.

Región maxilar izquierda (n° 3): semejantes características a n° 1.

### Imunohistoquímica

Tumor dorsal: VIM ++/50%; S-100 ++/25%; HNK +++/1%; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor trigémico: VIM ++/50%; S-100 ++/75%; HNK ++/1%; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor maxilar: VIM +++/50%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Displasia tubular renal.

Newofibroma dorsal subcutáneo.

Ganglioneurofibroma de trigémico intracraneal.

Newofibroma maxilar izquierdo.

### Notas



**Hamster ENU 24M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	27/8/90	<b>Fecha sacrificio</b>	27/5/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

Región supraciliar derecha: lesión pigmentada sobreelevada de 1 cm de diámetro máximo de aspecto verrucoso.

Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Región supraciliar: tumoración névica.

Riñón: áreas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Tumor névico de región supraciliar.

**Notas**

Hamster ENU 25H

Fecha nacimiento 30/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 27/5/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Pata anterior derecha: tumoración encapsulada de 7x5x4 cm, mostrando a la sección áreas blanquecinas sólidas y áreas quísticas de contenido serohemático.

Hepatoesplenomegalia moderada. Hígado con pequeños quistes de contenido seroso.

Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor pata anterior: neoformación encapsulada con áreas quísticas y áreas sólidas de células fusiformes con formación focal de estructuras rosetoides, necrosis y actividad mitótica elevada (4-6 mitosis/10 HPF).

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular. Nefropatía crónica con microcalcificaciones.

**Inmunohistoquímica**

Tumor pata anterior: VIM +++/75%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE ++/25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibrosarcoma de pata anterior derecha.

Displasia tubular renal.

**Notas**

Inicio tumor pata anterior 5/3/91.

**Hamster ENU 26H**

**Fecha nacimiento** 10/6/90      **Fecha gonadectomía** 22/8/90      **Fecha sacrificio** 29/5/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10684    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Pata anterior izquierda: tumoración subcutánea encapsulada de 6x4 cm, bien delimitada, presentando a la sección área induradas blanquecinas junto con quistes de contenido serohemático.

Hepatoesplenomegalia moderada. Hígado con aislados quistes de contenido seroso.

Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor pata anterior: neoformación encapsulada con áreas fusocelulares con actividad mitótica elevada, hemorragia y necrosis tumoral. Degeneración quística.

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular.

**Inmunohistoquímica**

Tumor pata anterior: VIM +++/75%; S-100 ++/<25%; HNK -; NSE ++/>25%; NF NV; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinoma maligno de pata anterior izquierda.

Displasia tubular renal.

**Notas**

Inicio tumor pata anterior 12/12/90.

Hamster ENU 27H

Fecha nacimiento 30/3/90 Fecha gonadectomía 7/6/90 Fecha sacrificio 29/5/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10685 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región retroocular: tumoración que ocupa órbita derecha desplazando globo ocular sin infiltrarlo macroscópicamente, de consistencia elástica y coloración blanquecina. No se observa afectación de nervio óptico.

Región cervical ventral: tumoración encapsulada de 4x2.5 cm, bien delimitada, de coloración blanquecina, consistencia elástica y con áreas hemorrágicas a la sección.

Riñones sin lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor cervical: neoformación no encapsulada con áreas de degeneración quística, hemorragia y necrosis tumoral, junto con áreas densas celulares con importante actividad mitótica (2-4 mitosis/10 HPF). Metaplasia mielóide.

Tumor retroorbitario: neoformación no encapsulada, que se extiende rodeando globo ocular sin infiltrarlo, constituido por células de Schwann predominantemente con abundante material mixoide intercelular. No mitosis ni necrosis. No cuerpos tactoides. No englobamiento de filetes nerviosos.

Riñón: áreas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

Tumor cervical: VIM +++/75%; S-100 ++/<25%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor retroorbitario: VIM ++/75%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinoma maligno cervical.

Neurofibroma retroorbitario.

**Notas**

## Hamster ENU 28M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	27/8/90	Fecha sacrificio	7/6/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Sí										
Técnicas especiales	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Pata anterior derecha: tumoración subcutánea de 1.5x1 cm, encapsulada, bien delimitada, mostrando a la sección coloración blanquecina y consistencia elástica.

Retroperitoneo: tumoración polilobulada de 5x4 cm, encapsulada, que desplaza riñones sin infiltrarlos macroscópicamente, mostrando a la sección áreas quísticas de contenido serohemático junto con áreas sólidas blanquecinas y elásticas.

Riñones sin lesiones macroscópicas.

### Hallazgos microscópicos

Tumor pata anterior: neoformación encapsulada con englobamiento de filetes nerviosos, infiltración de músculo estriado y ausencia de necrosis y mitosis. Vacuolas intranucleares.

Tumor retroperitoneal: neoformación encapsulada con áreas sólidas de células pequeñas indiferenciadas, quísticas, hemorragia y necrosis tumoral. Actividad mitótica elevada (3-6 mitosis/ 10 HPF). Englobamiento de filetes nerviosos.

### Inmunohistoquímica

Tumor pata anterior: VIM ++/25%; S-100 ++/50%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

Tumor retroperitoneal: VIM ++/25%; S-100 ++/25%; HNK -; NSE +++/ < 25%; NF -; EMA -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurofibroma de pata anterior.

Neurinoma maligno retroperitoneal.

### Notas

Hamster ENU 29M

Fecha nacimiento 30/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 14/6/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10720 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Abazón izquierdo: tumoración encapsulada de 3x2 cm, de consistencia elástica y coloración blanquecina.

Cavidad abdominal: ocupada por tumoración encapsulada, polilobulada, de 7x5x3.5 cm, de consistencia blanda, mostrando a la sección áreas blanquecinas sólidas y quistes de contenido serohemático. En grasa peritoneal y en pared retroperitoneal se observan varios nódulos entre 0.2 y 1 cm blanquecinos y elásticos de aspecto metastático.

