

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Patología Animal II**  
**(Patología y Clínica Médico-Quirúrgica)**



**ESTUDIO BIOLÓGICO, HISTOLÓGICO,  
INMUNOHISTOQUÍMICO DE TUMORES DE LA  
GLÁNDULA DE ZYMBAL INDUCIDOS CON DMBA EN  
RATAS SPRAGUE-DAELEY**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María de la Merced Gómez García**

Bajo la dirección de los doctores

**Laura Peña Fernández  
Fernando Val Bernal**

**Madrid, 2002**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO BIOLÓGICO, HISTOLÓGICO E  
INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS TUMORES DE LA  
GLANDULA DE ZYMBAL INDUCIDOS CON DMBA EN  
RATAS SPRAGUE-DAWLEY.**

**M<sup>a</sup> de la MERCED GOMEZ GARCIA**

**MADRID 1994**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL II**  
**UNIDAD DE HISTOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA**

**ESTUDIO BIOLÓGICO, HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO**  
**DE LOS TUMORES DE LA GLANDULA DE ZYMBAL INDUCIDOS CON**  
**DMBA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY.**

**DIRECTORES: LAURA PEÑA FERNANDEZ**

Profesor titular de Patología Animal.  
(Unidad de Histología y Anatomía Patológica).  
Dpto Patología Animal II.

**FERNANDO VAL BERNAL**

Catedrático de Anatomía Patológica.  
Dpto Ciencias Médicas y Quirúrgicas.  
Facultad de Medicina.  
Universidad de Cantabria.

**D<sup>a</sup> LAURA PEÑA FERNANDEZ**, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, y **D. FERNANDO VAL BERNAL**, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Cantabria

**CERTIFICAN:**

que la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO BIOLÓGICO, HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS TUMORES DE LA GLANDULA DE ZYMBAL INDUCIDOS CON DMBA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> de la MERCED GÓMEZ GARCIA, se ha realizado en la Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid y en la Unidad Docente de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, bajo nuestra dirección.

Madrid a 21 de septiembre de 1994.

Laura Peña Fernández

Fernando Val Bernal

*A mis padres*

*A Pablo*

*A Pablete*

# **AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Peña y al Dr. Val Bernal, por su incansable labor científica y constante apoyo y estímulo en esta Tesis Doctoral.

A María y Manolo, porque gracias a ellos comencé mi andadura como profesor en la facultad, que era lo que yo quería en aquel momento y por todas las enseñanzas y buenos consejos que he recibido a lo largo de estos años.

A Nani, que fué la pionera en el estudio de los tumores inducidos en los animales de experimentación, siendo un ejemplo, por el rigor científico y la calidad demostrada en todos sus trabajos de investigación.

A Nines y Antonio, no sólo compañeros, sino amigos, que dedicaron muchas horas de su vida a este trabajo y tuvieron mucha paciencia conmigo y con las ratas.

A Luis Buelta, otro buen compañero que se ha pasado largas horas en el ordenador para que este trabajo pudiera salir adelante, colaborando directamente en la estadística y en los gráficos que acompañan a esta Tesis Doctoral .

A Fidel y Marisa, porque cada uno de ellos me ha prestado un poco de su tiempo, sobre todo en lo referente a la revisión bibliográfica.

A la Dra. Maria Luisa de Vicente por su cooperación en la inducción química de las ratas.

A Pedro, que con su buen hacer ha realizado unos cortes histológicos perfectos y por su infinita paciencia.

A Montse y Flor, que me han ayudado con las técnicas de laboratorio, por sus consejos y su dedicación.

Al resto de compañeros del dpto. de Anatomía Patológica de Valdecilla porque han sido todos encantadores.

A todos los compañeros del dpto. de Patología Animal II, porque todos y sin excepción, me han ayudado en lo posible y porque al vivir fuera, han hecho que mis estancias en Madrid sean de lo más agradable.

A Ana Rodriguez, por su buen inglés y su buena voluntad.

A mis padres y mis hermanos que me prestaron su ayuda en el momento oportuno para que pudiera terminar este trabajo.

A Pablo porque sin su apoyo y sin su comprensión jamás hubiera concluído esta tesis.

A Yako, aunque ausente, porque ha sido siempre un ejemplo a seguir, por su dedicación en el trabajo y por su calidad humana.

# **INDICE**

## INDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	1
<b>II.- REVISION BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
II.1.- TUMORES GLÁNDULA DE ZYMBAL (T.G.Z.) .....	6
II.1.1.- LOCALIZACIÓN Y DENOMINACIÓN .....	6
II.1.2.- ETIOPATOGENIA .....	8
II.1.3.- ASPECTO MACROSCÓPICO .....	14
II.1.4.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA .....	14
II.2.- TÉCNICAS ESPECIALES .....	19
II.2.1.- CITOQUERATINAS .....	19
II.2.2.- LECTINAS .....	34
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	47
III.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	48
III.2.- INDUCCIÓN TUMORAL .....	48
III.3.- GRUPO DE ANIMALES .....	49
III.4.- CONTROLES REALIZADOS .....	50
III.5.- SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES .....	51
III.6.- ESTUDIO HISTOLÓGICO .....	52
III.6.1.- TOMA DE MUESTRAS .....	52
III.6.2.- FIJACIÓN .....	52
III.6.3.- INCLUSIÓN .....	53
III.6.4.- OBTENCIÓN DE CORTES .....	53
III.6.5.- MÉTODOS DE TINCIÓN .....	54
III.6.5.1.- TÉCNICAS HABITUALES .....	54
III.6.5.2.- TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS .....	54
III.6.5.3.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS .....	55
III.6.6.- ICONOGRAFÍA .....	58
III.6.7.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	58

<b>IV.- RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
IV.1.- INDUCCIÓN TUMORAL .....	61
IV.1.1.- TUMORES MAMARIOS .....	61
IV.1.2.- TUMORES DE LA GLÁNDULA DE ZYMBAL .....	62
IV.2.- ESTUDIO BIOLÓGICO .....	63
IV.2.1.- ESTADO GENERAL .....	63
IV.2.2.- PESO DE LOS ANIMALES .....	64
IV.2.3.- SUPERVIVENCIA: .....	65
IV.2.3.1.- Supervivencia global .....	65
IV.2.3.1.- Supervivencia en animales sin T.G.Z. ....	67
IV.2.3.3.- Supervivencia en animales con T.G.Z. ....	67
IV.3.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS .....	68
IV.3.1.- NECROPSIAS .....	68
IV.3.1.1.- En animales sin T.G.Z. ....	68
IV.3.1.2.- En animales con T.G.Z. ....	69
IV.3.2.- TUMORES DE MAMA .....	71
IV.3.2.1.- Localización y número .....	71
IV.3.2.2.- Estudio macroscópico .....	71
IV.3.2.3.- Estudio Histopatológico .....	72
IV.3.3.- TUMORES DE LA GLÁNDULA DE ZYMBAL .....	76
IV.3.3.1.- Localización y número .....	76
IV.3.3.2.- Estudio macroscópico .....	76
IV.3.3.3.- Volumen tumoral .....	77
IV.3.3.4.- Estudio histopatológico .....	78
IV.3.3.5.- Técnicas histoquímicas .....	84
IV.3.3.6.- Técnicas inmunohistoquímicas .....	89
<b>V.- TABLAS E ICONOGRAFÍA</b> .....	<b>93</b>
<b>VI.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>134</b>
<b>VII.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>151</b>
<b>VIII.- RESUMEN</b> .....	<b>155</b>
<b>IX.- SUMMARY</b> .....	<b>157</b>
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>159</b>

# **I.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral continúa con la línea de investigación que sobre Oncología Experimental se viene desarrollando en el Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Cuenta además con la experiencia diagnóstica e investigadora del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Cantabria. Es por tanto, fruto de años de trabajo de otros investigadores que con su esfuerzo han facilitado el camino para los que en estos momentos iniciamos nuestra andadura.

En este trabajo hemos elegido un modelo experimental de oncogénesis química en rata Sprague-Dawley mediante el carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). Dicho carcinógeno ha sido utilizado por numerosos autores para provocar distintas neoplasias, entre ellas, tumores de mama (Peña, 1989), parte proximal del estómago revestida de epitelio escamoso y conducto auditivo externo (Hirose y col., 1988).

El DMBA es un carcinógeno químico de síntesis del grupo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, cuya administración a ratas Sprague-Dawley provoca, por vía intragástrica, la aparición de tumores de mama y tumores de la glándula de Zymbal (T.G.Z.). Posee, desde un punto de vista práctico, grandes ventajas, como son su administración en una única dosis y la rapidez de inducción tumoral (Huggins y col., 1961). Por otra parte, la facilidad de manejo de la rata Sprague-Dawley es, sin lugar a dudas, un factor más a tener en cuenta en la elección del modelo neoplásico.

Los tumores objeto de nuestro estudio, son tumores que asientan en una glándula sebácea existente únicamente en el conducto auditivo externo de la rata y de algunos roedores (Zymbal, 1933; Skoryna y col., 1951) y que sirven de modelo experimental para el estudio de tumores de glándulas sebáceas de la piel humana (Pliss, 1987) y posiblemente de la especie canina.

Diversos autores han realizado algunos trabajos para intentar estudiar el origen y la patogenia de estos tumores. Así, Spitz y col., (1950) señalan la dificultad de identificar su origen debido al eclipsamiento de los elementos del tumor por la intensa queratinización que se produce. Skoryna (1951), afirma que los tumores de la glándula de Zymbal surgen indudablemente como resultado de la administración de un carcinógeno químico, pero siempre que existan unas lesiones degenerativas tisulares provocadas por un éstasis de la secreción o bien por otitis medias. Schardein (1966), opina por el contrario, que las lesiones previas como el éstasis, inflamación u obstrucción no están asociadas con los tumores si no que son producto de dilataciones quísticas producidas por la edad, y potenciadas por un carcinógeno químico. Así mismo, los T.G.Z. también pueden aparecer sin ser inducidos químicamente. En 1986, Gopinath encontró, realizando un estudio de tumores espontáneos de cerebro en ratas Sprague-Dawley, la aparición de tumores espontáneos en la glándula de Zymbal.

Por otra parte el conocimiento que existe en la actualidad sobre el aspecto histológico de los tumores de la glándula de Zymbal es muy escaso. La mayoría de los trabajos en los que se menciona su aparición se limitan a señalar su presencia sin añadir más información al respecto. Únicamente Pliss en 1987 (en un trabajo para la O.M.S.), Mohr y col. (1990) y Mohr (1993) han realizado clasificaciones histológicas de estas neoplasias, lo que en nuestra

opinión resulta insuficiente. Además, no existen tampoco referencias sobre cuales son sus propiedades histoquímicas o su caracterización inmunohistoquímica.

Habida cuenta de la escasez de información que se tiene de los tumores de la glándula de Zymbal (T.G.Z.), nos planteamos este trabajo y nos propusimos alcanzar los siguientes **objetivos**:

- 1.- Realizar un estudio biológico de los tumores de la glándula de Zymbal, tras la administración intragástrica del carcinógeno DMBA a ratas Sprague-Dawley, considerando la posible relación con los tumores de mama aparecidos.
- 2.- Llevar a cabo el estudio histológico de estos tumores con microscopía óptica.
- 3.- En los animales no portadores de T.G.Z., hacer un estudio histológico completo con M/O del conducto auditivo externo, con el fin de detectar posibles cambios pretumorales y estadios iniciales no visibles macroscópicamente.
- 4.- Estudiar las propiedades histoquímicas de los T.G.Z. con técnicas histoquímicas tradicionales y mediante el uso de lectinas.
- 5.- Caracterizar los T.G.Z. desde el punto de vista inmunohistoquímico con anticuerpos anti-citoqueratinas.

## **II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **II.1.- TUMORES DE LA GLÁNDULA DE ZYMBAL**

### **II.1.1.- LOCALIZACIÓN Y DENOMINACIÓN**

En el conducto auditivo externo de las ratas existe una gran glándula sebácea, que fué descrita original e independientemente por Zymbal y Zawisch-Ossenitz en 1933. Es una glándula especial, que solo poseen roedores e insectívoros (Skoryna y col., 1951) a diferencia de la especie humana y del resto de los animales, cuyo conducto auditivo externo, presenta además de las glándulas sebáceas adyacentes a los folículos pilosos, unas glándulas sudoríparas modificadas que se denominan glándulas ceruminosas (Batsakis y col., 1967).

En el conducto auditivo externo de la rata Zawisch-Ossenitz (1933) describió 13 grupos de glándulas sebáceas, mientras que Zymbal (1933) observó solamente tres. En la actualidad se acepta que existen 3 grupos de glándulas sebáceas (Pliss, 1987). En el primer y el segundo grupo se incluyen glándulas sebáceas localizadas en la pared anterior y posterior del canal acústico que están en el tejido conjuntivo que subyace del epitelio escamoso de revestimiento. Las glándulas sebáceas de la pared anterior son más numerosas, grandes y lobuladas que las de la pared posterior, que suelen ser pequeñas y solitarias. El tercer grupo está representado por una única glándula sebácea grande que es normalmente el origen de los tumores objeto de nuestro estudio. Esta glándula localizada anteriormente y por debajo del oído medio, es triangular, de color amarillo rosáceo y de unos 3 a 5 mm de diámetro y unos 7-8 mg de peso. Hace prominencia dentro del canal acústico externo, estando situada entre él y la mandíbula inferior (Pliss, 1987).

Schardein y col. (1966) denominaron al primer y segundo grupos de glándulas como "glándulas sebáceas del canal anterior y posterior", mientras que a la glándula principal se le dió el nombre de "glándula del canal auditivo". Esta última glándula fue descrita como un grupo de cuatro lóbulos cada uno de ellos con un conducto excretor menor (conducto intralobular) que confluyen en un conducto principal secretor.

La importancia de dicha glándula radica en que es origen de tumores espontáneos e inducidos en distintas experiencias con carcinógenos químicos (DMBA, TACP, 2-AAF...), experiencias que inicialmente son para el estudio de tumores mamarios en ratas o para evaluar el poder carcinógeno de estos productos químicos. En dichos trabajos se observó la aparición de neoplasias auriculares casi por casualidad, ya que solamente aparecen en aquellas experiencias que duran bastantes meses (Skoryna y col., 1951; Schardein y col., 1966; Pliss, 1978; Kato y col., 1989).

Para nombrar a estos tumores se han empleado los siguientes términos: tumores del canal acústico glandular (Schardein y col., 1966), del conducto acústico externo (Bielchowsky, 1944), del conducto auditivo (Hirose y col., 1988) y tumores del lado de la cabeza, o simplemente, tumores de cabeza (Skoryna, 1951). La denominación más actual y la elegida por nosotros es la de tumores de la glándula de Zymbal (Kato y col., 1989; Mohr y col., 1990), que abreviamos como tumores de Zymbal o T.G.Z.

### **II.1.2.- ETIOPATOGENIA**

El proceso por el cual aparecen los T.G.Z. está aun por señalar de forma definitiva y su origen ha sido oscuro hasta hace pocos años. Ya que Cox y col. (1947), utilizando como carcinógeno el 2-Acetaminofluorano (2-AAF) se plantearon el origen de estos tumores que para ellos estaba en una estructura accesoria sin determinar más que al propio canal auditivo.

Uno de los factores que explica la dificultad del análisis histológico de los T.G.Z. es la intensa queratinización (Spitz y col., 1950), tanto es así que estos autores no se consideran capaces de encontrar el origen de los tumores debido precisamente al eclipsamiento de los elementos del tumor por las masas de queratina.

Skoryna (1951) realizó un experimento con ratas macho y hembra, a las que administró el 2-AAF, apareciendo T.G.Z. en 43 hembras y 29 machos que fueron diagnosticados como carcinomas de glándulas sebáceas. Estos investigadores opinan que los tumores surgen indudablemente de la administración del carcinógeno porque no encontraron tumores espontáneos en esta localización. Sin embargo, señala que la administración del carcinógeno no es suficiente para producir tumores en una glándula sebácea normal, sino que como requisito debe existir alguna lesión degenerativa previa que ocurre independientemente a la administración del carcinógeno. Como alteraciones previas se señalan la dilatación quística glandular resultante de un éstasis en la secreción y la otitis media. Esta última afirmación la desmienten Laws y col., (1955) indicando que solamente interviene el carcinógeno y que ni los cambios quísticos ni la otitis media son necesarios para el posterior desarrollo

neoplásico.

Sin embargo, Tannembaum (1962) y Snell (1965) observaron la presencia de T.G.Z. espontáneos. En el primer caso, 3 ratas del total (105) de 800 días de edad presentaron carcinoma de glándulas sebáceas. En la experiencia de Snell, las ratas que tuvieron carcinomas de células escamosas, contaban aproximadamente 21 meses de edad. La edad parece ser un factor determinante en la aparición de T.G.Z. espontáneos. Así Schardein y col. (1966) solamente empezaron a observar adenomas quísticos del canal auditivo en los grupos de ratas control a partir de los 420 días de edad. Estos autores creen que la inflamación no está relacionada con los tumores. Sugieren que las dilataciones quísticas glandulares que aparecen con la edad contribuyen a la formación del tumor y a su desarrollo; dichos cambios se acentuarían con la administración del carcinógeno, en este caso TACP [Tris (p-aminofenil) carbonio pamoato].

En otras especies, como el perro y el gato, también se sabe que los tumores de glándulas sebáceas de la piel afectan a animales de edad avanzada (Müller y col., 1989).

Gruenstein y col. (1966) realizaron otra experiencia con ratas a las que administraron 3-metilclorantreno (3-MC) vía intragástrica. De 81 ratas macho, obtuvieron 4 tumores de glándulas sebáceas, tres de ellos en la glándula de Zymbal y de 122 hembras, solamente una de ellas desarrolló un carcinoma de glándulas sebáceas en la glándula de Zymbal. De estos resultados dedujeron que los T.G.Z. se inducen en las ratas cuando el carcinógeno es introducido por vía gastrointestinal.

Mediante estudios realizados sobre lipogénesis sebácea en piel humana, (Cooper y col., 1976; Coterill y col., 1972), se sabe que existe una relación entre la edad y la lipogénesis sebácea.

Conviene señalar un exhaustivo estudio realizado por Bode y col. (1985) en el que se estudia la incidencia de tumores espontáneos en ratas en un período de 10 años. Para estos autores el incremento en la incidencia de tumores espontáneos es correlativo al incremento gradual en el peso corporal y al consumo de comida. En este estudio las ratas macho desarrollaron menos tumores que las hembras. Sin embargo, fueron los machos los que desarrollaron más tumores de piel y apéndices epidérmicos.

En los últimos años, la participación de distintos carcinógenos químicos en el desarrollo de los T.G.Z. se ha visto confirmada. Hilpert y col. (1985) afirman que las glándulas sebáceas, especialmente la glándula de Zymbal de las ratas, es un órgano diana para un potente carcinógeno como el Trans-4-acetilaminoestilbeno. Ese mismo año, Likhachev y col. descubren también tumores de glándula de Zymbal en ratas tratadas con 1,2 dimetilhidracina (DMH) y beta glucuronidasa, llegando a la conclusión de que los tumores son debidos a los efectos carcinógenos del DMH ejercidos mediante la formación de conjugados estables de sus metabolitos y su liberación enzimática en tejidos diana. También en 1985, Maltoni y col., estudiando experimentalmente la carcinogenicidad del benceno, demostraron que tanto por ingestión como por inhalación, es un potente carcinógeno, produciendo gran variedad de tumores en ratas entre los que se encuentran los T.G.Z.

Así mismo, en la década de los 80 se confirmó la aparición espontánea

de los T.G.Z. tras los trabajos de Gopinath y col. (1986) en un estudio de tumores espontáneos de cerebro en ratas Sprague-Dawley a lo largo de 5 años. En este trabajo observaron también la aparición de tumores espontáneos en la glándula de Zymbal.

Rice y col. (1986) aplicaron localmente 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA) en los oídos de ratones atímicos provocando la aparición de adenomas sebáceos cutáneos tanto en el lugar de aplicación como en otras localizaciones.

En otro experimento realizado también con ratas Sprague-Dawley (Hirose y col., 1988) en el que se administró a los animales DMBA y antioxidantes como tratamiento antitumoral, se concluyó que el conducto auditivo externo es un órgano diana del DMBA; sin embargo el tratamiento con los antioxidantes no demostró ninguna modulación en la carcinogénesis del conducto auditivo.

Diversos estudios han confirmado la relación entre la secreción sebácea y el estatus hormonal. Entre ellos, Müller y col. (1989) señalan que en carnívoros la testosterona causa hipertrofia de las glándulas sebáceas y los estrógenos y el cortisol causan involución de las mismas. En cuanto a la actividad secretora de sebo, ésta estaría aumentada por pequeñas dosis de andrógenos y disminuída por grandes dosis de estrógenos.

Kato y col. (1989) administrando 2-amino-3,4-dimetilimidazol(4,5-f)quinolina a ratas demostraron que este compuesto es mutagénico realmente, y que induce tumores en varios órganos entre ellos en la glándula de Zymbal. Los primeros tumores aparecieron a los 139 días y fueron observados en 19 de

20 ratas macho y en 17 de 20 hembras.

El primer estudio realizado en cultivos celulares de la glándula de Zymbal se debe a Reddy y col. (1989) que evaluaron el efecto del benceno y sus derivados (DMBA, AAF). Se observó que los cultivos de las glándulas de Zymbal expuestos a estos productos presentaban cambios en el DNA sugiriendo que algo semejante podría suceder en el proceso *in vivo*. El efecto del benceno sobre la glándula de Zymbal fue confirmado por Huff y col. (1989) que indicaron un aumento en la incidencia de los tumores de la glándula de Zymbal, tanto en macho como en hembras. Más pormenorizado fue el estudio de Low y col. (1989), sobre el efecto del benceno, (marcado con C<sup>14</sup>) administrado oralmente en el que llegaron a las siguientes conclusiones:

- Que la glándula de Zymbal no es un sitio de acumulación del benceno o de sus metabolitos.
- Que en la glándula de Zymbal la eliminación de los metabolitos del benceno se produce en dos fases.

Este mismo año, Shirai y col. (1989) contradiciendo todas las opiniones que hasta entonces se habían ido formulando, afirman que la edad no influye en la aparición de tumores de la glándula de Zymbal.

La controversia sobre la influencia de procesos inflamatorios previos se alimenta con la publicación en 1989 de un estudio sobre carcinomas de células escamosas del canal auditivo externo en humanos (Kinney, 1989) en el que se afirma que la aparición de este tumor puede verse favorecida en un oído en el que previamente haya habido una inflamación crónica.

En 1990 se siguen realizando experimentos con distintos carcinógenos químicos en los que se producen tumores en la glándula de Zymbal, como en el trabajo de Rogers y col. (1990) en el que, además de inducir los tumores con procarbacin, demuestran que estos tumores no se ven afectados por una dieta deficiente en lipotropos: colina y metionina (la deficiencia de estos es un potente potenciador de la carcinogénesis química).

Finalmente Reddy y col. (1990) este mismo año estudian el efecto de fenol, hidroquinona y benzoquinona en cultivos de glándulas de Zymbal y llegan a la conclusión de que estos productos producen mutaciones en el DNA *in vitro*.

## **PERIODO DE LATENCIA**

En cuanto al tiempo de aparición del primer tumor, varía dependiendo de si los tumores han sido inducidos con carcinógenos químicos o si por el contrario han sido tumores espontáneos. Los primeros suelen comenzar a aparecer entre los 9 y los 12 meses después de la administración del producto y el tiempo transcurrido desde la aparición del primer nódulo auricular hasta la muerte del animal es de 2 a 3 meses, (Skoryna y col., 1951; Schardein y col. 1966; Pliss, 1978; Kato y col., 1989) aunque en algunos casos puede ocurrir la regresión espontánea del tumor (Pliss, 1978).

Por el contrario, en los tumores de aparición espontánea, el tiempo de aparición se alarga considerablemente, así están descritos tumores de la glándula de Zymbal en ratas entre 420 y 800 días (Tannembau y col. 1962; Snell, 1965; Schardein 1966).

### **II.1.3.- ASPECTO MACROSCÓPICO**

Skoryna (1951), describe los primeros estadios del tumor como abultamientos subcutáneos, en los que la piel se mueve libremente sobre los tumores. Segun va creciendo el tumor, se ulcera la piel y salen al exterior masas sebáceas, necróticas y purulentas. En algunos casos esta secreción aparece en el conducto auditivo externo, aparentemente por una perforación del tumor dentro del canal. En los casos avanzados es frecuente la putrefacción de la descarga con formación de abscesos subcutáneos (Pliss 1987).

### **II.1.4.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA**

A lo largo de los años los tumores que aparecían en la cabeza de las ratas sometidas a estudios con carcinógenos químicos han sido descritas histológicamente pocas veces. Así, Cox y col. (1947) señalaron que estos tumores eran histológicamente carcinomas de células escamosas, siendo su posible origen una estructura adyacente al conducto auditivo externo, probablemente una glándula sebácea.

Por el contrario, ese mismo año, Harris y col. (1947) los consideraron como tumores de baja malignidad, al estar rodeados por una cápsula fibrosa. La invariable presencia de material necrótico en el centro del tumor la asociaron con infecciones secundarias.

Schardein (1966) en una experiencia en la que administró Tris-(*p*-aminofenil) carbonio pamoato a un grupo de ratas, clasificó los tumores auriculares realizando una clara distinción entre los tumores con origen en las

glándulas de la pared anterior y posterior del conducto (a las que llamó glándulas sebáceas del canal anterior y posterior) y de los tumores que tienen origen en la glándula principal descrita por Zymbal en 1933, a los que denominó tumores de la glándula del canal auditivo. A las neoplasias encontradas en el primer grupo de glándulas las clasificó en: adenomas quísticos, nódulos adenomatosos pequeños y sólidos y tumores grandes adenomatosos. Según este autor los tumores acabarán haciendo prominencia dentro del canal y tendrán metaplasia escamosa con queratinización. Los tumores de la glándula del canal auditivo (T.G.Z.) fueron diagnosticados histológicamente como adenomas quísticos y tumores epiteliales papilares, señalando que, al igual que los del grupo anterior, al crecer presentan metaplasia escamosa y forman perlas de queratina.

Para Pliss (1987) los tumores iniciales están compuestos de pequeños nódulos adenomatosos localizados entre las porciones quísticas de los lóbulos, aunque reconoce este autor que estos estados iniciales del crecimiento del tumor, no han sido todavía examinados adecuadamente. Además recoge las descripciones hechas hasta el momento de varios autores y realizando para la O.M.S. la siguiente clasificación histológica de los T.G.Z.

**\* ADENOMAS:**

- \* Con diferenciación escamosa
- \* Con diferenciación sebácea escamosa

**\* CARCINOMAS:**

- \* Adenoma maligno
- \* Carcinoma sebáceo

- \* Carcinoma de células escamosas con queratinización
- \* Carcinoma de células escamosas sin queratinización
- \* Carcinoma de células sebáceas escamosas

**ADENOMAS:** Los adenomas de las glándulas sebáceas guardan un estrecho parecido estructural con las glándulas sebáceas normales. Se encuentran principalmente tipos celulares basales e intermedios. Existe una formación intensiva de sebo, con degeneración de muchas células, cuyos núcleos, sin embargo, pueden ser conservados y aparecer en las masas sebáceas. La apariencia de estos tumores es como un quiste papilar o epiteloma adenoquistico.

**ADENOMAS MALIGNOS:** En los adenomas malignos, según la clasificación de Pliss aparece una ordenación irregular de las células en el acini; estas células son de diferente tamaño, atípicas y con el núcleo hiperocrómico, por la presencia de numerosas figuras mitóticas y la ausencia de un borde nítido de demarcación del tumor.

**CARCINOMA SEBÁCEO:** Los carcinomas sebáceos, aparecen frecuentemente ulcerados y al corte tienen un aspecto brillante característico. Están compuestos de acinis grandes, de ordenación irregular y normalmente sin conductos. La porción central puede aparecer con cambios quísticos y repletos de material sebáceo, células degeneradas y leucocitos. La mayoría de las células son algo pleomórficas y están frecuentemente en mitosis. Además de estos tumores con patrón acinar, también se han observado carcinomas sebáceos con ordenación difusa. El estroma es frecuentemente muy activo con una intensa proliferación de fibroblastos, a veces atípicos. Este tumor presenta normalmente un crecimiento infiltrativo en tejidos adyacentes.

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS:** Los carcinomas de células escamosas pueden ser con o sin queratinización y son más frecuentes que los carcinomas sebáceos. Estos tumores parecen derivar del epitelio del conducto de la glándula de Zymbal o del epitelio del canal acústico externo.

**CARCINOMA DE CÉLULAS SEBÁCEAS ESCAMOSAS:** En ocasiones se produce la metaplasia escamosa del epitelio sebáceo con cambios de malignidad. Simultáneamente, tanto el epitelio de los conductos y los acinis pueden llegar a ser neoplásicos, precediendo al desarrollo del carcinoma de células sebáceas escamosas.

Segun este autor (Pliss, 1987) las metástasis son raras, pero pueden aparecer en los pulmones y en los ganglios linfáticos submaxilares.

Posteriormente, Hirose y col. (1988) estudiando los tumores de mama inducidos con DMBA en ratas Sprague-Dawley realizaron una clasificación de los tumores de la glándula de Zymbal de una forma bastante esquemática. Así, clasificaron los tumores en benignos (adenomas sebáceos y papilomas sebáceos) y en malignos (carcinoma sebáceo).

En 1990, varios investigadores acordaron sistematizar la nomenclatura de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas de las ratas. Mohr et al (1990) en el apartado referente a la glándula de Zymbal, la clasificación propuesta fue la siguiente:

- \* hiperplasia sebácea
- \* adenoma sebáceo
- \* carcinoma sebáceo
  
- \* adenoma sebáceo escamoso
- \* carcinoma sebáceo escamoso
  
- \* hiperplasia de células escamosas
- \* carcinoma de células escamosas (con o sin queratinización)

Unos años más tarde, Mohr (1993), en solitario, realiza una Clasificación Internacional de Tumores de Roedores para la O.M.S.; en el apartado de los tumores de la glándula de Zymbal de las ratas, la clasificación queda reducida a:

- \* hiperplasia escamosa
- \* hiperplasia sebácea
- \* adenoma sebáceo
- \* carcinoma de células escamosas, queratinizado o no queratinizado
- \* carcinoma sebáceo

En este último tumor, está señalada la presencia de zonas con diferenciación de células escamosas.

## **II.2.- TÉCNICAS ESPECIALES:**

### **II.2.1.- CITOQUERATINAS**

### **II.2.2.- LECTINAS**

#### **II.2.1.- CITOQUERATINAS (CK)**

Una gran proporción del citoplasma celular, normal o transformado, está representado por componentes del citoesqueleto: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios (F.I.). El estudio del citoesqueleto y concretamente mediante técnicas inmunohistoquímicas en las células neoplásicas es de suma importancia y de gran actualidad, ya que la existencia de un determinado filamento intermedio caracteriza un tipo celular, permitiendo su correcta identificación (Franke y col., 1978; Osborn y col., 1983). Los filamentos intermedios deben su nombre a que fueron observados después de los microtúbulos (20-25 nm) y de los microfilamentos (5-6 nm) y su grosor se sitúa entre los dos grupos anteriores, estos filamentos intermedios miden entre 7 y 11 nm de diámetro y se incluyen los siguientes grupos (Franke y col., 1979):

- 1.- neurofilamentos
- 2.- filamentos gliales
- 3.- vimentina (presente en células de origen mesenquimatoso)
- 4.- citoqueratina (filamento epitelial)
- 5.- desmina (filamento del tejido muscular)

El valor diagnóstico de anticuerpos "anti" filamentos intermedios ha sido establecido tanto para tumores humanos (Osborn y col., 1983) como para

tumores experimentales (Bannach y col., 1980) y pretende aclarar la histogénesis de ciertas células neoplásicas, así como las variaciones que puedan sufrir los citoesqueletos de las células tumorales.

En 1978, Franke y col., observaron una inmunofluorescencia positiva anti prequeratina en células epiteliales de epitelio no queratinizado. Propusieron el término "citoqueratinas" para designar a esos filamentos entre 6-11 nm presentes en las células epiteliales, idearon este vocablo con el fin de destacar que esas queratinas formaban parte de células vivas y diferenciarlas así del concepto de célula queratinizada. El término "prequeratina" hace referencia a los tonofilamentos aislados de las células epidérmicas cornificadas (Rabanal, 1991).

Ese mismo año, Franke y col. (1978) no solo observaron fluorescencia positiva con anticuerpos anti-prequeratina en gran variedad de células epiteliales en cultivo y en cortes en congelación, sino que lo pudieron apreciar también en células neoplásicas epiteliales. Estos mismos autores pensaron que cada filamento intermedio era específico de un determinado tipo celular. Pero tanto Franke y col. (1979) como Gard y col. (1979) observaron que en un mismo tipo celular podían aparecer citoqueratina y vimentina.

A comienzos de los 80, se iniciaron los estudios de los filamentos intermedios con métodos inmunohistoquímicos en tumores experimentales, analizándose distintos tumores hepáticos inducidos en ratas macho Sprague-Dawley con nitrosaminas (Bannasch y col., 1980). Observaron que las células tumorales mantenían los mismos filamentos intermedios que la célula de la cual derivaban, clarificando los criterios para la identificación de los tumores poco

diferenciados y sus metástasis.

También en 1980, se determinó que a diferencia de los F.I. vimentina, desmina o filamentos gliales, que consisten normalmente en un solo tipo de subunidad de proteína, los filamentos de citoqueratina, son una compleja familia de diferentes polipéptidos. Variando su peso molecular de 40.000 a 68.000, y su pH de 5 a 8 (Doran y col., Winter y col., Fuchs and Green).

En este sentido se sitúa el trabajo de Franke y col. (1981) en el que afirman que una misma especie exhibe diferentes polipéptidos de citoqueratinas, observando que las citoqueratinas de los hepatocitos de rata y ratón eran bastante diferentes, aunque próximas, de las queratinas epidérmicas.

Ya en 1981 se intentan determinar con inmunofluorescencia los tipos de citoqueratinas de la glándula mamaria humana y de rata, así como de los tumores mamarios humanos e inducidos con DMBA en ratas Sprague-Dawley (Krepler y col., 1981). Estos autores utilizaron sueros obtenidos en cobaya, anti-queratina epidérmica bovina y anti-citoqueratina polipéptido D (procedente de hepatocito de ratón) y observaron menor intensidad y porcentaje de células positivas con la citoqueratina polipéptido D en todas las pruebas realizadas. Al emplear el suero anti-queratina epidérmica de bóvido en glándula mamaria humana, carcinomas intraductales humanos, glándula mamaria de rata en lactación y en reposo, obtuvieron una tinción intensa en las células epiteliales ductales y en las células mioepiteliales. Debido a esta variación de la intensidad de la fluorescencia al aplicar los dos sueros, indicaron que las células de un carcinoma determinado pueden presentar distinta composición en su citoesqueleto, mostrando distintos subtipos de citoqueratinas, pero consideraron que

las células carcinomatosas siempre son positivas a alguna citoqueratina. Estas variaciones en el citoesqueleto de las células tumorales se atribuyen según estos autores, a un grado de diferenciación distinto o a un origen variado de las células. Los adenocarcinomas mamarios inducidos con DMBA revelaron una tinción específica de las células carcinomatosas y mioepiteliales con los anticuerpos anti-queratina epidérmica bovina anti-citoqueratina D hepática.

Solamente un año después, Moll y col. (1982) realizaron varios y exhaustivos trabajos, con los que intentaron identificar las diferentes citoqueratinas. Fruto de ellos es la conocida clasificación de citoqueratinas de Moll y col. que actualmente está plenamente aceptada. Dicha clasificación se realiza según el peso molecular de los distintos subtipos de citoqueratinas, y su pH. Los diferentes polipéptidos de las citoqueratinas humanas pueden ser divididos por electroforesis en gel de doble dimensión en ciertos subgrupos:

\* Citoqueratinas 1 y 2:

CK 1: con peso molecular de 68 kd y pH 7´8.

CK 2: Con peso molecular de 65´5 kd y pH 7´8.

Se han descrito en la epidermis queratinizada.

\* Citoqueratina 3:

Con peso molecular 63 kd y pH 7´5.

Se han encontrado en córnea humana y en córnea bovina.

\* Citoqueratina 4-6:

CK 4: con 59 kd de peso molecular y pH 7´3.

CK 5: con 58 kd de peso molecular y pH 7´4.

CK 6: con 56 kd de peso molecular y pH 7´8.

Estos componentes se han observado en algunos epitelios estratificados no queratinizados del hombre, como en la mucosa de la lengua, en la tráquea y en glándulas sudoríparas de la piel y glándula mamaria. Los componentes 5 y 6, se han observado también en la epidermis y en los folículos pilosos.

\* Citoqueratinas 7 y 8:

CK 7: con peso molecular de 54 kd y pH 6.

CK 8: con peso molecular 52´5 kd y pH 6´1.

Estas citoqueratinas se han encontrado en diversos epitelios simples, epitelio de transición de la vejiga de la orina y en varias glándulas apocrinas.

\* Citoqueratinas 9-11:

CK 9: con peso molecular 64 kd y pH 5´4.

CK 10: con peso molecular 56´5 kd y pH 5´3

CK 11: con peso molecular 56 kd y pH 5´3.

Son citoqueratinas ácidas, que se van a encontrar en la epidermis.

\* Citoqueratina 12:

De peso molecular 55 kd y pH 4´9.

Sólo ha sido observada en córnea humana. Dos polipéptidos ácidos similares están presentes en la córnea bovina.

\* Citoqueratina 13:

Con peso molecular de 54 kd y pH 5´1.

Es el principal componente de varios epitelios escamosos estratificados. Probablemente se corresponde con una citoqueratina de peso molecular 47,

encontrada en el esófago bovino por Franke y col., en 1981.

\* Citoqueratina 14-17:

CK 14: Peso molecular 50 kd y pH 5´3.

CK 15: Peso molecular 50 kd y pH 4´9.

CK 16: Peso molecular 48 kd pH 5´1.

C-17: Peso molecular 46 kd pH 5´1.

Estas citoqueratinas de peso molecular bajo y pH ácido, se encuentran en diferentes combinaciones, en la epidermis, en los folículos pilosos y en muchos epitelios estratificados no queratinizados.

\* Citoqueratina 18:

Su peso molecular es de 45 kd y pH 5´7.

Esta citoqueratina tiene una distribución muy parecida a la citoqueratina 8. Parece ser que se corresponde con la "citoqueratina D" descrita originalmente en algunos epitelios humanos y de roedores (Krepler y col., 1981), y bovinos (Schiller y col., 1982).

\* Citoqueratina 19:

Su peso molecular es de 40 kd y el pH de 5´2.

Se encuentra en la mayoría de los tejidos epiteliales. Aparece como el componente principal de los epitelios simples y como citoqueratina minoritaria en los diversos epitelios estratificados. Aparece también en carcinomas de células escamosas (Wu and Rheinwald, 1981). Franke y col. (1981) describieron una citoqueratina similar en rata, en las células epiteliales intestinales.

Otros autores (Sun y col., 1983) agrupan estas citoqueratinas anteriores (a las que denominan polipéptidos individuales) en 7 clases diferentes de acuerdo con su reactividad inmunológica y su peso; además de tres familias de CK, usando 3 anticuerpos monoclonales anti-citoqueratinas obtenidos en ratón, a los que denomina AE1, AE2 y AE3. El anticuerpo AE1 (familia AE1) reacciona con las siguientes clases de CK: de 40 kd, 50 kd, y 56,5 kd, mientras que AE3 reacciona con las de 46 kd, 52 kd, 58 kd, y 65-67 kd. Resulta curioso observar que AE2 reacciona con los miembros de peso molecular más alto de las dos familias anteriores, como los de 56,5 kd y 65-67 kd. Con lo que realmente las familias de citoqueratinas quedarían reducidas a dos grandes familias AE1 y AE3. Estos autores consideran que las distintas clases de CK son marcadores de diferentes tipos de diferenciación epitelial, así las citoqueratinas agrupadas en las clases de 50 y 58 kd serían marcadores de todos los epitelios estratificados escamosos, mientras que las clases de 56,5 y 65-67 kd, son marcadores de epitelios queratinizados. Estos conceptos pueden tener importancia a la hora de futuros estudios de diferenciación epitelial para diagnósticos diferenciales en carcinomas (Sun y col., 1983).

En años posteriores, el estudio de las CK se dirigió hacia la caracterización de diversos tumores epiteliales. Thomas y col. (1984), estudian las citoqueratinas que se encuentran en distintos tumores de piel, comparando los resultados con la expresión de CK en piel humana. Afinan un poco más a la hora de situar los distintas subclases de citoqueratinas. Por ejemplo, encuentran CK 18 y CK 17 en la capa basal de la epidermis normal y CK 12 en las capas suprabasales y en algunas células basales, a diferencia de Moll y col. (1982) y Franke y col. (1981) que sólo detectaron esta CK en córnea humana y bovina respectivamente. Así, en los carcinomas de células basales encuentran tinción

uniforme para la CK 18 y para la CK 17 con menor intensidad y pequeños focos que se tiñen con la citoqueratina de 55 kd, la CK 12. Los carcinomas invasivos de células escamosas se tiñen difusamente para las CK de 45, 46 y 55 kd y en algunos tumores las zonas disqueratósicas y zonas cornificadas existe tinción para la de 63 kd. Este patrón de tinción irregular indica desórdenes en la queratinización de los queratinocitos. Tal y como indicaron Viac y Reano (1982) la presencia de grupos de células fuertemente teñidas junto a células negativas a la CK de 63 kd sugiere que las poblaciones celulares entre carcinomas escamosos puede ser heterogénea con relación a su grado de maduración escamosa y de ahí su diferente expresión de CK. Los carcinomas de células escamosas *in situ*, muestran una intensa tinción para las citoqueratinas de alto peso molecular (55 y 63 kd). La pérdida de polaridad que aparece en este tipo de tumores está asociada aparentemente con una marcada alteración en el proceso de la queratinización (Thomas y col., 1984).

La progresión de un tumor en la epidermis humana y en la de ratón puede estar asociada a una reducción de proteínas citoqueratinas de alto peso molecular (Klein-Szanton, 1983).

También en este año, se demostró en cultivos celulares de carcinomas mamarios inducidos en ratas con DMBA, que las células basales alargadas, células mioepiteliales derivadas de la célula madre, se teñían más intensamente con la citoqueratina epidérmica de ratón, que las células epiteliales (Bartek y col., 1985). La diferente expresión de CK de las células basales fue confirmada por Bartek y col. (1985) con anticuerpos anti-citoqueratina 19 al señalar que sí se teñía la glándula mamaria humana pero no las células mioepiteliales ni algunas epiteliales lumbales.

La importancia de la técnica inmunohistoquímica empleada para la detección de las distintas CK comienza a ser evaluada por Battifora y col. (1986), los cuales realizando trabajos con diferentes tejidos epiteliales, describen la importancia de la fijación de los tejidos (con etanol y no con formalina), para el estudio de sus citoqueratinas, sobretodo si se realiza con anticuerpos monoclonales, así como la conveniencia de efectuar una digestión previa con proteasas.

Pinkus y col., (1986) establecen la utilidad de las citoqueratinas como marcadores de tumores epiteliales, incluso superiores al EMA (epithelial membrane antigen).

En cuanto a la inmunotinción de carcinomas sebáceos, Takata y col. (1989) realizaron un estudio inmunohistoquímico de 22 casos de carcinomas sebáceos de glándula parótida humana, demostrando la presencia de abundante material lipídico en la mayor parte de las células tumorales, al teñir el tumor con Sudán negro B. Además utilizaron marcadores epiteliales tales como citoqueratinas y EMA, encontrando una marcada inmunoreactividad para las CK 6 (56 kd) y CK 9 (64 kd), así como para el EMA. Las citoqueratinas se expresaron en el citoplasma de las células tumorales y el EMA sólo en la membrana citoplásmica.

También en este mismo año, Latham y col. (1989) investigaron la diferenciación de las glándulas sebáceas utilizando diferentes marcadores como el EMA, la involucrina, y las citoqueratinas 4, 10, 18, 6 y 14 (clasificación de Moll y col., 1982). En cuanto a las citoqueratinas llegaron a las siguientes conclusiones:

CK 18 y 6: reaccionan con todas las células de la glándula sebácea, epidermis y folículos pilosos.

CK 14: reconoce solo las células basales de la glándula sebácea haciendo distinción por lo tanto entre células diferenciadas e indiferenciadas.

