

## Tesis de Posgrado

# Estudio citogenético de tumores murinos inducidos por reacción a cuerpo extraño

Larripa, Irene Beatriz

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Larripa, Irene Beatriz. (1980). Estudio citogenético de tumores murinos inducidos por reacción a cuerpo extraño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1655\\_Larripa.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1655_Larripa.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Larripa, Irene Beatriz. "Estudio citogenético de tumores murinos inducidos por reacción a cuerpo extraño". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1655\\_Larripa.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1655_Larripa.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO CITOGÉNÉTICO  
DE TUMORES MURINOS INDUCIDOS POR REACCIÓN  
A CUERPO EXTRAÑO

Irene Beatriz Larripa

Padrino de Tesis: Dra. Sonia Brioux de Salum

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Citogenética  
Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex"  
Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires  
1980

1655  
j:2

PADRINO DE TESIS

Dra. Sonia Brioux de Salum

Jefa del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Citogenética de la Academia Nacional de Medicina.

Miembro de la Carrera del Investigador (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - CONICET-)

CONSEJERO DE ESTUDIOS

Dr. Osvaldo R. Vidal

Profesor Titular de la Cátedra de Citogenética. Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Miembro de la Carrera del Investigador (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - CONICET-).

Les aberrations chromosomiques ne sont probablement ni la cause ni la conséquence du cancer, elles sont le processus néoplasique même.

Raymond Turpin Jérôme Lejeune

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todos los que colaboraron en la realización de esta Tesis llevada a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Citogenética del Instituto de Investigaciones Hematológicas 'Mariano R. Castex' de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires y, en especial, a las siguientes personas e Instituciones:

- \* Al Dr. Alfredo Pavlovsky, que sentó las bases para que muchos pudiéramos trabajar en el importante Instituto que dirige.
- \* A la Dra. Sonia Brioux de Salum, por su activa participación como Directora de Tesis y su apoyo incondicional en todo momento.
- \* Al Dr. Osvaldo R. Vidal, quien como Consejero de Estudios, me orientó en el desarrollo de este trabajo de investigación.
- \* A la Dra. Christiane Dosne de Pasqualini, quien cedió el importante modelo experimental y me ayudó y estimuló permanentemente.
- \* A la Dra. Lía Rumi, por su activa colaboración en el desarrollo del sistema de cultivo in vivo.
- \* A mis compañeras de trabajo, quienes me ayudaron y alentaron en todo momento.

- \* A la Sra. Estela H. de Licen, por su excelente ayuda técnica en el procesado y mantenimiento de los cultivos celulares.
- \* Al Sr. Osvaldo Miskoski, por su eficaz trabajo fotográfico.
- \* Al Lic. Rubén Lombardo, por su asesoramiento estadístico.
- \* A mi familia, por su constante estímulo en la labor cotidiana
- \* A CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y FUNDALEU (Fundación para Combatir la Leucemia), a través de cuyo apoyo económico se hizo posible este trabajo.

# I N D I C E

## 1. INTRODUCCION

1.1. Citogenética y cáncer .....	1
1.1.1. Antecedentes históricos .....	1
1.1.2. Línea germinal (stem-line) y evolución clonal .....	7
1.1.3. Alteraciones cromosómicas específicas inducidas experimentalmente .....	16
1.2. Bando cromosómico .....	20
1.2.1. Bando G en ratones .....	20
1.2.2. Bando C en ratones .....	23
1.3. Tumorigénesis a cuerpo extraño .....	27
1.4. Modelo experimental .....	33
1.5. Objetivo del trabajo .....	37

## 2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Tumores murinos .....	39
2.1.1. Tumores primarios .....	40
2.1.2. Transplantes celulares .....	41
2.2. Técnicas citogenéticas directas .....	42
2.3. Técnicas citogenéticas aplicando técnicas de cultivo .....	42
2.3.1. Técnica de cultivo in vivo .....	42
2.3.2. Técnica de cultivo in vitro .....	44
2.3.3. Técnica de cultivo de embrión .....	45
2.4. Técnicas de Bando cromosómico .....	45
2.4.1. Técnica de Bando G .....	45
2.4.2. Técnica de Bando C .....	46
2.5. Técnica autorradiográfica .....	47
2.6. Apéndice Estadístico .....	48