Hígado mostrando varios quistes de contenido seroso. Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor abazón: neoformación encapsulada con áreas de células fusiformes, áreas densas de células indiferenciadas pequeñas y áreas mixoides. Actividad mitótica elevada.

Tumor abdominal: neoformación constituida por células fusiformes junto con áreas mixoides mostrando extensa necrosis. Focal metaplasia condral. Áreas de hemorragia con numerosos siderófagos. Múltiples metástasis peritoneales y retroperitoneales.

**Imunohistoquímica**

Tumor abdominal: VIM +/50%; S-100 +/25%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibrosarcoma de abazón izquierdo.

Neurofibrosarcoma abdominal con metaplasia condral y metástasis peritoneales y retroperitoneales.

**Notas**



## Hamster ENU 30H

Fecha nacimiento 10/6/90 Fecha gonadectomía 22/6/90 Fecha sacrificio 14/6/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10730 Cultivo No Citogenética No

### Hallazgos macroscópicos

Hocico: lesión pigmentada y sobrelevada de aspecto verrucoso de 0.5 cm de diámetro.

Región dorsal: lesión pigmentada, sobrelevada y bien delimitada de 3x2 cm.

Abazón izquierdo: tumoración encapsulada de 6x5x4 cm, blanquecina y mixoide a la sección.

Retroperitoneo: masa tumoral de 5x3x3 cm, englobando ambos riñones y desplazándolos anteriormente sin infiltrarlos macroscópicamente. A la sección presenta áreas quísticas de contenido serohemático.

### Hallazgos microscópicos

Hocico: Tumor névico.

Tumor dorsal: tumoración névica con actividad mitótica elevada y necrosis.

Tumor abazón: tumoración de estirpe neural con actividad mitótica elevada. No encapsulada. Predominio de áreas mixoides sobre quísticas y densas celulares.

Tumor retroperitoneal: neoformación de estirpe neural, con predominio de áreas fusocelulares y diferenciación ganglionar. No mitosis ni necrosis. No encapsulada.

Riñón: áreas nefrogénicas.

### Imunohistoquímica

Tumor abazón: VIM ++/>25%; 8-100 NV; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

### M. electrónica

T. RETROPERITONEAL: Matriz extracelular abundante. Polimorfismo celular y nuclear moderado. Procesos citoplásmicos abundantes y finos. Membrana basal continua. Mastocitos. Estructuras pseudomeissnerianas. Vacuolas citoplásmicas intranucleares. Gránulos neurosecretorios.

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurinoma maligno de abazón izquierdo.

Melanoma maligno dorsal.

Tumor névico de hocico.

Ganglioneurofibroma retroperitoneal.

### Notas



**Hamster ENU 31M**

**Fecha nacimiento** 9/6/90      **Fecha gonadectomía** 17/8/90      **Fecha sacrificio** 14/6/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10731    Cultivo No    Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Mal estado general.

SNC: tumoración en base del cerebro de 1 cm de diámetro, probablemente correspondiente a hipófisis.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor maligno de hipófisis.

**Inmunohistoquímica**

VIM -; S-100 + (focal); HNK + (focal); NSE -; NF + (focal); EMA -; CEA -; SOMAT -; ACTH -; PROLACT -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Carcinoma de hipófisis.

**Notas**

**Hamster ENU 32M**

**Fecha nacimiento** 9/6/90      **Fecha gonadectomía**      **Fecha sacrificio** 14/6/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Cavidad abdominal: tumoración de 7x4x3 cm, polilobulada, mostrando a la sección quistes de contenido serohemático y áreas extensas de necrosis.

Atrofia testicular derecha.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor abdominal: neoformación de estirpe neural, con predominio de áreas de células pequeñas indiferenciadas y áreas mixoides. Extensa necrosis tumoral. Actividad mitótica elevada (>4 mitosis/10 HPF).

**Imuno histoquímica**

VIM +/1%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/1%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinoma maligno abdominal.  
Atrofia testicular derecha.

**Notas**

Hamster ENU 33M

Fecha nacimiento 9/6/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 14/6/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región cervical dorsal: tumoración subcutánea encapsulada de 0.5 cm de diámetro, elástica y de coloración blanquecina.

Región torácica dorsal: nódulo subcutáneo de 1 cm de diámetro, elástico y blanquecino, rodeado por músculo.

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Neurofibroma torácico dorsal.

Hemangiopericitoma cervical dorsal.

**Inmunohistoquímica**

Neurofibroma: VIM NV; S-100 ++/75%; HNK ++/1%; NSE ++/50%; NF +++/ <25%; EMA +/ <25%.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma cervical dorsal.

Hemangiendoteloma (?).

**Notas**

**Hamster ENU 34H**

**Fecha nacimiento** 10/6/90      **Fecha gonadectomía**      **Fecha sacrificio** 26/6/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ No TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal muerto.

Región torácica ventral: Lesión subcutánea de 4x3 cm, bien delimitada, de consistencia blanda y a la sección mostrando amplias áreas de necrosis.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor torácico: neoformación no encapsulada, con amplia degeneración quística y necrosis. No se observan mitosis. Infiltración de grasa adyacente.

**Inmuno histoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma subcutáneo torácico ventral.

**Notas**

Inicio tumor 5.3.91.

**Hamster ENU 35M**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 27/8/90      **Fecha sacrificio** 28/6/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    No    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal muerto.

Cavidad abdominal: tumoración pediculada de 5x4 cm, dependiente de grasa mesentérica, encapsulada, bien delimitada, elástica, blanquecina y a la sección con áreas quísticas y hemorrágicas.