CK 10: reconoce sebocitos diferenciados y suprabasales

CK 4: tiñe basales, suprabasales y sebocitos maduros. En este punto difieren de los trabajos de Van Mujien y col. (1986) que no obtuvieron tinción para esta citoqueratina en cortes de glándulas sebáceas y con Moll y col. (1982) que limitan esta citoqueratina sólo a epitelios estratificados no cornificados. Latham y col. (1989) sugieren que la diferencia radica en la metodología empleada pues ellos utilizan cortes de criostato y proteólisis previa, confirmando la importancia de la técnica empleada para la correcta interpretación de los resultados.

Battifora (1989) basándose en los trabajos anteriores (Moll y col., 1982) divide a la familia de las citoqueratinas en dos subfamilias (A y B), según su peso molecular, su inmunoreactividad con anticuerpos monoclonales de especificidad restringida y su punto isoeléctrico. La subfamilia A está formada por queratinas de peso molecular 56,5, 55, 54, 50, 48, 46, 45, y 40 kd. Los miembros de esta familia tienen un punto isoeléctrico relativamente ácido. La subfamilia B está compuesta de citoqueratinas de 65-67, 64, 59, 58, 56, 54 y 52 kd y teniendo un punto isoeléctrico relativamente básico. Excepto por la citoqueratina de 40 kd (Moll 19), los miembros de la subfamilia A tienen su correspondiente miembro en la subfamilia B. Cada par tienen una categoría similar por su peso molecular entre sus respectivas subfamilias y en general tienen formas parecidas de expresión. Esta correspondencia ya fue señalada por Sun y col. (1983). Hay que hacer notar que en cada par, el miembro de la sub-

familia B es mayor que la de A en 8 kd. Así, por ejemplo, el par formado por las citoqueratinas más pequeñas de cada grupo, con 45 kd y 52 kd se encuentra normalmente en escasa cantidad en epitelios simples solamente, pero parece ser abundante en algunas neoplasias epiteliales (Battifora, 1989).

Como ya se ha señalado, es crucial la técnica empleada, pero aún lo es más el anticuerpo anticitoqueratina empleado. Según señala Battifora (1989), en los estudios inmunohistoquímicos de neoplasias de estirpe epitelial es preferible usar anticuerpos monoclonales, ya sean solos o, lo que es más habitual en los diagnósticos de rutina, las mezclas o "cocktails" de anticuerpos anticitoqueratinas. Los anticuerpos monoclonales superan en especificidad y sensibilidad a los antiseros policlonales, más usados hasta entonces. Los anticuerpos anticitoqueratinas pueden ser divididos por tanto, en dos grupos, uno que agrupa los de amplio espectro, que reconocen epítomos compartidos por muchos miembros de la familia de citoqueratinas, y otro que incluye anticuerpos que reconocen un epítomo restringido a unos pocos miembros o una sola CK. Así, por ejemplo, los anticuerpos más utilizados en el diagnóstico habitual son, por una parte, las CK 18 y 19, que son sueros con especificidad restringida a unas pocas citoqueratinas de bajo peso molecular y que actúan como detectores de diferenciación epitelial, ya que estas CK de bajo peso molecular se expresan en muchas neoplasias epiteliales (Battifora, 1989). Por otra parte, como ejemplo de anti CK de amplio espectro tenemos los AE1 y AE3, citados ya por Sun y col. (1983).

En 1991, Bartek y col., facilitan en gran medida la investigación inmunohistoquímica de las CK al fabricar 14 nuevos anticuerpos monoclonales para CK. Este panel incluye anticuerpos monoclonales de reactividad

panepitelial, anticuerpos monoclonales contra epítomos compartidos por dos CK, y anticuerpos monoclonales que reaccionan o son aparentemente específicos de CK individuales. Además, estos anticuerpos pueden ser usados en tejidos incluidos en parafina; una de las desventajas de los anticuerpos disponibles hasta ahora era la pérdida de sensibilidad hacia los epítomos diana en los tejidos fijados y posteriormente incluidos en parafina.

Usando estos mismos anticuerpos, Staskova y col. (1991), revelan que existe una reactividad cruzada entre especies para anticuerpos monoclonales individuales. Así, para la queratina 8 humana pueden existir hasta 12 epítomos distintos en diferentes especies animales. Por lo tanto la expresión de las CK puede variar en las distintas especies animales (Russo y col., 1990).

Tampoco, Tsubura y col. (1991) encontraron citoqueratina 8 en el aparato pilosebáceo de piel humana, aunque tuvieron una ligera positividad en las células periféricas de las glándulas sebáceas para la CK 14. Es muy interesante el trabajo de Zouboulis y col. (1981) sobre las CK como marcadores de diferenciación sebocítica *in vitro*. Para las CK 4 y 7 solamente observaron tinción en sebocitos *in vitro* pero no en cortes en tejido. También comprobaron una marcada expresión de CK 19 en sebocitos en comparación con los queratinocitos, y una ausencia total de CK 1 y 2 que son encontradas típicamente en cultivo de queratinocitos.

Doran y col. (1991) realizaron un trabajo semejante al anterior, demostrando *in vitro* la naturaleza epitelial de los sebocitos humanos aunque son negativos para los anticuerpos propios de queratinocitos.

Por otra parte Markey y col. (1991) estudiando tumores de origen epitelial en humanos, señalaron que la expresión de citoqueratinas típicas de epitelios simples por parte de los queratinocitos tumorales podría estar relacionada con la invasión tumoral.

Shabana y col. (1992) realizaron cultivos de células epiteliales humanas para observar la expresión de citoqueratinas en los diferentes estadios de estratificación. Así, en los estadios iniciales de formación de colonias, todas las células expresan el mismo tipo de citoqueratinas, la de células basales (14), las CK marcadoras de epitelios simples (8, 18 y 19) y la CK (16). Cuando hay estratificación, aparecen las CK 4 y 13 que son marcadores de diferenciación de epitelios estratificados no queratinizados.

En 1992, Tchornobay y col. realizaron un estudio sobre un carcinoma humano sebáceo extraocular, sin diferenciación escamosa, ni diferenciación de células basales (tumor extremadamente raro y agresivo) y se encontraron citoqueratinas típicas de capas suprabasales.

La detección en los tumores cutáneos de CK correspondientes a otras localizaciones en tejidos normales ha continuado en los años 90. Larcher y col. (1992) observaron que la CK 8 típica de epitelios simples se expresaba en carcinomas de piel del ratón y no en los papilomas. Además, esta queratina presentaba una correlación entre su positividad y el grado de malignidad del carcinoma.

Kartasova y col. (1992) observaron que las CK 1 y 10 son comunmente

expresadas en las capas diferenciadas de tumores benignos epiteliales humanos, pero se pierden en la transformación maligna de la carcinogénesis de la piel. Sugieren que las células tumorales benignas expresan queratinas suprabasales por lo que las células son diferenciadas y su proliferación es menor.

Moll y col. (1992) describieron una nueva citoqueratina, la citoqueratina 20, expresada por el epitelio intestinal, gástrico, urotelial y por las células de Merkel. Se ha comprobado que es un marcador importante para diferenciar diferentes tipos de carcinomas.

En cuanto a la reactividad interespecies, un trabajo reciente ha confirmado su conservación. Chaloin-Dufau y col. (1993) en un estudio sobre citoqueratinas 3 y 12 de vertebrados demostraron que la queratina ácida CK 12, está altamente conservada a lo largo de todas las especies, menos en la trucha, mientras que la CK básica 13, muestra variaciones entre especies y sólo ha sido identificada en mamíferos.

Por otra parte, Wollina y col. (1992) realizando un estudio inmunohistoquímico comparativo entre piel porcina y piel humana no encontraron ninguna expresión de citoqueratinas en las glándulas sebáceas de las dos especies. Estos autores, por otro lado, afirman que las investigaciones inmunohistoquímicas en el cerdo son difíciles porque los anticuerpos monoclonales específicos de estos tejidos no son todavía comerciales, y además, una posible explicación a la falta de tinción de las glándulas sebáceas con CK, puede ser el bajo nivel de expresión que tengan (Groves y Tucker, 1989). Así pues, Wollina y col. (1991) en un estudio sobre piel porcina, alternaron sucesivamente anticuerpos mono- y policlonales.

En 1993, Stoler y col., estudiaron la transformación en cultivo de un carcinoma escamoso de piel de ratón en un carcinoma fibroblastoide. Al estudiar las CK señalan que algunos de estos tumores expresan CK pero de una manera muy pobremente organizada, mientras que otros pierden completamente la expresión de queratinas. Parece existir por tanto una relación entre la pérdida de expresión de CK y la malignidad tumoral.

Traweek, y col. (1993) realizan un exhaustivo e interesante trabajo, debido a que se ha demostrado que existe inmunoreactividad a las queratinas en tumores de músculo liso, y origen no epitelial (Brown, D.C. y col., 1987; Miettinen, M. 1988; Chase D.R. y col., 1984; Farhood, A., 1991). Mediante la técnica de PCR (Polymerase chain reaction) se ha estudiado los tres genes de queratinas más primitivas (8, 18, 19) en tejidos mesenquimatosos y hematopoyéticos, para comprobar la especificidad de la asociación entre estos filamentos intermedios y las células de origen epitelial. Estos autores llegan a la conclusión de que efectivamente la expresión del gen filamento citoqueratina no está restringido a células de origen epitelial y se han encontrado en distintos tejidos, como fibroblastos normales, células mononucleares en sangre periférica, nódulos linfáticos.

## **II.2.2.- LECTINAS**

### **DEFINICION**

Las lectinas son proteínas de origen no inmune obtenidas fundamentalmente de plantas que tienen la propiedad de unirse específicamente a carbohidratos (Calderó y col., 1990). Su primera descripción, fué realizada por Stillmark (1888) al observar que los extractos de las semillas de ricino (*Ricinus comunis*) provocaban una aglutinación de los eritrocitos humanos y de algunos animales de experimentación. Posteriormente se han ido descubriendo nuevos extractos proteicos de otras semillas que también tienen capacidad para aglutinar eritrocitos por lo que se propuso la denominación de hemaglutininas vegetales para estas sustancias (Sharon y col., 1972). Su número inicial se ha incrementado con los años al descubrirse más compuestos con propiedades similares en plantas inferiores, bacterias, hongos e incluso animales vertebrados e invertebrados (Sharon, y col., 1972), observándose además, que no solo aglutinan eritrocitos, sino que aglutinan también células neoplásicas (Aub y col. 1963 y 1965) y estimulan la división de los linfocitos (Nowell, 1960). Por ello, han sido nombradas también como aglutininas naturales, como heteroaglutininas o anticuerpos naturales (Kocourek, 1986).

El término actual "lectina" (del Latin *legere*: elegir o escoger) lo introdujeron Boyd y Shapleigh (1954) como un nombre genérico para designar unas sustancias que presentaban la capacidad de unirse selectivamente a moléculas de carbohidratos, de manera similar a como lo hacen los anticuerpos, pero sin la estimulación antigénica.

En los últimos veinte años el interés por las lectinas ha aumentado

considerablemente y se han descubierto sustancias de origen muy diverso (enzimas, hormonas, proteínas transportadoras...), que a pesar de sus similitudes con las lectinas, no deben ser consideradas como tales, ya que aunque se unen selectivamente a los azúcares, no aglutinan ni precipitan conjugados y a menudo producen alteraciones metabólicas al azúcar al cual se unen. Para aclarar la situación, Goldstein y col. (1980) definieron las lectinas como "un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que tienen la capacidad de aglutinar células y/o precipitar conjugados", indicando las siguientes características:

- que las lectinas tienen por lo menos dos lugares de unión a los carbohidratos específicos de las células que aglutinan y/o a los polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos que precipitan
- que la especificidad de la lectina se establece, habitualmente, en función de los monosacáridos u oligosacáridos que inhiben las reacciones de aglutinación, precipitación o agregación inducidas por la lectina

Calderó y col. (1990) añadieron otro punto más a esta definición señalando que las lectinas no desarrollan ninguna actividad metabólica sobre el azúcar al cual se unen.

### **ESPECIFICIDAD**

La mayoría de las lectinas reaccionan con azúcares no reducidos situados en la posición terminal de los glicoconjugados, pero pueden existir lectinas que reaccionen con componentes internos o ramificados de las cadenas de los carbohidratos; por ejemplo, Concanavalina A (Con A), además de unirse a los

azúcares alfa-manosa y alfa-glucosa terminales, también reacciona con residuos de alfa-manosa situados en el interior de la cadena (Gallager, 1984; Goldstein y col., 1986).

Aunque la unión carbohidrato lectina recuerde a una unión antígeno-anticuerpo, el tipo de enlace que se establece es lábil, no covalente y reversible. En ocasiones, se requiere la presencia de metales pesados, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , para mantener activos sus lugares de unión (Goldstein y col., 1986).

La especificidad de las lectinas se establece mediante técnicas de inhibición de la aglutinación de células o de la precipitación de glicoconjugados (Calderó y col., 1990). Se considera como carbohidrato más específico de una lectina, aquel que inhibe las reacciones de aglutinación o de precipitación a una concentración más baja. Sin embargo las estructuras glicoconjugadas presentes en los tejidos son complejas y se encuentran relacionadas con otras estructuras tisulares y celulares, lo que complica los estudios histoquímicos pues lectinas con la misma especificidad *in vitro*, muestran distinta reactividad en los tejidos (Alroy y col., 1984; Damjanov y col., 1987).

### **CLASIFICACIÓN**

Se han realizado numerosos intentos con la finalidad de unificar criterios para una mejor clasificación de las lectinas. Gallagher (1984) propuso una clasificación basada en los carbohidratos que son capaces de inhibir las reacciones inducidas por las lectinas. Esta clasificación dividía a las diferentes lectinas en dos grandes grupos:

a) lectinas de clase I: que pueden ser inhibidas con bajas concentraciones de monosacáridos.

b) lectinas clase II: las que son inhibidas exclusivamente por oligosacáridos.

Pero la mayoría de los autores prefieren agrupar las lectinas en función de su especificidad de unión a los azúcares terminales en las cadenas de carbohidratos (Goldstein y col., 1986), así quedarían clasificadas en cinco grupos:

1.- Lectinas que se unen a glucosa/manosa:

Con A (Concanavalin A)	<i>Canavalia ensiformis</i>
LCA (Lens culinaris)	<i>Lens esculenta</i>
PEA (Pea garden)	<i>Pisum sativum</i>

2.- Lectinas que se unen a N-acetilgalactosamina/galactosa:

BPA	<i>Bauhinia purpurea</i>
DBA	<i>Dolichus biflorus</i>
GSA-I	<i>Griffonia simplicifolia-I-A4</i>
GSA-I	<i>Griffonia simplicifolia-I-B4</i>
HPA	<i>Helix pomatia</i>
LBA (Lima bean)	<i>Phaseolus lunatus</i>
MPA	<i>Maclura pomifera</i>
PNA (Peanut)	<i>Arachis hypogaea</i>
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>
SBA (Soybean)	<i>Glycine max</i>

SJA	<i>Sophora japonica</i>
VVA	<i>Vicia villosa</i>
WFA	<i>Wiostaria floribunda</i>

3.- Lectinas que se unen a L-fucosa:

LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i>
UEA-I	<i>Ulex europaeus I</i>
AAA	<i>Aleuria aurantia</i>

4.- Lectinas que se unen a N-acetilglucosamina

DSA	<i>Datura stramonium</i>
GSA-II	<i>Griffonia simplicifolia II</i>
PWM (Pokeweed)	<i>Phytolacca americana</i>
STA	<i>Solanum tuberosum</i>
UEA-II	<i>Ulex europeus II</i>
WGA (Wheat germ)	<i>Triticum vulgare</i>

5.- Lectinas que se unen al ácido siálico:

LFA	<i>Limax flavus</i>
LPA	<i>Limulus polyphemus</i>

Se las nombra por las iniciales de la planta de origen más la palabra aglutinina, exceptuando algunas, en las que las iniciales son las del nombre común en inglés (que va en paréntesis).

## **HISTOQUÍMICA**

En cuanto a su aplicación en histoquímica, las lectinas se han utilizado como marcadores histoquímicos en el estudio de la diferenciación celular y de la transformación neoplásica en distintos tejidos (Hakomori y col., 1983; Marumatsu, 1988).

A finales de los años 60 y principios de los 70 varios autores describieron a las lectinas como un apoyo más a la hora de diferenciar entre células neoplásicas y no neoplásicas en aquellos casos en los que no está muy clara la diferencia, como en hiperplasias de mama, pólipos de intestino y varias hiperplasias de piel. Estas lectinas aglutinarían las células tumorales pero no las normales. (Burger y col., 1967; Inbar y col., 1969; Ben-Basset, 1970 y Rapin y col., 1974).

En las células normales, las glicoproteínas receptoras de lectinas están uniformemente distribuidas en la superficie, aunque estos lugares están normalmente protegidos o cubiertos por algún componente de la membrana plasmática que pueden ser modificados por una ligera tripsinización (Burger y col., 1970). Por el contrario, los lugares receptores en la membrana plasmática de las células neoplásicas están agrupadas y cuando se tratan con lectinas, las células se aglutinan (Sharon y col., 1972; Vlodausky y col., 1975). Según otros investigadores (Sela y col., 1970; Sharon y col. 1975) aglutinan todo tipo de células tumorales, independientemente de que el tumor sea espontáneo o inducido por agentes químicos, virales o por radiaciones ionizantes. Tras estos estudios, Bauer y col. (1977) afirmaron que las glicoproteínas de la superficie

de las células tumorales difieren de las glicoproteínas de las células normales y Brawell y col. (1978) demostraron que la glicoproteína de la célula tumoral es dimérica, mientras que en una célula normal es monomérica.

En 1981 Louis y col. utilizando Con A marcada con isotiocianato de fluoresceína de tumores en epidérmicos humanos, confirman que los receptores de la superficie celular de las células tumorales están anormalmente distribuidos en grupos en la superficie. En este estudio, Louis y col. consiguen una tinción muy diferente en distintas lesiones epidérmicas estudiadas: las hiperplasias y los nevi, no se tiñeron con la Con-A, otras lesiones precancerosas como la queratosis solar, emitieron una ligera fluorescencia o fueron negativas y los tumores malignos, como el carcinoma de células escamosas o el carcinoma de células basales, presentaron una gran positividad en la superficie celular y en el citoplasma.

En 1982, Holthöfler y col., continúan aplicando lectinas marcadas en distintos tejidos en congelación. Destacan que UEA-I es un marcador del endotelio vascular de la especie humana dando positividad en todos los vasos sanguíneos dermales y subcutáneos, así como el contorno de células epidérmicas de capas medias y las glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos, especialmente en las células corticales.

Las lectinas también se han utilizado para el estudio de la diferenciación celular. Nemanic y col. (1983) emplean lectinas marcadas con rodamina en la diferenciación epidérmica y observan alteraciones en el patrón de tinción de las membranas de los queratinocitos. Así, para estos autores, el estrato granuloso contiene 3 o 4 veces más glicolípidos que el estrato córneo y atribuyen este

cambio en los azúcares de la superficie celular a la acción de glucosidasas específicas de la epidermis. También señalan que las capas basales se tiñen principalmente con Con A, RCA y WGA; el PNA tiñe el estrato granuloso y UEA-I el estrato granuloso y la parte superior del espinoso. En ningún caso se tiñó el estrato córneo.

En cuanto al epitelio glandular, concretamente en glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, (Ookusa, 1983 y Schaumburg, 1984), se ha señalado que la intensidad de tinción con las lectinas se incrementa durante la maduración celular y que DBA, RCA, y SBA distinguen entre células superficiales y células basales de las glándulas sudoríparas ecrinas.

Por otra parte, el patrón de tinción parece ser el mismo en distintas especies animales pues, según Elias y col. (1983) en la epidermis humana, de rata y de ratón, la capa basal se tiñe con CON-A, PSA, RCA, WGA y LCA; el estrato espinoso con Con-A, PNA, RCA, SBA y WGA y el estrato granuloso igual que el anterior más UEA-I.

Muchos autores postulan que los patrones de tinción de lesiones pretumorales o neoplasias benignas con lectinas son similares a los descritos en piel normal, mientras que en las neoplasias malignas aparecen diferentes tipos de tinción. Así Schaumburg-Lever y col. (1986) afirman que en las lesiones preneoplásicas existe una pérdida de tinción de PNA.

En 1986, Von Kuster y col. realizaron un trabajo muy interesante con Con A y LCA en glándula sebácea normal y neoplásica, llegando a los siguientes resultados: en las glándulas sebáceas, la reacción fué positiva en la

membrana plasmática así como en las membranas de las vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas. La tinción de glándulas sebáceas hiperplásicas resultó idéntica a las de glándulas sebáceas normales, sin embargo en los adenomas sebáceos la tinción queda reducida a células diferenciadas en el centro de los lóbulos y en los carcinomas sebáceos, se tiñen las células más maduras.

La variación de la histoquímica normal de las lectinas en los tumores se ha demostrado también en otros tipos tumorales como, por ejemplo, en tumores de colon donde se han observado cambios progresivos de la reactividad en los adenomas con grados crecientes de displasia hasta alcanzar, en los adenomas con displasia severa, un patrón similar al existente en los carcinomas (Kellokumpu y col., 1986).

Damjanov (1987) clasifica estos cambios de los glicoconjugados de células neoplásicas en:

- a) pérdida de ciertos carbohidratos normales
- b) incremento de los carbohidratos habituales
- c) distribución alterada de los carbohidratos normales
- d) aparición de carbohidratos que no se han encontrado en células normales adultas de las que procede el tumor.

Un año después, Dansey y col. (1988) mostraron diferencias significativas en los patrones de unión de las lectinas y en la intensidad de la reactividad entre el epitelio normal, lesiones proliferativas benignas y el cáncer de mama. Por ejemplo, la modificación de la reactividad normal de algunas lectinas principalmente de la PNA y Con A, se ha relacionado con la agresividad histológica del tumor, con su capacidad metastática y el pronóstico

de la neoplasia.

También, Sasano (1989) intenta utilizar las lectinas para el estudio de neoplasias de la glándula adrenal con la finalidad de determinar diferencias en la composición de los glicoconjugados celulares entre tumores benignos y malignos. Únicamente la lectina RCA ha mostrado en ocasiones afinidad en los carcinomas corticales pero en los adenomas. Por lo que se desaconseja el uso de lectinas como marcador diferenciador de tumores suprarrenales benignos y malignos de la especie humana (Calderó y col., 1990).

Otros autores como Li Px (1990) afirman la validez de las lectinas al realizar un estudio histoquímico en neoplasias pulmonares humanas, observando que la tinción débil con Con A y PSA, en carcinomas de células pequeñas y la tinción negativa en carcinoides y melanoma malignos, ayuda a clasificar su origen.

También las lectinas se han utilizado para estudiar la maduración tisular. Así en 1988, De Lellis, con respecto a la tinción con lectinas de los tejidos epiteliales, hace una especial mención a la expresión de los carbohidratos en epidermis, glándulas ecrinas y glándulas sebáceas (Schaumburg-Lever y col., 1984). Algunos estudios han demostrado que la intensidad de tinción con PNA y SBA se incrementa durante la maduración celular y que DBA, RCA-I y SBA distinguen entre células superficiales y células basales de las glándulas sudoríparas ecrinas (Ookusa y col., 1983) lo que confirma una vez más que existen cambios de tinción durante la diferenciación celular desde la capa germinativa hasta la capa córnea.

Así mismo, Atoji y col. (1988), realizan un interesante trabajo con lectinas comparando la glándula interdigital de un feto y un animal adulto (antílope cabra japonés). Dicha glándula es sebácea y apocrina. Las glándulas sebáceas del animal adulto y del feto se tiñen con PNA, RCA, SBA, WGA y Con A, aunque en el feto el grado de tinción con RCA, SBA, WGA y Con A, es mayor. Observaron también que UEA reacciona con la parte apocrina de la glándula interdigital, pero no con la glándula apocrina de la superficie de la piel con lo que sugieren que la porción apocrina de esta glándula tiene diferente función que la de la piel.

En 1990, Calderó y col. en una revisión sobre lectinas, abren cierta polémica al afirmar que, aunque los resultados obtenidos con lectinas son alentadores, la aplicación de estas sustancias para el diagnóstico anatomopatológico es todavía limitada. Señalan que la utilidad más importante en este campo es el reconocimiento de endotelios mediante UEA-I, lo cual permite utilizarla como marcador de células endoteliales, tumores de origen vascular e invasión vascular metastática (Gonzalez y col., 1988; Terg y col., 1988). Aunque otros autores afirman que este marcador es más sensible, pero menos específico que el antígeno relacionado con el factor VIII (Wick y col., 1987; Leader y col., 1986).

En su completo trabajo de revisión Calderó y col. (1990) concluyen que, a pesar de sus limitaciones en el ámbito de la histopatología diagnóstica, las lectinas son útiles para estudiar procesos como la diferenciación celular y la transformación neoplásica y auguran que en un futuro próximo las lectinas podrían ayudar tanto en el diagnóstico de las neoplasias como en el establecimiento de parámetros pronósticos.

Taatjes y col. (1990) afirman que las lectinas sí pueden ser útiles para diferenciar ciertos tipos celulares del pulmón y por tanto, usarse para investigar la dinámica celular durante el desarrollo pulmonar y su remodelación. Existen lectinas que se unen muy claramente a un determinado tipo celular, por ejemplo, la LEA, se une específicamente al epitelio de bronquiolos y alveolos, mientras que la GS-I se une selectivamente al endotelio de los capilares alveolares (Bankston y col., 1991).

En años posteriores, ha continuado el empleo de lectinas en neoplasias y así, Sasano y col. (1991) señalan que la tinción con lectinas es útil para distinguir tumores. Por ejemplo, en las neoplasias ováricas serosas y mucinosas de la mujer, la transformación maligna de las neoplasias se asocia a la alteración de glicoconjugados y especialmente los tumores de baja malignidad tienen una composición diferente de los glicoconjugados celulares de los carcinomas ováricos invasivos. Boland y col. (1991) afirman que la lectina ACA (amaranthin) puede ser usada para identificar focos de proliferación anormal en síndromes de cáncer colorectal familiar en la especie humana.

En lo referente al estudio comparativo de lectinas en distintas especies, Wollina y col. (1992) realizaron un interesante trabajo en el aparato pilosebáceo del cerdo y del hombre en el que consiguieron tinción muy intensa para los sebocitos periféricos con Con A y WGA en ambas especies. Los sebocitos centrales de las dos especies tuvieron tinción de menor intensidad con Con A y WGA que los sebocitos periféricos.

Por último, se continúan abriendo nuevos campos de investigación y distintas aplicaciones para las lectinas. Así, se han descrito nuevas lectinas

aisladas de la leucemia basofílica de la rata (RBL y de los fibroblastos de ratón 3T3) que se unen a galactosa y al C-terminal de la IgE (Brassart y col., 1992). Esto podría ser un original y nuevo mecanismo para el estudio de desórdenes ligados a la IgE, como las alergias alimenticias.

# **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

## MATERIAL Y MÉTODOS

### III.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de nuestro estudio, utilizamos un total de 45 ratas hembra, de estirpe Sprague-Dawley. Al comienzo del experimento tenían 4 semanas de vida y un peso que oscilaba entre 80 y 100 gramos.

Durante el tiempo que duró el experimento (396 días), se sometieron a un ambiente climático homogéneo,  $20 \pm 2$  °C y a una dieta alimenticia con piensos estándar para ratas y ratones (Sanders S-10).

Tanto la alimentación como el agua de bebida fueron administradas *ad libitum*. Los animales fueron alojados en jaulas individuales transparentes de policarbonato, provistas de rejillas metálicas con separador de comida y biberón.

### III.2.- INDUCCIÓN TUMORAL

La administración del carcinógeno se realizó 15 días después de la llegada de los animales, tiempo que consideramos suficiente para la adaptación de las ratas a su nuevo ambiente.

El carcinógeno de elección fue el 7, 12-dimetilbenzantraceno, DMBA, C18 H10 (CH3)2, de Fluka, Buchs, Suiza. A cada uno de los 40 animales problema de 45 días de edad se le administró por sondaje intragástrico una dosis de 20 mg. de DMBA disueltos en 1 ml. de aceite de sésamo. Las 5 ratas testigo, recibieron

solamente aceite de sésamo en la misma cantidad y de igual forma. Este día en el que comenzamos la experiencia con la inducción tumoral lo denominamos día 1.

### **III.3.- GRUPOS DE ANIMALES**

Dividimos los animales en 3 grupos principales:

- a) **grupo testigo**
- b) **grupo sin T.G.Z.**
- c) **grupo con T.G.Z.**

Los animales del grupo a), testigo, fueron  $n=5$ ; el grupo b) formado por los animales tratados con DMBA que no han tenido tumores de la glándula de Zymbal  $n= 22$  y el grupo c) incluye los animales que sí han tenido tumores de Zymbal  $n=18$ . Este último grupo los dividimos en 4 subgrupos según el período de desarrollo de los tumores de la glándula de Zymbal, teniendo en cuenta la aparición del primer tumor, independientemente de la aparición del segundo tumor, si lo han tenido, hasta que el animal muere o es sacrificado.

**GRUPO I:** Animales en los que el tumor ha sido un hallazgo de necropsia. Es decir, que ni era visible, ni era palpable antes de la muerte del animal. En este grupo están los animales 1, 19, 25, 31.

**GRUPO II:** Animales con un desarrollo tumoral de la glándula de Zymbal de 1 a 2 meses. Fueron los animales 10, 22, 24, 27, 39.

**GRUPO III:** Animales con un desarrollo tumoral de 2 a 3 meses. En este grupo

están los animales 13, 15, 18, 28, 29.

**GRUPO IV:** Animales con tumores de más de 3 meses. En este grupo encontramos a los animales 17, 32, 34, 35.

#### **III.4.- CONTROLES REALIZADOS**

Todos los animales fueron sometidos a un control diario de supervivencia y de estado general. Se ha llevado a cabo un control semanal de observación y palpación para apreciar la presencia de nódulos tumorales, tanto en la región mamaria (el DMBA es un inductor también de cáncer de mama), como en la región auricular objeto de nuestro estudio. Los tumores de la glándula de Zymbal (T.G.Z.) no se midieron por tener un crecimiento interno hacia el conducto auditivo.

Atendiendo al momento de aparición los T.G.Z. se clasificaron en 4 grupos, independientemente de a qué animal correspondan. Ya que puede haber animales que tengan el tumor de Zymbal del oído izquierdo en un grupo, y el derecho esté incluido en otro grupo distinto.

**GRUPO NECROPSIA:** Tumores que fueron hallazgo de necropsia.

**GRUPO 1 MES:** Tumores que tuvieron de desarrollo tumoral hasta 1 mes.

**GRUPO 2 MESES:** Tumores de hasta 2 meses de desarrollo.

**GRUPO 3 MESES:** Tumores con desarrollo de hasta 3 meses.

Quincenalmente, controlamos la variación de peso tanto de las ratas problema, como de las testigo, con una balanza de precisión electrónica.

### **III.5.- SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES**

A lo largo de toda la experiencia se han ido sacrificando ratas para la obtención de T.G.Z. en diferentes períodos. En aquellos animales que presentaron 2 tumores se tuvo en cuenta el de aparición más temprana. El sacrificio se llevó a cabo mediante una sobredosis de anestésico por inhalación, para lo que utilizamos éter etílico en cámara cerrada. Se han ido sacrificando animales con los T.G.Z. con distinto tiempo de desarrollo tumoral, así sacrificamos 2 animales del grupo II, 4 del grupo III, 1 del grupo IV y los 5 animales del grupo testigo. Murieron espontáneamente como consecuencia del proceso tumoral 33 animales.

Al realizar la necropsia de todos los animales, efectuamos el siguiente protocolo:

\* Obtención de los tumores de la glándula de Zymbal, junto con el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo. Estos tumores se midieron por sus dos diámetros mayores. En algunos fue difícil determinar alguno de sus diámetros por estar invadiendo cerebro, por estar unido a una neoplasia mamaria, o por su consistencia pastosa. Hemos considerado los tumores de Zymbal, desde el punto de vista geométrico, como un elipsoide de revolución sobre su semieje mayor, criterios comunmente aplicados en Oncología Experimental. Hemos hecho, por tanto, una estimación aproximada, del volumen tumoral mediante la aplicación de la fórmula siguiente:

$$V = \frac{4}{3} \pi a \times b^2$$

Los valores  $a$  y  $b$  (semiejes mayor y menor, respectivamente), los hemos

calculado a partir de las mediciones de los diámetros tumorales realizados en el momento de la necropsia.

\* Se recogieron también todos los tumores de mama. Estos tumores, se pesaron en una balanza de precisión "Cobos C-300".

\* Posteriormente continuamos la necropsia ordenada, completa y sistemática, con observación macroscópica de todos los órganos y cavidades del cadáver, procediéndose rápidamente a la toma de muestras para los distintos tipos de estudio.

### **III.6.- ESTUDIO HISTOLÓGICO**

#### **III.6.1.- TOMA DE MUESTRAS:**

Recogimos muestras de todos los tumores de la glándula de Zymbal y de los tumores mamarios, así como de todas las metástasis tumorales que aparecieron tanto en cavidad torácica, como en cavidad abdominal, o de cualquier órgano que presentase alguna anomalía.

#### **III.6.2.- FIJACIÓN:**

Para la fijación de estas muestras, hemos utilizado tanto formol al 10%, como una solución de Bouin, que lleva la siguiente composición:

- 75 ml. de una solución de ac. pícrico a saturación.
- 25 ml. de formalina comercial
- 1 ml. de ac. acético, añadido al momento de ser utilizado.

En esta última solución se fijaron las muestras tumorales para el estudio inmunohistoquímico, para lo cual se mantuvieron de 2 a 4 horas, habiéndose tallado previamente en muestras de 1 cm de espesor. Después de esta fijación realizamos sucesivos lavados en alcohol de 40 grados.

### **III.6.3.- INCLUSIÓN**

El procesado del tejido para microscopía óptica se realizó mediante la inclusión de éste en parafina sintética "Histosec pastillas" (Merck), con punto de fusión 56<sup>o</sup>-58<sup>o</sup>C. El procesador automático de tejidos que se empleó fue un "Shandon-Elliot Bench SCE 0400", la formación de los bloques se realizó en una consola Tissue-Tek (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola, de Miles Scientific).

### **III.6.4.- OBTENCIÓN DE CORTES**

Los cortes realizados en bloques de parafina se hicieron con un microtomo de rotación tipo "Minot Leiz 1516", con pedal automático. Se consiguieron cortes de 3 y 4 micras. Para el estudio histológico de la glándula de Zymbal se realizaron cortes seriados.

Se realizaron también cortes en congelación, a partir de material fresco recién obtenido de la necropsia. Estos cortes se realizaron en un criostato "1720 digital Leitz", y tuvieron un espesor de 6 micras.

### III.6.5.- MÉTODOS DE TINCIÓN

#### III.6.5.1.- TÉCNICAS HABITUALES

- Hematoxilina-Eosina
- Tricrómico de Masson
- Sudan III

#### III.6.5.2.- TECNICAS HISTOQUÍMICAS CON LECTINAS

Para nuestro estudio histoquímico, las lectinas que hemos utilizado son las siguientes:

- \* Lectina que se une a glucosa/manosa:

**Con A:** De Sigma Flucks, a la dilución 1:50

- \* Lectina que se unen a N-acetilgalactosamina/galactosa:

**PNA:** Arachis Hypogaea. De Sigma Flucks a la dilución de 1:75.

- \* Lectina que se une a L-fucosa:

**UEA-I:** Ulex europaeus I. De Dako, a la dilución 1:500, biotinizada para revelar con fosfatasa alcalina.

- \* Lectina que se une a N-acetilglucosamina:

**WGA:** Triticum vulgare. De Sigma Flucks, a la dilución 1:125.

La técnica de tinción con lectinas ha sido la siguiente:

- \* Deshidratar con alcohol (5´) y acetona (10´)
- \* Lavados (2×5´) con TBS (Tris buffer saline, pH 7,4).
- \* Tripsinización (0´05 gr de tripsina, 45 ml de H<sub>2</sub>O y ClCa 0´1%) (30´)

- \* Lavados con TBS (2×5´)
- \* Bloqueo de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1´5%, 30´)
- \* Lectina de elección marcada con peroxidasa, esta reacción se debe hacer en cámara húmeda y a temperatura ambiente (90´)
- \* Lavados con TBS (2×5´)
- \* Revelado con Diaminobenzidina (10´), 25 mg/ml de TBS y 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- \* Lavar con TBS (2×5´)
- \* Contrastar con hematoxilina
- \* Deshidratar y montar

Para UEA-I, revelamos con fosfatasa alcalina.

Se han realizado los pertinentes controles negativos:

- a) Mediante la sustitución de la lectina marcada con peroxidasa por un conjugado de peroxidasa inespecífica (conejo anti-IgG pollo conjugada con peroxidasa).
- b) Inhibición del azúcar específico mediante la incubación de cada lectina a la dilución adecuada con una solución de su azúcar específico al 4% durante una hora, antes de su aplicación en las preparaciones, siguiendo después los tiempos normales de la técnica.

### III.6.5.3.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS ANTICITOQUERATINAS

Los anticuerpos anticitoqueratinas han sido los siguientes  
(la nomenclatura es la propuesta por Moll y col., 1982):

- \* **anti CK PAE** (Citoqueratina policlonal de Amplio Espectro) de Dako Corporation. Este antisuero reconoce las citoqueratinas 1, 3, 4, 5, 6, 8. La dilución óptima de uso es de 1:200.
- \* **anti CK MAE** (Citoqueratina monoclonal de amplio espectro) de Sigma Immuno Chemicals (CK 37) La dilución que utilizamos fue de 1:200
- \* **anti CK APM** (Citoqueratina de Alto Peso Molecular) monoclonal, de Immunon que contiene una mezcla de tres anticuerpos monoclonales:
  - **8**, de 52.5 Kd
  - **1, 5, 10, 11**: de 68, 58, 56.5 y 56 Kd
  - **1**: 68 Kd, cuando esta citoqueratina está asociada con epitelio no escamoso.
- \* **anti CK 1**, monoclonal, con peso molecular de 68 kD, de Enzo diagnostics, a la dilución de 1:20. Esta citoqueratina de APM, viene prediluida para su uso.
- \* **anti CK 4** (Citoqueratina 4) monoclonal, de Sigma Immuno Chemicals. Reconoce la citoqueratina de 59 Kd. La dilución de trabajo fue de 1:300.
- \* **anti CK 8-18** (Citoqueratina 8/18) monoclonal. De Novocastra Laboratories (Landerdiagnostico). La dilución de trabajo utilizada fue de 1:200
- \* **anti CK 10-11** (Citoqueratina 10-11) monoclonal. De Sigma Immuno Chemicals. La dilución de trabajo fue de 1:200.
- \* **anti CK 14** (Citoqueratina 14) monoclonal. De Sigma Immuno Chemicals. Utilizamos la dilución 1:200.

La técnica de tinción fue la siguiente:

- \* desparafinar
- \* lavar con PBS (2×5´)
- \* bloqueo de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en PBS, 30´)
- \* lavar en PBS (2×5´)

- \* tripsinización (0´05 gr de tripsina, 45 ml de H<sub>2</sub>O y ClCa 0´1%) (30´)
- \* suero normal de conejo (1:30) (30´) en monoclonales  
suero normal de cerdo (1:30) (30´) en policlonales
- \* anticuerpo primario (citoqueratina correspondiente) incubando en cámara húmeda durante toda la noche.
- \* lavar en PBS (2×5´)
- \* anticuerpo puente:
  - policlonales: cerdo anticonejo (1/100 durante 30´).
  - monoclonal:
    - conejo antiratón (1/310 durante 30´) para diaminobencidina (DBA).
    - "pool" antiratón, cabra y conejo (prediluida) para fosfatasa alcalina (PA).
- \* lavar en PBS (2×5´)
- \* complejo fosfatasa antifosfatasa APAAP ó PAP anti-ratón
- \* lavar (2×5´)
- \* Revelado con:
  - A) Fosfatasa alcalina:
    - 10ml Buffer Tampón Trizma, pH 8´2;
    - 0´1 mg de Fast Red;
    - 0´003 mg de NN dimetilformamida
    - 300 µl de Naftol SA difosfato.
  - B) Diaminobenzidina (10´), 25 mg/ml de TBS y 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- \* lavar en agua destilada 10´
- \* hematoxilina 3´
- \* montar en medio acuoso para la fosfatasa alcalina, ó deshidratar y montar con DEPEX para las reveladas con DAB.

Para las citoqueratinas 1 y de Alto Peso Molecular hemos utilizado el revelado con fosfatasa alcalina, para el resto, hemos utilizado la peroxidasa antiperoxidasa, y revelado con diaminobencidina (DAB).

Hemos realizado los controles negativos pertinentes, sustituyendo el anticuerpo anticitoqueratina por PBS y utilizando cortes de tejidos no epiteliales.

Para la observación de estas técnicas utilizamos un microscopio Orthoplan (Leitz), acoplado a un sistema de luz polarizada.

### **III.6.6.- ICONOGRAFÍA**

Fotografías macroscópicas: se realizaron con una cámara Minolta, provista de un macro-objetivo de 50 mm, 1:3,5, con película Kodak Ektachrome 160.

Fotografías microscópicas: empleamos una película Kodak Ektachrome 64 de Tungsteno y microscopio Olympus AH-3 (Varox AHB53), con sistema de autofocus y dos cámaras incorporadas.

### **III.6.7.- METODOS ESTADÍSTICOS**

Una característica peculiar del **análisis de supervivencia** que vamos a llevar a cabo, es que no todos los datos son completos, es decir, que no se observan todas las ratas hasta que se mueren, sino que hay algunas muertes que se realizan por sacrificio. A estas muertes por sacrificio (no naturales), las denominaremos datos incompletos. A las muertes naturales las denominamos datos completos.

Para el análisis de supervivencia de las ratas, hemos utilizado la prueba de Kaplan-Meier o del producto límite. La ventaja de este método es que la

longitud de los intervalos es variable, por lo que los resultados no dependen de la elección del intervalo.

Para la comparación de curvas de supervivencia entre los animales con tumores de Zymbal y sin ellos, hemos utilizado la prueba de Logrank, mediante la cual, verificamos si la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo es igual para los dos grupos. El procedimiento se basa en calcular el número de muertes acaecido en cada grupo (frecuencia observada: O), así como el número esperado (E). Se comparan ambos valores según la fórmula  $(O-E)^2/E$ , y la suma de este parámetro entre los dos grupos nos da una medida de la diferencia entre ellos.

Para poder observar si existen diferencias significativas de volumen tumoral entre los distintos grupos hemos utilizado el método de Newman-Keuls que es una prueba de comparación múltiple de las medias de los grupos. Consiste en ordenar las medias y calcular para cada diferencia (q),  $q=(m1-m2)/s$ , siendo  $s=(VR/n)$ , donde VR es la varianza residual (azar), y "n" el tamaño de las dos muestras. A los valores de "q" observados se les asigna un rango en función del orden que ocupan las medias, al clasificarlas de mayor a menor, y se contrastan con un valor "q" teórico, límite atribuible al azar con un nivel de probabilidad prefijado ( $p < 0.05$  ó  $p < 0.01$ ) en el programa.

En el resto de los estudios estadísticos hemos empleado las pruebas habituales.

## **IV.- RESULTADOS**

## RESULTADOS

### IV.1.- INDUCCIÓN TUMORAL

#### IV.1.1.- TUMORES MAMARIOS

Después del día 1 de la experiencia, es decir, tras la administración del DMBA, se controló mediante observación y palpación, la aparición de los tumores de mama. El primer tumor apareció el día 24 (Tabla I). Después de este día el número de tumores aumentó rápidamente, hasta llegar al día 156, en el que el 97,5% de las ratas estaban afectadas. Quedó por tanto un solo animal que no tuvo tumores de mama hasta el día 286. Por consiguiente, este día quedaron afectados con tumores de mama los 40 animales que recibieron DMBA (100%).

El crecimiento más rápido del número de ratas afectadas por estos tumores, se produjo a las 8 semanas y media de la experiencia (60 días). Posteriormente, el número de ratas afectadas fue creciendo más lentamente (Fig. 1).

Al final de la experiencia contabilizamos 171 tumores de mama, habiendo una media de 4,27 tumores por animal (Tabla II). En 18 animales, además de los tumores de mama aparecieron tumores de la glándula de Zymbal.

#### IV.1.2.- TUMORES DE LA GLANDULA DE ZYMBAL

Los tumores de la glándula de Zymbal (T.G.Z.) fueron identificados también por palpación. El primer T.G.Z. se registró en el segundo tercio de la experiencia, exactamente el día 156 (Fig. 2). Y el día que estuvieron afectados el 100% de los animales de este grupo, fue casi al final de la experiencia, exactamente el día 380 (Tabla III).