Riñones con disminución de su tamaño, superficie granujenta y coloración grisácea.

Suprarrenal derecha: tumoración de 0.5 cm de diámetro, de coloración blancoamarillenta.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor abdominal: neoformación no encapsulada, con predominio de áreas quísticas junto con áreas hemorrágicas. No se observan mitosis.

Suprarrenal: tumoración constituida por células de amplio citoplasma, con patrón de crecimiento sólido y pleomorfismo nuclear y celular. Actividad mitótica elevada.

**Inmunohistoquímica**

Tumor abdominal: VIM +++/75%; S-100 ++/50%; HNK -; NSE -; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma mesentérico.

Carcinoma de suprarrenal derecha.

**Notas**

## Hamster ENU 36M

Fecha nacimiento	9/6/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	28/6/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Pata anterior izquierda: tumoración subcutánea de 3x2 cm, no encapsulada, bien delimitada, de consistencia elástica y coloración blanquecina.

Región dorsal lateral derecha: lesión cutánea pigmentada de 4x2cm, sobrelevada y ulcerada centralmente.

Pulmones: múltiples nódulos metastáticos bilaterales entre 0.1-0.4 cm de coloración negruzca.

Adenopatía cervical derecha de 1 cm de diámetro, de aspecto metastático y de coloración negruzca a la sección.

Riñones sin lesiones.

### Hallazgos microscópicos

Riñón: áreas nefrogénicas. Metástasis por melanoma.

Tumor pata anterior izquierda: neoformación no encapsulada, de estirpe neural con áreas fusocelulares. Areas de necrosis tumoral. Actividad mitótica elevada (>6 mitosis/10 HPF).

Lesión pigmentada dorsal: neoformación de estirpe epitelial que infiltra epidermis con focal pigmentación y actividad mitótica elevada. Metástasis pulmonares, ganglionares y renales.

### Imuno histoquímica

Tumor pata anterior: VIM +++/75%; S-100 ++/25%; HNK ++/25%; NSE ++/25%; NF -; EMA -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurinoma maligno de pata anterior izquierda.

Melanoma maligno ulcerado con metástasis renales, pulmonares y ganglionares.

### Notas



Hamster ENU 37M

Fecha nacimiento 29/3/90 Fecha gonadectomía 30/5/90 Fecha sacrificio 2/7/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10778 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región maxilar derecha: tumoración subcutánea de 2x1 cm, encapsulado, elástico y blanquecino (n° 4).  
Rama mandibular izquierda: abombamiento de 0.5 cm de la misma mostrando a la sección formación quística multilocular, de contenido serohemorrágico (n° 6).  
Región dorsal: tumoración subcutánea de 5x3 cm, encapsulada, elástica, blanquecina, con áreas quísticas y hemorrágicas a la sección (n° 1).  
Región dorsal cadera derecha: tumoración subcutánea de 3x2 cm encapsulada, elástica, blanquecina, dependiente de raíces lumbares y sacras (n° 2).  
Cavidad abdominal: tumoración perivesical encapsulada de 1 cm, dependiente de raíces sacras, elástica y blanquecina (n° 3).  
Intestino: dilatación de colon transversal y descendente, con adelgazamiento de la pared (n° 5).  
Hígado: presencia de varios quistes de contenido seroso entre 0.5 y 1.5 cm.  
Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.  
Tumor maxilar derecho: neoformación no encapsulada englobando filetes nerviosos, mostrando áreas quísticas, mixoides y densas celulares.  
Tumor mandibular izquierdo: neurofibroma mandibular y ameloblastoma.  
Tumor dorsal: neoformación encapsulada, con áreas quísticas y mixoides y presencia de células pequeñas indiferenciadas con formación de rosetas. Mitosis numerosas (3-4/10 HPF). Necrosis tumoral. Abundantes mastocitos.  
Tumor cadera derecha: similares características al anterior más infiltración de músculo estriado y vacuolas intranucleares.  
Tumor perivesical: similares características a los dos anteriores. No encapsulado. No necrosis.  
Intestino grueso: neurofibroma de pared intestinal.

**Imunohistoquímica**

Tumor maxilar derecho: VIM +++/50%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE +++/ <25%; NF -; EMA -.

Tumor dorsal: VIM +++/75%; S-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/25%; NF +++/ <25%; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinomas malignos dorsal, cadera derecha (dependiente de raíces lumbares y sacras) y perivesical (dependiente de raíces sacras).  
Neurofibromas de maxilar derecho, mandíbula izquierda y de pared de intestino grueso.  
Ameloblastoma mandibular izquierdo.

**Notas**

Inicio tumoración dorsal 12.2.91.



**Hamster KNU 38H**

**Fecha nacimiento** 6/6/90      **Fecha gonadectomía**      **Fecha sacrificio** 3/7/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**

**Exposición ENU** SI

**Técnicas especiales** SI    BQ    SI    IBQ    SI    TEM 10783 (A,B)    **Cultivo** No    **Citogenética** No

**Hallazgos macroscópicos**

**Abazón derecho:** tumoración subcutánea de 1.5 cm, microide a la sección (n° 6).  
**Región nervial ventral derecha:** tumoración subcutánea de 1 cm, bien delimitada y microide a la sección (n° 5).  
**Región dorsolateral izquierda:** tumoración subcutánea de 4x3 cm, polilobulada, encapsulada, con áreas hemorrágicas y quísticas a la sección (n° 3).  
**Pala anterior izquierda:** tumoración subcutánea de 7x5x4 cm, con múltiples áreas de necrosis y quísticas a la sección (n° 4).  
**Pala posterior izquierda:** tumoración subcutánea de 2.5x1.5 cm, encapsulada, bien delimitada, blanquecino y microide a la sección (n° 1).  
**Cura posterior pared vaginal:** tumoración de 3x2.5 cm, que no se consigue separar de vagina, de consistencia elástica, con áreas microides quísticas y hemorrágicas a la sección. Comprime recto sin infiltrarlo (n° 2).  
**Hepatoesplenomegalia moderada.** Hígado con lesiones quísticas entre 0.5 y 1 cm de contenido seroso.  
**Riñones de tamaño normal y superficie con un pequeño puntado blanquecino bilateral.**