Al principio, el número de ratas afectadas por tumores de Zymbal, aumentan muy lentamente hasta el día 200, a partir del cual, se produce un aumento más evidente del número de ratas afectadas (Fig. 3).

Al final (día 386) observamos que un 45% del total de los animales tratados con DMBA han tenido al menos un tumor de la glándula de Zymbal (Fig. 4 y Fig. 10).

En total contabilizamos 25 tumores de la glándula de Zymbal, ya que un 38% ( $n=7$ ) de los animales afectados tuvieron tumor en los dos oídos.

Observamos que en los animales que posteriormente presentaron tumores en la región auricular, los tumores de mama aparecieron más tarde, que en aquellos animales que no los padecieron.

El número de animales en cada grupo quedó como sigue (Fig. 10):

- a) grupo testigo: 5 animales
- b) grupo sin T.G.Z.: 22 animales
- c) grupo con T.G.Z.: 18 animales

## **IV.2.- ESTUDIO BIOLÓGICO**

### **IV.2.1.- ESTADO GENERAL**

El estado general de los animales fue considerado bueno los dos primeros meses de la experiencia. A partir de aquí, los tumores de mama aumentaron de tamaño y se ulceraron, causando dolor y prurito para los animales. Estas ulceraciones producían también una pérdida continua de sangre por lo que además, estos animales, empezaron a estar apáticos, y con menor vitalidad, síntomas que se agudizaban a medida que se acercaba el momento de su muerte. El aumento de tamaño de los tumores produjo también dificultad locomotora, debido al gran volumen que alcanzaron algunas neoplasias mamarias. Algunos animales llegaron a morir con el tercio posterior completamente paralizado.

Las ratas que tuvieron tumores de la glándula de Zymbal presentaron un mejor estado general que aquellas que no los padecieron, hasta el momento de la aparición de estos tumores de oído. En algunos animales, incluso, la aparición de los tumores de mama fue más tardía que en el resto del grupo, por lo que su estado general fue mejor.

A partir del día en el comienzan a aparecer los tumores de Zymbal (156), el estado general de los animales del grupo con T.G.Z. se deteriora bastante. En estos tumores la piel que los rodea aparece completamente tensa y posteriormente se ulcera, con el consiguiente prurito, pérdida de sangre...; además, al aumentar de tamaño y estar en una zona tan comprometida, estos tumores afectan seriamente la visión.

#### **IV.2.2.- PESO DE LOS ANIMALES**

El peso de los animales se obtuvo cada quince días, desde el momento que llegaron, el día de administración del DMBA, hasta el momento de su muerte o sacrificio.

La media del peso de los animales fue aumentando progresivamente hasta el día 108 de la experiencia (Fig. 5). A partir de este día, los animales con DMBA (grupos T.G.Z. y sin T.G.Z.), empiezan a mantener el peso sin aumentarlo, incluso a veces perdiéndolo, hasta el día 192, a partir del cual comienzan a aumentar de peso, superando además a los animales testigo que hasta ahora estaban por encima de los animales tratados con DMBA (Tabla IV). En cuanto a la diferencia de peso entre estos dos últimos grupos, podemos decir que la media del peso de los animales con tumores de Zymbal, superó en general, al del grupo sin tumores de oído (Fig. 6). Es más, a partir del último tercio de la experiencia, esta diferencia se hace más notable (Tabla IV).

Este período, desde el día 108 hasta el 192, en el que las ratas mantie-

nen un peso sin cambios bruscos, coincide con el período en el que existe un mayor número de ratas afectadas por tumores de mama.

Por otro lado, el peso de los animales con DMBA en el momento de la muerte fue bastante variable. Desde un mínimo de 198 gramos, hasta un máximo de 770. Un porcentaje bastante alto de este peso se correspondió con el peso de los tumores de mama, en general un 32,18 % del peso total de los animales pertenecía a los tumores de mama, no habiendo diferencias significativas entre el grupo de los animales con tumores de Zymbal, y los no afectados, debido a que los 3 tumores de oído que se pudieron pesar, tuvieron una media de 5 gr. por tumor (Tablas V y VI).

#### **IV.2.3.- SUPERVIVENCIA**

##### **IV.2.3.1.- SUPERVIVENCIA GLOBAL**

Hemos dividido para el estudio de supervivencia la experiencia en tres períodos.

Primer período (del día 1-95): en cuanto a la supervivencia de todos los animales de la experiencia, podemos observar (Fig. 7), que hasta el día 89 post administración del DMBA, no ocurre ninguna muerte. En este primer intervalo de tiempo, que transcurre desde el día 1 de la experiencia hasta el 95, solo murieron 2 animales.

Segundo período: en un segundo intervalo, ocurrido desde el día 96

hasta el 191 día, se producen 7 muertes, lo que nos indica un porcentaje bastante bajo en comparación con el resto de la experiencia. Este segundo intervalo coincide, en términos generales, con el período de tiempo en el que los animales mantienen un peso estable. En él, están afectadas casi la totalidad de los animales por tumores de mama, el 97, 5% de los casos.

Tercer período: un tercer intervalo, similar en días al anterior, ocurre desde el día 192, hasta el 287. En este período de tiempo observamos la pérdida de 15 animales, por lo que doblamos el número de animales muertos del período anterior, ocurriendo 6 de ellas en las dos primeras semanas.

Cuarto período: el cuarto y último intervalo a estudiar de la gráfica de supervivencia global abarca desde el día 288 hasta el final de la experiencia (día 386), en el ocurren 11 muertes naturales y 7 sacrificios que no se contabilizaron.

Por otro lado, estudiamos los días de supervivencia de animales que han tenido metástasis pulmonar (Fig. 9). Comparando este grupo con el de animales que no han tenido metástasis pulmonar, mediante una comparación de las medias de los días vividos, observamos que no existe una diferencia significativa, siendo la  $p=0.21016$  (Tabla X).

Considerando que una rata Sprague-Dawley tiene una media de vida de 40 meses, podemos comprobar que este tiempo se ha reducido considerablemente en los animales con DMBA (con T.G.Z. y sin T.G.Z.) pues han muerto,

como término medio a los 8.5 meses, (el primero a los 4 meses, y el último a los 13 meses). Por lo tanto, en los animales tratados con DMBA, se reduce el tiempo normal de vida unas cinco veces.

#### **IV.2.3.2.- SUPERVIVENCIA DE RATAS SIN TUMORES DE ZYMBAL**

En cuanto a la supervivencia por grupos, podemos observar en el grupo de animales sin T.G.Z. que la gráfica de supervivencia es idéntica (Fig 8) para los dos primeros períodos de tiempo a la gráfica de supervivencia global (Fig. 7).

En el tercer intervalo en el tiempo (día 192 al 287) ocurren el 54.5% de las muertes de este grupo. En este período de tiempo, por tanto mueren la mayoría de los animales de este grupo, son ratas con tumores de mama en general de gran tamaño y peso y ulcerados.

En el último período de tiempo a estudiar (día 288-386) solo quedan tres animales vivos de este grupo, que van muriendo progresivamente, hasta el día 369 en el que muere el último animal de este grupo (Tabla VII).

#### **IV.2.3.3.- SUPERVIVENCIA DE RATAS CON TUMORES DE ZYMBAL**

En cuanto a la gráfica de supervivencia de los animales con tumores de Zymbal, en el primer, segundo y casi la mitad del tercer intervalo de tiempo establecidos, no observamos ninguna muerte. El primer animal de este grupo

mueren el día 243. En este tercer intervalo, además solo comprobamos la muerte de tres animales (Tabla VIII y Fig. 8).

En el último período de tiempo estudiado, mueren el 83 % de los animales de este grupo. Estos animales mueren de una forma escalonada, sin grandes diferencias en general. Observamos que ninguno de los animales con tumores de Zymbal, ha vivido más de tres meses desde la aparición del tumor.

Al comparar las curvas de supervivencia de las ratas con tumores de Zymbal y las que no los han padecido, mediante el método Logrank, observamos que la diferencia entre ambos es significativa, con una  $p < 0.001$  (Tabla IX).

### **IV.3.- RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS**

#### **IV.3.1.- NECROPSIAS**

A todos los grupos de animales (Fig. 10) se les practicó una necropsia, ordenada, completa y sistemática.

##### **IV.3.1.1.- ANIMALES SIN TUMORES DE ZYMBAL**

Las necropsias realizadas a este grupo de animales  $n=22$  (Fig. 10), pudieron demostrar que, efectivamente, todas las ratas presentaban múltiples tumores mamarios de tamaño variable y que la mayoría de ellos no se encon-

traban adheridos a planos profundos.

En algunos casos la caquexia tumoral fue muy evidente, llegando un animal a tener un porcentaje del peso tumoral de casi el 85% de peso total.

A la apertura de la cavidad torácica, encontramos 5 animales con metástasis pulmonares, que histológicamente eran metástasis de tumores mamarios. Otros 8 animales tuvieron pulmones con focos de neumonía aguda.

En una rata observamos una tumoración en cavidad torácica a la altura del timo y otra en cavidad abdominal que no parecía estar asociada a ninguna estructura; se diagnosticaron histológicamente como linfoma linfocítico en ambas cavidades. El resto de los órganos presentaba un aspecto normal.

#### IV.3.1.2.- ANIMALES CON TUMORES DE ZYMBAL

En la necropsia de los animales con tumores de Zymbal, pudimos observar las mismas lesiones descritas en el grupo anterior, aunque en este grupo aparecieron 7 animales con metástasis pulmonares, por lo que realmente no existen diferencias significativas con el grupo anterior en cuanto a la aparición de metástasis pulmonares. En total, entre los dos grupos, con T.G.Z. y sin T.G.Z., un 30% de los animales tuvieron metástasis pulmonar de los tumores mamarios (Fig. 11). Uno de los animales, presentó una tumoración en la cavidad abdominal, no adherida a ningún órgano, de  $2.5 \times 1$  cm, también se demostró histológicamente que era una metástasis de un tumor mamario.

En este grupo, además de los múltiples tumores de mama, observamos masas tumorales situadas en la región auricular. En el curso de la necropsia y tras un minucioso examen de la región, descubrimos 8 T.G.Z. que no se veían externamente en 7 animales (3 de ellos ya tenían un T.G.Z. en la otra región auricular). En estos animales, sin embargo, al diseccionar el conducto auditivo, nos encontramos que esta glándula, que en condiciones normales tiene un tamaño pequeño  $0.3 \times 0.4$  de diámetro, presentaba un ligero aumento y se apreciaba con bastante claridad, de color blanco amarillento.

El resto de los tumores de oído, habían sido diagnosticados por palpación con anterioridad, por lo que quedó establecida la distribución de los grupos de trabajo (Fig. 12), a la que hacemos referencia en el capítulo de material y métodos. En el grupo de animales en los que el primer tumor de oído tiene una duración de 1 mes, encontramos 5 casos, con desarrollo tumoral hasta 2 meses, 5 casos y con desarrollo tumoral hasta 3 meses, 4 casos.

Dependiendo del tipo histológico sus caracteres macroscópicos varían, así existen tumores bien localizados y circunscritos, sin llegar por ello a tener una cápsula que los recubra y otros infiltran tejidos subyacentes. Incluso en uno de los animales, un tumor mamario localizado en la primera mama, estaba invadiendo un tumor de oído o viceversa. El estudio macroscópico detallado de los T.G.Z. figuran en la pag. 17.

## **IV.3.2.- TUMORES DE MAMA**

### **IV.3.2.1.- LOCALIZACION Y NÚMERO**

Hemos observado 171 tumores de mama, lo que supone una media por animal de 4,3 tumores, los cuales están repartidos uniformemente entre la cadena mamaria derecha y la cadena mamaria izquierda. Para la cadena mamaria derecha tendríamos una media de 2.3 tumores por rata, y para la izquierda una media de 2 tumores (Tabla XI y Fig. 13).

Comparando las proporciones, observamos que un 38% de las ratas han tenido al menos un tumor en la cadena mamaria derecha, frente al 34% de las ratas, que han tenido tumores en la cadena mamaria izquierda. Por lo tanto no existen diferencias significativas entre las distintas localizaciones de los tumores ( $p < 0.05$ ) (Tabla XII).

### **IV.3.2.2.- ESTUDIO MACROSCÓPICO**

Las neoplasias mamarias, tenían una forma generalmente ovoidea y recubiertas de piel que en ocasiones se encontraba ulcerada. En general, estos tumores estaban recubiertos por una cápsula de tejido conjuntivo que los delimitaba. En algunos casos, muy pocos ( $n=3$ ), encontramos que estos tumores estaban adheridos a planos profundos.

Al retirar la piel de estas neoplasias, se observaba la superficie tumoral constituida por lobulaciones brillantes, blanquecinas y de diferentes tamaños. En algunas zonas alternaba la presencia de hemorragias. Su consistencia era blanda. La superficie de corte presentaba a veces zonas de consistencia más blanda que el resto y de color gris oscuro que se corresponden, histológicamente, con áreas de necrosis. Otras veces, al cortar, fluía un líquido claro de aspecto lechoso o sanguinolento en cantidad variable, que dejaban al descubierto cavidades quísticas bien visibles.

#### IV.3.2.3.- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

##### **TUMORES BENIGNOS**

Los tumores benignos de mama representaron un 14,8% (n=25) del total de neoplasias mamarias. Un 5.7% (n=10) fueron fibromas, y un 9.19% (n=15) fueron fibroadenomas pericanaliculares.

Los fibromas estuvieron formados por fibras de colágeno en proporción moderada y fibroblastos de forma alargada o estrellada. El núcleo, oval, apareció ligeramente teñido por la hematoxilina, y presentó una disposición central. No observamos atipias, ni mitosis, ofreciendo por tanto una clara imagen de benignidad.

Los fibroadenomas pericanaliculares, presentaban las células epiteliales dispuestas en acinis sin caracteres de malignidad ni mitosis. Alrededor de estos

túbulos observamos varias capas de tejido conjuntivo o fibroso.

En estas neoplasias benignas, destaca la presencia de un proceso inflamatorio reactivo integrado por linfocitos y en mayor proporción células cebadas en distintos estados de granulación.

Un 77% de estos tumores mamarios benignos, los encontramos en ratas que tuvieron tumores de la glándula de Zymbal.

## **TUMORES MALIGNOS**

Un 85.2% de las neoplasias mamarias fueron malignas, predominando los adenocarcinomas ya que solo encontramos un fibrosarcoma.

Los adenocarcinomas, en su gran mayoría estaban recubiertos por una cápsula conjuntiva que emitía trabéculas hacia el interior, separando la masa tumoral en numerosas lobulaciones y formando un estroma rico en fibras de colágeno y fibroblastos. Aparecieron también, abundantes células inflamatorias, entre las que destacamos, las células cebadas o mastocitos. También encontramos, zonas de hemorragias y de necrosis, y a veces zonas de calcificación distrófica.

El parénquima tumoral estaba integrado por acinis glandulares tapizados por células epiteliales cúbicas o aplanadas. Los núcleos tuvieron una localización central, presentando muchos de ellos una marcada hipercromatosis parieto-

nuclear y uno o dos nucleólos. También observamos atipias celulares, como anisocitosis, anisocariosis y mitosis homotípicas en cantidad variable.

Encontramos cuatro tipos histológicos:

**TIPO A:** Poco diferenciado. Se aprecian amplias zonas de aspecto sólido por la escasa formación de luces glandulares. Los caracteres histológicos indican gran malignidad, células de aspecto inmaduro y elevado número de mitosis. Representaron un 8% del total de neoplasias mamarias (n=14).

**TIPO B:** Bien diferenciado. Las células epiteliales son cúbicas y presentan un típico patrón acinar. Estas células se organizan en una o varias capas, presentando a veces una poliestratificación de 4 o 5 capas. El número de mitosis es variable, pudiendo presentar gran cantidad o no encontrarse apenas. Fueron neoplasias del tipo B un 55,17% del total (n=96).

**TIPO C:** Atrófico. Estos tumores están formados por una sola capa de células glandulares cúbicas bajas, o planas. Los acinis se presentan muy dilatados y con secreción. No se encuentran mitosis. Fueron del tipo C un 13% del total de las neoplasias mamarias (n=22).

**TIPO D:** Secretor. Encontramos un 5% (n=12). Las células glandulares

presentan numerosas vacuolas intracitoplasmáticas, grandes o pequeñas. No apreciamos signos de malignidad tumoral.

Observamos un 1% **FIBROSARCOMA**, que estaba formado por células alargadas y por fibras que formaban haces orientados en distintas direcciones. Existieron gran cantidad de mitosis, muchas de ellas atípicas.

Todos los resultados histológicos de los TM quedan reflejados en la tabla XIII y la fig. 14.

### **IV.3.3.- TUMORES DE LA GLÁNDULA DE ZYMBAL**

#### **IV.3.3.1.- LOCALIZACIÓN Y NÚMERO**

Obtuvimos un total de 25 T.G.Z. en 18 animales. En cuanto a la localización de estos tumores de oído, hemos observado que no existen diferencias significativas entre los localizados en el oído derecho, y los del oído izquierdo. Así, un 30% de los animales de este grupo tuvieron una tumoración en el oído derecho y un 33%, tuvieron localizado el tumor en el oído izquierdo. Comparando las proporciones, vemos que la diferencia no es significativa  $p < 0.05$  (Tabla XIV y Fig. 15).

#### **IV.3.3.2.- ESTUDIO MACROSCÓPICO**

Los T.G.Z. detectados por primera vez en el transcurso de la necropsia (grupo necropsia) presentaban un aspecto muy parecido al de la glándula normal, con un ligero aumento de tamaño. La superficie era blanquecina amarillenta y lisa. El tumor estaba muy bien delimitado. Su consistencia era pastosa por lo que a la sección se deshacían en masas homogéneas pastosas blanco amarillentas.

Estos nódulos de mayor tamaño que la glándula normal, se incluyen como T.G.Z. aunque histológicamente muchos de ellos se diagnosticaron posteriormente como hiperplasias con dilataciones quísticas.

Los tumores que en general no tuvieron más de 1 mes de desarrollo tumoral (Grupo 1 mes) presentaban las mismas características aunque con un evidente aumento del tamaño de la neoplasia (media de diámetros:  $1 \times 0,92$ )

Las neoplasias que tuvieron 2 y 3 meses de desarrollo tumoral (Grupos 2 y 3 meses), en general presentan un aspecto distinto a los grupos anteriores. La piel que recubría estos tumores, que hasta ahora había permanecido intacta, estaba ulcerada y con costras ennegrecidas (Fig. 18). La mayoría de las veces, presentaban un aspecto ovoideo, con un tamaño que llegó a sobrepasar los 2,5 cm de diámetro (Fig. 19). En algunos casos de tumores del Grupo 3 meses, no se pudieron medir bien debido a que estas neoplasias no tenían unos bordes definidos sino que eran unas masas que invadían tejidos adyacentes, como glándulas salivares, tejido muscular e incluso cerebro. Al cortar estos tumores, se deshicieron en masas pastosas de distintas características, variando de un color grisáceo, achocolatado o amarillento.

#### IV.3.3.3.- VOLUMEN TUMORAL

Los volúmenes de los T.G.Z. varían dependiendo del grupo de animales que se estudie. Así, en el grupo de animales, en el que el tumor de oído fue un hallazgo de necropsia tuvimos una media de 0'74 cc. En el grupo de animales que tuvieron tumores con un mes de desarrollo tumoral el volumen fue de 4'56 cc, en el de dos meses, 7'51 y en el grupo que tuvo tumores de oído durante tres meses, el volumen ascendió a 16'57 (Tabla XV y Fig. 16).

Así, como podemos observar en la Tabla XVI, existen diferencias significativas entre los volúmenes tumorales de los grupos de animales con tumor de tres meses, con los del grupo "necropsia", "1 mes" y "2 meses". También existen diferencias entre el grupo "necropsia" y el volumen medio del grupo "2 meses", mientras que las comparaciones del resto de los grupos, como "2 meses" con "1 mes" y "1 mes" con "necropsia", no presentan diferencias significativas.

#### IV.3.3.4.- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

##### **GLÁNDULAS SEBÁCEAS NORMALES**

Las glándulas sebáceas de la pared anterior y posterior del canal auditivo externo de las ratas testigo y las que murieron al principio de la experiencia, consistían en numerosas glándulas simples situadas justo debajo del epitelio escamoso del conducto auditivo, próximas a la glándula principal. Las glándulas de la pared anterior están compuestas de glándulas sebáceas más grandes y más lobuladas, formando pequeños agregados, mientras que las de la pared posterior están integradas por pequeñas glándulas solitarias orientadas la mayoría hacia la superficie (Fig. 20).

En definitiva, no hemos encontrado alteraciones en las glándulas de la pared anterior y posterior de las ratas tratadas, ni en las testigos. Solamente en uno de los casos en los que ya existía una tumoración de la glándula principal (carcinoma de células escamosas) hemos encontrado una ligera hiperplasia de

las glándulas de la pared anterior.

En cuanto a la glándula principal o glándula de Zymbal de las ratas testigo, tras el análisis de los cortes seriados, se comprueba que está dividida en cuatro lóbulos principales. Cada lóbulo está compuesto por grupos de glándulas sebáceas que van a evacuar a conductos excretores menores. Estos conductos menores son visibles fácilmente, con un epitelio plano estratificado; se unen en conductos de mayor tamaño lobulares, que están tapizados por un epitelio estratificado escamoso. Al final se unen en un conducto principal que desemboca en la región anteroinferior del conducto auditivo externo, cerca de la membrana timpánica, entre placas de cartílago.

Las unidades secretoras son típicas glándulas sebáceas: sobre la membrana basal encontramos varias filas de células basales basofílicas aplanadas que no tienen gotas lipídicas. Según avanza la maduración celular las gotas de lípidos se van acumulando hasta llenar completamente el citoplasma celular en las células maduras. Dichas células están localizadas centralmente y tienen un núcleo central. Puesto que es una glándula holocrina, la secreción se forma por la completa desintegración de sus células y en la porción de la glándula que se abre al conducto, encontramos células desintegradas, masas de lípidos y restos celulares que descargaran en el conducto menor (Fig. 21).

### **HIPERPLASIAS CON DILATACIONES QUÍSTICAS**

El conducto excretor principal de la glándula de Zymbal no muestra

cambios significativos ni con la edad, ni con la administración del DMBA.

Conforme aumenta el tiempo transcurrido desde la administración del DMBA existe un aumento progresivo en la incidencia y gravedad de las dilataciones de los conductos lobulares y menores que adquieren una apariencia quística (Fig. 22). Las glándulas presentan mayor cantidad de células descamadas y restos celulares por estar alterada su descarga. Consecuentemente las glándulas aumentan su tamaño (Fig. 23).

Además de las dilataciones quísticas aparecen hiperplasias glandulares focales (Fig. 24). Estas áreas hiperplásicas se caracterizan por la presencia de un mayor número de glándulas de pequeño tamaño y con células inmaduras. La ordenación de las células es normal.

Estas alteraciones se consideran como cambios preneoplásicos y se encontraron en total un 20% de T.G.Z. que presentaban este tipo de lesiones pertenecientes al grupo denominado "necropsia" y fueron un hallazgo de necropsia, pues no habían sido diagnosticados previamente por palpación (Fig. 17 y Tabla XVII).

### **ADENOMAS SEBÁCEOS**

Los adenomas sebáceos son formaciones de mayor tamaño que presentan una cápsula muy fina de tejido conjuntivo. En este grupo, las dilataciones quísticas son aún más evidentes llegando a ocupar más de la mitad del diámetro

tumoral. Como consecuencia de la dilatación su epitelio disminuye de grosor. Coexistiendo con las cavidades quísticas, las glándulas adquieren focalmente un aspecto adenomatoso diferenciándose de las áreas hiperplásicas por su mayor tamaño y por su irregular distribución dentro de los acinis (Fig. 25). En general en estos tumores encontramos más células basales e intermedias y una intensa formación de sebo con degeneración de muchas células. El núcleo puede, sin embargo, preservarse y aparecer en las masas sebáceas (células momificadas). Las células de los adenomas son poliédricas. Su citoplasma varia de basófilo homogéneo en las células más inmaduras, a eosinófilo espumoso o vacuolado, en las más maduras. En general su aspecto es semejante al de las células sebáceas normales. Los núcleos son redondos con nucleólos bien definidos, a menudo con la apariencia de estar en contacto con la membrana nuclear. La cromatina está finamente granulada. La picnosis y cariorrexis son evidentes.

Del total de T.G.Z. un 28% fueron adenomas, perteneciendo 42% al grupo "necropsia" y el resto al grupo de desarrollo tumoral de un mes (Fig. 17 y Tabla XVII).

## **ADENOCARCINOMAS**

En los adenocarcinomas se conserva en gran medida la estructura de la glándula, aunque las células de la glándula tienen una ordenación irregular y presentan atipias. Son de diferente tamaño y con el núcleo hipercrómico e irregular. A veces aparecen células poliédricas semejantes a las de la glándula normal en el centro del acini, pero sin su apariencia vacuolada típica. Existen

numerosas figuras mitóticas y células con cariólisis y cariorrexis.

Además de los elementos descritos, existen grandes cavidades quísticas, formadas tanto por los conductos dilatados como por la formación de acinis quísticos (Fig. 26).

También hemos observado un aumento evidente en la cantidad de estroma donde aparecen varios focos inflamatorios. Las células inflamatorias en algunas áreas eran exclusivamente linfocitos y en otras zonas sólo polimorfonucleares neutrófilos, concretamente en zonas de desintegración tisular. En los tipos histológicos anteriormente descritos no se apreció la existencia de un estroma inflamatorio.

Encontramos un 8% de adenocarcinomas, perteneciendo la mitad de ellos al grupo de desarrollo tumoral de 1 mes, y la otra mitad al grupo de desarrollo tumoral de 2 meses (Fig. 17 y Tabla XVII).

### **CARCINOMA DE CÉLULAS SEBÁCEAS ESCAMOSAS**

En este tipo tumoral no se observaron apenas formaciones quísticas. Se caracteriza por la presencia de células sebáceas atípicas, normalmente sin estructura glandular ni conductos, que sufren focalmente una metaplasia escamosa con cambios de malignidad. Las células son pleomórficas y se observan muchas mitosis (Fig. 27).

En las zonas de metaplasia escamosa con caracteres de malignidad, las células tumorales se disponen de forma semejante al epitelio de la epidermis. En las células más diferenciadas aparecen gránulos de queratohialina, y en algunas zonas podemos apreciar también una marcada paraqueratosis y formación de globos córneos. Entre las formaciones escamosas aparecen, en ocasiones, grupos aislados de células sebáceas. También, hemos observado queratinización individual o en pequeños grupos, en células disqueratósicas grandes y redondeadas, con citoplasma muy eosinofílico y núcleo hiper cromático (Figs. 28 y 29).

El estroma es frecuentemente muy activo con una intensa proliferación de fibroblastos, a veces atípicos. Presenta una inflamación crónica difusa con células plasmáticas y linfocitos. En algunas áreas de intensa destrucción tisular aparece un exudado rico en neutrófilos que llega a formar verdaderos microabscesos, con degeneración hidrópica en las células epiteliales adyacentes.

Este tumor tiene carácter invasivo, pues infiltra las masas musculares adyacentes, glándulas salivales y, en uno de los casos, incluso afectó al cerebro.

Encontramos un 40% de carcinomas sebáceos escamosos, siendo por tanto, el grupo más numeroso. Se repartieron de la siguiente manera, un 10% en el grupo de desarrollo tumoral de 1 mes, un 50% en el de 2 meses, y un 40% en el de 3 meses (Fig. 17 y Tabla XVII).

## **CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

Existió una sola neoplasia que se diagnosticó como carcinoma de células escamosas, en la que no se encontraron células sebáceas tumorales. Está íntegramente formada por células epiteliales escamosas atípicas con una intensa y característica producción de queratina. Las células neoplásicas presentan los núcleos irregulares y picnóticos (Fig. 30). Este tumor tiene un carácter muy invasivo, pues crece infiltrando tejidos próximos como el tejido muscular, las glándulas salivales y el tejido nervioso. Encontramos un sólo tumor perteneciente a este grupo, y se sitúa dentro de los tumores de desarrollo tumoral de 3 meses (Fig. 17 y Tabla XVII).

En el animal que presentó este tipo de tumor, la glándula de Zymbal mantiene su localización normal y una estructura, más o menos conservada, aunque muestra severas dilataciones quísticas.

Por todo ello, el origen de este tumor parece ser el conducto excretor principal. Además este tumor se abre al conducto auditivo externo que aparece histológicamente normal.

### **IV.3.3.5.- TECNICAS HISTOQUÍMICAS**

Tanto la glándula normal como las hiperplasias y neoplasias sebáceas presentaron una secreción positiva al Sudan III. No presentó secreción positiva

al Sudan III el único caso de carcinoma de células escamosas.

Describimos a continuación la tinción histoquímica con las diferentes lectinas:

### **Con A**

La Concanavalina A (Con A), es una lectina que se une al azúcar terminal glucosa/manosa, de las cadenas de carbohidratos.

En las glándulas normales, hiperplasias y adenomas, las células positivas a la Con A han sido prácticamente las mismas: por un lado, el epitelio del conducto auditivo externo y las glándulas sebáceas de la pared anterior y posterior y por otro, tanto las glándulas hiperplásicas como los adenomas, no solo las células diferenciadas sino también las células basales (Fig. 31). Así mismo han sido positivas las células de los conductos excretores.

En los adenocarcinomas, las células sebáceas más diferenciadas se han teñido ligeramente, mientras que las más inmaduras eran negativas. En los conductos son positivas las capas más maduras, sobre todo la queratinizadas, siendo negativas las basales. La tinción no es homogénea pues en las paredes de estos conductos existen algunas células queratinizadas individuales más positivas que el resto.

En los carcinomas sebáceos escamosos, podemos observar que las células

sebáceas maduras son positivas con la Con A (Fig. 32), siendo negativas aquellas que presentan los caracteres típicos de células indiferenciadas. En las áreas de metaplasia escamosa ocurre lo mismo, solo las capas más diferenciadas son positivas. La tinción es más intensa en las células sebáceas maduras que en las células escamosas más diferenciadas (Fig. 33).

En el único carcinoma escamoso encontrado, la mayoría de las células son negativas, pues son completamente anaplásicas, siendo sólo positivas las capas queratinizadas.

### WGA

La lectina *Triticum vulgare* (WGA), se une al azúcar terminal N-acetilglucosamina.

El epitelio del conducto auditivo externo es positivo también en sus capas superiores, menos en la capa córnea. El conducto excretor principal tiene positividad en la capa superior por debajo del estrato córneo, siendo negativas las células basales.

Una vez más, el patrón de tinción de la glándula normal, de las hiperplasias y de los adenomas sebáceos ha sido semejante respecto a la tinción con WGA: las células sebáceas se han teñido en su membrana celular siendo todas positivas, aunque con menor intensidad que con Con A.

En cuanto al resto de los tumores, todos presentan en general, las mismas características: la porción glandular de adenocarcinomas y los carcinomas sebáceos escamosos, solo se tiñen con WGA las células sebáceas maduras, con poca intensidad y siguiendo un patrón de membrana. Cuanto más anaplásico es el tumor, las células sebáceas van perdiendo tinción, llegando a desaparecer, por ejemplo, en aquellos tumores de desarrollo tumoral de más de tres meses. Las células tumorales escamosas de carcinomas sebáceos escamosos y en el carcinoma escamoso, las capas intermedias son positivas para esta lectina (Fig. 34), siendo negativos, las capas basales y la capa córnea. Existe también diferente intensidad de tinción en poblaciones celulares heterogéneas (Fig. 35). Como excepción las zonas con paraqueratosis, muestran una fuerte positividad.

### **PNA**

La lectina *Arachis hypogaea* (PNA), se une al azúcar terminal N-acetilgalactosamina/galactosa.

Las glándulas sebáceas normales, incluyendo el conducto auditivo externo, las hiperplasias y adenomas son positivos con PNA, por lo que esta lectina es un buen marcador de células sebáceas normales, aunque en las hiperplasias y adenomas la intensidad de tinción es menor (Fig. 36).

Así mismo, se tiñen todas las células sebáceas de adenocarcinomas y carcinomas sebáceos escamosos. En las zonas de células escamosas, son positivas las capas basales, y negativas las capas intermedia y córnea (Fig. 37).

El carcinoma escamoso que es el tumor más anaplásico encontrado, solo existe tinción en algunas células de la capa basal.

### UEA-I

El Ulex Europeus (UEA-1), se une al azúcar terminal L-fucosa.

El UEA-I es positivo en el conducto auditivo externo y en general es un buen marcador de células sebáceas. Además, tanto las hiperplasias como los adenomas han sido fuertemente positivos a la tinción con esta lectina (Fig. 38).

En los adenocarcinomas presentan positividad las células sebáceas maduras y las células epiteliales de los conductos (Fig. 39).

En los carcinomas sebáceos escamosos, las zonas escamosas tumorales presentan las capas intermedias fuertemente positivas, siendo negativos los estratos basal y córneo. En algunos casos en los que la metaplasia escamosa fue poco anaplásica, algunas capas basales dieron positivo con esta lectina. Sólo las células sebáceas tumorales más maduras se tiñen con esta lectina, pero con menor intensidad con respecto a las glándulas normales y en los tipos anteriores (Fig. 40).

En el carcinoma escamoso, solo fueron ligeramente positivas algunas células de las capas superiores y las células paraqueratósicas.

Todos los resultados histoquímicos obtenidos con Lectinas estan esquematizados en la Tabla XVIII.

#### IV.3.3.6.- INMUNOHISTOQUÍMICA

A continuación describimos los resultados referentes a la detección de citoqueratinas.

#### **CITOQUERATINA POLICLONAL DE AMPLIO ESPECTRO (CK PAE)**

Con este anticuerpo policlonal de amplio espectro se observó positividad en las glándulas sebáceas de la pared anterior y posterior, y en la glándula principal de Zymbal, así como en el epitelio del conducto auditivo externo.

En los adenomas e hiperplasias, no ha variado la tinción con respecto a la de la glándula de Zymbal normal.

En adenocarcinomas y carcinomas sebáceos escamosos también hemos comprobado la positividad a esta citoqueratina en las células sebáceas. En las zonas tumorales escamosas todas las células han sido positivas, incluso las células más inmaduras. Solo en el carcinoma escamoso, las células más anaplásicas han sido negativas (Fig. 41).

### **CITOQUERATINA MONOCLONAL AMPLIO ESPECTRO (CK MAE)**

Esta CK, ha presentado positividad sobretudo en las células basales de glándulas sebáceas normales, hiperplasias y adenomas, así como en el epitelio del conducto auditivo externo (Fig. 42). En los carcinomas sebáceos escamosos, las células sebáceas han sido ligeramente positivas así como todas las células con diferenciación escamosa. En el carcinoma escamoso todas las células han presentado inmunotinción.

### **CITOQUERATINA DE ALTO PESO MOLECULAR (CK-APM)**

También detectamos esta CK en el epitelio del C.A.E. Pero todas las células sebáceas, ya sean de glándulas normales o alteradas, han sido negativas.

En los adenocarcinomas, carcinomas sebáceos escamosos y carcinomas escamosos, la CK APM en las zonas tumorales escamosas, ha sido negativa en las capas basales indiferenciadas (Fig. 43); la capa intermedia ha sido positiva y el estrato córneo ha sido negativo. Esta citoqueratina, en general, ha presentado una tinción de poca intensidad (Fig. 44).

### **CITOQUERATINA 1 (CK-1)**

En las estructuras normales, sólo apareció CK 1 en el C.A.E. con una marcada positividad (Fig. 45), ya que, tanto las glándulas sebáceas de la pared anterior y posterior, como la glándula de Zymbal normal, hiperplásica o adeno-

matosa no han presentado positividad a esta citoqueratina, aunque, excepcionalmente, alguna células maduras han mostrado una ligera tinción.

Como era de esperar, en los adenocarcinomas, carcinomas sebáceos escamosos y carcinoma escamoso, la CK-1 no es positiva en las células sebáceas. En las zonas tumorales escamosas, las capas basales han sido negativas y se ha revelado una fuerte positividad a esta citoqueratina en la capa intermedia (Fig. 46). En la capa superficial córnea la expresión de CK 1 se observaron zonas negativas junto a otras fuertemente teñidas.

#### **CITOQUERATINA 4 (CK-4)**

En el conducto auditivo externo, hemos observado una ligera positividad a esta CK. Pero, sin embargo, es la CK que ha presentado mayor positividad en las células sebáceas, tanto normales como hiperplásicas o tumorales (Fig. 47). Las formaciones escamosas tumorales también han sido positivas en sus capas más superficiales, presentando una tinción uniforme. La capa córnea ha sido negativa. En el carcinoma escamoso muy pocas células han expresado esta CK.

#### **CITOQUERATINA 8-18 (CK 8-18)**

Esta citoqueratina, típica de epitelios simples y glandulares según la bibliografía consultada, ha presentado una tinción negativa para el conducto auditivo externo, una débil positividad en las glándulas sebáceas normales, hiperplásicas y adenomatosas, así como en los carcinomas sebáceos escamosos y adenocarcinomas, incluso en las zonas de diferenciación escamosa, en las que

se han teñido ligeramente las capas intermedias y superficiales (Fig. 48). La tinción ha sido uniforme y difusa.

### **CITOQUERATINA 10-11 (CK 10-11)**

Todas las estructuras de las glándulas sebáceas normales, hiperplasias y adenomas se han teñido con esta citoqueratina, en los adenocarcinomas y carcinomas de células sebáceas, las células sebáceas tumorales presentan inmunotinción con distinta intensidad entre sí (Fig. 49). En el conducto auditivo externo y en las células de las capas intermedias y superficiales de las zonas tumorales escamosas, tanto de los carcinomas sebáceos escamosos, como del carcinoma escamoso son positivas (Fig. 50) y la tinción también ha mostrado distinta intensidad, encontrándonos células fuertemente teñidas junto a otras de positividad muy débil.

### **CITOQUERATINA 14 (CK 14)**

El conducto auditivo externo presenta una positividad media a esta CK, así como las células sebáceas de glándulas normales, hiperplasias y adenomas que estan en contacto con la membrana basal siendo el resto de las células negativas (Fig. 51). En los adenocarcinomas y en las células sebáceas tumorales han sido ligeramente positivas; así mismo, las capas intermedias y córneas de las zonas escamosas han presentado CK 14. En el carcinoma escamoso solo han presentado positividad las capas córneas.

**V.- TABLAS E  
ICONOGRAFÍA**

INCIDENCIA TUMORAL (T. mama)		
DIAS	RATAS AFECTADAS	PORCENTAJE
24	1	2.5%
36	12	30%
48	23	57.5%
60	26	65%
96	30	75%
108	31	77.5%
120	36	90%
132	37	92.5%
156	39	97.5%
286	40	100%

TABLA I. Porcentaje de animales afectados por tumores de mama.

Nº TUMORES DE MAMA POR RATA		
MEDIA ARITMETICA	4.275	LIMITE INFERIOR 3.5435
		LIMITE SUPERIOR 5.0065
DESVIACION TIPICA	2.2896	LIMITE INFERIOR 1.8815
		LIMITE SUPERIOR 2.9637

TABLA II. Media de tumores mamarios por animal.

INCIDENCIA TUMORAL (T. Zymbal)		
DIAS	RATAS AFECTADAS	PORCENTAJE
156	1	5.5%
168	3	16.6%
192	3	16.6%
250	7	38.8%
274	9	50%
286	11	61.1%
298	12	66.6%
332	13	72.2%
356	17	94.4%
380	18	100%

TABLA III: Grupo de animales afectados por tumores de Zymbal. Incidencia tumoral.

EVOLUCION DEL PESO (GRAMOS)			
DIAS	RATAS CON TUMORES DE ZYMBAL	RATAS SIN TUMORES DE ZYMBAL	CONTROLES
1	197.3	189.2	193.3
36	276.7	264.1	290.2
108	345.0	332.4	348
156	291.9	297.1	295.3
192	331.1	308.1	319.6
214	347.9	338.1	313.2
262	350.1	319.7	310.3
310	413.9	385.2	333.6
344	498.2	484.4	343
380	525	---	358.2

TABLA IV. Evolución de la media del peso de los animales a lo largo de la experiencia.

PESO TERMINAL DE LOS ANIMALES SIN TUMORES DE ZYMBAL			
PESO DE LOS TUMORES DE MAMA			
RATA	PESO(gr.)	PESO TUMORES	% PESO TUMORAL
2	218.8	22.2	10.4
3	360.1	47.7	13.24
4	340	59.8	17.5
5	394.7	194	49.1
6	320.3	85.6	26.7
7	770	594.3	77.1
8	364.8	74	20.27
9	397.1	135.9	34.2
11	310.2	158	50.9
12	198.1	20.3	10.2
14	757.3	747.6	85
16	309.2	177	52.2
20	280.9	159	56.5
21	337.1	80	23.7
23	356	57.1	16.03
26	287.6.3	28.5	9.9
30	351.2	10.9	3.10
33	370	60.7	16.4
36	370.3	60.9	16.1
37	320	57.11	17.8
38	388.2	88.5	22.8
40	370.1	61	16.3

TABLA V. Peso al término de la experiencia de los animales sin tumores de Zymbal.

PESO TERMINAL DE LOS ANIMALES CON TUMORES DE ZYMBAL			
PESO DE LOS TUMORES DE MAMA			
RATA	PESO(gr.)	PESO TUMORES	% PESO TUMORAL
1	620	308.9	49.8
10	330.1	73.7	22.3
13	558.2	252.3	45.2
15	581.9	189.2	32.5
17	364.8	104	28.4
18	446.2	8.28	1.9
19	408.7	231.7	51.9
22	550.3	37.4	91
24	497.9	444.2	80.7
25	402.6	344	69.07
27	392	66.2	16.04
28	382.1	30	7.6
29	655.2	118.8	31.09
31	514.02	145.4	22.1
32	390.2	146.6	28.1
34	275.6	136.8	35.07
35	270.1	120	44.4
39	148.6	148.6	30.02

TABLA VI. Peso al término de la experiencia de los animales con tumores de Zymbal, y de los tumores mamarios.

SUPERVIVENCIA DE RATAS SIN TUMORES DE ZYMBAL			
DIAS	SUCESOS	PR. SUPERV.	VIVOS
89	1	0.95455	21
91	1	0.90909	20
121	1	0.86634	19
132	1	0.81818	18
144	1	0.77273	17
153	1	0.72727	16
171	1	0.68182	15
192	1	0.63636	14
193	1	0.59091	13
197	3	0.45455	10
208	1	0.40909	9
212	1	0.36364	8
216	1	0.31818	7
221	1	0.27273	6
223	1	0.22727	5
241	1	0.18182	4
268	1	0.13636	3
323	1	0.09090	2
365	1	0.04545	1
369	1	0	0

TOTAL CASOS: 22

TABLA VII. Supervivencia del grupo de animales que no tuvieron tumores de Zymbal.

SUPERVIVENCIA DE RATAS CON TUMORES DE ZYMBAL				
DIAS	SUCESOS	INCOMPLETOS	PR. SUPERV.	VIVOS
243	1	0	0.94444	17
262	1	0	0.88889	16
279	1	0	0.08333	15
294	1	2	0.76923	12
319	1	2	0.69231	9
338	1	1	0.60577	7
342	1	0	0.51923	6
347	1	0	0.43269	5
375	1	1	0.32452	3
380	1	0	0.21635	2
386	1	0	0.10817	1
TOTAL CASOS: 18		INCOMPLETOS: 7	COMPLETOS: 11	

TABLA VIII. Supervivencia del grupo de animales con tumores de Zymbal. Análisis de supervivencia Kaplan-Meier (datos incompletos: sacrificios).

COMPARACION DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA LOGRANK				
GRUPO	TAMAÑO	OBSERVADOS	ESPERADOS	(O-E) <sup>2</sup> /E
CON TUMOR	18	11	23.1168	6.3511
SIN TUMOR	22	22	9.8832	14.8552
TOTAL	40	33	---	21.2063

SIGNIFICATIVO ( $p < 0.001$ )

TABLA IX. Comparación de las curvas de supervivencia de los animales con tumores de Zymbal, y sin ellos, según el método Logrank.

DIAS DE SUPERVIVENCIA RATAS CON METASTASIS PULMONAR-SIN METASTASIS PULMONAR COMPARACION DE MEDIAS			
GRUPO	MEDIA	DESV. TIPICA	TOTAL CASOS
CON METASTASIS	274.7	66.0405	10
SIN METASTASIS	233.087	92.742	23

NO SIGNIFICATIVO ( $p = 0.21016$ )

TABLA X. Comparación de las medias de los días de supervivencia de animales con metástasis pulmonar y las que no tienen metástasis pulmonar.