**Hallazgos microscópicos**

**Riñón: áreas nefropáticas.**  
**Tumor abazón derecho:** neoformación encapsulada, con áreas quísticas y áreas de células pequeñas indiferenciadas con mitosis aisladas. No cuerpos tatóiles, ni englobamiento de filares nerviosos. Vacuolas intranucleares.  
**Tumor cervical:** neoformación de estipe basal de carácter benigno que engloba vasos cutáneos.  
**Tumor dorsolateral:** neoformación no encapsulada con áreas sólidas de células pequeñas indiferenciadas con mitosis aisladas y necrosis tumoral. Areas quísticas. Moderado aumento de mastocitos en el estroma.  
**Tumor pala anterior izquierda:** de similares características al anterior, presentando cuerpos tatóiles y vacuolas intranucleares.  
**Tumor pala posterior izquierda:** neoformación no encapsulada que se extiende infiltrando gruesa con fenómenos de trombosis vascular. No mitosis ni necrosis. Infiltrado inflamatorio crónico con mastocitos.  
**Tumor pared vaginal:** neoformación no encapsulada. No infiltración de recto. Areas quísticas. Englobamiento de filares nerviosos. No mitosis ni necrosis. Vacuolas intranucleares. Numerosos mastocitos.

**Imunohistoquímica**

**Tumor pared vaginal:** S-100 +++/50%; HNK -; NSE ++/25%; NF -; EMA -.  
**Tumor dorsolateral:** VIM +++/75%; S-100 ++/50%; NSE ++/75%; NF -; EMA -.  
**Tumor pala anterior izquierda:** HNK -; NSE ++/50%; NF -; EMA -.  
**Tumor cervical:** S-100 ++/75%; NSE +++/50%; EMA -.

**M. electrónica**

**Diagnóstico**  
 Neurofibromas subcutáneos de abazón derecho, cervical derecho, pala posterior izquierda y pared vaginal.  
 Neurofibromas malignos dorsolateral izquierdo y pala anterior izquierda.

**Notas**

**Inicio tumor pala posterior:** 14.3.91. **Inicio tumor pala anterior:** 13.12.90.

**Hamster ENU 39M**

**Fecha nacimiento** 29/3/90      **Fecha gonadectomía** 30/5/90      **Fecha sacrificio** 3/7/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM    10784    Cultivo    No    Citogenética    No

**Hallazgos macroscópicos**

**Cabeza:** lesión pigmentada de 2x2 cm, sobreelevada y ulcerada centralmente.  
**Abazón izquierdo:** tumoración subcutánea de 3x2 cm, encapsulada y mixoide a la sección.  
**Pulmón:** múltiples metástasis bilaterales, nodulares entre 0.1 y 0.2 cm, pigmentadas.  
**Riñón:** polo inferior con nódulo metastático de 0.2 cm.

**Hallazgos microscópicos**

**Riñón:** áreas nefrogénicas. Metástasis por melanoma.  
**Tumor abazón izquierdo:** neoformación encapsulada de estirpe neural con predominio de áreas quísticas. No mitosis ni necrosis.  
**Tumor cabeza:** neoformación constituida por células de hábito epitelial, con focal pigmentación, infiltración epidérmica y áreas fusocelulares.  
**Pulmón:** metástasis por melanoma.

**Inmuno histoquímica**

**Tumor abazón:** VIM ++/75%; NSE ++/ <25%; NF -; EMA-

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Neurofibroma** de abazón izquierdo.  
**Melanoma** maligno con metástasis pulmonares y renales.

**Notas**

Hamster **ENU 40H**

Fecha nacimiento 27/6/90 Fecha gonadectomía 24/8/90 Fecha sacrificio 17/7/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 10820 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región axilar izquierda: tumoración subcutánea de 7x5 cm, que depende de plexo braquial, encapsulada, bien delimitada, presentando a la sección áreas centrales de necrosis y quísticas, junto con áreas más superficiales mixoides. Se observan filetes nerviosos englobados en el tumor.

Hepatomegalia moderada.

Riñones de tamaño y coloración normal con superficie finamente granular.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor axilar: neoformación no encapsulada con áreas de degeneración (necrosis y hemorragia). Englobamiento de filetes nerviosos con hipertrofia de los mismos (patrón plexiforme).

**Imunohistoquímica**

Tumor axilar: VIM ++/50%; S-100 +++/ > 75%; HNK -; NSE ++/ < 25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma axilar izquierdo.

**Notas**

**Hamster ENU 41M**

<b>Fecha nacimiento</b>	9/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	17/7/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>							
<b>Exposición ENU</b>	Sí										
<b>Técnicas especiales</b>	Sí	HQ	Sí	IHQ	Sí	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Región torácica dorsal: Tumorción encapsulada de 3x2 cm, dependiente de últimas raíces torácicas, mixoide a la sección.

Cavidad abdominal: Ascitis hemorrágica (aprox. 10cc).

Retroperitoneo: tumoración de 5x4 cm, dependiente de raíces sacras, bien delimitada, mostrando amplias áreas de necrosis a la sección.

Hígado: quistes hepáticos.

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Hígado: metástasis por neurofibroma maligno.

Tumor torácico: neoformación no encapsulada con predominio de áreas de células indiferenciadas con formación de rosetas. Necrosis tumoral. Actividad mitótica elevada (8-12 mitosis/10 HPF).

Tumor retroperitoneal: neoformación encapsulada que se extiende infiltrando cordón espermático, dependiente de raíces sacras. Predominio de áreas densas celulares con formación de rosetas. Necrosis tumoral. Más de 15 mitosis/10 HPF.

**Imuno histoquímica**

Tumor retroperitoneal: VIM +++/75%; S-100 ++ /75%; HNK -; NSE ++/1%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinoma maligno subcutáneo torácico.

Neurinoma maligno retroperitoneal dependiente de raíces sacras.

Metástasis hepáticas por neurinoma maligno.

**Notas**

**Hamster ENU 42M**

**Fecha nacimiento** 29/3/90      **Fecha gonadectomía** 30/5/90      **Fecha sacrificio** 26/7/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    **HQ**    Sí    **IHQ**    Sí    **TEM**    No    **Cultivo**    No    **Citogenética**    No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal con mal estado general.

Riñones: de superficie pálida y tamaño normal.

Suprarrenal derecha: aumentada de tamaño, 1 cm de diámetro, coloración amarillenta.

Hígado con quistes de contenido seroso entre 0.2 y 0.5 cm.

Intestino: gran dilatación de asas intestinales (intestino delgado y grueso), con área de estenosis de 3cm de longitud en rectosigma.

**Hallazgos microscópicos**

Riñones: áreas nefrogénicas.

Area estenosis intestinal: neoformación de pared intestinal no encapsulada, de límites difusos con englobamiento de filetes nerviosos. Numerosos mastocitos. Estirpe neural. No mitosis ni necrosis.

Suprarrenal derecha: neoformación constituida por células que muestran pleomorfismo celular y nuclear importante y actividad mitótica elevada.

Corazón: calcificación de anillo valvular aórtico.

**Imuno histoquímica**

Tumor pared intestinal: VIM -; S-100 ++/50%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma intestinal (rectosigma).

Carcinoma suprarrenal derecho.

**Notas**

**Hamster ENU 43M**

<b>Fecha nacimiento</b>	30/3/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	7/8/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

Hígado con quistes de contenido seroso.  
Riñones sin lesiones macroscópicas.  
No lesiones tumorales macroscópicas en SNC y SNP.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Quistes hepáticos.

**Notas**



Hamster ENU 44M

Fecha nacimiento 9/6/90 Fecha gonadectomía 17/8/90 Fecha sacrificio 8/8/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Animal con respiración dificultosa.

Región cervical lateral izquierda: tumoración subcutánea de 2x2 cm, encapsulada, que en profundidad desplaza y comprime tráquea sin infiltrarla.

Pulmones: Lóbulo superior pulmón derecho indurado, blanquecino. Varios nódulos blanquecinos aislados entre 0.1 y 0.2 cm en lóbulo medio e inferior. Pulmón izquierdo con aislados nódulos blanquecinos.

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor cervical: neoformación encapsulada con englobamiento de filetes nerviosos. No infiltración traqueal. No necrosis ni mitosis.

Pulmón: bronconeumonía aspirativa.

Suprarrenal: hiperplasia nodular cortical

Riñón: áreas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

Tumor cervical: VIM ++/25%; 8-100 +++/50%; HNK ++/25%; NSE ++/25%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma cervical.  
Bronconeumonía aspirativa.  
Adenoma suprarrenal.

**Notas**



**Hamster ENU 45M**

<b>Fecha nacimiento</b>	9/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	20/8/91						
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>							
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Trigémino intracraneal izquierdo: engrosamiento fusiforme, coloración blanquecina, consistencia elástica.

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor trigémino: neoformación no encapsulada, no mitosis ni necrosis. Predominio de áreas celulares.

**Inmunohistoquímica**

VIM NV; S-100 ++/25%; NSE ++/25%; HNK -; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurofibroma de trigémino intracraneal izquierdo.

**Notas**

Hamster ENU 46H

Fecha nacimiento	30/3/90	Fecha gonadectomía	7/6/90	Fecha sacrificio	22/8/91
Tiempo exposición DEG	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación	
Exposición ENU	SI				

Tóxicos especiales	SI	HQ	SI	HQ	SI	TEM	10878 (A,B)	Cultivo	SI	Citogenética	SI
--------------------	----	----	----	----	----	-----	-------------	---------	----	--------------	----

Hallazgos macroscópicos

Región supratilar: lesión cutánea pigmentada, sobrelevada y centralmente ulcerada de 2x1 cm (n° 3).  
Región cervical anterior: tumoración subcutánea de 3x2,5 cm, que surge de una rama mandibular de trigémino izquierdo, extendiéndose hacia trócleas englobándolo pero sin infiltrarlo macroscópicamente. Moleable y hemorrágico a la sección (n° 2).  
Pata anterior izquierda: tumoración subcutánea encapsulada de 4x3 cm, blanda y móvil a la sección, observándose filares nerviosos englobados en la tumoración (n° 1).  
Suprarrenal izquierda: ocupada en su totalidad por tumoración de 2,5 cm de diámetro, deslazado y comprimido polo superior renal sin infiltrarlo, mostrando a la sección una coloración blanquecina con focos hemorrágicos.  
Riñones de superficie firmemente granulosa y coloración pálida.  
Hepatomegalia moderada.  
Adenomegalias cerebrales (entre 0,5 y 1 cm).

Hallazgos microscópicos

Riñón: áreas nefropélicas. Microcalcificaciones. No infiltración por tumor suprarrenal.

Tumor pigmentado: melanoma maligno ulcerado.

Tumor cervical: neoformación no encapsulada de estirpe neural con englobamiento de filares nerviosos, infiltración de músculo estriado y toda tráquea sin infiltrarla. Fenómenos de trombos vascular.