TUMORES DE MAMA MAMA DERECHA- MAMA IZQUIERDA COMPARACION DE MEDIAS			
MAMA	MEDIA	DESV. TIPICA	TOTAL CASOS
DERECHA	2.275	1.3772	40
IZQUIERDA	2	1.3587	40

NO SIGNIFICATIVO P: 0.3714

TABLA XI. Comparación entre las medias de los tumores mamarios que afectan a la cadena mamaria derecha y a la izquierda.

TUMORES DE MAMA MAMA DERECHA-MAMA IZQUIERDA COMPARACION DE PROPORCIONES			
MAMA	FRECUENCIA	TOTAL CASOS	PROPORCION
DERECHA	38	40	95%
IZQUIERDA	34	40	85%

NO SIGNIFICATIVO (P<0.05)

TABLA XII. Comparación del número de tumores de mama que aparecen en la cadena mamaria derecha y los que presenta la cadena mamaria izquierda.

TIPOS HISTOLOGICOS DE LOS TUMORES DE MAMA		
TIPOS HISTOLOGICOS		PORCENTAJE
BENIGNOS	FIBROMAS	6 %
	FIBROADENOMAS	9 %
MALIGNOS	ADENOCARCINOMA "A"	8 %
	ADENOCARCINOMA "B"	56 %
	ADENOCARCINOMA "C"	13 %
	ADENOCARCINOMA "D"	7 %
	FIBROSARCOMA	1 %

TABLA XIII: Tipos histológicos y porcentaje de los tumores de mama.

COMPARACION DE PROPORCIONES TUMORES DE ZYMBAL OIDO DERECHO-OIDO IZQUIERDO			
OIDO	FRECUENCIA	TOTAL CASOS	PROPORCION
DERECHO	12	40	30%
IZQUIERDO	13	40	33%

NO SIGNIFICATIVO ( $P < 0.05$ )

TABLA XIV. Comparación de los oídos afectados por tumores de Zymbal.

VOLUMEN TUMORAL TUMORES DE ZYMBAL					
GRUPO	MEDIA	DES. TIP.	CASOS	MINIMO	MAXIMO
NECROPSIA	0.73513	0.62018	4	0.3351	1.642
1 MES	4.5624	4.6353	5	1.6839	12.7423
2 MESES	7.5097	6.8681	5	1.3907	16.3537
3 MESES	16.5657	9.7786	4	4.188	27.8807

TABLA XV: Volúmenes de los tumores de la glándula de Zymbal ( $\text{cm}^3$ ), en los distintos grupos de desarrollo tumoral.

COMPARACION MULTIPLE DE LAS MEDIAS DE LOS GRUPOS RATAS CON TUMORES DE ZYMBAL			
VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	SIGNIFICATIVO
3 MESES	NECROPSIA	15.8305	P<0.01
3 MESES	1 MES	12.0032	P<0.01
3 MESES	2 MESES	9.056	P<0.01
2 MESES	NECROPSIA	6.7745	P<0.05
2 MESES	1 MES	2.9472	NO
1 MES	NECROPSIA	3.8273	NO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS (Varianza= 14.4267)

TABLA XVI: Comparación de las medias de los volúmenes tumorales de la glándula de Zymbal entre los distintos grupos.

TUMORES DE LA GLANDULA DE ZYMBAL TIPOS HISTOLOGICOS					
GRUPOS	HIPERPLA.	ADENOMA	ADENOCAR.	C.SEB.ESC.	C.ESCA.
NECROPSIA	20%	12%	---	---	---
1 MES	---	16%	4%	4%	---
2 MESES	---	---	4%	20%	---
3 MESES	---	---	---	16%	4%

TABLA XVII: Tipos histológicos de los tumores de la glándula de Zymbal.

LECTINAS					
TIPO HISTOLOGICO		CON A	WGA	PNA	UEA-I
CONDUCTO AUDITIVO	EPITELIO	++	+	++	++
	GL. SEBACEAS	++	+	++	+++
HIPERPLASIAS		++	+	+	++
ADENOMAS		++	+	+	++
ADENO- CARCINOMA	C. INDIFERENCIADAS	-	-	-	-
	C. DIFERENCIADAS	+	+	+	++
CARCINOMA SEBACEO ESCAMOSO	C.SEB.INMADURA	-	-	-	-
	C.SEB.MADURA	++	+	+	+
	CAPA BASAL	-	-	+++	-
	CAPA INTERMEDIA	+	+++	+	+++
	CAPA CORNEA	+	-	-	-
CARCINOMA ESCAMOSO	CAPA BASAL	-	±	±	-
	CAPA CORNEA	+	-	-	±

TABLA XVIII: Resultados obtenidos en los tumores de la glándula de Zymbal con las técnicas histoquímicas de Lectinas. (+ débil, ++ positivo, +++ muy positivo, - negativo)

CITOQUERATINAS									
TIPO HISTOLOGICO		CK PAE	CK MAE	CK APM	CK 1	CK 4	CK 8-18	CK 10-11	CK 14
CONDUCTO AUDITIVO	EPITELIO	+++	++	++	+++	+	-	++	++
	GL. SEBÁCEAS	++	+	-	-	++	+	+	±
HIPERPLASIAS		++	+	-	-	+	+	+	±
ADENOMAS		++	++	-	-	+	+	+	±
ADENO- CARCINOMA	C. INDIFERENCIADA	+	++	-	-	-	-	-	+
	C. DIFERENCIADA	+	+	-	-	+	+	+	+
CARCINOMA SEBÁCEO ESCAMOSO	CEL. SEB. INMADURA	+	+	-	-	-	+	-	-
	CEL. SEB. MADURA	+	+	-	-	+	+	+	+
	CAPA BASAL	+	+	-	-	-	-	-	-
	CAPA INTERMEDIA	++	++	+	+++	+	+	++	++
	CAPA CORNEA	+	+	+	-	-	+	++	+
CARCINOMA ESCAMOSO	CAPA BASAL	+	+	-	-	±	±	±	-
	CAPA CORNEA	+	+	-	±	-	+	+	+

TABLA XIX: Resultados obtenidos de la expresión de las citoqueratinas en los tumores de glándulas de Zymbal.

(- negativo, + débil, ++ positivo, +++ muy positivo)

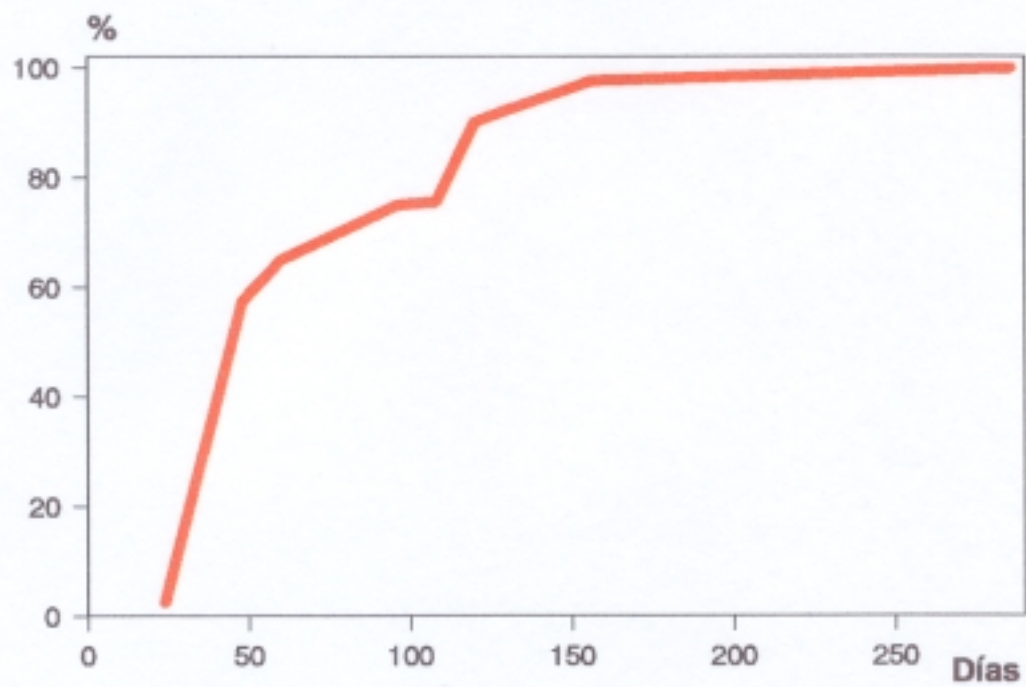


Fig. 1.- Evolución del porcentaje de animales afectados por tumores de mama.

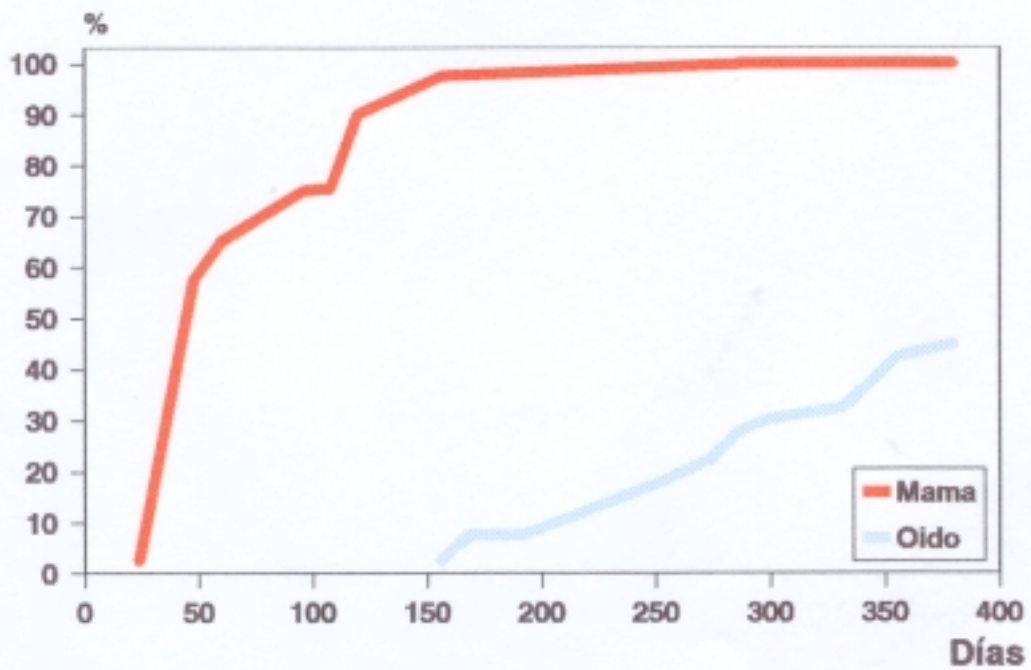


Fig. 2.- Evolución del porcentaje de animales afectados por tumores de mama y el de los afectados por tumores de oído.

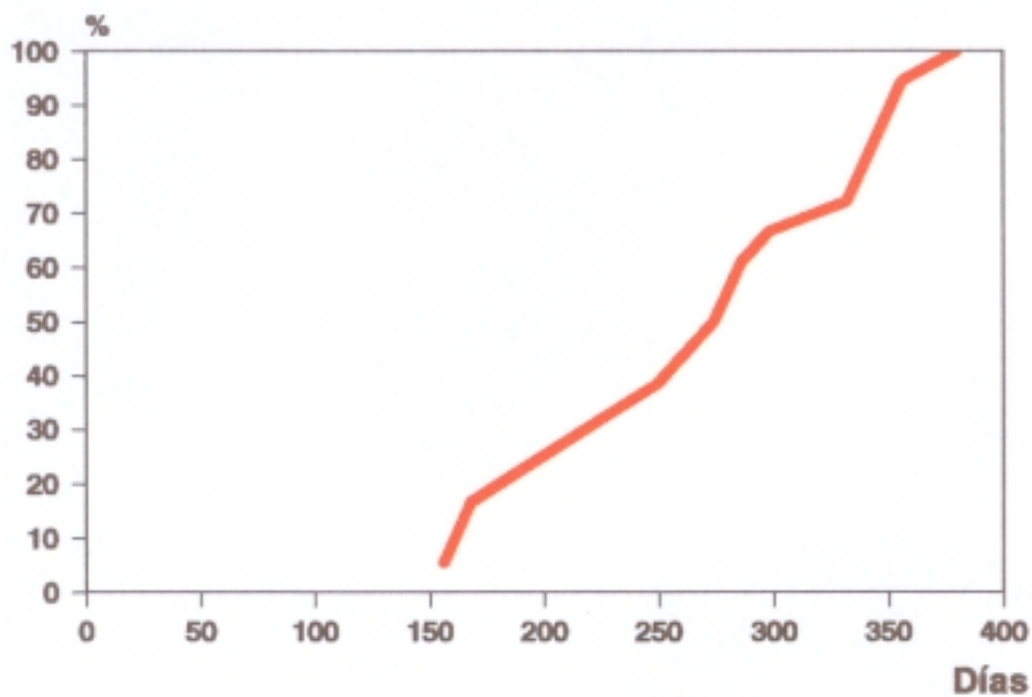


Fig. 3.- Evolución del porcentaje de animales afectados por tumores de Zymbal.

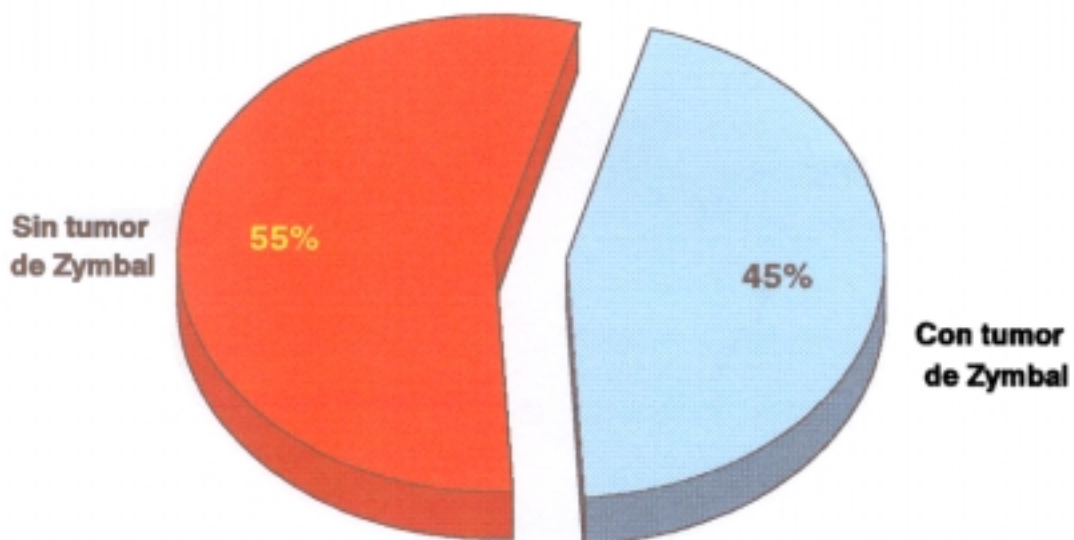
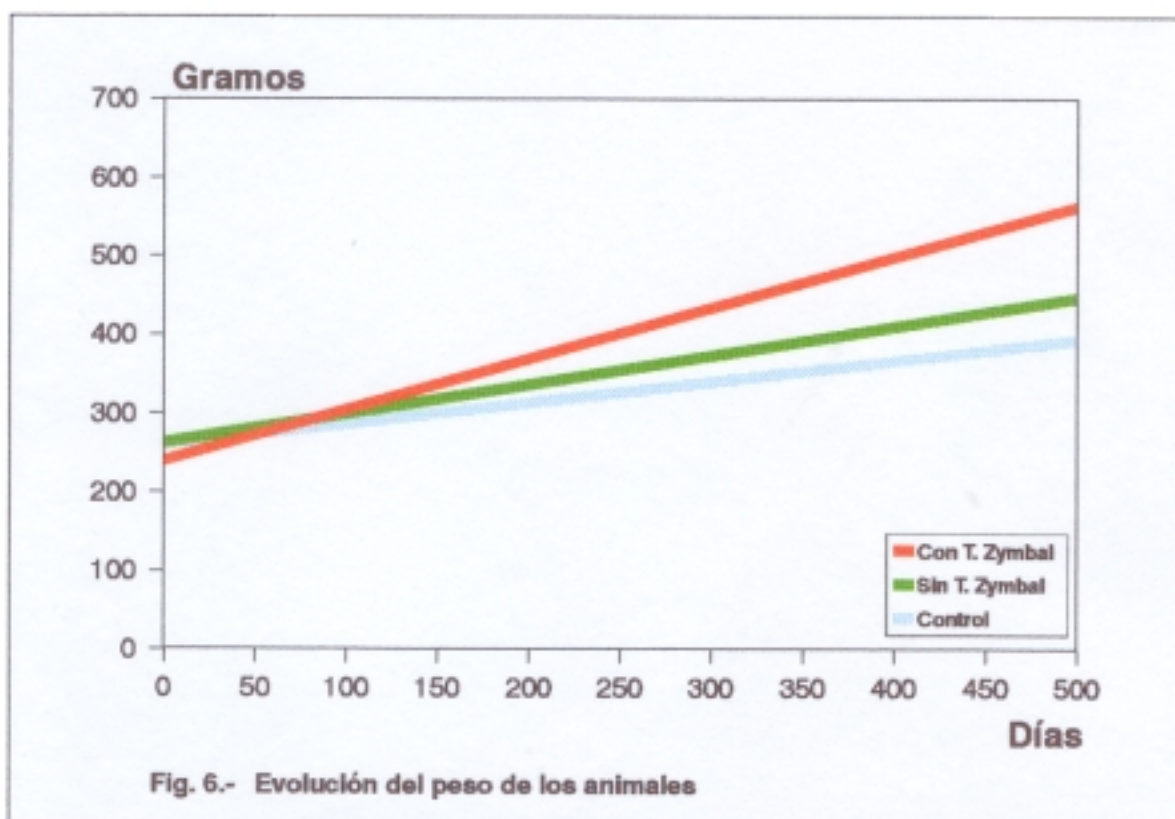
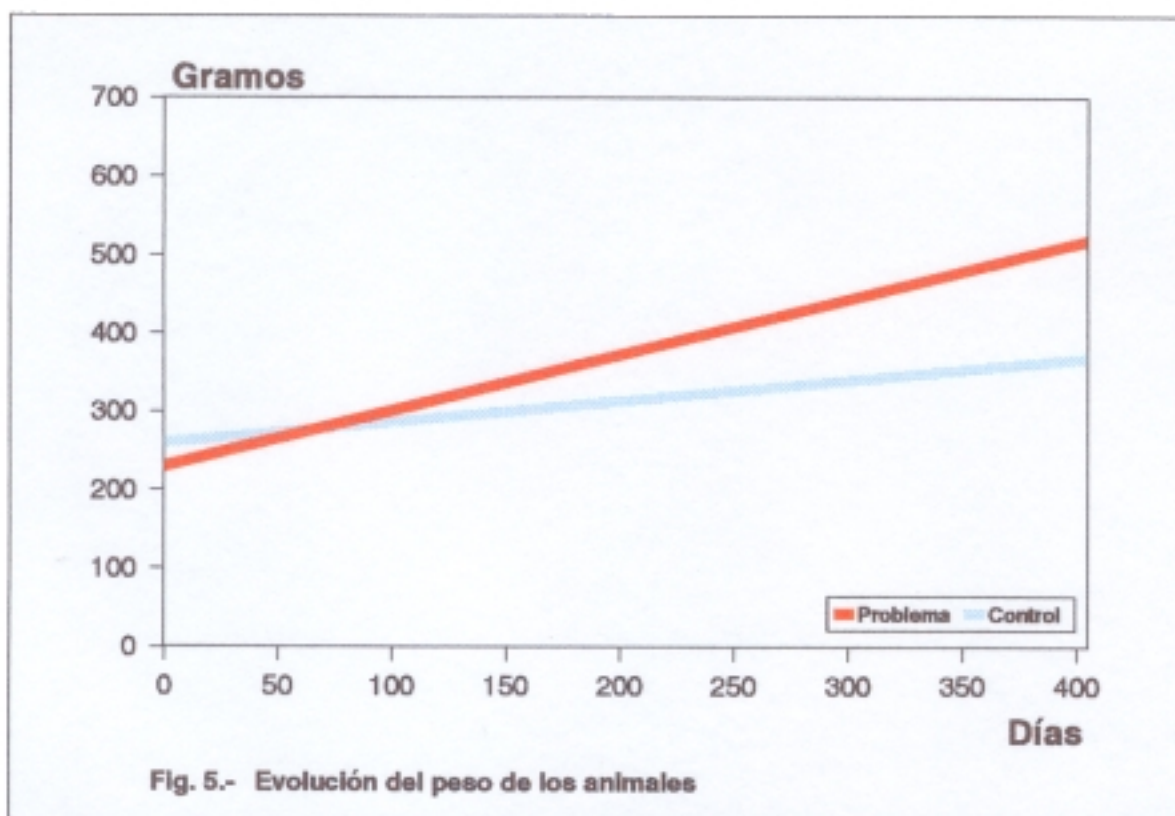
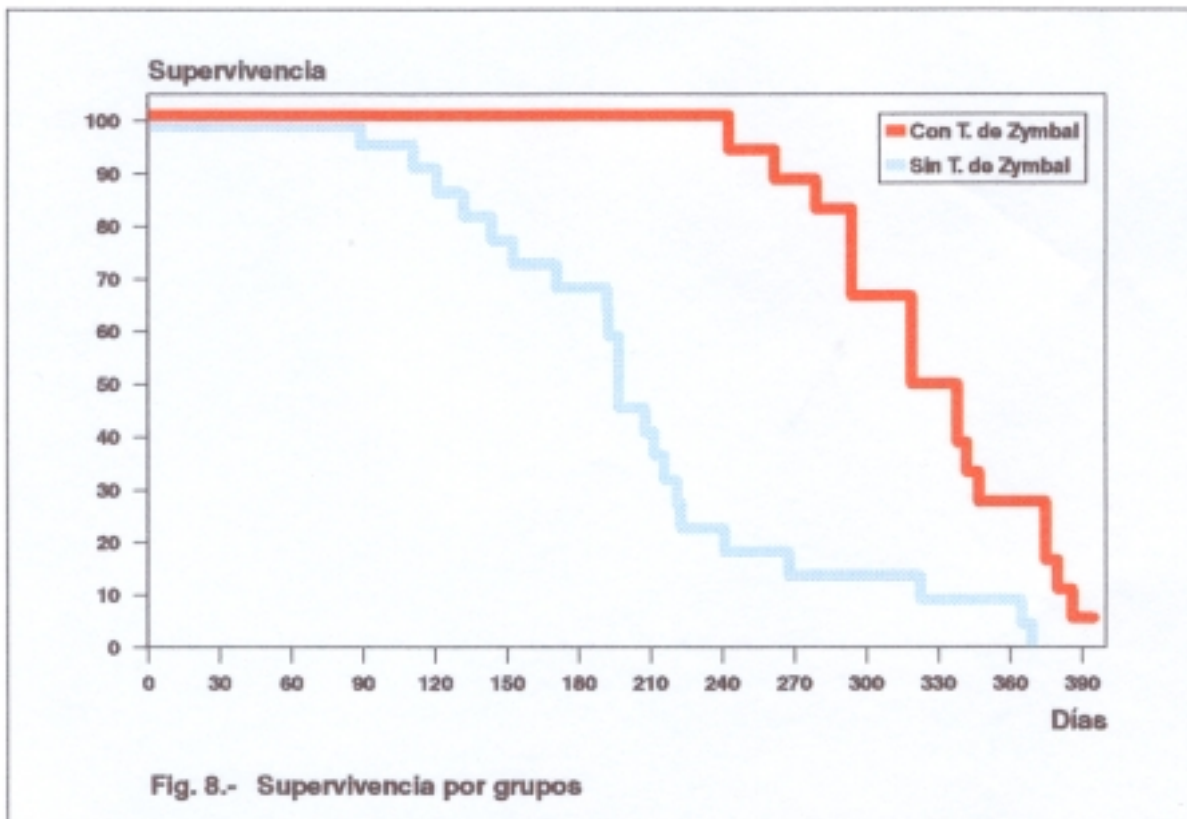
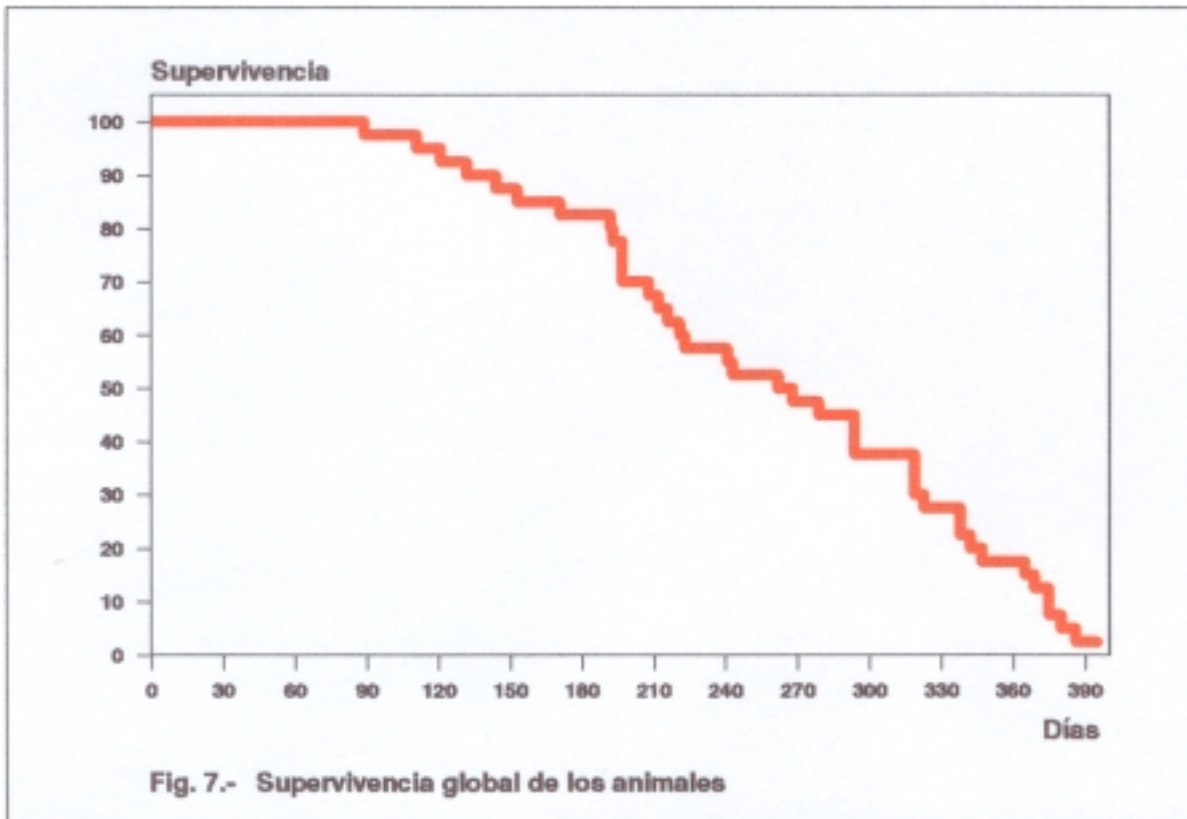
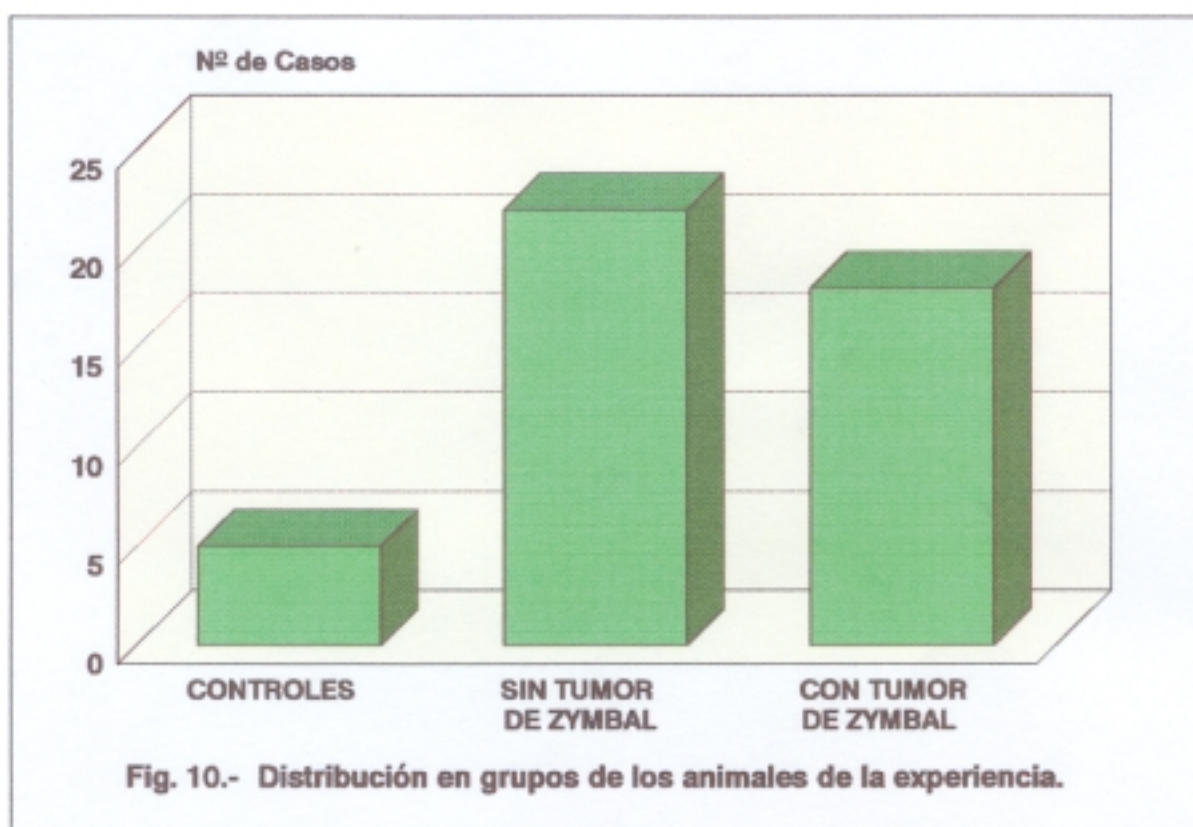
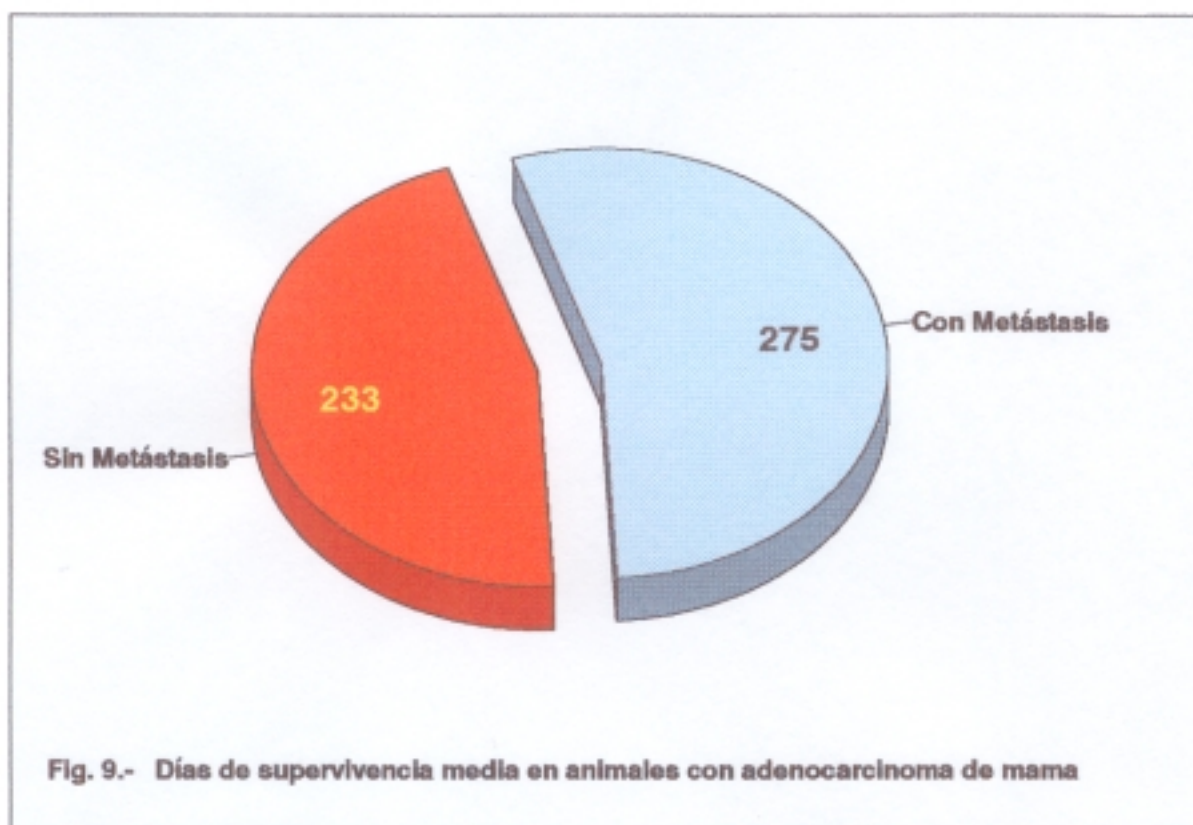


Fig. 4.- Porcentaje de animales afectados por tumores de Zymbal.







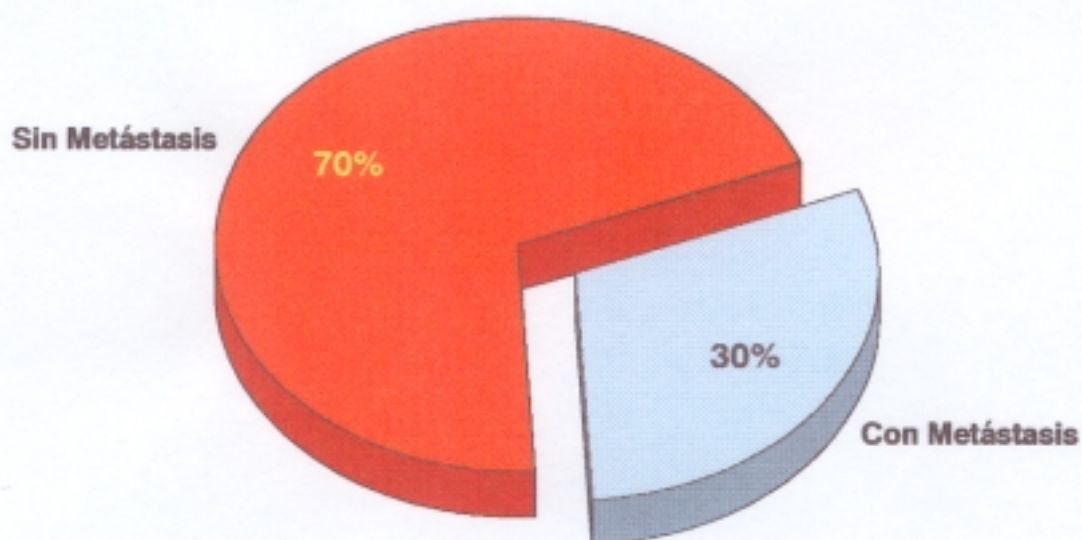


Fig. 11.- Porcentaje de animales con metástasis pulmonar por adenocarcinoma de mama.

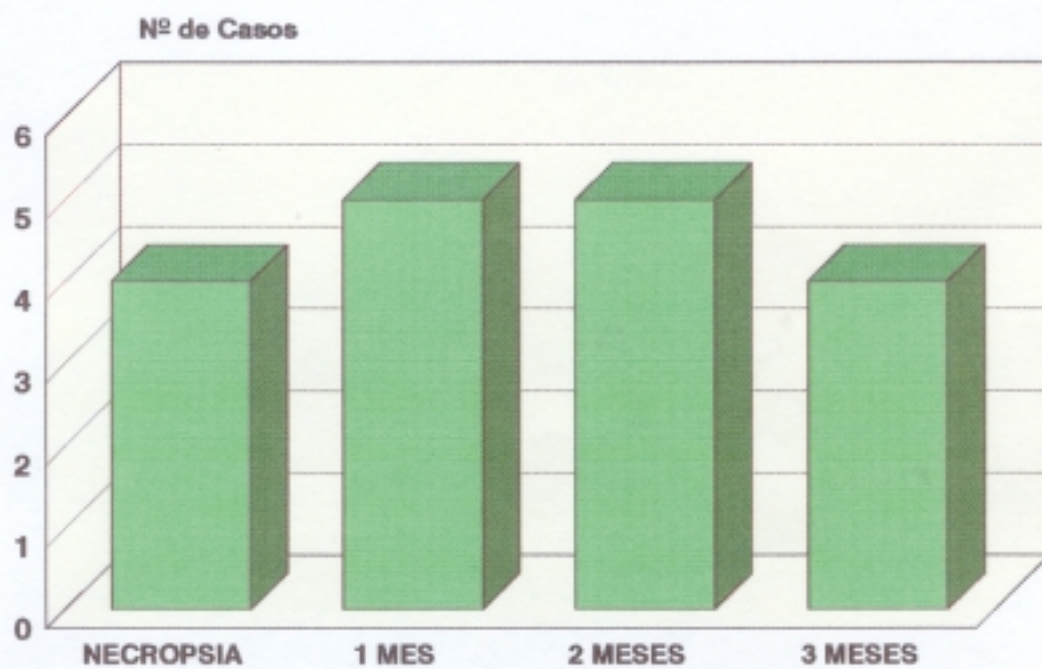
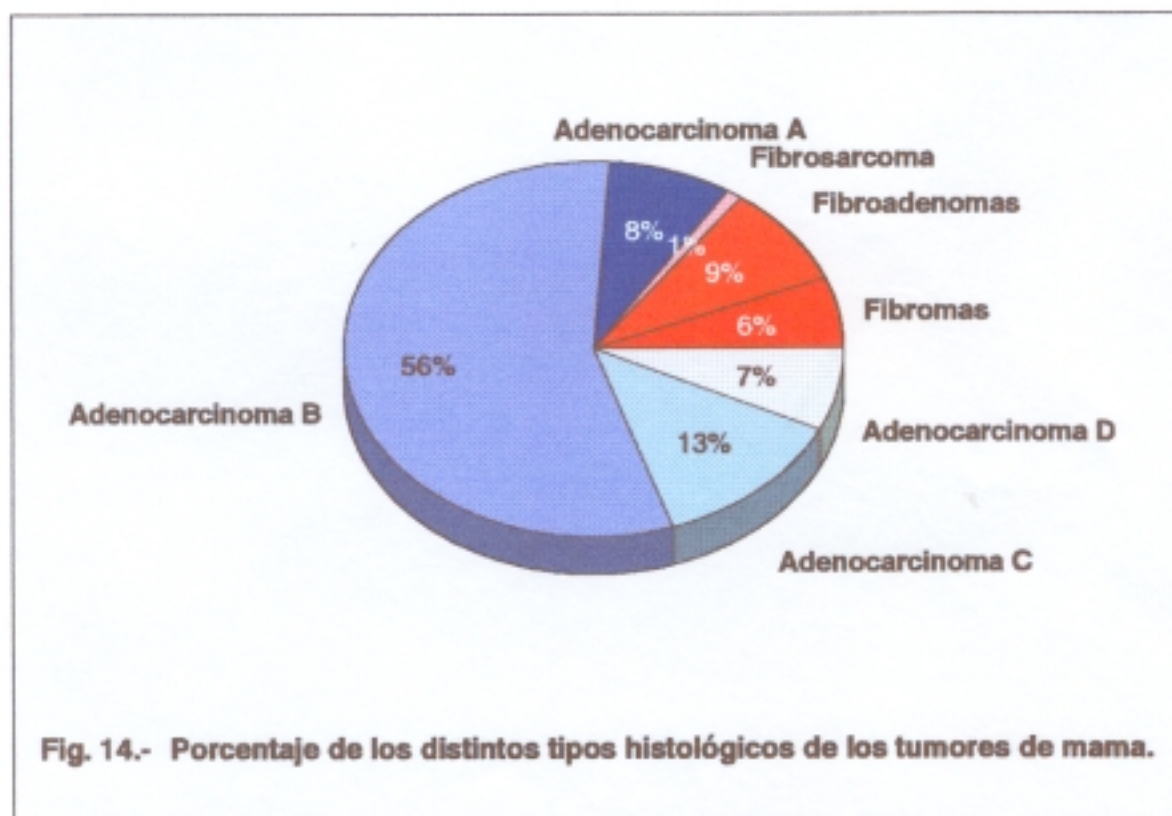
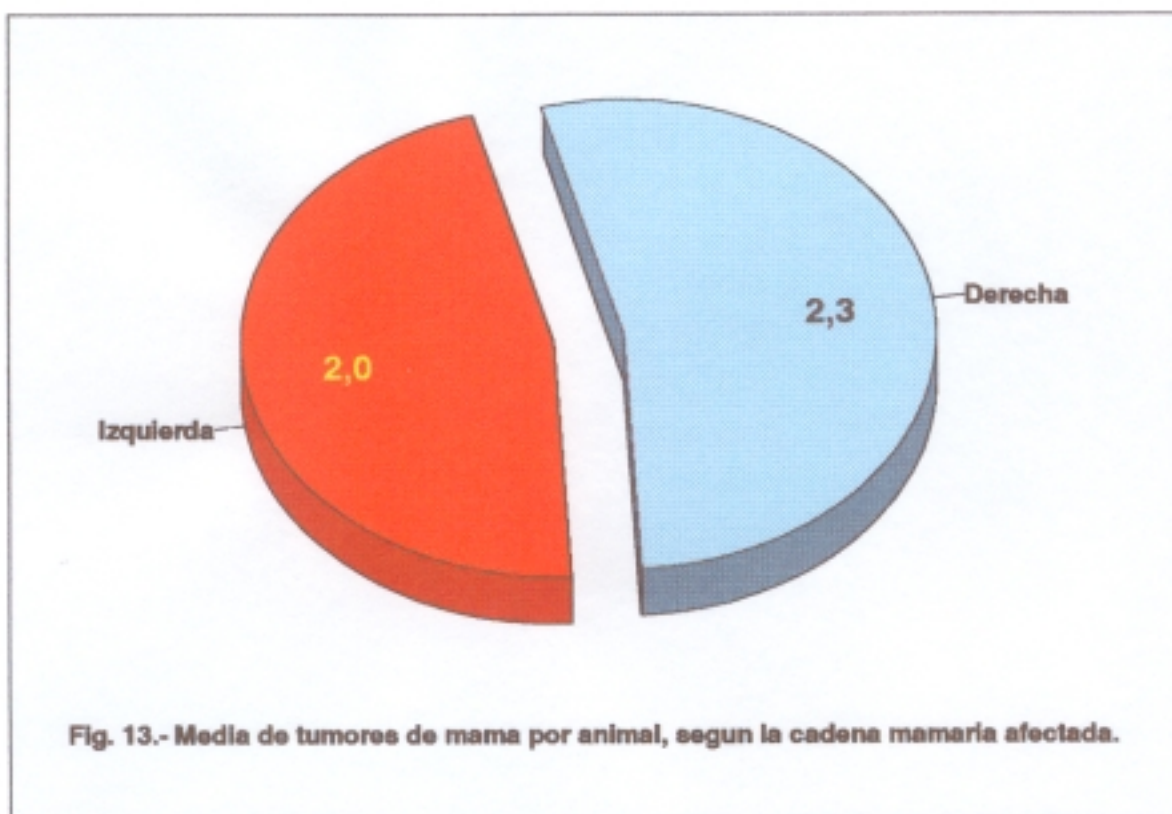
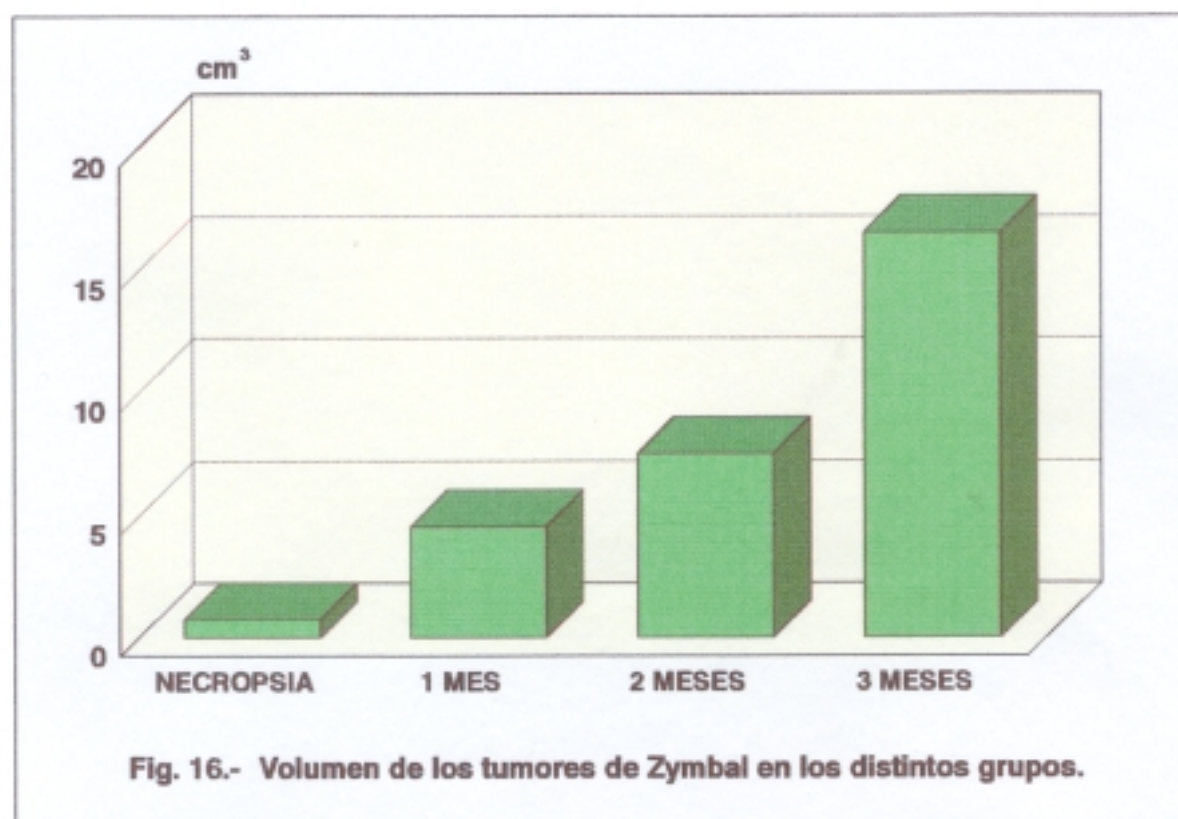
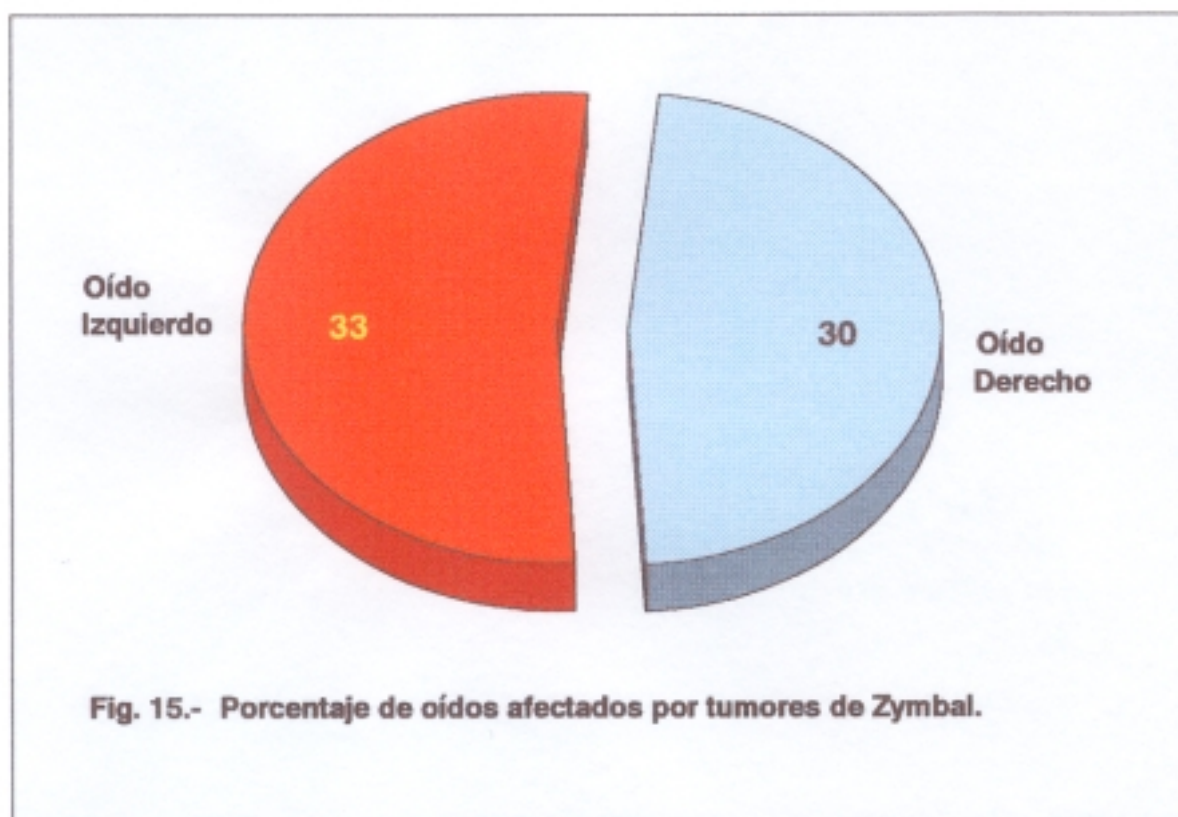
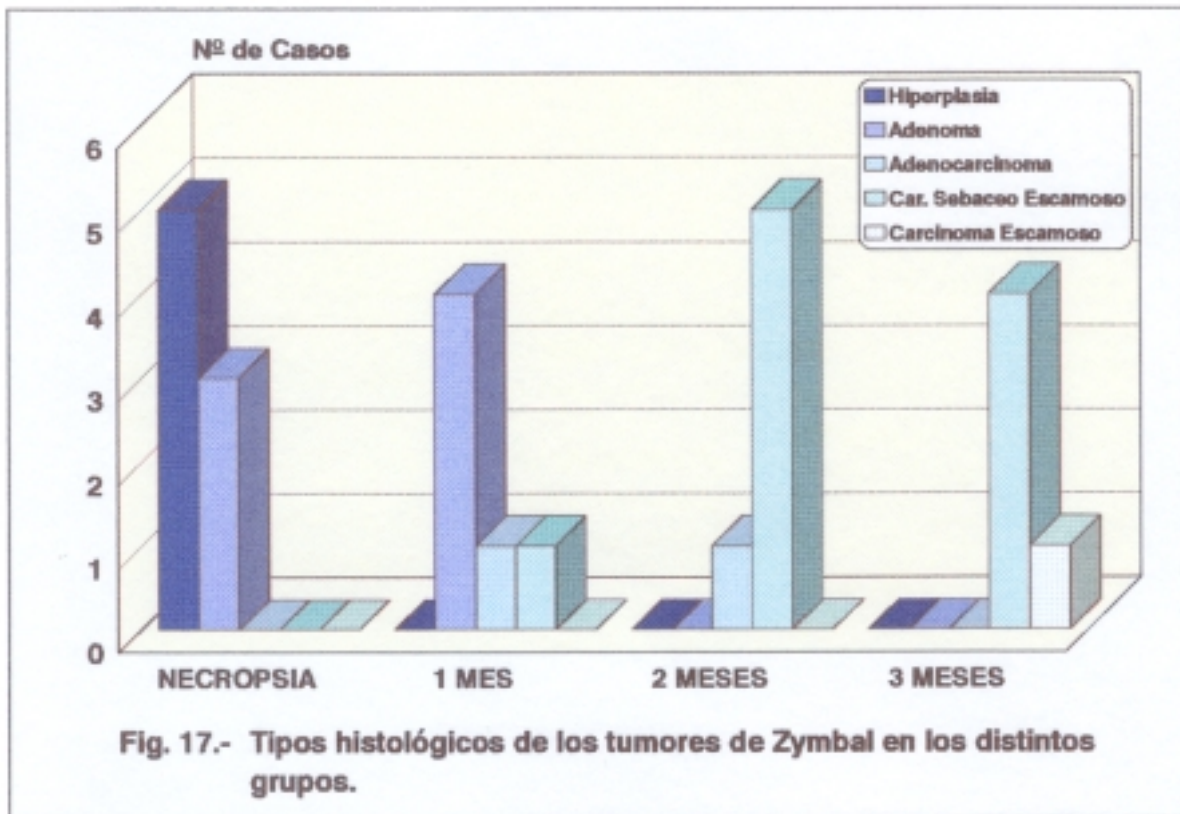