Tumor pata anterior: neoformación no encapsulada con englobamiento de filares nerviosos, infiltración de músculo estriado y grasa. Varulac intravacuolares. Mastocitos numerosos.

Suprarrenal: carcinoma con metástasis en adenopatía hilar renal.

Examen histogénico

Tumor pata anterior: VIM ++/50%, S-100 ++/>75%, HNK -,NSE ++/<25%.

M. electrónicas

Cultivo celular

Crecimiento en placas o grupos tridimensionales de células epiteliales con vacuolas y granuleciones citoplásmicas.

Diagnóstico

Melanoma maligno supratilar.  
Neurofibromas de pata anterior izquierda y cervical anterior.  
Carcinoma de suprarrenal izquierda con metástasis en ganglio hilar renal.

Notas

Hamster ENU 47H

Fecha nacimiento 6/6/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 23/8/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ No TEM 10881 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región mandibular derecha: tumoración subcutánea de 4x3 cm, no encapsulada, con áreas hemorrágicas y quísticas a la sección.  
Trigémino intracraneal derecho: tumoración bien delimitada de 0.3x0.2 cm, provocando compresión de base de cerebro.  
Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular. Nefropatía crónica.  
Tumor mandibular: neoformación no encapsulada con áreas fusocelulares con disposición focal en empalizada y formación de rosetas. Áreas indiferenciadas con células multinucleadas que se disponen predominantemente alrededor de los espacios quísticos. Actividad mitótica elevada.  
Lengua: neoformación no encapsulada de estirpe neural en el seno de músculo lingual. No mitosis ni necrosis.  
Suprarrenal: hiperplasia cortical nodular.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinoma maligno mandibular derecho.  
Newofibroma lingual.  
Adenoma suprarrenal.

**Notas**

## Hamster ENU 48H

Fecha nacimiento	6/6/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	26/8/91						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Retroperitoneo: tumoración bien delimitada de 6x6x4 cm, que desplaza riñones rodeándolos sin infiltrarlos. A la sección muestra áreas mucoides y quísticas.

Riñones sin lesiones.

### Hallazgos microscópicos

Riñón: áreas nefrogénicas. Displasia tubular.

Tumor retroperitoneal: neoformación no encapsulada con áreas quísticas y de células pequeñas indiferenciadas con actividad mitótica elevada (6-8 mitosis/10 HPF). Necrosis tumoral extensa.

### Inmunohistoquímica

VIM ++/75%; S-100 ++/50%; HNK -; NSE ++/1%; NF -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurinoma maligno retroperitoneal.

### Notas

**Hamster ENU 49M**

<b>Fecha nacimiento</b>	27/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	26/8/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas evidentes.

**Hallazgos microscópicos**

No lesiones histopatológicas reseñables.

Riñón: áreas nefrogénicas.

**Imunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 50M**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 27/8/90      **Fecha sacrificio** 9/9/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM 10905 (A,B)    Cultivo No    Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región dorsal izquierda: tumoración subcutánea de 9x5 cm, dependiente de últimas raíces torácicas y primeras lumbares, polinodular, encapsulado, con áreas de necrosis y quísticas de contenido hemático.

Hepatoesplenomegalia moderada.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor dorsal: neoformación no encapsulada mostrando fenómenos de trombosis, hemorragia y necrosis tumoral. Englobamiento de filetes nerviosos. Abundantes mastocitos. Formación de rosetas. Actividad mitótica elevada (4-6 mitosis/10 HPF).

**Imunohistoquímica**

VIM ++/50%; 8-100 ++/75%; HNK -; NSE ++/25%; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newinoma maligno subcutáneo dorsal.

**Notas**



**Hamster ENU 51H**

Fecha nacimiento 30/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 11/9/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Nódulo subcutáneo torácico ventral de 1 cm de diámetro máximo, bien delimitado, de consistencia elástica y de coloración blanquecina.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumoración subcutánea: no encapsulada, con presencia de numerosos mastocitos en el estroma, constituida por células redondas o elongadas con prolongaciones citoplásmicas y abundante sustancia mixoide intercelular, englobando pequeños filetes nerviosos. No necrosis tumoral ni mitosis.

**Ian uohistoquímica**

Tumoración subcutánea: VIM ++/75%; S-100 +/50%; HNK -; NSE ++/<25% (citoplásmico granular); NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newofibroma.

**Notas**



**Hamster ENU 52H**

<b>Fecha nacimiento</b>	30/3/90	<b>Fecha gonadectomía</b>	7/6/90	<b>Fecha sacrificio</b>	14/10/91
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>	
<b>Exposición ENU</b>	Si				
<b>Técnicas especiales</b>	No	<b>HQ</b>	<b>TEM</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Citogenética</b>

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas evidentes.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

Hamster ENU 53H

Fecha nacimiento 30/3/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 3/11/91  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM No Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Abazón derecho: tumoración encapsulada de 4x3 cm, a la sección quística y hemorrágica.

Plexo braquial derecho: tumoración subcutánea dependiente de plexo braquial de 3x2 cm, adherida a escápula derecha, coloración blanquecina, a la sección con áreas hemorrágicas.

Adenomegalias cervicales.

Hepatoesplenomegalia. Hígado con quistes múltiples de contenido seroso. Bazo con dos nódulos blanquecinos indurados de 0.5 y 1 cm, con áreas hemorrágicas.

Riñones: superficie pálida finamente granular.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Nefropatía crónica. Microcalcificaciones.

Tumor abazón: neoformación no encapsulada con extensa necrosis, áreas quísticas y fusocelulares junto con áreas de células anaplásicas de núcleos lobulados o bien mostrando multinucleación. Formación de rosetas. Actividad mitótica elevada (> 10 mitosis/10 HPF). Metástasis ganglionar.

Tumor plexo braquial: similar al anterior pero con mayor diferenciación y menor actividad mitótica.

Pulmón: neoformación constituida por hendiduras vasculares rodeadas por células de hábito epitelial o fusiformes. No actividad mitótica ni necrosis.

Bazo: infartos esplénicos.

**Inmunohistoquímica**

Tumor abazón: VIM +++/75%; S-100 +++/50%; HNK -; NSE ++/50%; EMA -; NF-.

Tumor plexo braquial: VIM +++/50%; S-100 +++/50%; HNK ++/5%; NSE +++/5%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinomas malignos de abazón derecho y plexo braquial derecho. Metástasis linfática.

Hemangiopericitoma pulmonar.

Infarto esplénico.

**Notas**

**Hamster ENU 54H**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/8/90      **Fecha sacrificio** 31/12/91  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    Sí    TEM 11117(A,B)    Cultivo No    Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Cavidad abdominal: tumoración peritoneal de 7x6 cm, quística y hemorrágica a la sección, englobando asas intestinales.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor abdominal: neoformación no encapsulada que infiltra pared abdominal, con áreas quísticas, mixoides, de aspecto glial y densas celulares indiferenciadas. Fenómenos de trombosis vascular. Actividad mitótica elevada.

**Imunohistoquímica**

VIM +++/50%; S-100 +++/50%; HNK +++/>25%; NSE ++/25%; EMA -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinoma maligno intestinal.

**Notas**

Hamster ENU 55M

Fecha nacimiento 9/6/90 Fecha gonadectomía Fecha sacrificio 7/1/92  
Tiempo exposición DES No Inicio intoxicación Final intoxicación  
Exposición ENU Sí  
Técnicas especiales Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 11120 Cultivo No Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región cervical ventral: tumoración subcutánea de 4x5 cm, bien delimitada, mostrando a la sección áreas sólidas blanquecinas, áreas quísticas y necrosis.

Mesenterio: tumoración no encapsulada de 1 cm de diámetro, blanquecina e indurada.

Atrofia testicular.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor cervical: neoformación no encapsulada con áreas sarcomatosas y epitelioideas, vacuolas intranucleares y áreas de necrosis y hemorragias. Actividad mitótica elevada (> 10 mitosis/ 10 HPF).

Suprarrenal: hiperplasia nodular cortical.

Atrofia testicular.

**Inmunohistoquímica**

Tumor cervical: VIM +++(75%); 8-100 +(50%); HNK -; NSE ++(<25%); EMA -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinoma maligno cervical.

Adenoma suprarrenal.

Atrofia testicular.

**Notas**

## Hamster ENU 56M

Fecha nacimiento	27/6/90	Fecha gonadectomía	27/8/90	Fecha sacrificio	7/1/92						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	11121	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Región trigeminal maxilar y mandibular: doble tumoración subcutánea bilateral, la derecha de 4x3 cm con áreas microquísticas, hemorrágicas, con predominio de áreas blanquecinas mixoides (n° 1). Tumoración izquierda de 3x2 cm, bien delimitada, blanquecina y mixoide a la sección (n° 2).

Pata posterior izquierda: tumoración subcutánea de 4x2 cm, que engloba nervio ciático con áreas microquísticas y hemorrágicas (n° 3).

Riñones sin lesiones.

### Hallazgos microscópicos

Tumor maxilar: neoformación no encapsulada, con áreas fusocelulares y epitelioides junto con áreas quísticas y mixoides. Actividad mitótica elevada (< 10 mitosis/10 HPF).

Tumor mandibular (n° 2): neoformación no encapsulada con englobamiento de filetes nerviosos, con predominio de áreas celulares mixoides y mostrando vacuolas intranucleares. Mastocitos numerosos. Diferenciación ganglionar.

Tumor pata posterior: neoformación encapsulada, con áreas celulares epitelioides, mixoides y quísticas. Necrosis tumoral. 4-5 mitosis/10 HPF.

### Inmunohistoquímica

Tumor maxilar: VIM +++/25%; S-100 NV; HNK -; NSE ++/<25%; EMA -; NF -.

Tumor mandibular: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE ++/<25%; NF -; EMA -.

Tumor pata posterior: VIM +++/75%; S-100 +++/50%; HNK ++/25%; NSE ++/25%; NF -; EMA -.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Newinoma maligno maxilar derecho.

Ganglionewofibroma mandibular izquierdo.

Newinoma maligno pata posterior izquierda.

### Notas

Inicio tumor morro: 24.1.91.

**Hamster ENU 57M**

**Fecha nacimiento** 30/3/90      **Fecha gonadectomía**      **Fecha sacrificio** 14/1/92  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí    HQ    Sí    IHQ    No    TEM 11135 (A,B)    Cultivo No    Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región dorsal derecha: lesión cutánea pigmentada y sobreelevada de 3x2 cm, mostrando un nódulo satélite a 0.5 cm de este de 1 cm de diámetro pigmentado y sobreelevado.

Pulmones: múltiples metástasis nodulares bilaterales pigmentadas entre 0.1 y 0.2 cm.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor dorsal: neoformación constituida por células de hábito epitelial con patrón de crecimiento sólido y focalmente pigmentadas. Actividad mitótica elevada. Metástasis pulmonares bilaterales.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Melanoma maligno dorsal con metástasis pulmonares múltiples.

**Notas**



**Hamster ENU 58M**

<b>Fecha nacimiento</b>	9/6/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	14/1/92						
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>							
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	11136	Cultivo	Si	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Región cervical ventral: tumoración subcutánea de 5x4 cm, dependiente de ramas nerviosas submandibulares, mostrando a la sección un predominio de áreas mixoides.

Región sacra anterior: tumoración de 2x1 cm, dependiente de raíces sacras, polilobulada, que engloba 1/3 inferior de uréteres, blanquecino, elástico y mixoide a la sección.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas.