Fig. 12.- Distribución en grupos de los animales con tumores de Zymbal.

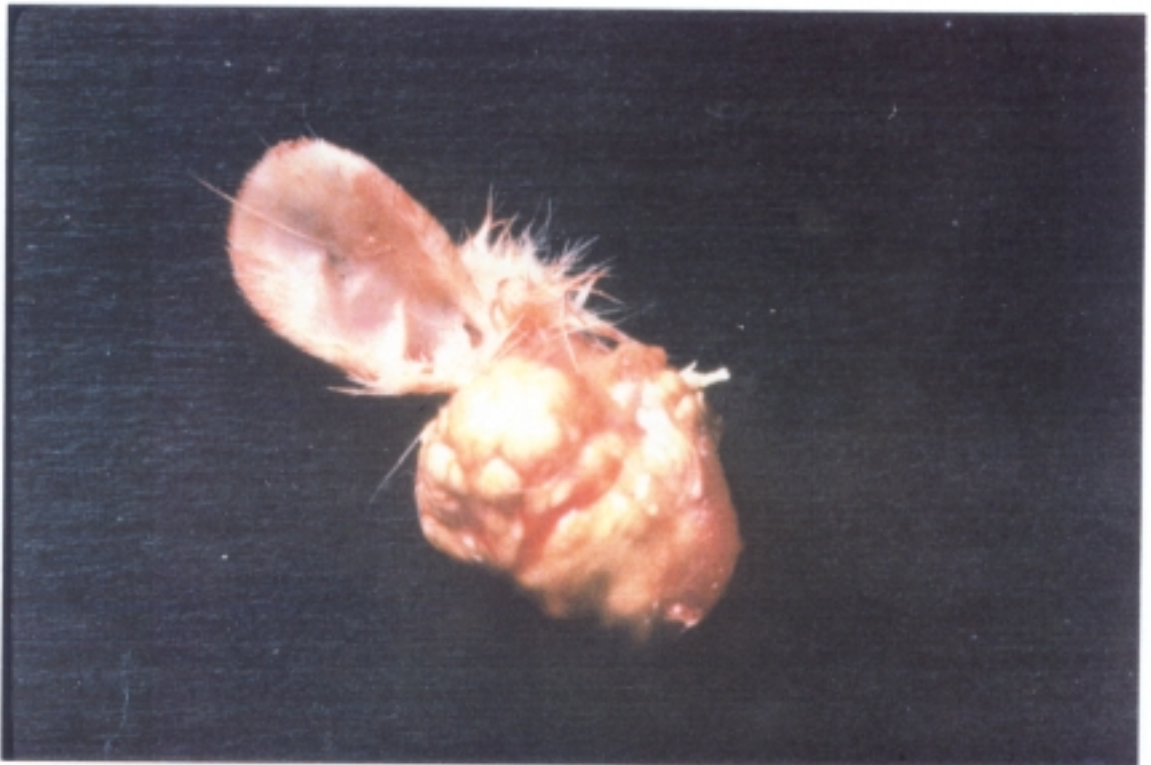








**Fig. 18.- Rata Sprague-Dawley; tumores de la glándula de Zymbal inducidos con DMBA.**



**Fig. 19.- Imagen macroscópica de un tumor de la glándula de Zymbal inducido con DMBA.**

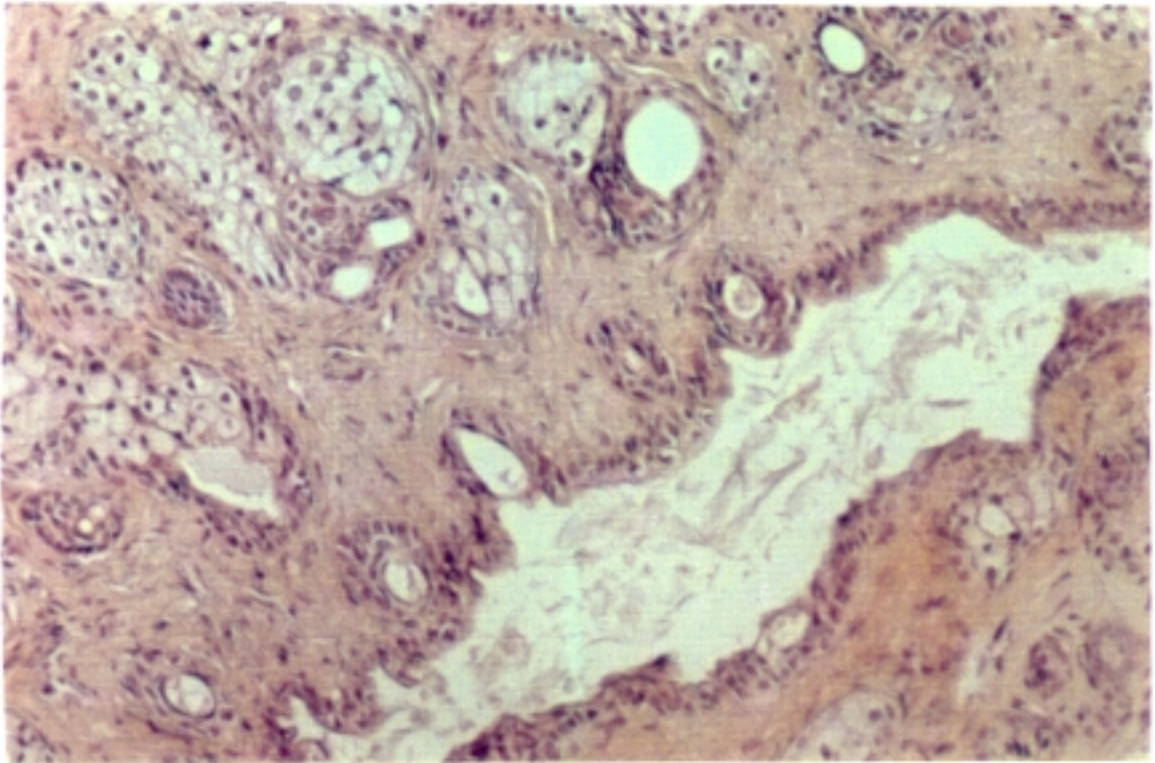


Fig. 20.- Glándulas sebáceas de la pared anterior y posterior del conducto auditivo externo. H&E x150.

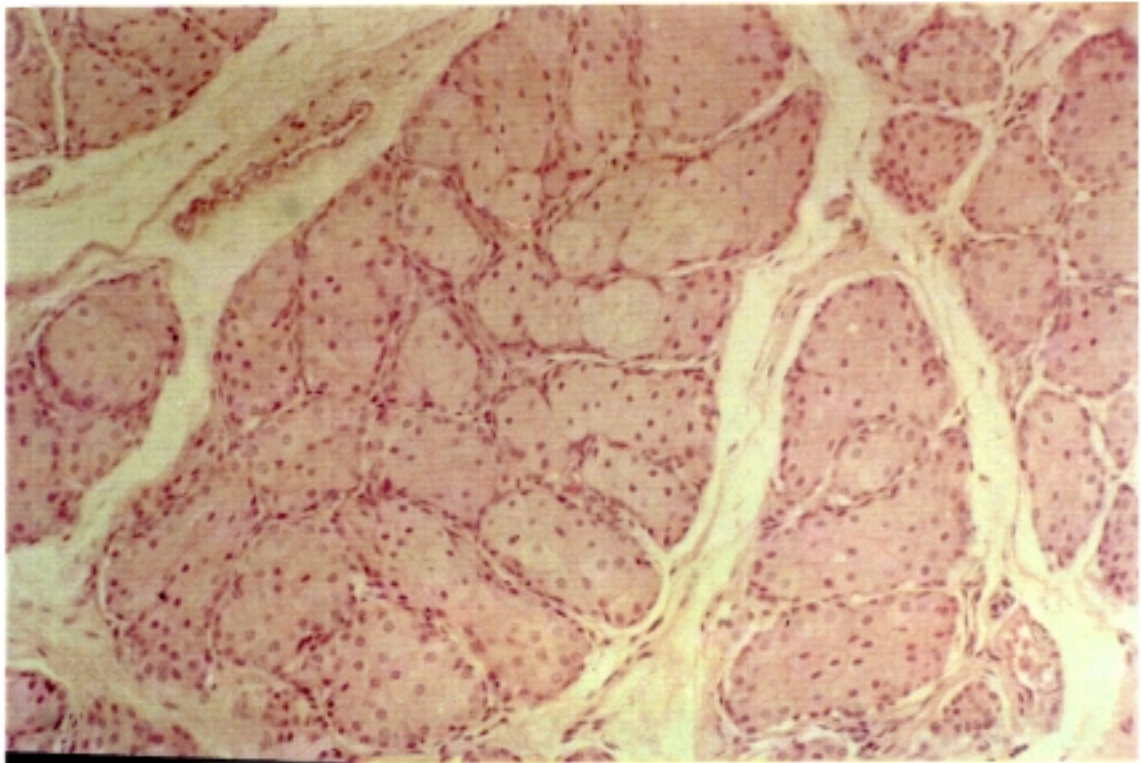
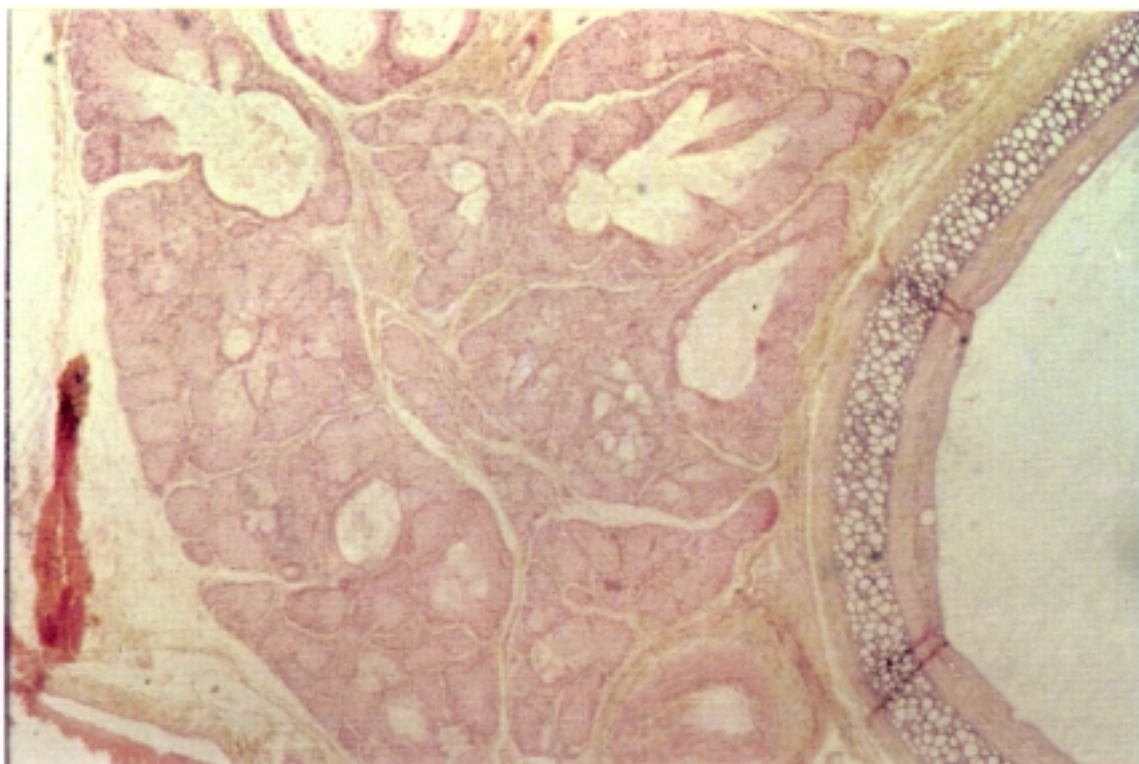
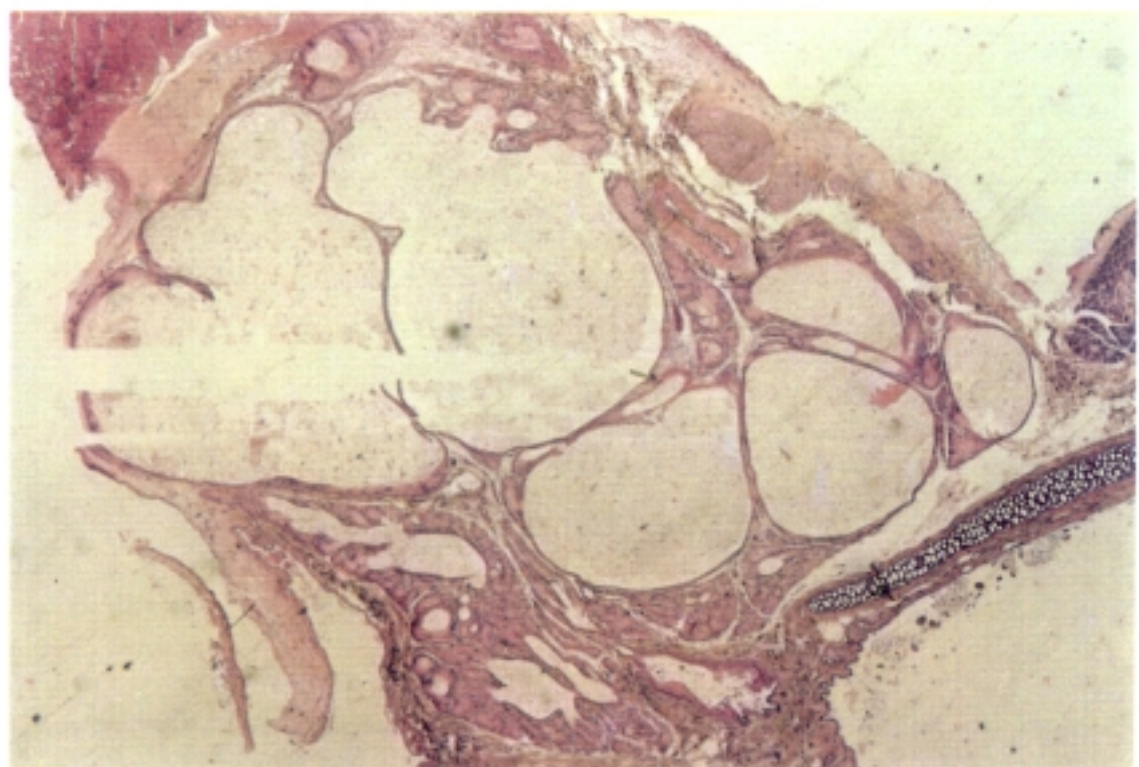


Fig. 21.- Glándula de Zymbal normal. H&E x150.



**Fig. 22.-** Glándula de Zymbal. Dilataciones quísticas iniciales. H&E x40.



**Fig. 23.-** Glándula de Zymbal. Dilataciones quísticas más severas. H&E x20.

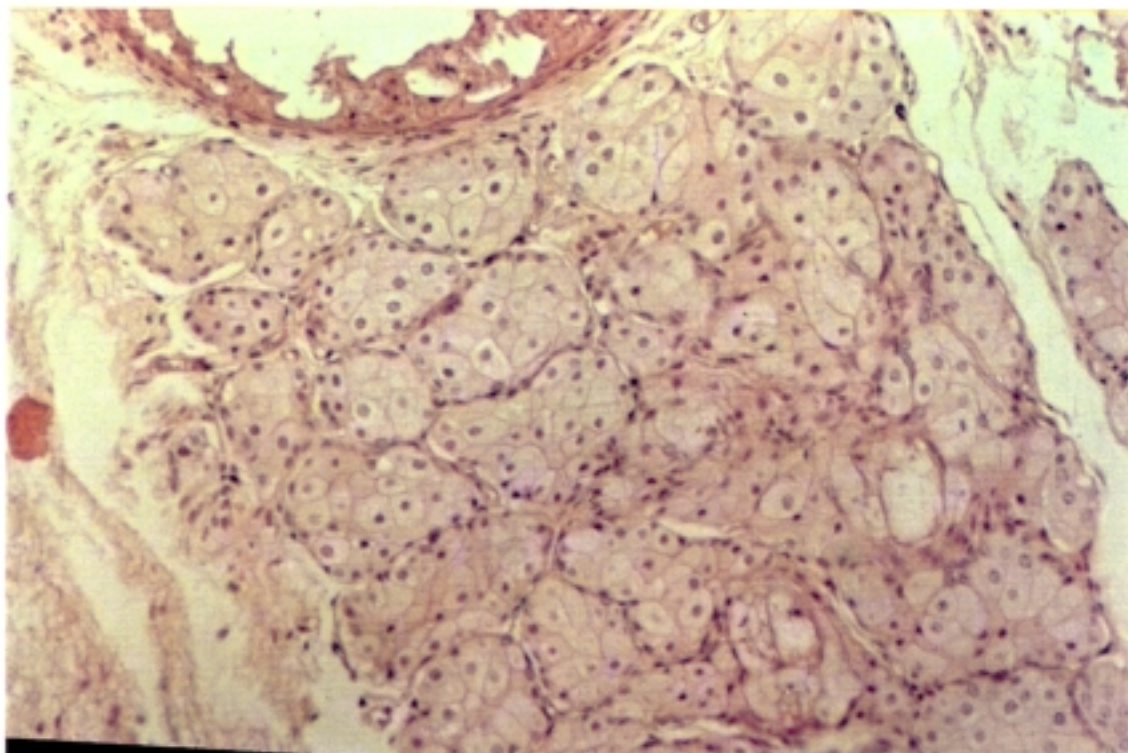


Fig. 24.- Nódulo hiperplásico de células sebáceas adyacente a un conducto excretor dilatado. H&E x150.

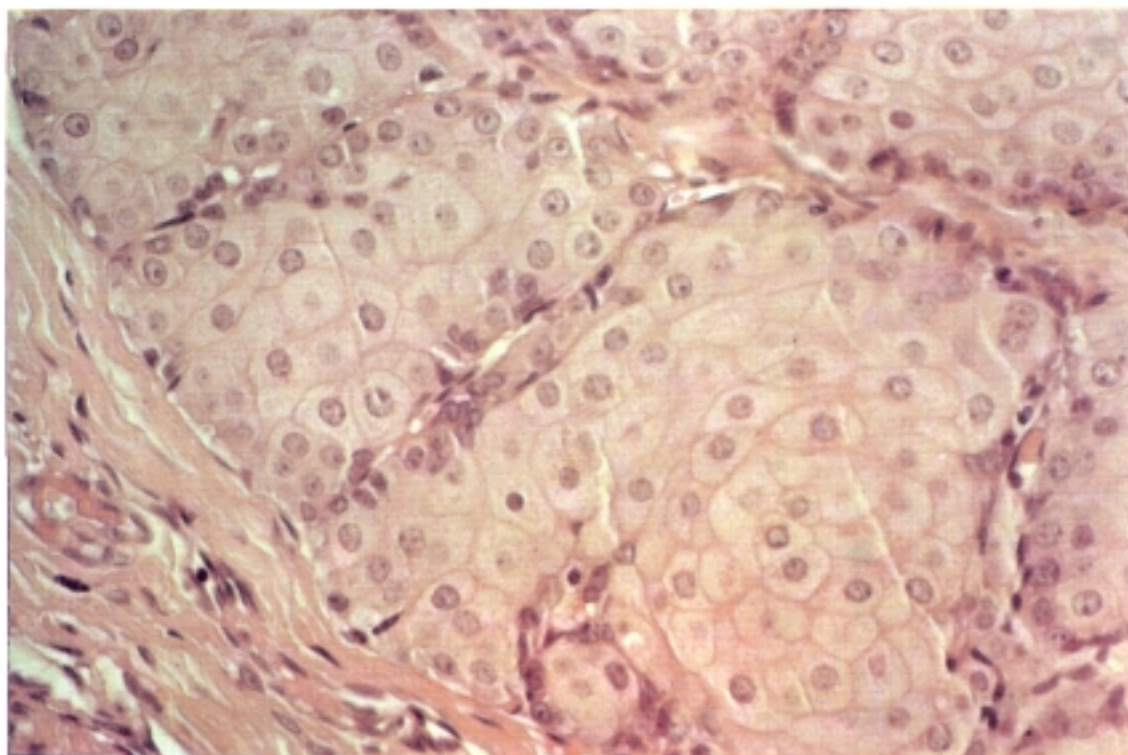


Fig. 25.- Adenoma sebáceo de la glándula de Zymbal. H&E x300.

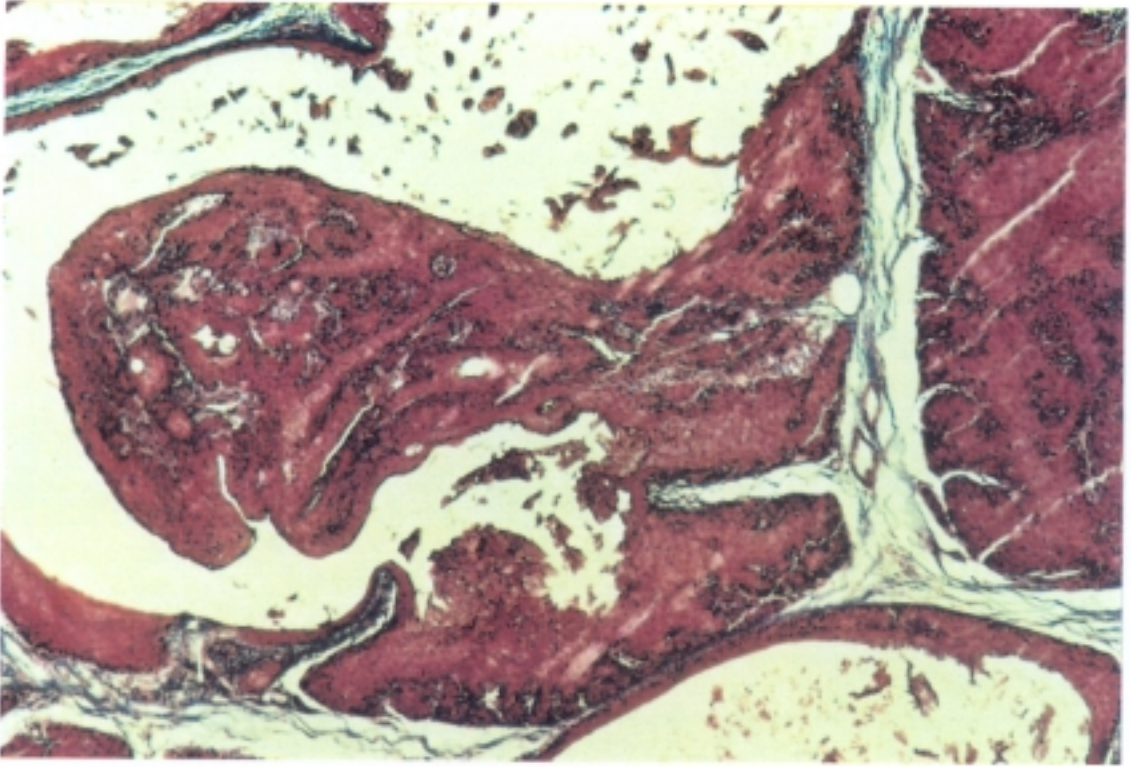


Fig. 26.- Adenocarcinoma. Glándula de Zymbal. Tricrómico de Masson x60.

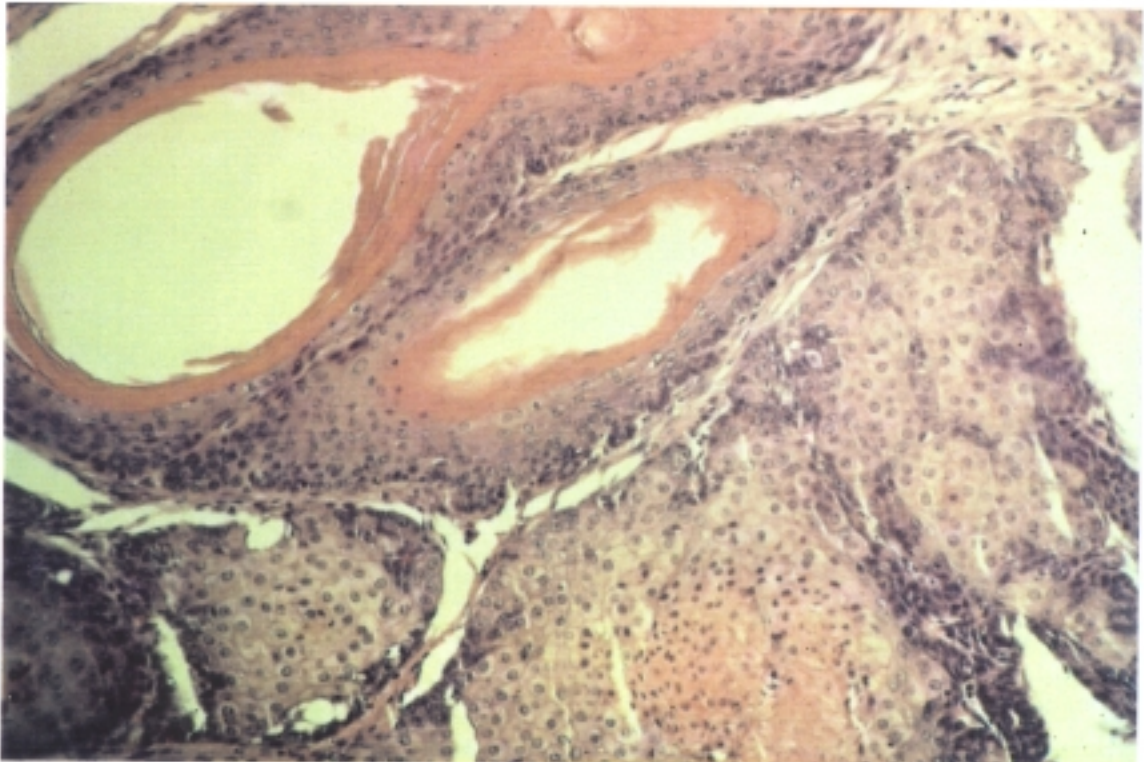
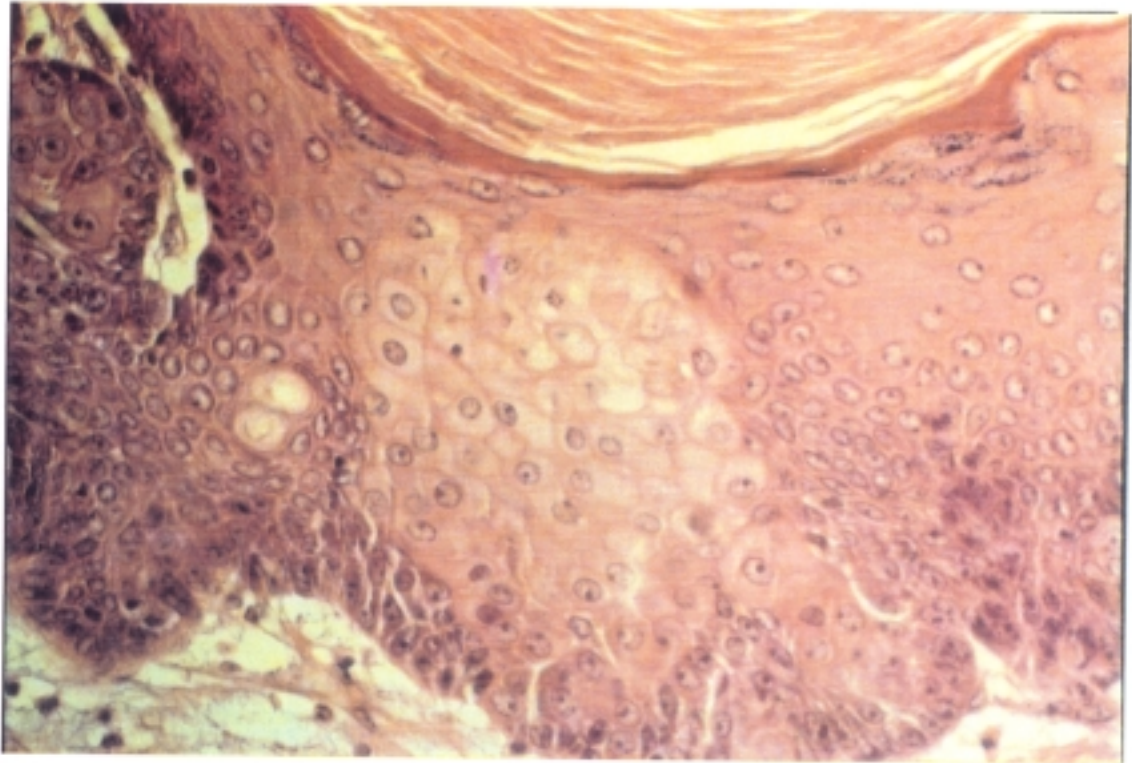
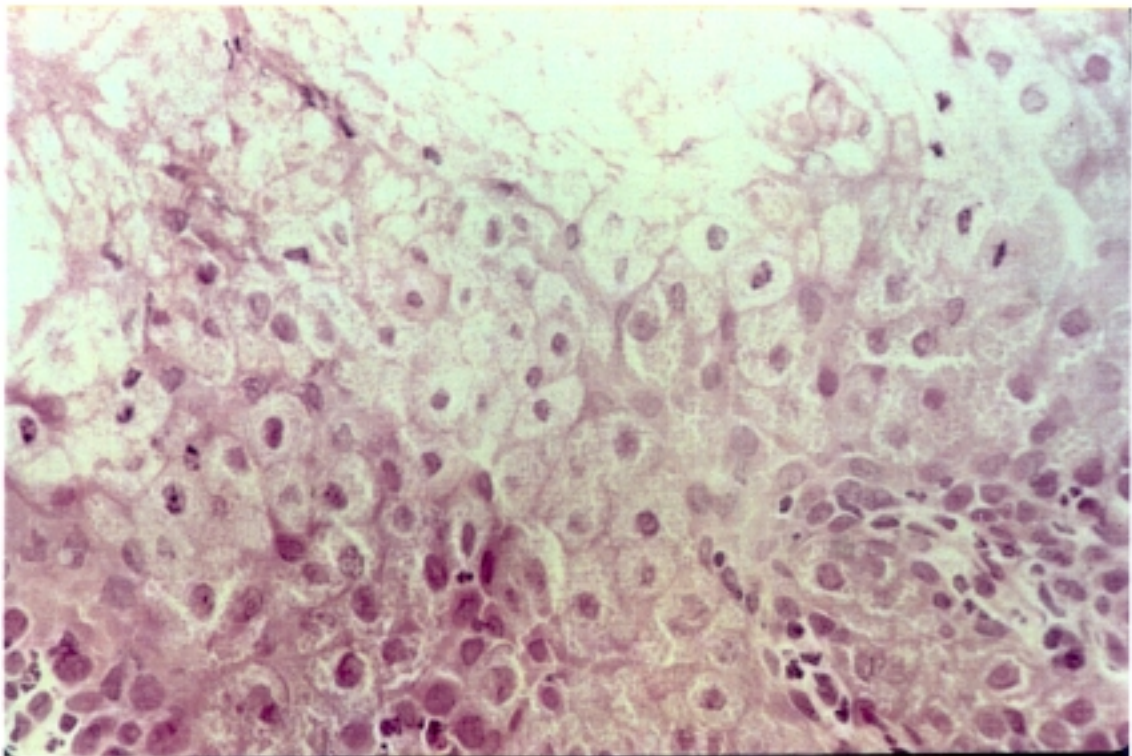


Fig. 27.- Carcinoma sebáceo escamoso. Glándula de Zymbal. H&E x100.



**Fig. 28.- Carcinoma sebáceo escamoso. Area de metaplasia escamosa. H&E x300.**



**Fig. 29.- Población celular heterogénea en un carcinoma sebáceo escamoso. H&E x400.**

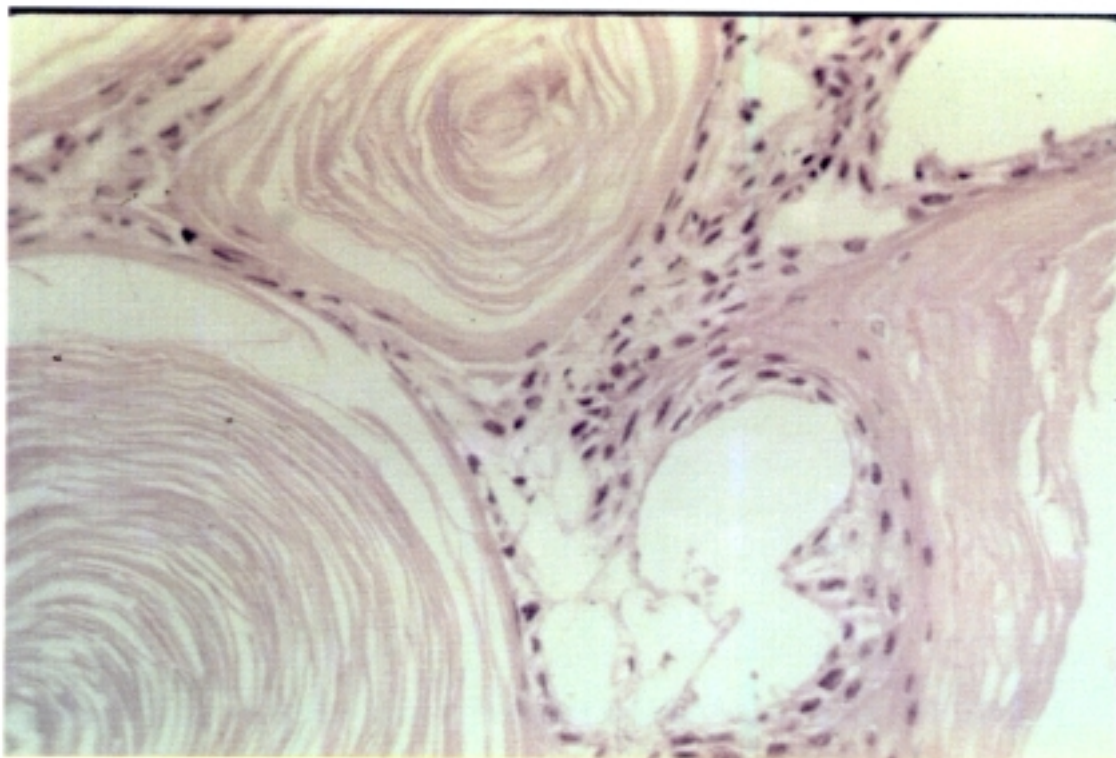


Fig. 30.- Carcinoma de células escamosas. H&E x90.

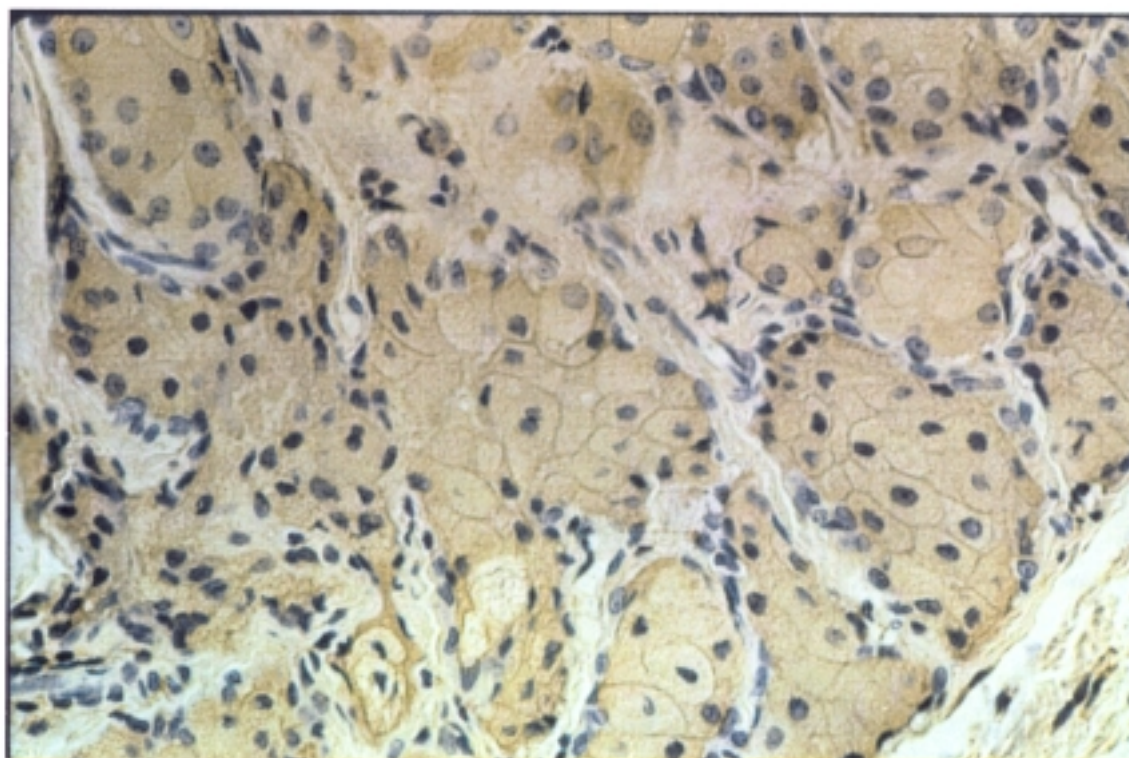


Fig. 31.- Adenoma sebáceo. Intensa reactividad de las células a Con A-peroxidasa x400.

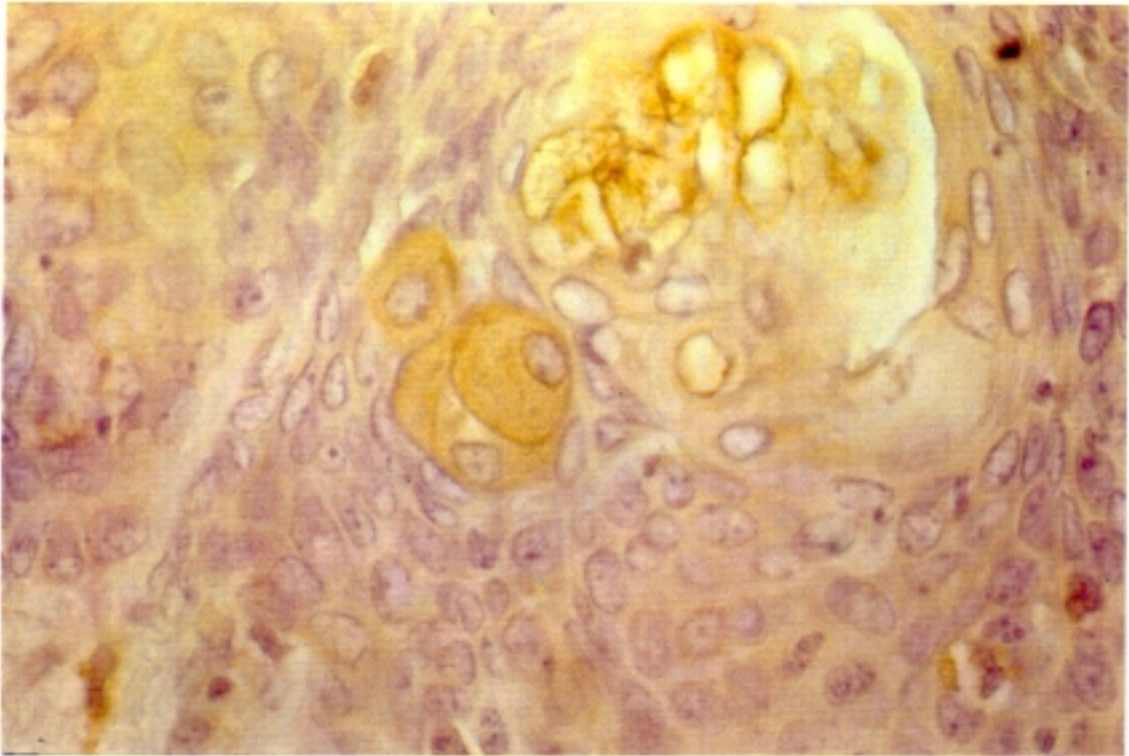


Fig. 32.- Carcinoma sebáceo escamoso. Células sebáceas intensamente positivas a Con A-peroxidasa x600.

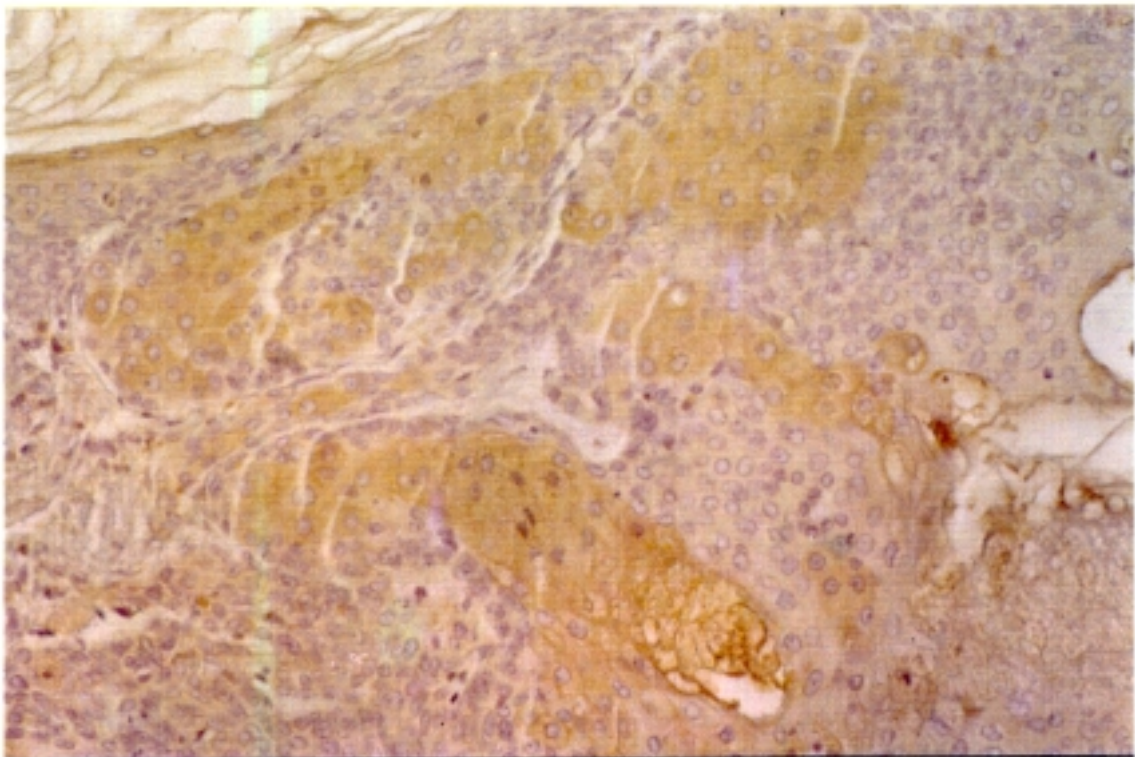


Fig. 33.- Carcinoma sebáceo escamoso. Reacción heterogéna frente a Con A-peroxidasa x200.

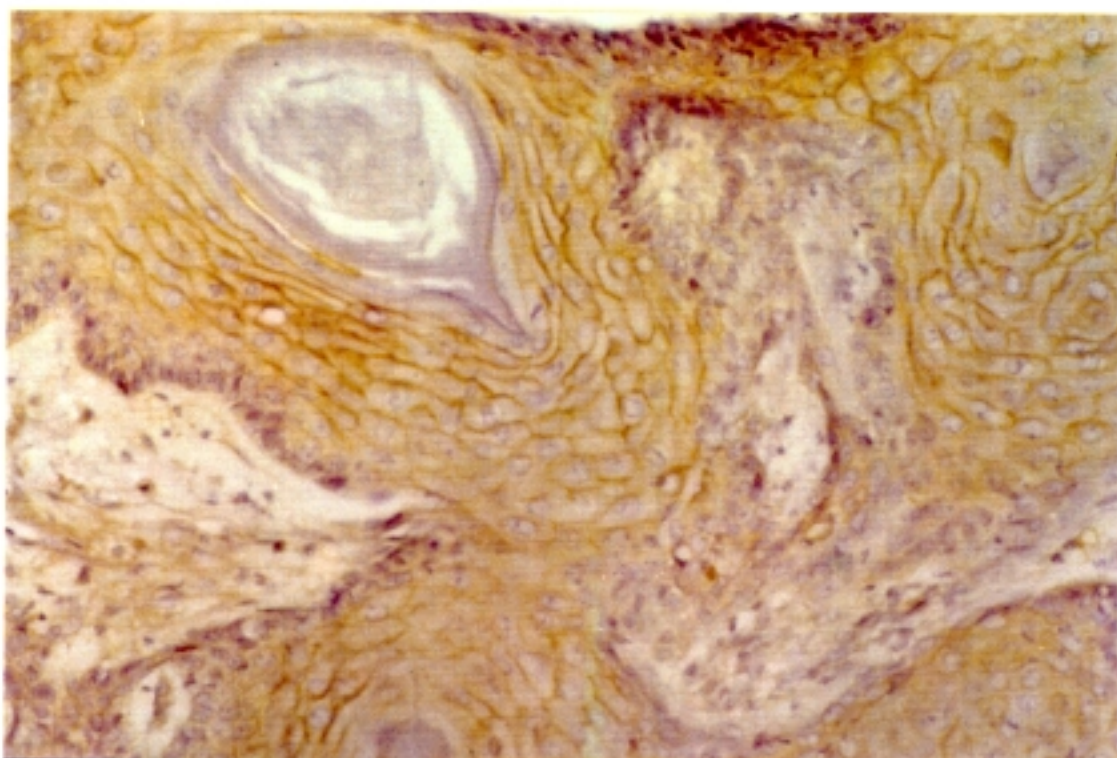


Fig. 34.- Carcinoma sebáceo escamoso. Capas intermedias fuertemente positivas con WGA-peroxidasa x200.

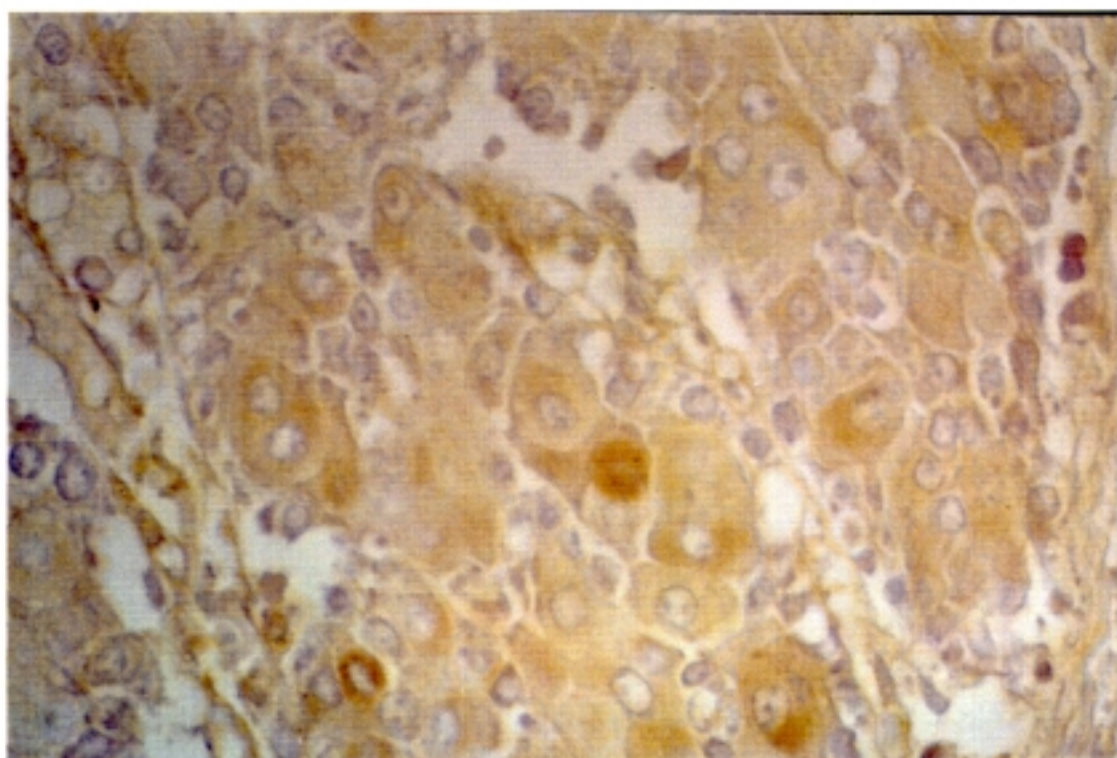
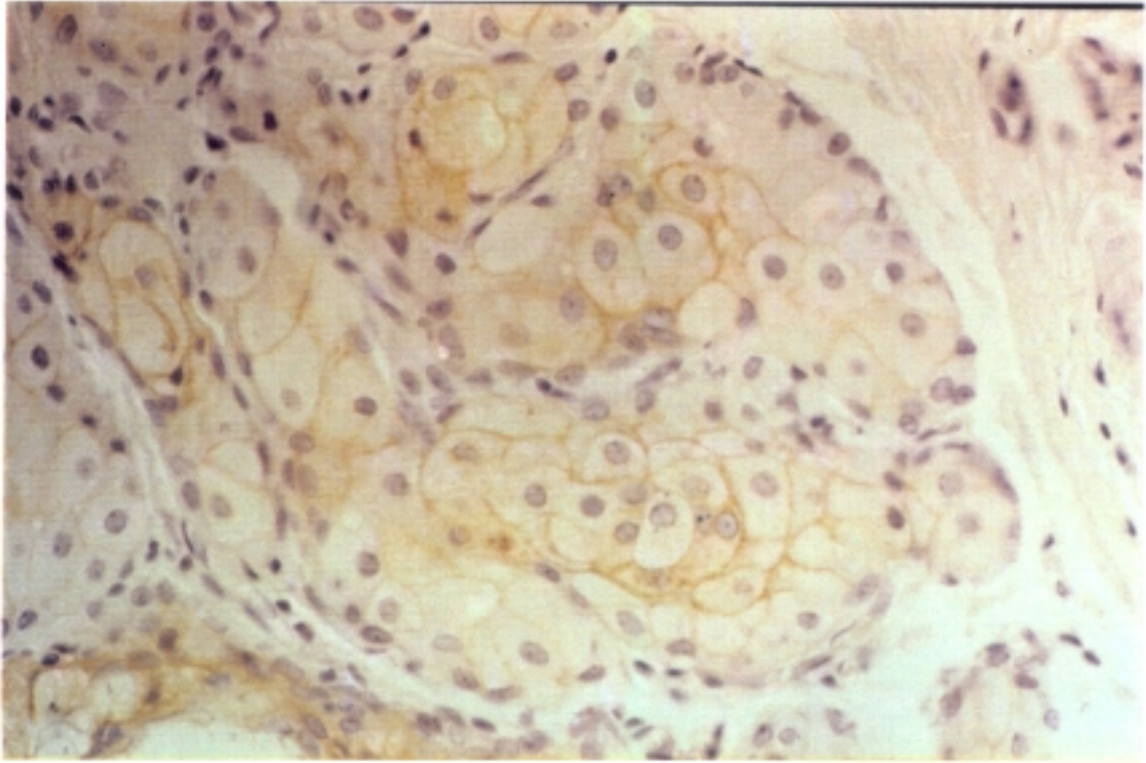
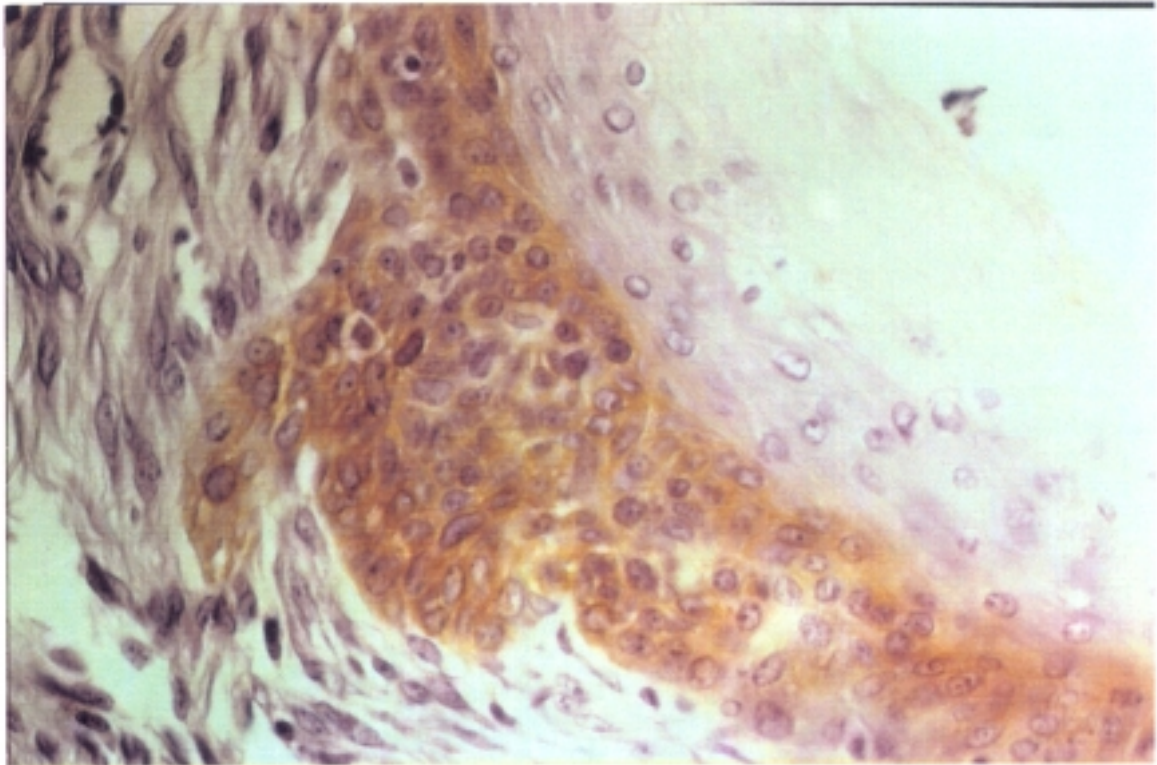


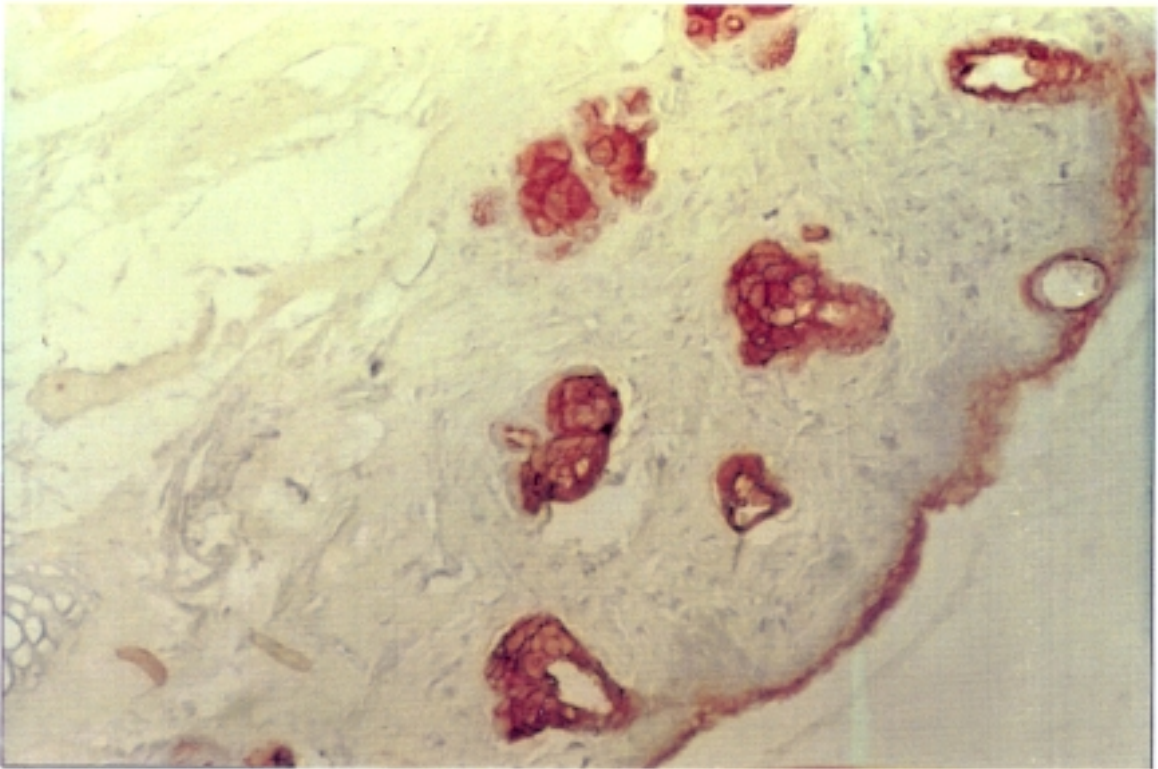
Fig. 35.- Tinción heterogénea con WGA-peroxidasa en las células de un carcinoma sebáceo escamoso x450.



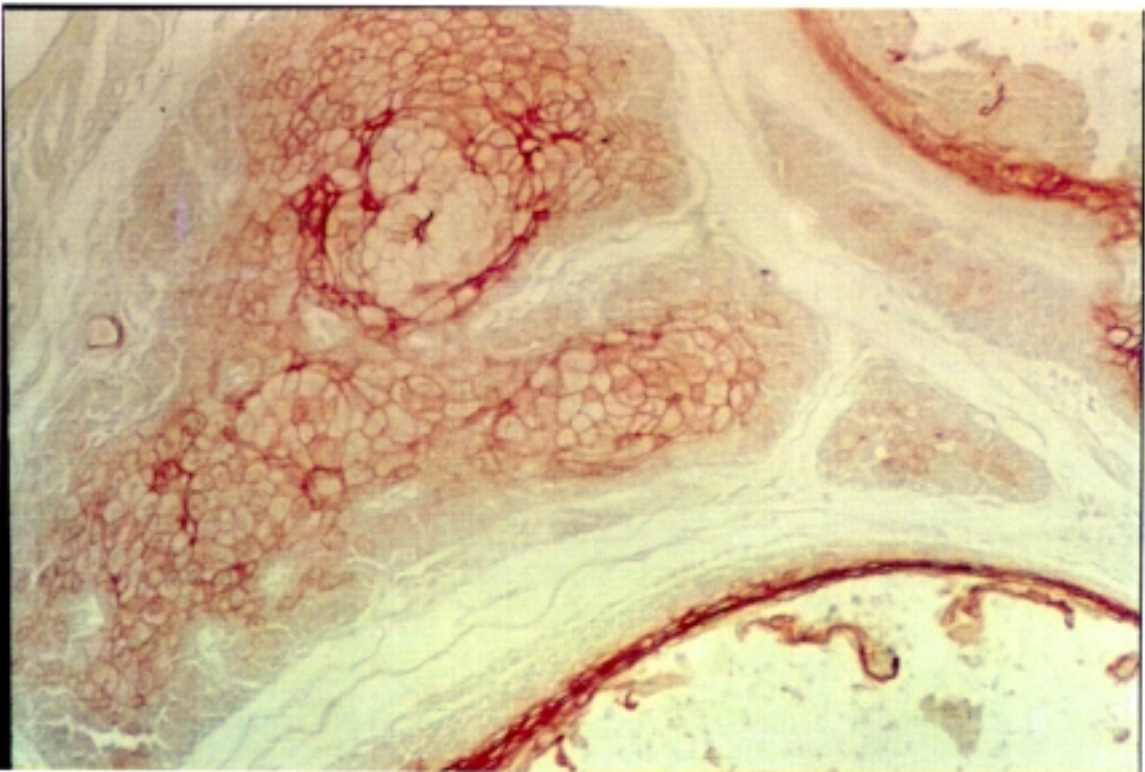
**Fig. 36.-** Adenoma de la glándula de Zymbal. Las células más diferenciadas son positivas a PNA-peroxidasa x300.



**Fig. 37.-** Carcinoma sebáceo escamoso. Capas basales de un área con diferenciación escamosa que reacciona intensamente con PNA-peroxidasa x300.



**Fig. 38.-** Conducto auditivo externo y glándulas sebáceas positivas a UEA-I-fosfatasa alcalina x120.



**Fig. 39.-** Adenocarcinoma de la glándula de Zymbal. UEA-I-fosfatasa alcalina x150.

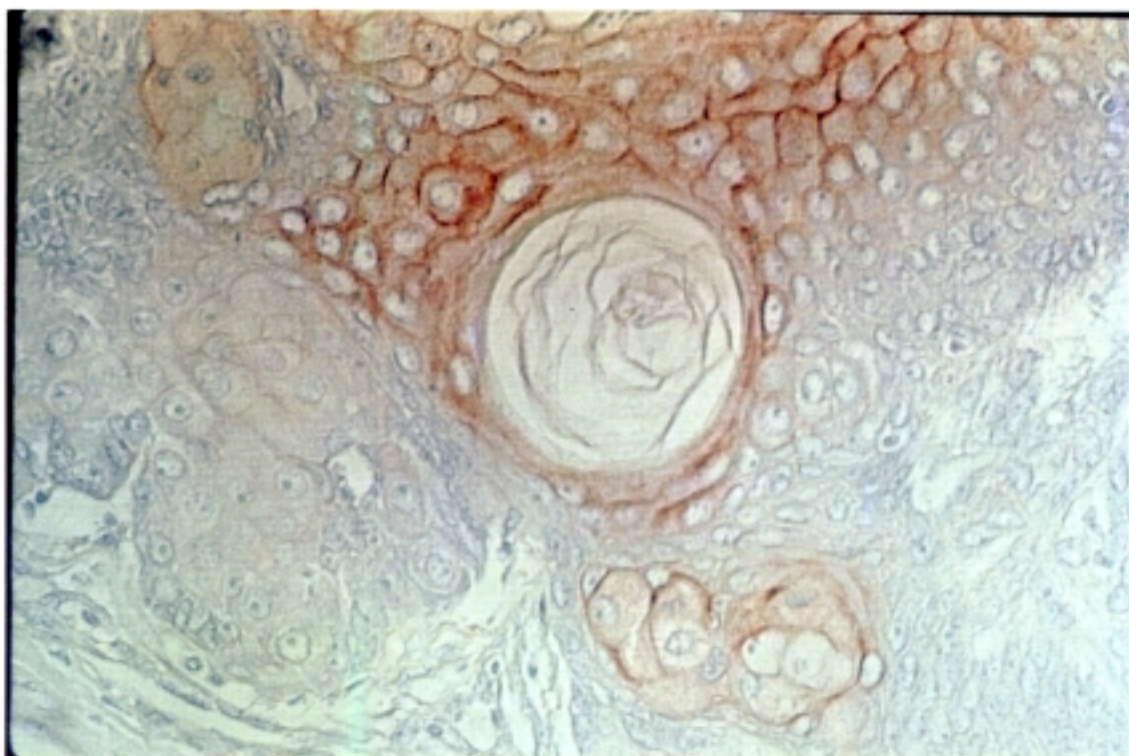


Fig. 40.- Carcinoma sebáceo escamoso. Area de diferenciación escamosa: capas intermedias positivas a UEA-I-fosfatasa alcalina x200.

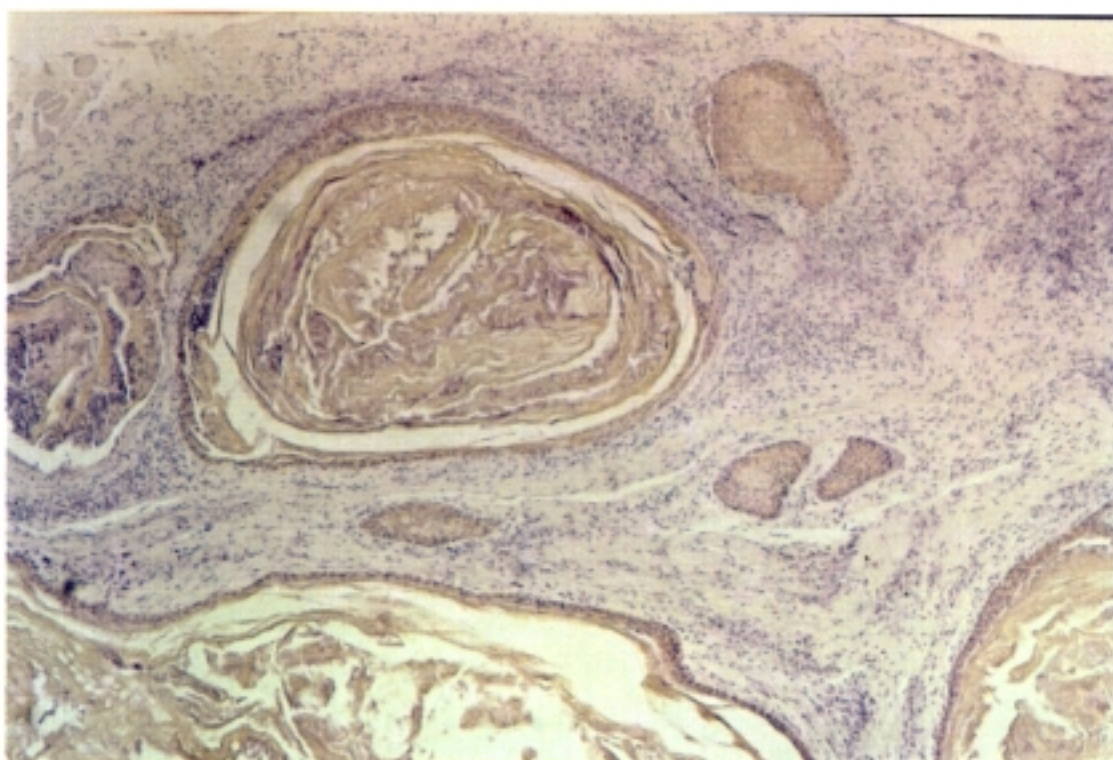


Fig. 41.- Carcinoma sebáceo escamoso. La CK PAE se expresa en todas las células de origen epitelial. PAP x60.

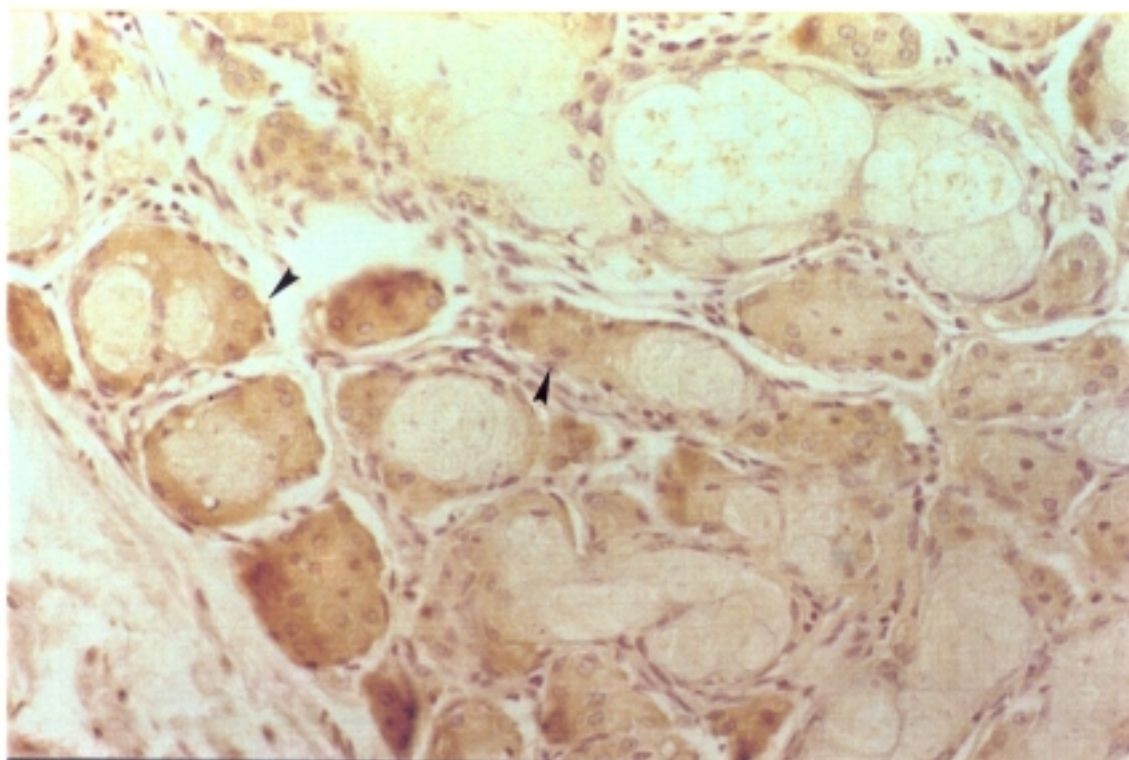


Fig. 42.- Adenoma sebáceo. Inmunotinción de las células basales para la CK MAE. PAP x200.

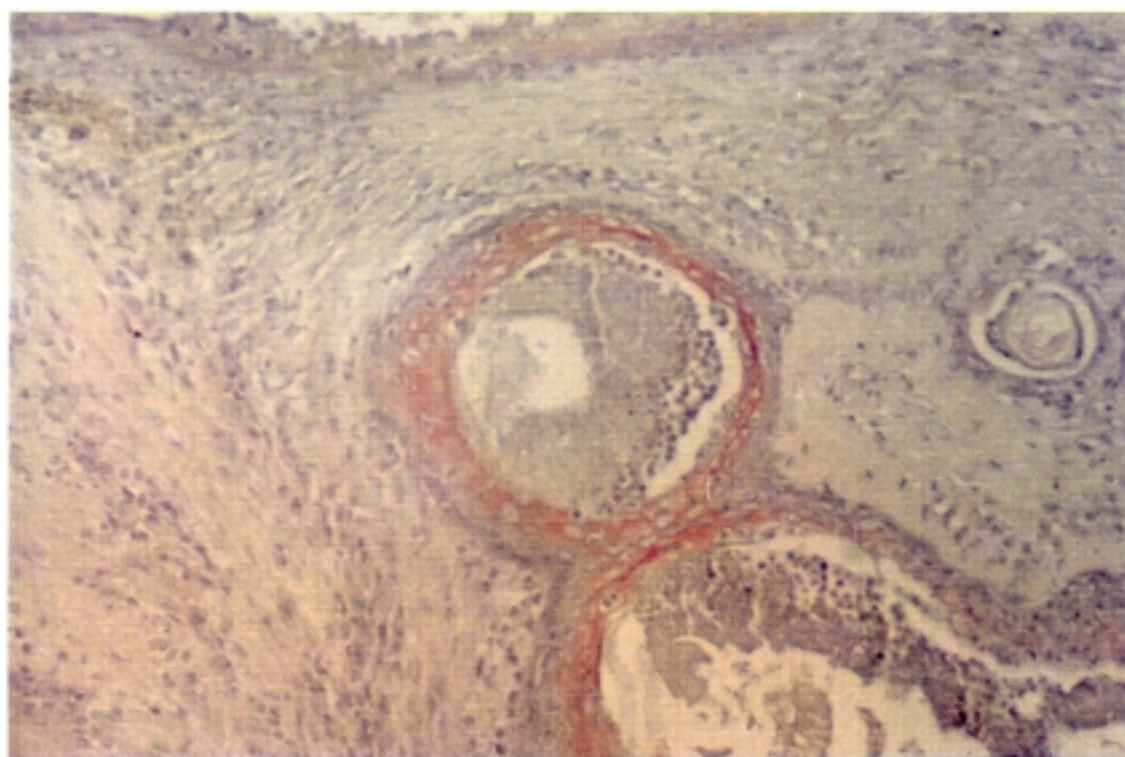


Fig. 43.- Carcinoma sebáceo escamoso. Zona de diferenciación escamosa, la capa intermedia expresa CK APM. Fosfatasa alcalina x150.

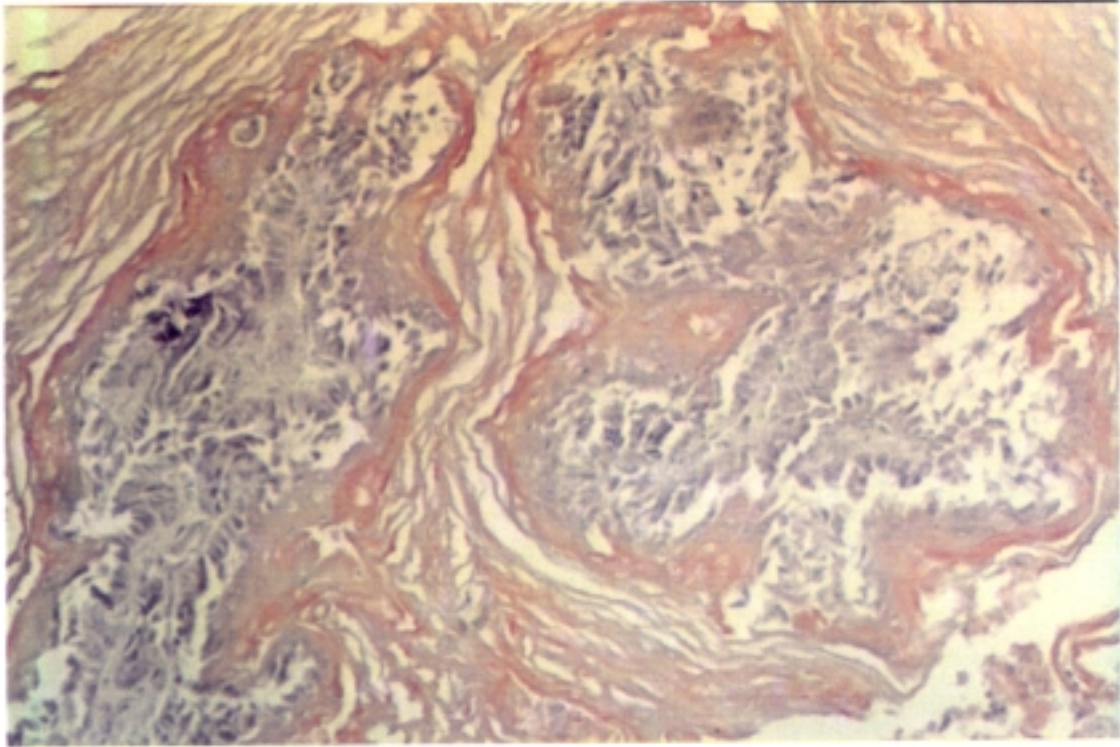


Fig. 44.- Carcinoma de células escamosas. CK APM. Fosfatasa alcalina x150

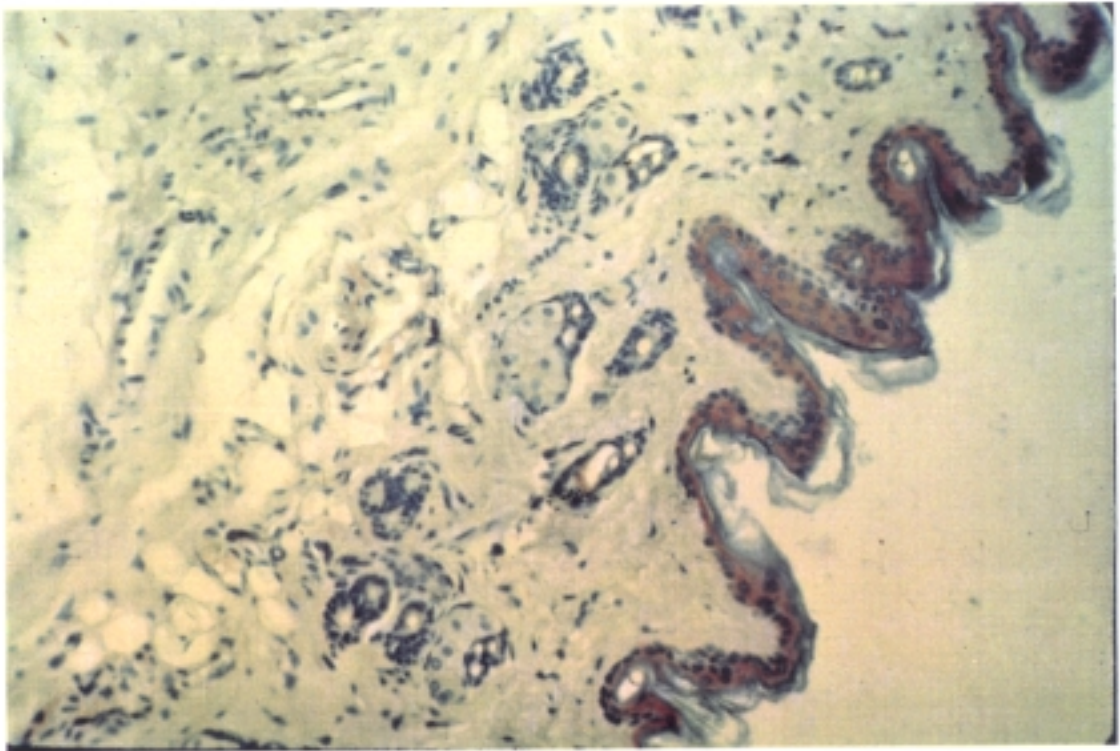


Fig. 45.- Conducto autivo externo. El epitelio expresa con gran intensidad CK 1. Fosfatasa alcalina x200.

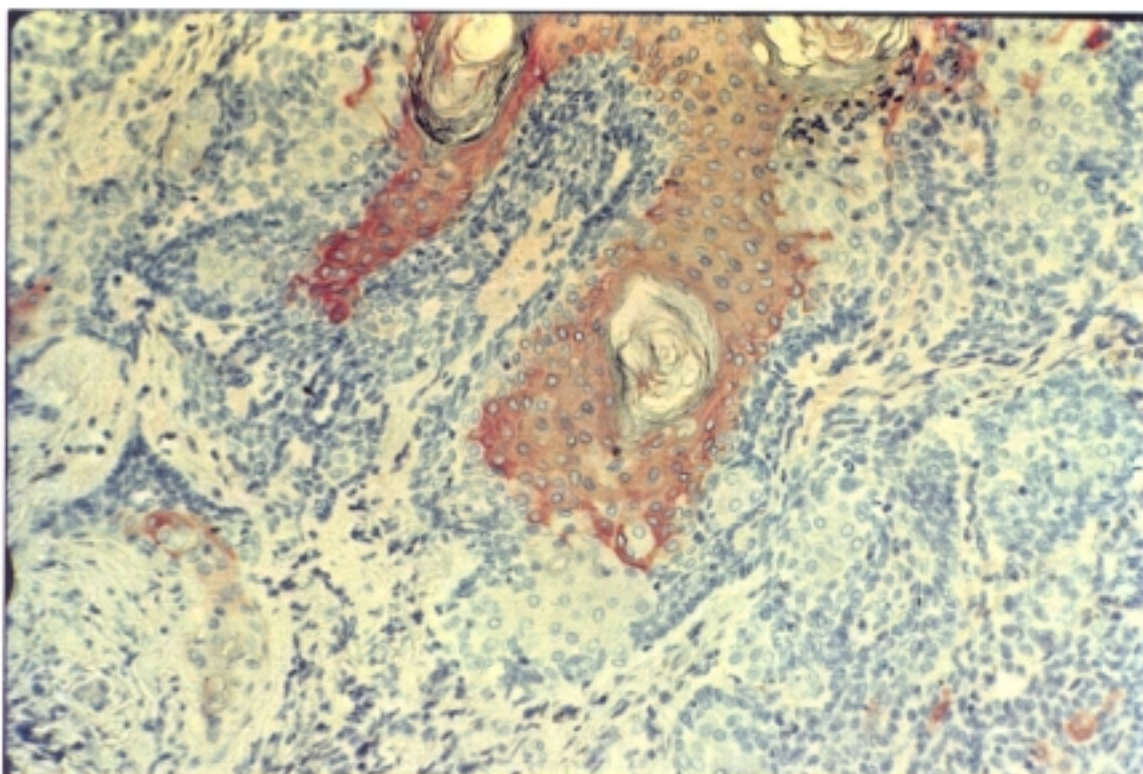


Fig. 46.- Carcinoma sebáceo escamoso. Zona de diferenciación escamosa; las capas intermedias expresan CK 1. Fosfatasa alcalina x200.