Tumor cervical: neoformación no encapsulada de estirpe neural, mostrando actividad mitótica y necrosis tumoral. Vacuolas intranucleares numerosas.

**Inmunohistoquímica**

Tumor cervical: VIM +++/75%; S-100 ++/50%; HNK ++/5%; NSE ++/25%; EMA -; NF -.

**M. electrónica**

Matriz extracelular abundante. Polimorfismo celular y nuclear. Células multinucleadas. Núcleos irregulares con escotaduras. Vacuolas citoplásmicas intranucleares. Largos procesos citoplásmicos finos y anchos. Membrana basal distinguible. Abundantes organelas citoplásmicas perinucleares. Gránulos neurosecretorios.

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Neurinoma maligno cervical.

**Notas**



**Hamster ENU 59H**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/8/90      **Fecha sacrificio** 14/1/92

**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**

**Exposición ENU** Sí

**Técnicas especiales** Sí    **HQ**    Sí    **IHQ**    No    **TEM** 11137 (A,B)    **Cultivo** No    **Citogenética** No

**Hallazgos macroscópicos**

No lesiones macroscópicas.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Nefropatía crónica.

**Inmunohistoquímica**

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

**Notas**

**Hamster ENU 60H**

**Fecha nacimiento** 27/6/90      **Fecha gonadectomía** 24/8/90      **Fecha sacrificio** 16/1/92  
**Tiempo exposición DES** No      **Inicio intoxicación**      **Final intoxicación**  
**Exposición ENU** Sí  
**Técnicas especiales** Sí HQ Sí IHQ Sí TEM 11141 (A,B) Cultivo Sí Citogenética No

**Hallazgos macroscópicos**

Región torácica ventral: tumoración de 3x3 cm, dependiente de raíces intercostales, blanquecino y mixoide a la sección.

Hocico derecho: tumoración de 1 cm de diámetro de coloración blanquecina y consistencia elástica.

Riñones sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Riñón: áreas nefrogénicas. Nefropatía crónica.

Tumor región torácica: neoformación no encapsulada, englobamiento de filetes nerviosos, infiltración de músculo estriado, no necrosis ni mitosis. Pequeño foco de células indiferenciadas.

Tumor hocico: similares características al anterior.

**Inmunoistoquímica**

Tumor torácico: VIM +++/25%; S-100 +++/50%; HNK -; NSE ++/<25%; EMA -; NF -.

Tumor hocico: VIM +++/75%; S-100 +++/75%; HNK -; NSE ++/>75%; NF -; EMA -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

Doble población celular, una constituida por células de pequeño tamaño, escaso citoplasma con prolongaciones finas constituyendo una malla, y otra de células de mayor tamaño y amplio citoplasma de aspecto fibroblástico.

**Diagnóstico**

Newofibromas torácico y de hocico.

**Notas**

**Hamster ENU 61M**

<b>Fecha nacimiento</b>	30/3/90	<b>Fecha gonadectomía</b>		<b>Fecha sacrificio</b>	12/5/92						
<b>Tiempo exposición DES</b>	No	<b>Inicio intoxicación</b>		<b>Final intoxicación</b>							
<b>Exposición ENU</b>	Si										
<b>Técnicas especiales</b>	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

**Hallazgos macroscópicos**

Mediastino posterior: tumoración de 2x1 cm, bien delimitada, dependiente de raíces torácicas, base de implantación ancha, blanquecino, de consistencia elástica..

Riñón sin lesiones.

**Hallazgos microscópicos**

Tumor mediastino: neoformación no encapsulada con predominio de áreas mixoides. No mitosis ni necrosis.

Pulmón: adenoma periférico tubuloacinar.

**Inmunohistoquímica**

Tumor mediastino: VIM -; S-100 +/<5%; HNK -; NSE +/<5%; EMA -; NF -.

**M. electrónica**

**Cultivo celular**

**Diagnóstico**

Newofibroma mediastínico posterior.

Adenoma periférico tubuloacinar pulmonar.

**Notas**

## Hamster ENU 62M

Fecha nacimiento	9/6/90	Fecha gonadectomía		Fecha sacrificio	12/5/92						
Tiempo exposición DES	No	Inicio intoxicación		Final intoxicación							
Exposición ENU	Si										
Técnicas especiales	Si	HQ	Si	IHQ	Si	TEM	No	Cultivo	No	Citogenética	No

### Hallazgos macroscópicos

Región dorsal: tumoración subcutánea de 4x3 cm, dependiente de últimas raíces dorsales, polilobulado, a la sección con áreas quísticas de contenido hemático.

Región presaca: Tumoración de 2X1.5 cm, bien delimitada, con predominio de áreas quísticas de contenido hemático a la sección.

Riñón derecho: quistes corticales entre 0.2 y 0.4 cm de contenido seroso.

Hígado con varias formaciones quísticas subcapsulada.

### Hallazgos microscópicos

Tumor dorsal: neoformación no encapsulada con englobamiento de filletes nerviosos e infiltración de músculo estriado. Presencia de áreas de células pequeñas indiferenciadas con alta actividad mitótica (> 10 mitosis/10 HPF). Áreas quísticas.

Tumor sacro: neoformación no encapsulada con áreas mixoides y quísticas y presencia de cuerpos tactoides. No mitosis ni necrosis.

Pulmón: edenoma acinar.

### Inmunohistoquímica

Tumor sacro: VIM ++/ <25%; S-100 ++/ <5%; HNK -; NSE -; EMA -; NF -.

Tumor dorsal: VIM -; S-100 -; HNK -; NSE NV; NF -; EMA-.

### M. electrónica

### Cultivo celular

### Diagnóstico

Neurinoma maligno dorsal.

Neurofibroma sacro.

Adenoma acinar pulmonar.

### Notas