Fig. 47.- Adenocarcinoma de la glándula de Zymbal. Todas las células sebáceas presentan inmunorreacción con la CK 4. PAP x120.

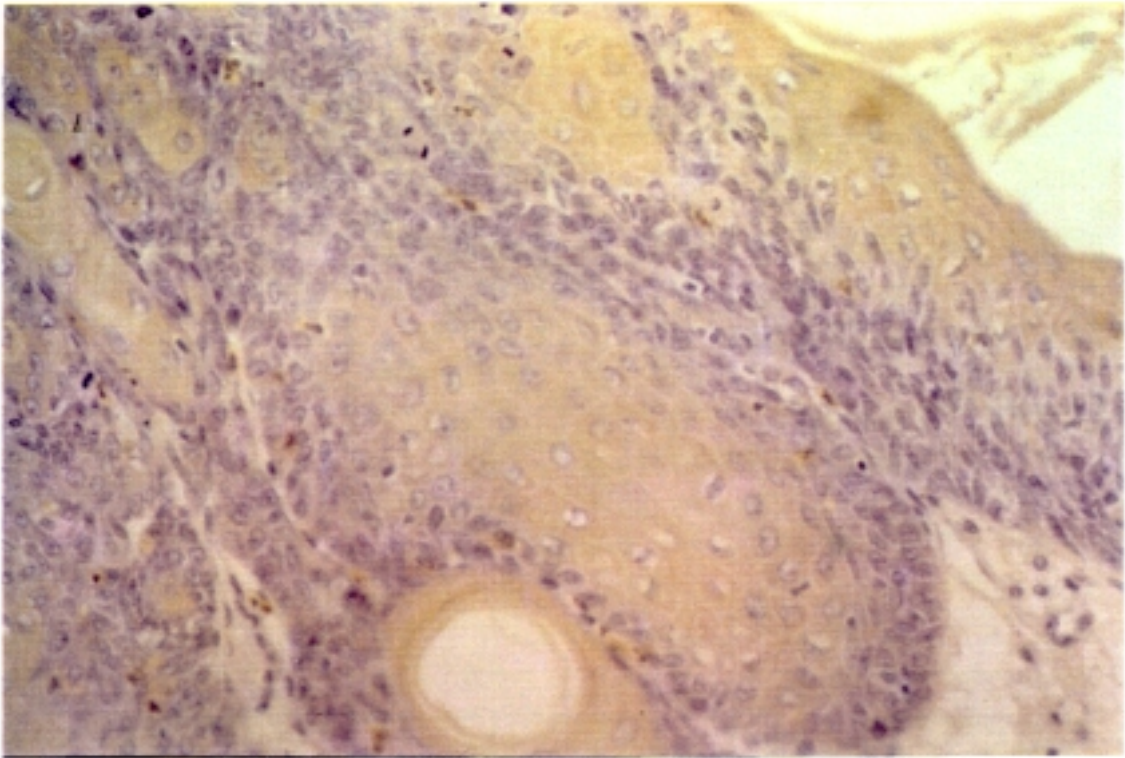


Fig. 48.- Carcinoma sebáceo escamoso. Ligera expresión de CK 8-18. PAP x300.

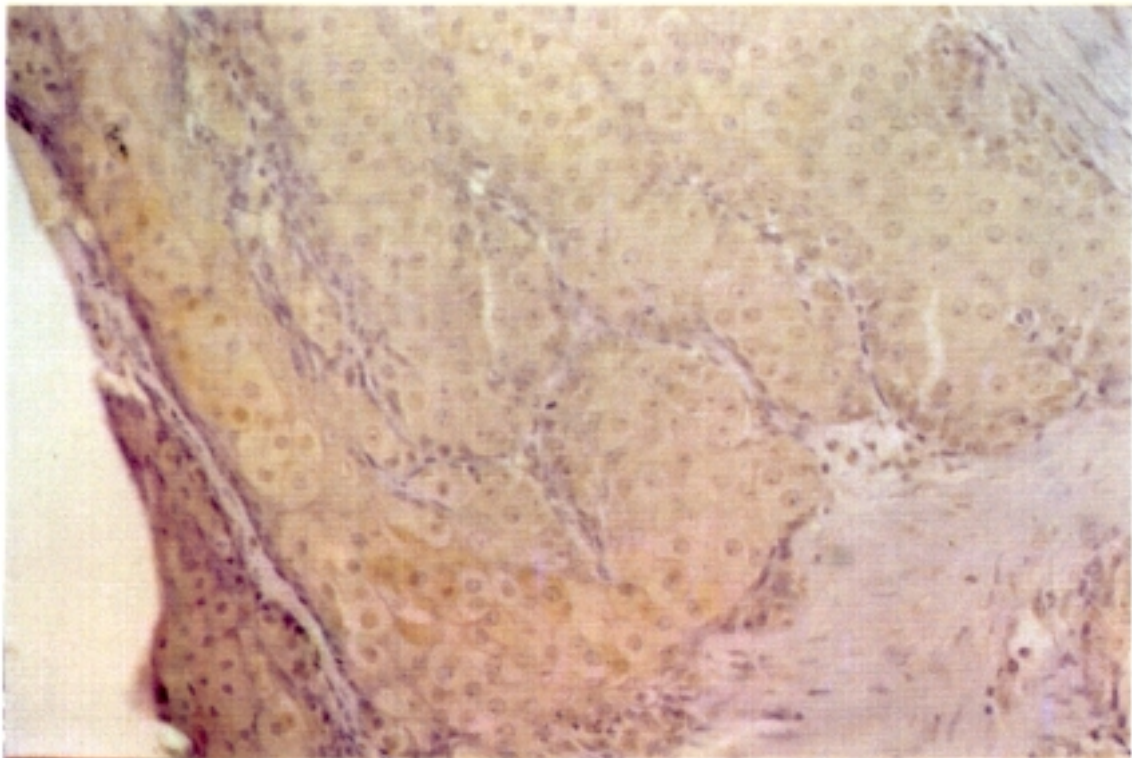


Fig. 49.- Carcinoma sebáceo escamoso. Las células sebáceas expresan débilmente CK 10-11. PAP x200.

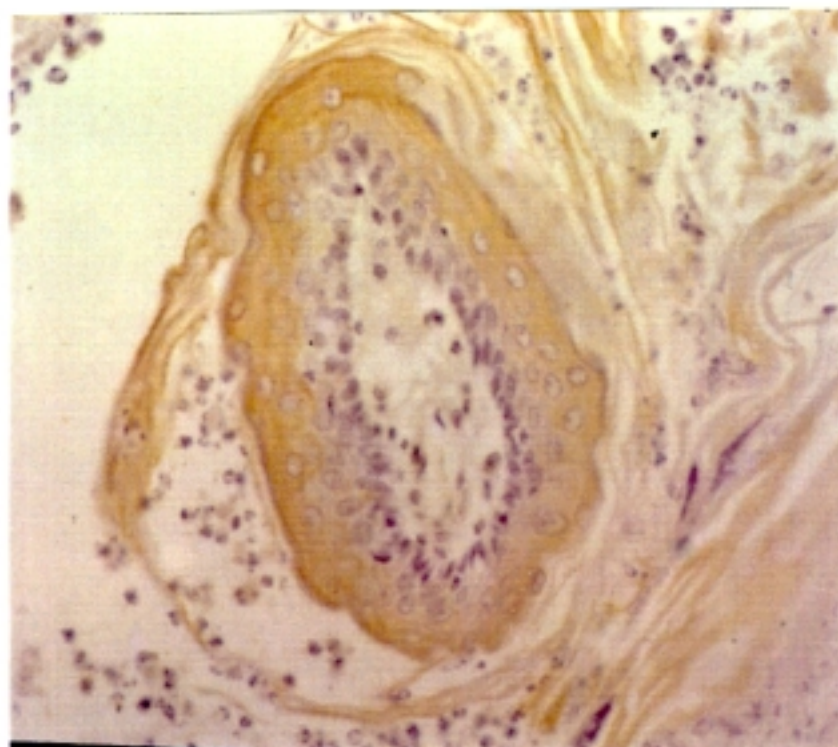


Fig. 50.- Carcinoma de células escamosas. Las células más diferenciadas expresan CK 10-11. PAP x240.

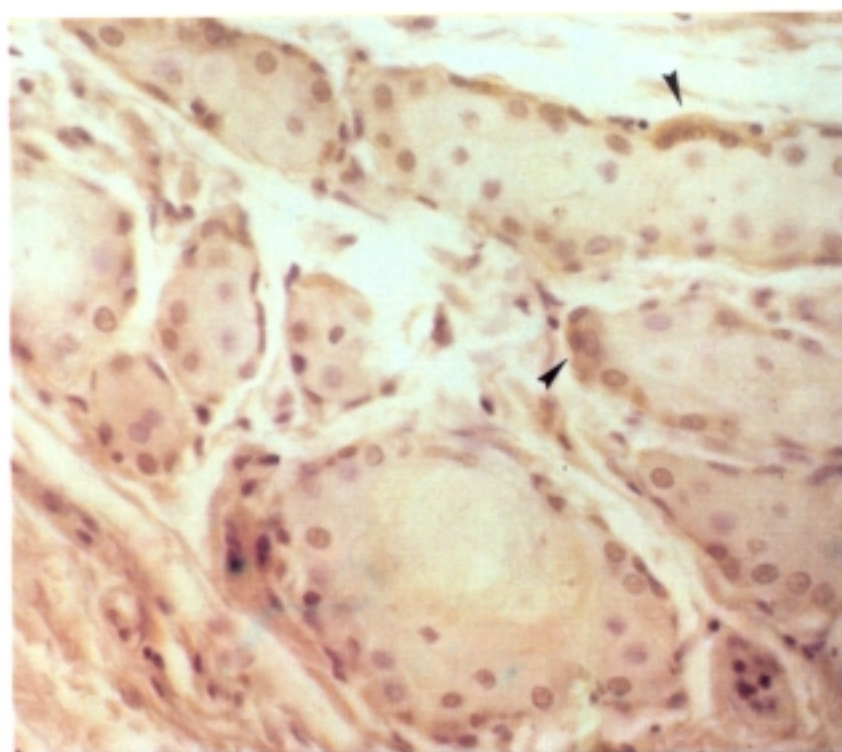


Fig. 51.- Adenoma de la glándula de Zymbal. Células basales positivas a CK 14. PAP x200.

## **VI.- DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

Los tumores de la glándula de Zymbal son neoplasias que han aparecido de forma no deseada en múltiples experiencias inducidas con carcinógenos químicos para estudiar otro tipo de neoplasias, como por ejemplo, tumores de mama. Han sido, por tanto, tumores que no se han estudiado en profundidad y que se han citado como resultados adicionales. Son muy pocos los trabajos monográficos de los T.G.Z. y ninguno de ellos hace referencia a la expresión de lectinas ni de citoqueratinas de estas neoplasias. Además, también son muy escasos los trabajos con referencias concretas de glándulas sebáceas de piel humana o de otras especies y ninguno de ellos mencionan las glándulas sebáceas de las ratas.

Este trabajo experimental se ha dirigido fundamentalmente al conocimiento de la glándula de Zymbal de las ratas y sus tumores.

En cuanto al período de inducción tumoral, éste fué de 24 días para los tumores de mama, con lo que coincidimos con diversos autores como Huggins y col. (1961), Drouhault y col. (1983) (28 días) y con Griswold y col. (1966) (30 días). Por el contrario, nos alejamos bastante de los días de inducción tumoral señalados por Escrich (1985) (74 días).

Respecto al número de tumores de mama por animal, la media fué de 4'2 que coincide con lo obtenido por Peña (1989) y Talwalker y col. (1964), aunque nuestro número de tumores es ligeramente superior. Por el contrario nos alejamos bastante de los resultados obtenidos por Drouhault y col. (1983), que solo describieron 2'7 tumores por animal.

En cuanto a los tumores de la glándula de Zymbal, el primer tumor apareció el día 156 de la experiencia, coincidiendo con Pliss (1987) y Kato y col. (1989) que detectaron el primer tumor el día 139, aunque usaron un carcinógeno distinto en su experiencia, y con Peña (1989), en cuya inducción con DMBA, la aparición de los tumores de la región auricular se produjo a partir del quinto mes. Estos resultados difieren completamente de los obtenidos en experiencias en las que se estudian los tumores de la glándula de Zymbal espontáneos, pues el tiempo de aparición del primer tumor se alarga considerablemente; así están descritos tumores de aparición entre 400 y 800 días (Tannembau y col., 1962; Snell, 1965; Schardein y col., 1966). Por otro lado, Pliss (1978) afirma que puede existir la regresión espontánea del tumor en alguno de los casos, sin embargo nosotros no lo hemos observado en ningún animal.

En cuanto al porcentaje de animales afectados por tumores de Zymbal, éste ha sido del 45%. Resultado bastante más alto que el 32% obtenido por Hirose y col. (1988) e inferior al obtenido por Peña (1989), en cuya experiencia se afectaron el 50% de los animales. Los datos procedentes de experiencias realizadas con otros carcinógenos químicos son muy variables: Bielchowsky y col. (1944) señalan un 78% de afectación y Skoryna y col. (1951) un 52%, induciendo los tumores con 2-acetilaminofluorene (2-AAF).

En cuanto al estado general de los animales, la mayoría de los autores (Griswold y col., 1966; Peña, 1989) consideran que fue bueno. Esto es debido a que sus experiencias en general fueron de poca duración (Griswold y col., 1966); sin embargo, en nuestra experiencia, más dilatada, el estado general de los animales empeora con el tiempo de desarrollo tumoral, sobre todo después de la aparición de los tumores de la glándula de Zymbal.

En cuanto al peso de los animales, fué inferior en los animales testigo hasta el día 190, aunque se mantuvo dentro de los límites de la normalidad, coincidiendo con varios autores (Messadi y col., 1986; Peña, 1987). A partir de este día, como consecuencia del incremento en el peso de las neoplasias mamarias, el peso aumentó superando la media de los animales testigo.

En cuanto a la supervivencia de los animales de nuestra experiencia hemos de señalar que no se ha producido ninguna muerte en los días posteriores a la administración del DMBA, difiriendo de los resultados de Peña (1989) que señala algunas muertes tras la administración del carcinógeno, en su opinión debidas a cierta toxicidad del producto. Sin embargo, tras nuestros resultados coincidimos con Huggins y col. (1961) en que la inducción tumoral mediante una única dosis de 20 mg. de DMBA via intragástrica, es un método de aplicación fácil, adecuado y de resultados efectivos y solo se ha comprobado toxicidad con dosis más altas.

Hasta el día 243 de la experiencia la posible causa de muerte de los animales ha sido sin lugar a dudas la presencia de múltiples tumores de mama o de sus metástasis. Talwalker y col. (1964) añaden como causa de muerte diversas complicaciones respiratorias. Creemos que, aunque en algunos animales hayan aparecido algunos focos neumónicos, no han sido lesiones tan graves como para producir la muerte de los animales. Por otra parte, coincidimos con Escrich (1985) a la hora de señalar la presencia de metástasis pulmonares, mientras que Messadi y col. (1986) y Peña (1989), no señalan ninguna alteración de este tipo.

Drouhault y col. (1983) observaron que los animales portadores de

neoplasias mamarias solo sobrevivieron 9,5 meses, tiempo muy inferior al nuestro pues nuestra experiencia duró 396 días. Tampoco coincidimos con Griswold y col. (1966) que señalan que para el día 200 después de la administración del carcinógeno la mayoría de los animales ya habían muerto. En nuestro caso el día 200, solo habíamos observado la muerte de 12 animales de los 40 que se recibieron DMBA.

En cuanto a la descripción macroscópica de las neoplasias mamarias, hemos encontrado pocos trabajos que abordan este aspecto. Señalan, sin embargo, la presencia de ulceraciones y hemorragias. No existe unanimidad en lo referente a la capacidad de invasión tumoral a otros tejidos circundantes, como músculos, tejido adiposo, o piel, señalada por diversos autores (Huggins, 1965; Talwalker y col., 1964; Archer y Orlando, 1968), y nosotros mismos. Sin embargo Peña (1989) y Mobbs (1966), no encontraron invasión en tejidos adyacentes.

En el apartado del estudio histológico de las neoplasias mamarias, se ha descrito la existencia de una escasa proporción de fibroadenomas, cuyo proporción aumenta a medida que transcurre el tiempo de ingestión del carcinógeno (Huggins y col., 1962; Mobbs, 1966; Griswold y Green, 1970; Griswold y col., 1966), pero no se menciona la existencia de fibromas, solamente Peña (1989), señala que un 2'70% de estos tumores. Nosotros pudimos observar la aparición de un 5'7 % de fibromas.

De acuerdo con numerosos autores la gran mayoría de los tumores mamarios fueron adenocarcinomas (Huggins y col. 1961; Russo y col. 1983; Melhem y col., 1987). Para su estudio nos pareció lo más oportuno adoptar la

clasificación de Stevens y col. (1965), citada por Peña (1989), por considerarla la mejor en cuanto a la descripción histológica de los tumores y por ser la única que señala el adenocarcinoma tipo D, que son tumores de aparición tardía, causa por la que la gran mayoría de los autores no han descrito este tipo de neoplasias. Como hemos señalado anteriormente, muchas de las experiencias hechas en ratas con DMBA, no han tenido la duración suficiente, ni para que aparezca el adenocarcinoma tipo D, ni para que se presenten los tumores de la glándula de Zymbal.

En muy pocas ocasiones se han descrito los caracteres macroscópicos de los tumores de la glándula de Zymbal, señalándose que son neoplasias recubiertas por una piel intacta en los primeros estadios de desarrollo tumoral, que se mueve libremente y para, según avanza el tiempo, ulcerarse, apareciendo el tumor adherido a planos más profundos (Skoryna y col., 1951; Pliss, 1978).

Coincidimos en la descripción histológica de la glándula de Zymbal, con la primera que se realizó en 1933 por Zymbal, y no con la descrita por Zawisch-Ossenitz (1933). Este último, describió la glándula constituida por 13 lóbulos. Nosostros hemos comprobado, que la glándula de Zymbal esta constituida por 4 lóbulos principales, integrados por grupos glandulares de los que surge un conducto menor, que confluye en un conducto lobular que desemboca en el conducto excretor. Nuestra descripción coincide en parte con la realizada por Skoryna, (1951); Schardein, (1966) y Pliss (1987). Para estos autores solo existirían conductos menores, o intralobulares, que confluyen en el conducto excretor principal.

La histología de las glándulas sebáceas de la pared anterior y posterior

del conducto auditivo externo, se conservó con un aspecto normal excepto en un solo caso en el que se encontraron alteraciones quísticas y un carcinoma escamoso en la glándula de Zymbal. Por el contrario, algunos autores (Schardein y col., 1966) señalan la existencia de formaciones adenomatosas y quísticas en las glándulas de la pared anterior en un 7'5% de los casos de los animales tratados con 3-TACP, ocurriendo 6 de los casos en animales que también tenían tumor de la glándula principal de Zymbal.

En cuanto a la clasificación histológica de estos tumores, a lo largo de la bibliografía consultada nos hemos encontrado con distintas clasificaciones, muchas de ellas demasiado complicadas o demasiado teóricas, que luego no son aplicables en la realidad. Así, por ejemplo, la clasificación que realiza Pliss en 1987, muy parecida a la de Mohr y col. en 1990, en la que separan por un lado los adenomas con diferenciación sebácea escamosa, y por otro los adenomas con diferenciación escamosa simplemente; esta diferenciación no fue observada en nuestro estudio, ya que al teñir con Sudan III, todas las masas amorfas y acelulares han sido positivas.

Por otro lado, estos mismos autores separan los tumores malignos en adenomas malignos, que nosotros hemos preferido denominar como adenocarcinomas, en carcinomas sebáceos, carcinomas de células sebáceas con o sin queratinización y carcinoma de células sebáceas escamosas. En nuestro estudio, hemos podido comprobar que todos los carcinomas son carcinomas sebáceos escamosos, en los que existen zonas de metaplasia escamosa con cambios de malignidad, junto a las células sebáceas tumorales, predominando en algunos tumores unos tipos histológicos más que otros. No consideramos esta diferencia lo suficientemente significativa como para realizar una división tan exhaustiva

de estas neoplasias como la que realizan estos autores (Mohr y col. 1990, y Pliss, 1987). Así, nos parece la clasificación más adecuada la de Mohr (1993), que clasifica los tumores en adenoma sebáceo, carcinoma de células escamosas, queratinizado o no queratinizado, y carcinoma sebáceo (en el que se señala la presencia de zonas con diferenciación de células escamosa), además de señalar la hiperplasia sebácea e hiperplasia escamosa. Pero ninguno de los autores antes citados, señalan la presencia de un adenocarcinoma como tal, solamente Pliss (1987), habla de un adenoma maligno. En el único caso de carcinoma escamoso que hemos observado en nuestra experiencia, realmente todo el tumor es un carcinoma escamoso, no presenta células sebáceas y su origen no parece ser la glándula de Zymbal, sino el epitelio plano estratificado de los conductos excretores.

Algunos autores como Hirose y col. (1988) y Schardein y col. (1966) al clasificar los tumores, nombran los papilomas sebáceos y los tumores epiteliales papilares, respectivamente. Sin embargo, en nuestro estudio la presencia de formaciones papilares es un hallazgo puntual y no son estructuras lo suficientemente representativas como para definir un determinado tipo histológico por su misma presencia.

A la vista de los resultados obtenidos sí podemos afirmar que los tumores de la glándula de Zymbal de las ratas sirven de modelo experimental para el estudio de los tumores de glándulas sebáceas de la piel humana.

El análisis minucioso de la evolución histológica de las lesiones pretumorales y tumores de la glándula de Zymbal nos han permitido acercarnos a su etiología. Existen varias teorías que intentan explicar el origen y la evolución de

estos tumores. La mayoría de los autores consultados coinciden en afirmar que aparecen cambios quísticos en esta glándula producidos por la edad del animal (Schardein y col., 1966; Tannembaum, 1962), aunque Laws y col. (1955), indican, por el contrario, que estos cambios quísticos, no están relacionados con el desarrollo del tumor. Sin embargo, Skoryna y col., (1966) opinan que estas lesiones degenerativas previas, ocurren independientemente de la administración del carcinógeno y es el prerrequisito (junto a otras alteraciones como otitis) que tiene que haber, para que, una vez administrado el producto, se produzcan los tumores de Zymbal. Schardein y col. (1966) también afirman que son los cambios quísticos los que contribuyen a la formación del tumor y a su desarrollo, y que estos cambios son acentuados por el carcinógeno químico en cuestión. Por otro lado, Kinney (1989) en un estudio sobre carcinomas de células escamosas del canal auditivo externo en un oído humano, afirma que este tumor puede ocurrir en un oído en el que previamente haya habido una inflamación crónica.

Por otra parte, se han realizado estudios para comprobar si realmente la glándula de Zymbal es un órgano diana del DMBA. Así Reddy y col. (1989) realizaron cultivos *in vitro* de glándulas de Zymbal, cultivos a los que administraron DMBA, y pudieron comprobar que estos tejidos metabolizaban el DMBA, produciendo cambios en su DNA, señalando que este proceso podría estar relacionado con la formación de los tumores *in vivo*.

Además se sabe existen tumores espontáneos de la glándula de Zymbal, como lo demuestran las experiencias de Tannembaum y col. (1962); Snell (1965) y Schardein (1966). Aunque, como ya hemos indicado en estas experiencias, la aparición de los tumores se alarga considerablemente.

Nuestra opinión, es que realmente sí existen cambios quísticos que se desarrollan con la edad, además consideramos que estas lesiones son pretumorales, pues muchas de ellas van acompañadas de la formación de nódulos hiperplásicos y adenomatosos. De acuerdo con nuestro estudio, estas lesiones son las que primero aparecen en el tiempo. Probablemente los cambios quísticos son acelerados por la administración del DMBA y el desarrollo del tumor se ve favorecido, ya que la primera aparición de cambios quísticos con nódulos adenomatosos espontáneos fué descrita a los 420 días (Schardein, 1966) y nosotros comenzamos a observar los primeros cambios tumorales a los 4 meses de edad. Un esquema de la sucesión de acontecimientos podría ser:

- \* El DMBA acelera la formación de dilataciones quísticas con hipersecreción de material sebáceo.
- \* Aparición de nódulos hiperplásicos y/o adenomatosos.
- \* Malignización y aparición de adenocarcinomas y carcinomas.
- \* Diferenciación escamosa de los carcinomas sebáceos.

Por otro lado, hemos podido establecer una correlación entre los tipos histológicos de las lesiones de la glándula de Zymbal y el tiempo de desarrollo tumoral. En este sentido, no podemos afirmar que un carcinoma sebáceo escamoso, haya tenido su origen en un adenocarcinoma y este a su vez se desarrolle a partir de una adenoma, pero sí parece existe realmente una correlación entre los distintos tipos tumorales y su desarrollo en el tiempo. Pliss (1987) sugiere que existe una evolución de un tipo tumoral a otro al hablar de la malignización de los adenomas, aunque también opina que no se puede descartar la posibilidad de que los carcinomas se desarrollen independientemente, sin pasar por el estado de adenoma.

Consideramos oportuno destacar, la ausencia total de bibliografía respecto a estudios con técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas de la glándula de Zymbal y de sus tumores.

En lo referente a las lectinas, hemos optado por nombrar a las lectinas en función de su especificidad de unión a los azúcares terminales en las cadenas de carbohidratos, siguiendo la clasificación de Goldstein y col. (1986), que es la preferida por la mayoría de los autores.

Varios investigadores, (Burger y col., 1967; Inbar y col., 1969; Ben-Basset, 1970 y Rapin y col., 1974), señalaron a las lectinas como un apoyo metodológico para diferenciar células no neoplásicas de las tumorales, en determinados casos en los que no está clara la diferencia, como en el caso de hiperplasias de mama, o hiperplasias de piel. Las lectinas aglutinarían las células tumorales, pero no las normales. Extrapolando sus resultados a la histoquímica, hemos podido comprobar que las lectinas utilizadas han presentado la misma positividad, en las glándulas normales, e hiperplasias y muy poca diferencia con respecto a los adenomas. Sí hemos encontrado variación en la tinción con lectinas en las neoplasias malignas, con respecto a la glándula normal.

En lo referente a las células sebáceas, tanto normales como neoplásicas, hemos observado, como lo hicieron Ookusa (1983) y Schaumburg (1984) en glándulas sebáceas y sudoríparas humanas que la intensidad de tinción se incrementa durante la maduración celular. Tanto Con A, WGA, PNA, y UEA-I, distinguen entre células bien diferenciadas, y las células inmaduras. En las lesiones pretumorales, todas las células son positivas, mientras que en los tumores más malignos, el número de células sebáceas positivas desciende consi-

derablemente. Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por Wollina y col. (1992) al realizar un estudio con lectinas en glándulas sebáceas cutáneas porcinas, pues encuentra una fuerte positividad en los sebocitos periféricos, más inmaduros, con WGA y con Con A, positividad que va disminuyendo, según maduran las células hasta que en los sebocitos centrales la positividad se vuelve más débil.

Los resultados que hemos obtenido con la lectina Con A, han sido idénticos a los observados por Von Kuster en 1986, en un estudio sobre epitelio sebáceo humano normal y neoplásico. En las glándulas sebáceas, la reacción ha sido positiva en la membrana plasmática, y en las membranas de las vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas. La tinción de glándulas sebáceas hiperplásicas y los adenomas sebáceos no varía respecto a las de las glándulas sebáceas normales. Finalmente, en los carcinomas sebáceos escamosos, se va perdiendo tinción y se tiñen solamente las células más maduras.

Atoji y col. (1988) también encontraron tinción en la glándula sebácea interdigital del antílope cabra japonés, con PNA, WGA y Con A.

En la mayoría de la bibliografía consultada, se refieren al UEA-1, como marcador bastante específico, del endotelio vascular. Nosotros hemos comprobado, que el UEA-I, es además un excelente marcador de células sebáceas de las ratas. Holtotler y col. (1982) también señalan positividad para esta lectina en las glándulas sebáceas de tejidos humanos, positividad que se amplía a las glándulas sudoríparas y folículos pilosos. Sin embargo, esta expresión de UEA-I, en glándulas sudoríparas y folículos pilosos no ha sido observada en nuestra investigación.

La positividad de las células sebáceas con UEA-I, sigue apareciendo en todos los tipos tumorales encontrados, aunque al ser las células más indiferenciadas, van perdiendo intensidad de tinción.

Al estudiar los tumores de la glándula de Zymbal con metaplasia escamosa, hemos podido comprobar que realmente existen diferencias entre la tinción con las lectinas en estas formaciones epiteliales y la que tiene un epitelio normal semejante sin transformar. Así, observamos tinción del epitelio escamoso del conducto auditivo externo para todas las lectinas y sin embargo existe una pérdida de tinción en las zonas de metaplasia escamosa y en las capas basales con la Con A, WGA y UEA-I y para capas superiores, con PNA. Dansey y col. (1988) también mostraron diferencias significativas en los patrones de unión de las lectinas y en la intensidad de la reacción entre un epitelio normal y un determinada neoplasia epitelial, afirmando, que la modificación de la reactividad normal de algunas lectinas, principalmente de PNA y Con A, se relaciona con la agresividad histológica del tumor, con su capacidad metastática y con el pronóstico de la neoplasia. Evidentemente, nosotros hemos encontrado la mayor modificación de tinción en el carcinoma escamoso, el tumor más atípico e invasivo de todos, en el que aparecieron muy pocas células positivas para cualquier lectina. No podemos hablar de su capacidad metastática ya que no apareció ninguna metástasis de estos tumores.

Por último, nos gustaría añadir, como dato curioso, que la capa queratinizada de las neoplasias malignas de la glándula de Zymbal ha sido negativa en general para todas las lectinas y ligeramente positiva para la Con A. Sin embargo, en los tumores que han presentado áreas de paraqueratosis, sí hemos observado tinción tanto para WGA como para UEA-I, en estas zonas. Hecho que

puede estar relacionado con una alteración en el cambio en los azúcares de la superficie celular durante la cornificación anormal, descrito por Nemanic y col. (1983). Estos autores comprobaron también que el estrato granuloso del epitelio de la piel del hombre contiene tres o cuatro veces más glucolípidos que el córneo. De aquí, la gran intensidad en la tinción de la capa intermedia, que nosotros hemos obtenido para WGA y UEA-I.

En lo referente al apartado de expresión de citoqueratinas, lo primero que destaca es la diferencia entre los anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de CK humanas usadas en tejidos de otras especies animales, como en nuestro caso, las ratas. Al usar el "Cocktail" de citoqueratinas policlonales (de K bovinas), hemos observado positividad para todas las células de origen epitelial, normales y tumorales, tanto células sebáceas, como epiteliales escamosas de los carcinomas escamosos. No ocurre lo mismo con los anticuerpos monoclonales, con los que hemos encontrado tinciones más débiles en general y una ligera positividad para las células de origen sebáceo. Esto coincide con lo señalado por Russo y col. (1990) que han descrito ya la diferencia existente entre el uso de anticuerpos monoclonales antiqueratinas humanas en tejidos humanos y tejidos de rata. Los epítomos para las células de idéntica localización en las dos especies, pueden no ser los mismos.

Así, Wollina y col. (1981) en un estudio inmunohistoquímico sobre piel porcina, utilizaron anticuerpos mono- y policlonales y afirmaron que las investigaciones inmunohistoquímicas en el cerdo son difíciles de realizar porque los anticuerpos monoclonales no son específicos para CK porcinas, lo que también nos ocurre en rata. Así, nosotros hemos obtenido una buena expresión de CK PAE en todas las células sebáceas, tanto de glándulas normales, hiperplásicas o

tumorales. Así, las CK 1 y la CK APM no presentaron inmunotinción en la glándula de Zymbal normal o neoplásica, coincidiendo con autores como Zouboulis y col. (1981) los cuales cultivando sebocitos humanos *in vitro* observaron una ausencia total de CK 1.

Sí existió expresión de CK 4 en las glándulas sebáceas tanto de células normales como neoplásicas, coincidiendo con Latham y col. (1989) que obtuvieron positividad para esta CK en las capas basales, suprabasales y en los sebocitos maduros de las glándulas sebáceas de piel humana; sin embargo Van Mujien y col. (1986) no pudieron conseguir tinción para esta CK en cortes de glándulas sebáceas, y Moll y col. (1982) limitan esta citoqueratina a epitelios estratificados no cornificados. Latham y col (1989) sugieren que la diferencia radica en la técnica empleada, pues ellos realizaron la tinción en cortes en criostato y previa proteólisis. En nuestro estudio el problema técnico no parece existir pues obtuvimos tinción en todas las células sebáceas, siendo el anticuerpo monoclonal con el que conseguimos mayor intensidad de tinción.

Para la CK 8-18 obtuvimos en las células sebáceas una ligera positividad coincidiendo también con los trabajos realizados por Latham y col (1989); sin embargo Tsubura y col. (1981) no encontraron expresión de CK 8 en el aparato pilosebáceo de piel humana.

Con la CK 10-11 sí observamos positividad en las células sebáceas normales y en las células sebáceas más diferenciadas de adenocarcinomas y carcinomas escamosos sebáceos coincidiendo con Latham y col (1981), que también encontraron expresión de estas citoqueratinas en las capas de células más diferenciadas de glándulas sebáceas de piel humana.

Tsubura y col (1991) consiguieron una ligera expresión de CK 14 en las células periféricas de las glándulas sebáceas del aparato pilosebáceo de piel humana. Así mismo, nosotros pudimos observar el mismo patrón de tinción para esta CK en las glándulas sebáceas normales, hiperplásicas y adenomas, aumentando también el número de células sebáceas positivas en los adenocarcinomas y carcinomas sebáceos escamosos, en comparación con el resto de anticuerpos monoclonales. Latham y col. (1989) también obtuvieron positividad solo en sebocitos basales de piel humana.

La tinción obtenida en todas las células sebáceas ha sido citoplásmica, de acuerdo con los resultados obtenidos por Takata y col. (1989) en carcinomas sebáceos humanos de glándula parótida.

En cuanto a la expresión de CK en los epitelios del conducto auditivo externo y zonas escamosas de los diferentes T.G.Z. hemos de señalar la intensa tinción obtenida con la CK PAM y la CK 1 en el conducto auditivo externo y los conductos excretores de la glándula de Zymbal, corroborando la opinión de Moll y col. (1982) que describía la CK 1 como típica de epitelios queratinizados. Conseguimos una tinción media con la CK APM, CK MAE, CK 14 y CK 10-11 en la misma localización. La positividad de estas últimas coincide también con la expresada por Franke y col. (1981) en diferentes tejidos.

Con CK 4 obtuvimos una positividad muy ligera y la CK 8-18 fue negativa en el conducto auditivo externo y conductos excretores. Varios autores han descrito esta CK como típica de epitelios simples (Franke y col., 1981; Moll y col., 1982 y Battifora, 1989).

En las zonas de metaplasia escamosa de T.G.Z. la CK que mayor positividad ha presentado ha sido la CK 1 y con una intensidad media la CK 10-11, CK PAE, CK 14 y CK MAE. Aunque la CK 1 y CK 10-11 tuvieron un patrón irregular de menor tinción. La presencia de células fuertemente teñidas junto a otras de menor tinción o negativas, fué descrita por Viac y Reano (1982) sugiriendo que las poblaciones celulares de los carcinomas escamosos en la especie humana es heterogénea. Sin embargo para el resto de CK (CK PAE, CK MAE, CK 14) la tinción ha sido homogénea. Ligeramente positiva y también homogénea ha sido la expresión de CK APM y CK 8-18 y CK 4 coincidiendo con Thomas y col. (1984) que, estudiando distintas CK en tumores de piel de la especie humana, observaron homogeneidad en la expresión de CK 45, 46 y 55 kD en los carcinomas escamosos invasivos.

## **VII.- CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- 1.- La administración de 20 mg. del carcinógeno químico 7,12 dimetilbenzantraceno por sondaje intragástrico en ratas Sprague-Dawley de 45 días de edad, induce la aparición de tumores y/o hiperplasias en la glándula de Zymbal (T.G.Z.) que se detectan macroscópicamente a partir del día 156 post-administración.
- 2.- Tras el estudio histológico de la glándula de Zymbal de todos los animales tratados, observamos que un 45% de los animales que recibieron DMBA presentaron al menos 1 tumor (o hiperplasia) de dicha glándula, de estos un 38% tuvieron lesiones en las dos regiones auriculares.
- 3.- Histológicamente en la glándula de Zymbal hemos diagnosticado las siguientes alteraciones: Un 20% de hiperplasias con cambios quísticos; el 28% de adenomas; un 8% adenocarcinomas y el 40% carcinomas sebáceos escamosos. En un animal observamos las imágenes propias de un carcinoma escamoso.
- 4.- Al establecer los grupos de T.G.Z. respecto a su tiempo de desarrollo comprobamos que el 100% de hiperplasias y un 55% de adenomas fueron observados en el grupo necropsia; un 45% de adenomas, un 50% de adenocarcinomas y el 10% de carcinomas sebáceos escamosos

pertenecen al grupo de desarrollo tumoral de 1 mes; el 50% de adenocarcinomas y un 50% de carcinomas sebáceos escamosos, se corresponden con el grupo de desarrollo tumoral de 2 meses; el carcinoma escamoso y un 40% de carcinomas sebáceos escamosos aparecieron en el grupo de desarrollo tumoral de 3 meses; por lo que se sugiere una evolución de los tipos tumorales en el tiempo.

- 5.- La glándula de Zymbal normal se tiñe con todas las lectinas utilizadas, siendo UEA-I la lectina que mayor intensidad de tinción ha demostrado.
- 6.- En general, en las hiperplasias y T.G.Z. se produce una disminución en el marcaje con las lectinas. Las células sebáceas tumorales más diferenciadas se tiñeron mejor con todas las lectinas empleadas. En las zonas tumorales de diferenciación escamosa de los carcinomas sebáceos escamosos, las capas intermedias reaccionan con las lectinas WGA y UEA-I, mientras que la capa basal se tiñó únicamente con PNA.
- 7.- En la glándula de Zymbal normal, la CK de mayor expresión fué la CK 4, aunque la CK 14 fué un marcador selectivo de sebocitos basales.
- 8.- En los T.G.Z. las células sebáceas también han expresado CK 4 aunque con menor intensidad que en la glándula normal. Sin embargo, en las zonas escamosas de los carcinomas sebáceos escamosos la CK 1 es la que detectamos en mayor cantidad.

- 9.- El 100% de los animales tratados presentaron tumores mamarios el día 286 tras la administración del DMBA, habiendo aparecido el primer tumor mamario el día 24 post-administración. Histológicamente, diagnosticamos un 5.7% de fibromas, 14.8% de fibroadenomas, un 8% de adenocarcinomas tipo A, un 55.7% de adenocarcinomas tipo B, un 13% de adenocarcinoma tipo C, un 5% de adenocarcinomas tipo D, y un 1% de fibrosarcomas.

## **VIII.- RESUMEN**

## RESUMEN

Hemos realizado el estudio de los tumores de la glándula de Zymbal (T.G.Z.) en ratas Sprague-Dawley aparecidos tras la inducción química por el 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA), a razón de 20 mg./animal mediante sondaje intragástrico. Estos tumores se detectaron macroscópicamente a partir del día 156 post-administración del carcinógeno. Mediante el estudio histológico de la glándula de Zymbal de todos los animales tratados comprobamos que un 45% presentaron al menos un tumor (o hiperplasia) en dicha glándula y de estos animales, un 38% tuvieron lesiones en las dos regiones auriculares; los tipos de alteraciones diagnosticadas fueron: 20% hiperplasias con cambios quísticos, 28% adenomas, 8% adenocarcinomas, 40% carcinomas sebáceos escamosos y en un sólo animal observamos las imágenes propias de un carcinoma escamoso. Al establecer los grupos de T.G.Z. respecto a su tiempo de desarrollo tumoral se sugiere una evolución de los tipos tumorales en el tiempo.

Con las técnicas histoquímicas de lectinas comprobamos que la glándula de Zymbal normal se ha teñido con Con A, WGA, PNA y especialmente UEA-I; aunque se produce una disminución en el marcaje con las lectinas a medida que aumenta la imagen de malignidad en las células sebáceas tumorales. En las zonas de diferenciación escamosa de los carcinomas sebáceos escamosos, las capas intermedias reaccionan fuertemente con WGA y UEA-I, mientras que la capa basal se tiñó únicamente con PNA. En el estudio inmunohistoquímico observamos que la CK de mayor expresión en la glándula de Zymbal fue la CK 4, aunque la CK 14 fue un marcador selectivo de sebocitos basales. En los T.G.Z. las células sebáceas expresaron también CK 4 aunque con menor intensidad. Sin embargo, en las áreas escamosas de los carcinomas sebáceos escamosos la CK 1 es la que detectamos en mayor cantidad.

Al mismo tiempo, estos animales desarrollaron a partir del día 24, tumores de mama que identificamos como: 5.7% de fibromas, 14.8% de fibroadenomas, un 8% de adenocarcinomas tipo A, un 55.7% de adenocarcinomas tipo B, un 13% de adenocarcinoma tipo C, un 5% de adenocarcinomas tipo D, y un 1% de fibrosarcomas.

## **IX.- SUMMARY**

## SUMMARY

We have carried out the study of the tumors in the Zymbal gland (Z.G.T.) in Sprague-Dawley rats appeared after the chemical induction with 7,12 dimethylbenzanthracene (DMBA), at the rate of 20 mg/animal by means of intragastric sounding. These tumors were first detected 156 days after the administration of the carcinogen. Histological study of the Zymbal gland of all the animals we confirmed that, a 45% presented at least one tumor (or hyperplasia) in this gland, of these animals, a 38% had lesions in both auricular regions; the diagnosed alteration types were: 20% hyperplasia with cystic changes, 28% adenomas, 8% adenocarcinomas, 40% sebaceous squamous cell carcinoma and typical images of squamous cell carcinoma were observed in only one animal. When we establish the Z.G.T. groups by their tumoral development time it suggests an evolution of the tumoral types in time. With the lectin histochemical techniques we observed that the normal Zymbal gland has been stained with Con A, WGA, PNA and specially with UEA-I; although a decrease in the lectin staining is produced as the malignant image increases in the sebaceous tumour cells. In the areas of squamous differentiation of the sebaceous squamous cell carcinoma, the intermediate layer reacted strongly to WGA y UEA-I, but basal layer was stained with PNA. In the immunohistochemical study we observed that the CK with the highest expression in the Zymbal gland was the CK 4, nevertheless the CK 14 was a selective marker of basal sebocytes. In the Z.G.T. the sebaceous cells expressed too CK 4 but with less intensity. However, in the squamous zones of the sebaceous squamous cell carcinoma the CK 1 was the one we detected with the greater intensity.

At the same time, these animals developed since the 24th day, mammary tumors identified as: 5,7% were fibromas, 14,8% of fibroadenomas, an 8% of adenocarcinomas type A, 55,7% of adenocarcinomas type B, 13% of adenocarcinomas type C, an 5% adenocarciomas type D and 1% of fibrosarcoma.

## **X.- BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

**Achtstätter, T., Moll, R., Moore, B. & Franke, W.W. (1985)**

Cytoqueratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract. *J Histochem Cytochem*, 33(5): 415-426.

**Alroy, J., Ucci, A.A. & Pereira, E.A. (1984)**

Lectins: histochemical probes for specific carbohydrate residues. En DeLellis, R.E. *Advances in Histochemistry*. Masson, New York, 67-88.

**Altmannsberger, M., Osborn, M., Hölscher, A., Schaner, A. & Weber, K. (1981)**

The distribution of keratin type intermediate filaments in human breast cancer. *Virchows Arch cell pathol*, 37: 277-284.

**Archer, F.L. & Orlando, R.A. (1968)**

Morphology, natural history and enzyme patterns in mammary tumors of the rat induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res*, 28: 217-224.

**Asch, B.B., Burstein, N.A., Vidrich, A. & Sun, T.T. (1981)**

Identification of mouse mammary epithelia cells by immunofluorescence with rabbit and guinea pig antikeratin antisera. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 5643-5647.

**Atoji, Y., Suzuki, Y. & Sugimura, M. (1988)**

Lectin histochemistry of the interdigital gland in the Japanese serow (*capricornis crispus*) in winter. *J Anat*, 161: 150-170.

**Aub, J.C., Tieslau, C. & Lankester, A. (1963)**

Reactions of normal and neoplastic cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci*, 50: 613-619.

**Aub, J.C., Stanford, B.H. & Cote, M.N. (1965)**

Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proc Natl Acad Sci*, 54: 396-399.

**Azumi, N. & Battifora, H. (1987)**

The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 88: 286-296.

**Banks, W.J. (1986)**

*Applied Veterinary Histology*, 2<sup>a</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Bankston, P.W., Porter, G.A. & Milici, A.J. (1991)**

Differential and specific labeling of epithelial and vascular endothelial cells of the rat lung by *Lycopersicon esculentum* and *Griffonia simplicifolia* I lectins. *Eur J Cell Biol*, 54(2): 187-195.

**Bannach, P., Zerban, H. Schmid, E. & Franke, W.W. (1980)**

Liver tumors distinguished by immunofluorescence microscopy with antibodies to proteins of intermediate-sized filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 4948-4952.

**Bartek, J., Durban, E.M., Hallowes, R.C. & Taylor-Papadimitrov, J. (1985)**

A subclass of luminal epithelial cells in the human mammary gland, defined by antibodies to cytokeratins. *J Cell Sci* 75: 17-33.

**Bartek, J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Bartkova, J., Kerekes, Z., Rejthar, A. & Kovarik, J. (1991)**

A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: characterization and value in diagnostic histopathology. *J Pathol*, 164 (3): 215-224.

**Batsakis, J.G. (1979)**

*Tumors of the head and neck*. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Batsakis, J.G., Hardy, G.C. & Hishiyama, R.H. (1967)**

Ceruminous gland tumors. *Arch Otolaryng*, 86: 92-95.

**Battifora, H. & Kopinski, M. (1986)**

The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem*, 38(8): 1095-1100.

**Battifora, H. (1989)**

XIV Congreso Nacional de la S.E.A.P. "Diagnóstico Inmunohistoquímico de Procesos Neoplásicos". Pag. 19-25.

**Bauer, H., Hayami, M. & Becker, D. (1977)**

Structural and kinetic approach to plasma membrane functions. En Nicholau, A. Springer-Verlag, Berlin, Heidebergh, and New York, pp 104-113.

**Beliles, R.P. & Totman, L.C. (1989)**

Pharmacokinetically based risk assessment of workplace exposure to benzene. *Regul Toxicol Pharmacol*, 9(2): 186-195.

**Ben-Bassat, H., Inbar, M. & Sachs, L. (1970)**

Requirements for cell replication after SV40 infection for a structural change of the surface membrane. *Virology*, 40: 854-859.

**Ben-ze'ev, A. (1985)**

The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 780: 197-212.

**Berger, M.R., Habs, M. & Schmahl, D. (1986)**

Long-term toxicology effects of prednimustine in comparison with chlorambucil, prednisolone, and chlorambucil plus prednisolone in Sprague-Dawley rats. *Semin Oncol*, 13(1): 8-13.

**Bielchowsky, F. (1944)**

Distant tumors produced by 2-aminophenil and 2-acetyl-amino-fluorene. *Brit J Exptl Pathol*, 25: 1-4

**Bode, G., Hartig, F., Hebold, G. & Czerwek, H. (1985)**

Incidence of spontaneous tumors in laboratory rats. *Exp Pathol*, 28: 235-243.

**Boland, C.R., Chen, Y.F., Rinderle, S.L., Resan, J.H., Luk, G.D., Lynch, H.T. & Goldstein, I.J. (1991)**

Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Res*, 51(2): 657-665.

**Bologna, M. Allen, R. & Dulbecco, R. (1986)**

Organization of cytokeratin bundles by desmosomes in rat mammary cells. *J Cell Biol*, 102: 560-567.

**Borysenko, M. & Beringer, T. (1984)**

Functional Histology, 2<sup>a</sup> ed. Little, Brown and Company, Boston.

**Bourne, J.A. (1983)**

Handbook of immunoperoxidase staining methods. Dako Corporation, Santa Barbara.

**Boyd, W.C. & Shapleigh, E. (1954)**

Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119: 419.

**Boyton, J.R. & Searl, S.S. (1985)**

Sebaceous gland carcinoma. *Arch Ophthalmol*, 103(2): 175-179.

**Brandt, I., Kowalsky, B. & Gustafsson, J.A. (1989)**

Tissue localization of the carcinogenic glutamic acid pyrolysis product Glu-P-1 in control and beta-naphthoflavone-treated mice and rats. *Carcinogenesis*, 10(8): 1529-1533.

**Bramwell, M.E. & Harris, H. (1978)**

Some further information about the abnormal membrane glycoprotein associated with malignancy. *Proc R Soc Lond (Biol)*, 203: 93-99.

**Brassart, D., Kolodziejczyk, E., Granato, D., Woltz, A., Pavillard, M., Perotti, F., Frigeri, L.G., Liu, F.T., Borely, Y. & Neeser, J.R. (1992)**

An intestinal galactose-specific Lectin mediates the binding of murine IgE to mouse intestinal epithelial cells. *Eur J Biochem*, 203(3): 393-399.

**Buckland, M.D., Hall, L., Mowlem, A. & Whatley, B.F. (1981)**

A guide to laboratory animal technology. William Heinemann Medical Books, London.

**Burgdorf, W.H., Pitha, J., & Fahmy, A. (1986)**

Muir-Torre Syndrome. Histologic spectrum of sebaceous proliferations. *Am J Dermatol*, 8(3): 202-208.

**Burger, M.M. & Goldberg, A.R. (1967)**

Identification of tumor-specific determination on neoplastic cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci*, 57: 359-356.

**Caldero-Pardo, J. & Campo-Guerri, E. (1990)**

Lectinas: utilidad en histología e histopatología. *Patol*, 23: 127-135.

**Carrol, K.K. (1980)**

Lipids and carcinogenesis. *J Envir Path Tox*, 3: 353-371.

**Cervera, A.I., Jorda, E. Romance, L., Jorda, M., Ramon, D. & Castells, A. (1985)**

Carcinoma de glándulas sebáceas. *Med Cutan Ibero Lat Am*, 13(4): 313-316.

**Chaloin-Dufau, C., Pavitt, I., Delorme, P. & Dhovailly, D. (1993).**

Identification of keratins 3 and 12 in corneal epithelium of vertebrates. *Epithelial Cell Biol*, 2(3): 120-125.

**Colvin, R.B., Bhan, A.K., & McCluskey, R.T. (1988)**

Diagnostic immunopathology. Raven Press, New York.

- Coterill, J.A., Cunliffe, W.J., Williamson, B. & Bulusu, L. (1972)**  
Further observations on the pathogenesis of acne. *British Med J*, III: 444-449.
- Cooper, M.F., McGrath, H. & Shuster, S. (1976)**  
Seabaceous lipogenesis in human skin. *Br J Dermatol*, 94: 165-173.
- Cox, A.J., Wilson, R.H. & DeEds, F. (1947)**  
The carcinogenic activity of 2-acetaminofluorene. Characteristics of the lesions in albino rats. *Cancer res*, 7: 647-657.
- Dahme, E. & Weiss, E. (1989)**  
*Anatomia Patológica Especial Veterinaria*. Acribia, Zaragoza.
- Damjanov, I. (1987)**  
Biology of disease. *Lectin cytochemistry and histochemistry*. 57(1): 5-20.
- Dansey, R., Murray, J., Ninin, D. & Bezwoda, W.R. (1988)**  
Lectin binding in human breast cancer: clinical and pathologic correlations with fluorescein-conjugated peanut wheat germ and concanavalin A binding. *Oncology*, 45: 300-302.
- Deeberg, F., Knup, F. & Rehm, S. (1986)**  
Spontaneous epithelial tumors of the skin in Han: WIST- and DA/Han rats. *Z Versuchstierkd*, 28(1-2): 45-57.
- Delellis, R.A. (1988)**  
*Advances in immunohistochemistry*. Raven Press, New York.
- Dellmann, H.D. & Brown, E.M. (1976)**  
*Histología Veterinaria*. Acribia, Zaragoza.

**DeSombre, E.R., Anderson, W.A. & Kang, Y.H. (1975)**

Identification, subcellular localization and estrogen regulation of peroxidase in 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Cancer Res*, 35: 172-179.

**DeSombre, E.R. & Lyttle, C.R. (1978)**

Isolation and purification of rat mammary tumor peroxidase. *Cancer Res*, 38: 4086-4090.

**Doran, T.I., Vidrich, A. & Sun, T.T. (1980)**

Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell*, 22: 17-25.

**Doran, T.I., Baff, R., Jacobs, P. & Pacia, E. (1991)**

Characterization of human sebaceous cells in vitro. *J Invest Dermatol*, 96(3): 341-348.

**Drouhault, R. Dufy, B. (1983)**

Influence de la calcitonina et de l'ACTH 4-10 sur les phénomènes d'induction tumorales mammaire induits par un carcinogène chimique, le 7-12 diméthylbenz(a)anthracène. *CR Soc Biol*, 178: 278-285.

**Dulbecco, R., Unger, M. Armstrong, B., Bowman, M. & Syka, P. (1983)**

Epithelial cell types and their evolution in the rat mammary gland determined by immunological markers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 1033-1037.

**El Abed, A., Kerdelhue, B., Castanier, M. & Scholler, R. (1987)**

Stimulation of estradiol-17 $\beta$  secretion by 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene during mammary tumour induction in Sprague-Dowley rats. *J Steroid Biochem*, 26: 733-738.

- Elias, P.M., Chung, J.C., Orozco-Topete, R. & Nemanic, M.K. (1983)**  
Membrane glycoconjugates visualization and biosynthesis in normal and retinoid-treated epidermis. *J Invest Dermatol*, 81:81-85.
- Escrich, R. (1985)**  
Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamarios experimentales. Tesis Doctoral. Universidad de Bellaterra, Barcelona.
- Fawcet, D.W. (1994)**  
A textbook of Histology. 12<sup>a</sup> ed. Chapman&Hall, New York.
- Ferguson, J.W., Geary, C.P. & McAlister, A.D. (1987)**  
Sebaceous cell adenoma. Rare intraoral occurrence of a tumor wich is a frequent marker of Torre's syndrome. *Pathology*, 19(2): 204-208.
- Franke, W.W., Schmid, e., Winters, S., Osborn, M. & Weber, K. (1979)**  
Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res*, 123: 25-46.
- Franke, W.W., Denk, H. Kalt, R. & Schmid, E. (1981)**  
Biochemical and immunological identification of cytokeratin proteins present in hepatocytes of mammalian liver tissues. *Exp Cell Res*, 131: 299-318.
- Franke, W.W., Schmid, E., Freudenstein, C., Appelhaus, B., Osborn, M. Weber, K. y Keenan, T.W. (1980)**  
Intermediate-sized filaments of the prekeratin type in myoepithelial cells. *J Cell Biol*, 84: 633-654.

**Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. Schmid, E., Y Freudestein, C. (1978)**

Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 75: 5034-50.

**Franke, W.W., Sciller, D.L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E. & Engelbrecht, I. (1981)**

Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. J Mol Biol, 153: 933-959.

**Franke, W.W., Weber, K. Osborn, M., Schmid, E. & Freudestein, C. (1978)**

Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament-like arrays in various cells of epithelial character. Exp Cell Res, 116: 429-445.

**Franke, W.W., Winter, S., Grund, C., Schmid, E., Schiller, D.L. & Jarasch, E.D. (1981)**

Isolation and characterization of desmosome-associated tonofilaments from rat intestinal brush border. J Cell Biol, 90: 111-127.

**Friedman, K.J., Boudreau, S., & Farmer, E.R. (1987)**

Superficial epithelioma with sebaceous differentiation. J Cutan Pathol, 14(4): 193-197.

**Fuchs, E. & Green, H. (1980)**

Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell, 19: 1033-1042.

**Gabbiani, G. Kapanci, Y., Barazzone, P. & Franke, W.W. (1981)**

Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol*, 104(3): 206-216.

**Gallagher, J.T. (1984)**

Carbohydrate-binding properties of lectins: A possible approach to lectin nomenclature and classification. *Biosci Rep*, 4: 621-632.

**Garcia-Martinez, V. (1986)**

Estructura y función del citoesqueleto en células normales y células tumorales. *Oncología*, 4, IX(196): 65-84.

**Gard, D.L., Bell, P.B. & Lazarides, E. (1979)**

Coexistence of desmin and the fibroblastic intermediate filament subunit in muscle and nonmuscle cells; identification and comparative analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 6780-6784.

**Geschicker, C.F. & Byrnes, E.W. (1942)**

Factors influencing the development and time of appearance of mammary cancer in the rat in response to estrogen. *Arch Path*, 33: 334-356.

**Goldstein, I.J., Hughes, R.C. Monsigni, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980)**

What should be called a lectin. *Nature*, 285: 66.

**Goldstein, I.J. & Poretz, R.D. (1986)**

Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. En Liener, I.E., Sharon, N. y Goldstein, I.J. *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Academic Press, New York, 33-247.

**Gonzalez-Campora, R., Sanchez, F., Martin, I., Mora, J., Montero, C., Galera-Davidson, H. (1988)**

Lectin histochemistry of the thyroid gland. *Cancer*, 62: 2354-2362.

**Gopinath, C. (1986)**

Spontaneous tumours in Sprague-Dowley rats. *Food Chem Toxicol*, 24(2): 113-120.

**Gould, M.N., Grau, D.R., Seidman, L.A., & Moore, C. (1986)**

Interspecies comparison of human and rat mammary epithelial cell-mediated mutagenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res*, 46: 4942-4945.

**Griswold, D.P. Skipper, H.E., Laster, W.R., Jr Wilcox, W.S. Schabel, F.M. Jr. (1966)**

Induced mammary carcinoma in the female rat as a drug evaluation system. *Cancer Res*, 26: 2169-2180.

**Griswold, D.P.Jr. & Green, C.H. (1970)**

Observations on the hormone sensitivity of 7, 12-DMBA-induced mammary tumors in the Sprague-Dowley rat. *Cancer Res*, 30: 819-826.

**Gruenstein, M., Meranze, D.R. & Shimkin, M.B. (1966)**

Mammary, sebaceous, and cutaneous neoplasms and leukaemia in male wistar rats receiving repeated gastric instillations of 3-methylcholanthrene. *Cancer Res*, 26: 2202-2205.

**Gude, W.D., Cosgrove, G.E. & Hirsch, G.P. (1970)**

Histological atlas of the laboratory mouse. Plenum Press, New York.

**Gurr, E. (1976)**

Biological staining methods. 8<sup>a</sup> ed. Searle Diagnostic, Tonbridge.

**Gusterson, B.A., Warburton, M.J. Mitchell, D., Ellison, M., Neville, A.M. & Rudland, P.S. (1982)**

Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. *Cancer Res*, 42: 4763-4770.

**Hakomori, S. & Kannagi, R. (1983)**

Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst*, 71: 231-251.

**Ham, A.W. & Cormak, D.H. (1984)**

Tratado de Histología. 8ª ed. Interamericana, Madrid.

**Harkness, J.E. & Wagner, J.E. (1977)**

Neoplasias en la rata. En *Biología y clínica de conejos y roedores*. Acribia, Zaragoza, pp 121-123.

**Harris, P. (1947)**

Cancer res, 7:88. En *Histogenesis of sebaceous gland carcinomas*. Skoryna et al (1951). *J Exp med*, 94:1-7.

**Haslam, S.Z. & Bern, H.A. (1977)**

Histopathogenesis of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 4020-4024.

**Hilpert, D. & Neumann, H.G. (1985)**

Accumulation and elimination of macromolecular lesions in susceptible and non-susceptible rat tissues after repeated administration of trans-4-acetylaminostilbene. *Chem Biol Interact*, 54(1): 85-95.

**Hirose, M., Masuda, A., & Fukushima, S. (1988)**

Effects of subsequent antioxidant treatment on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated carcinogenesis of the mammary gland, ear duct and forestomach in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, 9(1): 101-104

**Hirose, M., Masuda, A., Inoue, T., Fukushima, S., & Ito, N. (1986)**

Modification by antioxidants and p,p'-diaminodiphenylmethane of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis of the mammary gland and ear duct in CD rats. *Carcinogenesis*, 7(7): 1155-1159.

**Hirose, M., Masuda, A., Ito, N., Kamano, K. & Okuyama, H. (1990)**

Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethyl-hydrazine (DMH)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis*, 11(5): 731-735.

**Holthöfer, H., Virtanen, I., Kariniemi, L., Hormia, M., Linder, E. & Miettinen, M.D. (1982)**

*Ulex europaeus* I Lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest*, 47(1): 60-65.

**Hopkins, G.J. & Carrol, K.K. (1979)**

Relationship between amount and type of dietary fat in promotion of mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst*, 62: 1009-1012.

**Hopkins, G.J., Kennedy, T.G. & Carroll, K.K. (1981)**

Polyunsaturated fatty acids as promoters of mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst*, 66: 517-522.

**Huff, J.E., Haseman, J.K., DeMarini, D.M., Eustis, S., Maronpot, R.R., Peters, A.C., Persing, A.L., Chrisp, C.E. & Jacobs, A.C. (1989)**

Multiple-site carcinogenicity of benzene in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect*, 82: 125-163.

**Huggins, C., Graund, L.C., & Brillantes, F.P. (1961)**

Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its supression. *Nature*, 21: 204-207.

**Huggins, C. (1965)**

Two principles in endocrine therapy of cancers: hormone deprival and hormone interference. *Cancer Res*, 25: 1163-1167.

**Inbar, M., Rabinovitz, Z. & Sachs, L. (1969).**

The formation of variants with a reversion of properties of transformed cells. III Reversion of the structure of the cell membrane. *Int J Cancer*, 4: 690-696.

**Inbar, M., Ben-Bassat, H. & Sachs, L. (1972)**

Membrane changes associated with malignancy. *Nature (London) New Biol*, 236: 3-4.

**Jones, T.C. & Hunt, R.D. (1983)**

*Veterinary Pathology*, 5<sup>a</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

**Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer, N. (1985)**

*Pathology of domestic animals*, 3<sup>a</sup> ed. Academic Press, Orlando.

**Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (1987)**

*Histología básica*, 2<sup>a</sup> ed. Salvat, Barcelona.

**Kahn, H.J., Thomer, P.S., Yeger, H., Bailey, D. & Banmal, R. (1986)**

Distinct keratin patterns demonstrated by immunoperoxidase staining of adenocarcinomas, carcinoids, and mesotheliomas using polyclonal and monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*, 86: 566-574.

**Kartasova, T., Roop, D.R., Holbrook, K.A., & Yuspa, S.H. (1993)**

Mouse differentiation-specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network. *J Cell Biol*, 120(5): 1251-1261.

**Kartasova, T., Roop, D.R., & Yuspa, S.H. (1992)**

Relationship between the expression of differentiation specific keratins 1 and 10 cell proliferation in epidermal tumors. *Mol Carcinog*, 6(1): 18-25.

**Kato, T., Migita, H., Ohgaki, H., Sato, S., Takayama, S., Sugimura, T. (1989)**

Induction of tumors in the Zymbal gland, oral cavity, colon, skin and mammary gland of F344 rats by a mutagenic compound, 2-amino-3,4 dimethylimidazol (4,5-*f*) quinoline. *Carcinogenesis*, 10(3): 601-603.

**Kealey, T., Lee, C.M., Thody, A.J. & Coaker, T. (1986)**

The isolation of human sebaceous glands and apocrine sweat glands by shearing. *Br J Dermatol*, 114: 181-188.

**Kellokumpu, I., Karhi, K. & Andersson, L.C. (1986)**

Lectin-binding sites in normal, hyperplastic, adenomatous and carcinomatous human colorectal mucosa. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A*, 92: 1-12.

**King, W.J. & Greene, G.L. (1984)**

Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307: 745-747.

**Kinney, S.E. (1989)**

Squamous cell carcinoma of the external auditory canal. *Am J Otol*, 10(2): 111-116.

**Kitt, T. (1985)**

Tratado de Anatomía Patológica General para veterinarios y estudiantes de veterinaria. Labor, Barcelona.

**Klein-Szanto, A.J.P., Nelson, K.G., Shah, Y., Slaga, T.J. (1983)**

Simultaneous appearance of keratin modifications and gamma-glutamyltransferase activity as indicators of tumor progression in mouse skin papillomas. *J Clin Invest*, 70:161.

**Kligman, A.M., Wheatley, V.R. & Mills, O.H. (1970)**

Comedogenicity of human sebum. *Arch dermatol*, 102:267.

**Kocourek, J. (1986)**

Historical background. En Liener, I.E., Sharon, N. y Goldstein, I.J. The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. Academic Press, New York, pp 1-32.

**Krepler, R., Denk, H., Weirich, E., Schmid, E. & Franke, W.W. (1981)**

Keratin-like proteins in normal and neoplastic cells of human and rat mammary gland as revealed by immunofluorescence microscopy. *Differentiation*, 20: 242-252.

**Kurata, Y., Hagiwara, A., Tamano, S., Shibata, M., Tanaka, H., Yamada, M., Ito, N., Fukushima, S. (1989)**

Modifying effects of beraprost sodium (TRK-100) on M-methyl-N-nitrosourea (MNU) carcinogenesis in F344 rats. *J Toxicol Sci*, 14(1): 1-39.

**Larcher, F., Bauluz, C., Diaz-Guerra, M., Quintanilla, M., Conti, C.J., Ballestin, C. & Jorcano, J.L. (1992)**

Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol Carcinog*, 6(2): 112-121.

- Latham, J.A., Redfern, P.F., Thody, A.J. & De Kretser, T.A. (1989)**  
Immunohistochemical markers of human sebaceous gland differentiation. *J. Histochem Cytochem*, 37(5): 729-734.
- Laws, J.O., Rudali, G. Royer, R. & Mabile, P. (1955)**  
Early changes produced in the auditory sebaceous gland (Zymbal's gland) of the rat by 2-acetylaminofluorene. *Ibid*, 15: 139-142.
- Leader, M., Collins, M. Patel, J., & Henry, K. (1986)**  
Staining for factor VIII related antigen and *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) in 230 tumors. An assessment of their specificity for angiosarcoma and Kaposi's sarcoma. *Histopathology*, 10: 1153-1162.
- Leeson, T.S. & Leeson, C.R. (1982)**  
*Atlas de Histología. Interamericana, México.*
- Leon, J., Guerrero, I. & Pellicer, A. (1988)**  
Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos. *Investigación y ciencia*, 143: 20-32.
- Li Px (1990)**  
Histochemical localization of glycoconjugate and CEA-glycoprotein in human lung neoplasm. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih*, 12(3): 183-185.
- Likhachev, A., Anisimov, V., Paranova, L. & Posharisski, K. (1985)**  
Effect of exogenous beta-glucuronidase on the carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine in rats: evidence that carcinogenic intermediates form conjugates and act through their subsequent enzymatic release. *Carcinogenesis*, 6(5): 679-681.
- Little, C.J., Pearson, G.R. & Lane, J.G. (1989)**  
Neoplasia involving the middle ear cavity of dogs. *Vet Rec*, 124(3): 54-57.

**Louis, C.J., Wyllie, R.G. & Chou. S.T. (1981)**

Lectin-binding affinities of human epidermal tumors and related conditions. *Am J Clin Pathol*, 75(5): 642-647.

**Low, L.K., Meeks, J.R., Norris, K.J., Nehlman, M.A. & Maeker, C.K. (1989)**

Pharmacokinetics and metabolism of benzene in Zymbal gland and other key target tissues after oral administration in rats. *Environ Health Perspect*, 82: 215-222.

**Luna, L.G. (1968)**

Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology, 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Book Company, New York.

**McCormick, D.L., May, C.M., Thomas, C.F. & Detrisac, C.J. (1986)**

Anticarcinogenic and hepatotoxic interactions between retinyl acetate and butylated hydroxytoluene in rats. *Cancer Res*, 46: 5264-5269.

**McCoy, G.W. (1989)**

A preliminar report on tumors found in wild rats. *J Med Res*, 21: 285-296.

**Maltoni, C., Ciliberti, A., Cotti, G., Conti, B. & Belpoggi, F. (1989)**

Benzene, an experimental multipotential carcinogen: results of the Long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. *Environ Health Perspect*, 82: 109-124.

**Maltoni, C., Conti, B., Cotti, G. & Belpoggi, E. (1985)**

Experimental studies on benzene carcinogenicity at the Bologna Institute of Oncology: current results and on going research. *Am J Ind Med*, 7(5-6): 415-446.

**Mancini, M.A., Majumdar, D., Chatterjee, B. & Roy, A.K. (1989)**

$\alpha_{2u}$ -Globulin in modified sebaceous glands with pheromonal functions: localization of the protein and its mRNA in preputial, meibomian, and perianal glands. *J Histochem Cytochem*, 37 (2): 149-157.

**Markey, A.C., Lane, E.B. Churchill, L.J., MacDonald, D.M. & Leigh, I.M. (1991)**

Expresion of simple epithelial keratins 8 and 18 in epidermal neoplasia. *J Invest Dermatol*, 97(5): 763-770.

**Marumatsu, T. (1988)**

Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation and development. *Biochimie*, 70: 1587-1596.

**Massa, M.C., & Medenica, M. (1985)**

Cutaneous adnexal tumors and cysts a review (part I). *Pathol Annu*, 20(2): 189-233.

**Meheregan, A.H. (1985)**

Sebaceous tumors of the skin. *J Cutan Pathol*, 12: 196-199

**Messadi, D.V., Billing, P., Shklar, G., & Kennedy, A.R. (1986)**

Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. *J Natl Cancer Inst*, 76: 447-452.

**Michaelis, L. (1987)**

Ear, nose and throath histopathology. Springer-Verlag, Berlin Heilderberg, 1987.

**Mobbs, B.G. (1966)**

The uptake of tritiated oestradiol by dimethylbenzanthracene-induced mammary tumours of the rat. *J Endocrinol*, 36:409-414.

**Mohr, U., Bader, R., Ernst, H., Ettlín, N., Gembart, C., Harleman, J.H., Hartig, F., Jahn, W., Kaliner, G., Karbe, E., Kaufmann, W., Krieg, K., Krimke, G., Kütler, K., Landes, C., Mettler, F., Morawietz, G., Notman, J., Püchner, H., Qureshi, S., Reznik, G., Rittinghausen, S., Tuch, K., Urwyler, H., Weisse, G., Weisse, I. & Zehnder, J. (1990)**

Tumor registry data base. Suggestions for a systematized nomenclature of pre-neoplastic and neoplastic lesions in rats. *Exp Pathol*, 38: 1-18.

**Mohr, U. (1993)**

International classification of rodent tumours. Part I: The rat. IARC Scientific Publications No. 122, Lyon.

**Moll, E., Franke, W.W., Schiller, C.L. (1982)**

The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31: 11-24.

**Moll, R., Werner, W., Volc-Platzer, B. & Krepler, R. (1982)**

Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *J Cell Biol*, 95: 285-295.

**Moore, C.J., Eldridge, S.R., Tricomi, W.A. & Gould, M.N. (1987)**

Quantitation of benzo[a]pyrene and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene binding to nuclear macromolecules in human and rat mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 47: 2609-2613

**Moulton, J.E. (1978)**

Tumors in domestic animals, 2<sup>a</sup> ed. University of California Press, Berkeley.

**Müller, G.H., Kirk, R. & Scott, D. (1989)**

Small animal dermatology. 3<sup>a</sup> ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

**Nadasdy, T., Kemeny, E., Molnar, G., Savay, L., Krenacs, T., & Ormos, J. (1990)**

A case of ceruminous adenocarcinoma. Ultrastructural and immunohistochemical studies. *Morphol Igazsagugyi Orv Sz*, 30(2): 81-89.

**Nemanic, M.K., Whitehead, J.S. & Elias, P.M. (1983)**

Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation: visualization with lectins and role of glycosidases. *J Histochem Cytochem*, 31(7): 887-897.

**Nicholson, G.L. (1974)**

The interaction of lectins with animal cell surfaces. *Int Rev Cytol*, 39: 89-190.

**Noda, Y., Oosumi, H., Morishima, T., Tsujimura, T. & Mori, M. (1987)**

Immunohistochemical study of carbonic anhydrase in mixed tumours and adenomas of sweat and sebaceous glands. *J Cutan Pathol*, 14(5): 285-290.

**Nowell, P.C. (1960)**

Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res*, 20: 426-466.

**O'Dowd, J.J. & Burnett, A.K. (1988)**

The distribution of DMBA and its dihydrodiols in tissues of control and Sudan-III-treated Long-Evans rats after the injection (i.v.) *in vivo* of a leukaemogenic dose of the hydrocarbon. *Carcinogenesis*, 9(1): 29-35.

**Ohgaki, H., Hasegawa, H., Kato, T., Suenaga, M., Ubukata, M. & Sato, S. (1986)**

Carcinogenicity in mice and rats of heterocyclic amines in cooked foods. *Environ Health Perspect*, 67: 129-134.

**Ookusa, R. (1983)**

Distribution of glycoconjugates in normal human skin using biotinyl lectins and avidin-horseradish peroxidase. *Histochemistry*, 79: 1-7.

**Orentreich, N. & Matias, J.R. (1988)**

Local stimulation of sebaceous gland activity by the topical administration of dehydroepiandrosterone. *J Soc Cosmet Chem*, 39: 291-303.

**Osborn, M. & Weber, K. (1983)**

Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filaments typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest*, 48(4): 372-394.

**Paniagua, R. & Nistal, M. (1983)**

Introducción a la histología animal comparada. Atlas-libro de la estructura microscópica de los animales. Labor, Barcelona.

**Pardo, F.J. (1988)**

Anatomía Patológica general y especial de la neoplasias. Científico Médica, Barcelona.

**Pearse, A.G.E. (1985)**

Histochemistry, theoretical and applied. Vol II: analytical technology, 4<sup>a</sup> ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

**Peña, L. (1989)**

Estudio biológico, histológico, inmunohistoquímico y ultraestructural de los tumores de mama inducidos con DMBA en ratas Sprague-Dawley. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. UCM. Madrid.

- Perkins, W., Campbell, I., Leigh, IM. & Mackie, R.M. (1993)**  
Keratin expression in normal skin and epidermal neoplasms demonstrated by a panel of monoclonal antibodies. *J Cutan Pathol*, 19(6): 476-482.
- Pinkus, G.S., Etheridge, C.L., & O'Connor, E.M. (1986)**  
Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? *Am J Clin Pathol*, 85(3): 269-277.
- Pliss, G.B. (1987)**  
Tumours in the auditory sebaceous gland. *En Pathology of tumours in laboratory animals. Vol. I. Turusov, V.S. IARC, Lyon.*
- Premi, T., Said, J.W., Nash, G. & Banks-Schlegel, S. (1984)**  
Profiles of keratin proteins in basal and squamous cell carcinoma of the skin. *Lab Invest*, 50(1): 36-41.
- Qiu, J.H. (1986)**  
Pathological studies on epidermic and appendage tumors and tumor-like lesions-analysis of 3.425 cases. *Chun Hua Chung Liu Tsa Chih*, 8(1): 48-50
- Quinlan, R.A. & Franke, W.W. (1983)**  
Molecular interactions in intermediate-sized filaments revealed by chemical cross-linking. *Eur J Biochem* 132: 477-484.
- Quinlan, R.A. Hatzfeld, M. & Franke, W.W. (1986)**  
Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins. *J Mol Biol*, 192: 337-349.
- Rabanal, M.R. (1991)**  
Detección inmunocitoquímica de los filamentos intermedios en tejidos normales y en neoplasias cutáneas del perro. Tesis Doctoral. Universidad de Bellaterra, Barcelona.

**Raizada, R.M. & Khan, N.U. (1986)**

Aural sebaceous adenomas. *J Laryngol Otol*, 100(12): 1413-1416.

**Ramaekers, F.C.S., Haag, D. Kant, A., Moesker, O., Jap, P.M.K., & Vooijs, G.P. (1983)**

Coexpression of keratin and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 2618-2622.

**Rapin, A.M., & Burger, M. (1974)**

Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. *Adv Cancer Res*, 20: 1-91.

**Reddy, M.V., Blackburn, G.R., Irwin, S.E., Kommineni, C., Mackerer, C.R., Nehlman, M.A. (1989)**

A method for in vitro culture of rat Zymbal gland: use in mechanistic studies of benzene carcinogenesis in combination with 32p-postlabeling. *Environ Health Perspect*, 82: 239-249.

**Reddy, M.V., Bleicher, W.T., Blackburn, G.R. & Mackerer, C.R. (1990)**

DNA adduction by phenol, hydroquinone, or benzoquinone in vitro but not in vivo: nuclease P1-enhanced 32p-postlabeling of adducts as labeled nucleoside bisphosphates, dinucleotides and nucleoside monophosphates. *Carcinogenesis*, 11(8): 1349-1357.

**Rice, J.M., & Khan, N.U. (1986)**

Sebaceous adenomas with associated epidermal hyperplasia and papilloma formation as major type of tumor induced in mouse skin by high doses of carcinogens. *Cancer Lett*, 33(3): 295-306.

**Rogers, A.E., Akhtar, R. & Zeisel, S.H. (1990)**

Procarbazine carcinogenicity in methotrexate-treated or lipotrope-deficient male rats. *Carcinogenesis* 11(9): 1494-1495.

**Rook, A., Wilkinson, D.S. & Ebling, F.J. (1989)**

Tratado de dermatología, 4ª ed. Doyma, Barcelona.

**Russo, J., Gusterson, B., Rogers, A.E., Russo, I.H., Wellings, S.R., & Van Zwieten, M.J. (1990)**

Biology of disease. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest*, 62(3): 244-267.

**Said, J.W., Nash, G. Banks-Schlegel, S., Sasoon, A.F., Murakami, S. & Shintaku, I.P. (1983)**

Keratin in human lung tumors. Patterns of localization of different-molecular weight keratin proteins. *Am J Pathol*, 113(1): 27-32.

**Sanchez, E., Diego, V. & Sanz, M.D. (1985)**

Sebaceoma. *Am. J. Dermatopathol*, 7(2): 198-199.

**Sasano, H. Nose, M. & Sasano, N. (1989)**

Lectin histochemistry in adrenocortical hyperplasia and neoplasms with emphasis on carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 113: 68-72.

**Sasano, H., Saito, Y., Nagura, H., Kudo, R., Rojas, M. & Silverberg, S.G. (1991)**

Lectin histochemistry in mucinous and serous ovarian neoplasms. *Int J Gynecol Pathol*, 10(3): 252-259.

**Schardein, J.L. & Kaump, D.H. (1966)**

Auditory canal structures in rats as altered by aging and by the administration of tris (*p-aminophenil*)carbonium pamoate. *Cancer Res*, 26(1): 1625-1632.

**Schaumburg-Lever, G., Alroy, J., Ucci, A.A. & Lever, W.F. (1984)**

Distribution of carbohydrate residues in normal skin. *Arch Dermatol Res*, 276: 216-223.

**Schaumburg-Lever, G., Alroy, J., Ucci, A.A. & Lever, W.F. (1986)**

Cell-surfaces carbohydrates in proliferative epidermal lesions. II masking of peanut agglutinin (PNA) binding sites in solar keratoses, Bowen's disease and squamous cell carcinoma by neuraminic acid. *J Cutan Pathol*, 13: 163-171.

**Schlegel, R., Banks-Schlegel, S. & Pinkus, G.S. (1980)**

Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues. *Lab Invest*, 42: 91-96.

**Schlegel, R., Banks-Schlegel, S. McLeod, J.A. & Pinkus, G.S. (1980)**

Immunoperoxidase localization of keratin in human neoplasm. *Am J Pathol*, 101: 41-50.

**Sela, B.A., Lis, H. Sharon, N. (1970)**

Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. *J Membr Biol*, 3: 267-279.

**Shabana, A.H., Khattab, R., Sawaf, M.H., Forest, N. & Ouhayon, J.P. (1992)**

A switch in cytoqueratin expression and intermediate filament organization associated with epithelial stratification. *J Biol Buccale*, 20(1): 33-43. (Abstrad)

**Sharon N. & Lis, H. (1972)**

Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 177: 949-959.

**Sharon, N. & Lis, H. (1975)**

Use of lectins for the study of membranes. *Methods Membr Biol*, 3: 147-200.

**Shirai, T., Nakamura, A., Fukushima, S., Takahashi, S., Ogawa, K. & Ito, N. (1989)**

Effects of age on multiple organ carcinogenesis induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl in rats, with particular reference to the prostate. *Jpn J Cancer Res*, 80(4): 312-316.

**Simpson-Herren, L. & Griswold, D.P. Jr. (1970)**

Studies of the kinetics of growth and regression of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary adenocarcinoma in Sprague-Dowley rats. *Cancer Res*, 30: 813-818.

**Skoryna, S.C., Ross, R.C. & Rudis, L.A. (1951)**

Histogenesis of sebaceous gland carcinomas produced in rats by 2-acetylaminofluorene. *J Exp Med*, 94: 1-17.

**Smith, E.M. & Calhoun, M.L. (1969)**

The microscopic anatomy of the white rat. A photographic atlas. Iowa State University Press. Ames.

**Snell, K.C. (1965)**

Spontaneous lesions of the rat. En W.E. Ribelin & J.R. McCoy (eds). *Pathology of laboratory animals*. Springfield, III.

**Spitz, S. Maguigan, W.H. & Dobriner, K. (1950)**

The carcinogenic action of benclidine. *Cancer*, 3:789-804.

**Staskova, Z., Vojtesek, B., Lukas, J., Pavlovska, R., Kamincka, T., Kovarok, J. & Bartek, J. (1991)**

Phylogenetically conserved epitopes of the keratin 8 polypeptide recognized by a novel set of monoclonal antibodies. *Folia Biol Praha*, 37(3-4): 197-206.

**Stillmark H. (1888)**

Über Rizin, ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen euphorbiaceen. Inaug Dis Dorpat. (Ref. de Patol, 23: 127-135, 1990).

**Stoler, A.B., Stembach, F., & Balmain, A. (1993)**

The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *J Cell Biol*, 122(5): 1103-1117.

**Strafuss, A.C. (1985)**

Skin tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 15(3): 473-492.

**Sun T., Eichner, R., Nelson, W.G., Tseng, S.C., Weiss, R.A., Jarvinen, H. & Woodcock-Mitchell, J. (1983)**

Keratin classes: Molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol*, 81: 109-115.

**Sun, T.T., Shih, C. & Green, H. (1979)**

Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 2813-2817.

**Taatjes, D.J., Barcomb, L.A., Leslie, K.O. & Low, R. (1990)**

Lectin binding patterns to terminal sugars of rat lung alveolar epithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 38(2): 233-244.

**Takata, T., Ogawa, I. & Nikai, H. (1989)**

Sebaceous carcinoma of the parotid gland. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 414: 459-464.

**Talwalker, P.K., Meites, J. & Mizuno, H. (1964)**

Mammary tumor induction by estrogen or anterior pituitary hormones in ovariectomized rats given 7,12-dimethyl 1,2-benzanthracene. *Proc Soc Expe Biol Med* 116: 531-534.

**Tamaki, K., Ohara, K. & Ishibashi, Y. (1987)**

PNA- binding sites in sebaceous tumors. *J Dermatol*, 14(2): 118-121.

**Tannenbaum, A., Vesselinovitch, S.C., Maltoni, C. & Mitchell, D.S. (1962)**

Multipotential carcinogenicity of urethan in the Sprague-Dawley rat.

*Cancer Res* 22: 1362-1371.

**Tchornobay, A.M., Levigne, V., Favre, J. & Claudy, A.L. (1992)**

Extraocular sebaceous carcinoma. *Acta Derm Venereol Stockh*, 72(1): 20-21.

**Terg, R., Bruguera, M., Campo, E., Hojman, R., Levi, D. & Podesta, A. (1988)**

Epithelioid hemangi endothelioma of the liver: report of two cases. *Liver*, 8:105-110.

**Theilen, G.H. & Madewell, B.R. (1987)**

*Veterinary Cancer Medicine*. Lea & Febiger, Philadelphia.

**Thomas, P., Said, J.W., Nash, G., & Banks-Schlegel, S. (1984)**

Profiles of keratin proteins in basal and squamous cell carcinomas of the skin. *Lab Invest*, 50(1): 36-41.

**Thomson, R.G. (1984)**

*Anatomía Patológica General Veterinaria*. Acribia, Zaragoza.

**Thomson, R.G. (1988)**

*Special Veterinary Pathology*. B.C. Decker Inc. Toronto.

**Traweek, T. Lui, J. & Battifora, H. (1993).**

Keratin gene expression in non-epithelial tissues. *Am J Pathol*, 142(4): 1111-1118.

- Tsubura, A., Okada, H., Sasaki, M., Dairkee, S.H. & Morii, S. (1991)**  
Immunohistochemical demonstration of keratins 8 and 14 in benign tumours of the skin appendage. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 418(6): 503-507.
- Turusov, V.S. (1987)**  
Pathology of tumours in laboratory animals. Vol I. Parts 1 and 2. IARC, Lyon.
- Van Mujien, G. N. P., Ruiter, D.J., Franke, W.W., Achstatter, t., Haasnoot, W.H.B., Ponc, M. & Warnaar, S. (1986)**  
Cell type heterogeneity of citokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytoqueratins nos. 4 y 13. *Exp Cell Res*, 162: 97.
- Viac, J., Reano, A. & Thivolet, J. (1982)**  
Cytoqueratins in human basal and squamous cell carcinomas: biochemical, immunohistological findings and comparison with normal epithelia. *J Cutan Pathol*, 9: 377.
- Von Kuster, L.C., Liwnicz, B.H. & Ward, D.E. (1986)**  
Concanavalin A and *Lens culinaris* agglutinin patterns in normal and neoplastic sebaceous epithelium. *J Cutan Pathol*, 13: 274-284.
- Vranes, M. & Kaufmann, R. (1986)**  
Adenoma seboparum sive sebaceoum. A histologic diagnosis. *Z Hautkr*, 61(22): 1622-1624.
- Weber, K. & Osborn, M. (1985)**  
Moléculas de la matriz celular. *Investigación y Ciencia*. 111: 76-88.
- Weisburger, J.H., Tanaka, T., Barnes, W.S. & Williams, G.M. (1986)**  
Mutagens and carcinogens formed during cooking. *Adv Exp Med Biol*, 197: 621-629.

**Weiss, L., Holmes, J.C. & Ward, P.M. (1983)**

Do metastasis arise from pre-existing subpopulations of cancer cells? *Br J Cancer*, 47: 81-89.

**Wheater, P.R., Burkitt, H.G. & Daniels, V.G. (1987)**

Histología funcional. Texto y atlas en color. 2ª ed. JIMS. Barcelona.

**Wick, M.R. & Marivel, J.C. (1987)**

Epithelioid hemangi endothelioma: an immunocytochemical and lectin-histochemical comparison. *Virchows Arch A*, 410: 309-316.

**Winter, S., Jarasch, E.D. Schmid, E., Franke, W.W. & Denk, H. (1980)**

Differences in polypeptide composition of cytokeratin filaments, including tonofilaments, from different epithelial tissues and cells. *Eur J Cell Biol*, 22: 371.

**Vlodausky I. & Sachs, L. (1975)**

Restriction of receptor mobility and agglutination by concanavalin A. *Exp Cell Res*, 96: 202-214.

**Wollina, U., Berger, U., & Mahrle, G. (1991)**

Immunohistochemistry of porcine skin. *Acta Histochem*, 90(1): 87-91.

**Wollina, U., Berger, U. Stolle, C., Stolle, H., Schubert, H. & Hipler, C. (1992)**

Histochemistry of the porcine pilosebaceous unit. *Acta Histochemistry*, 93(1): 256-263.

**Von Kuster, L.C., Liwicz, B.H. & Ward, D.E. (1986)**

Concanavalin A and Lens culinaris agglutinin binding patterns in normal and neoplastic sebaceous epithelium. *J Cutan Pathol*, 13: 274-284.

**Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W.G. & Sun, T.T. (1982)**

Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol*, 95: 580-588.

**Wu, Y.J. & J.G. Rheiwald. (1981)**

A new small (40 Kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell*. 25: 627-635.

**Zawisch-Ossenotz, C. (1933)**

Das talgdrüsenorgan des gehörganges von nagern und insectivoren. *Z Mikroskop Anat Forsch* 33:625-675. En *Pathology of tumours in laboratory animals*. Vol I. Parts 1 and 2. IARC, Lyon.

**Zouboulis, C.C., Xia, L.Q., Detmar, M., Bogdanoff, M., Giannakopoulos, G., Gollnick, H., Orfanos, C.E. (1991)**

Culture of human sebocytes and markers of sebocytic differentiation in vitro. *Skin Pharmacol*, 4(2): 74-83.

**Zymbal, W.E. (1933)**

Histologische und experimentelle untersuchung am epithelgewebe der tolgämsen. *Z Zellforsch Mikroskop Anat*, 18: 596-625. En *Pathology of tumours in laboratory animals*. Vol I. Parts 1 and 2. IARC, Lyon.