### 3. RESULTADOS

3.1.	Datos obtenidos en ratones normales .....	49
3.2.	Datos obtenidos en tumores murinos primarios .....	52
3.2.1.	Datos obtenidos aplicando la técnica de cultivo in vivo .....	53
3.2.2.	Datos obtenidos aplicando la técnica de cultivo in vitro .....	69
3.2.3.	Coincidencia de datos aplicando técnicas de cultivo in vivo e in vitro .....	78
3.2.4.	Determinación de marcadores específicos .....	79
3.3.	Datos obtenidos en los trasplantes .....	101
3.4.	Sobrevida de las células neoplásicas dentro del cilindro .....	103

### 4. DISCUSION

4.1.	Estudio citogenético de los tumores primarios .....	106
4.1.1.	Doble diminuto (dm) .....	113
4.2.	Estudio citogenético de los trasplantes .....	119
4.3.	Comentarios finales .....	120

### 5. CONCLUSIONES .....

### 6. RESUMEN .....

### 7. BIBLIOGRAFIA .....



## ABREVIATURAS

C.D.: Cámara de Difusión

C.P.: Cilindro Plástico

der: derivado

DMBA: 7,12 dimetilbenz(α)antraceno

dm: Marcador doble diminuto

HSR: Zonas homogeneamente teñidas(dentro del cromosoma)

I: Isocromosoma

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

m: Marcador minúsculo

MEM: Medio Esencial Mínimo

MLA: Marcalor Largo Acrocéntrico

MSM: Marcador Submetacéntrico

MM: Marcador Metacéntrico

p: brazo corto del cromosoma

Ph': Cromosoma Philadelphia

q: brazo largo del cromosoma

Rb: Translocación Robertsoniana

RSV: Virus Rous

S: Período de Sintesis del ciclo celular

SSC: Solución Salina Concentrada

t: translocación

TMBA: 7,8,12 trimetilbenz(α)antraceno

TdrH<sup>3</sup>: Timidina Tritiada

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. Citogenética y Cáncer

### 1.1.1. Antecedentes históricos.

Desde hace un siglo numerosos biólogos han establecido el rol esencial de los cromosomas en la herencia y la reproducción celular. Al mismo tiempo, han reconocido que el estudio de los cromosomas era de suma importancia para comprender el proceso neoplásico.

Ya en 1870, los patólogos habían observado que el crecimiento maligno se caracterizaba por múltiples disturbios en la división celular y nuclear. El primer trabajo sobre el tema fue el de Arnold (1879), pero recién en 1890 von Hansemann postuló que los carcinomas se caracterizaban por mitosis asimétricas, lo cual llevaba a una distribución desigual de la cromatina originando el desarrollo de la neoplasia.

Stroebe (1892) encontró que las mitosis asimétricas no estaban restringidas solamente a los carcinomas sino que también se observaban en sarcomas, tumores benignos y tejidos en regeneración.

Estas observaciones llevaron al zoólogo alemán Boveri (1914) a enunciar su teoría de la mutación somática sobre el origen del cáncer. Boveri nunca imaginó que 60 años más tarde el problema vinculado al rol de los cambios cromosómicos en la génesis del cáncer continuaría siendo un tema de gran controversia. De acuerdo con su teoría, los tumores malignos tendrían una constitución cromosómica anormal y cualquier evento que llevara a un desbalance en el contenido de la cromatina resultaría en un tumor maligno. Señaló que el desarrollo de una constitución cro

mosómica desbalanceada era una posible causa de cáncer y, particularmente, puso énfasis en los disturbios mitóticos y la asimetría. Los principios generales de esta teoría serían:

- Las células malignas pueden provenir de células de tejidos normales.-
- La causa de su comportamiento anormal está en las células mismas y no en el medio que las rodea (entorno).-
- Existe una diferencia neta entre tumores benignos y malignos.-
- La célula maligna adquiere una indiferenciación secundaria por la pérdida de propiedades que antes estaban presentes y toma un comportamiento citotípico que es la proliferación ilimitada.

Desde entonces se considera que la causa fundamental de los tumores es un desbalance en el contenido de la cromatina. Boveri anticipó el concepto del origen monoclonal del cáncer cuando afirmó que cada tumor proviene de una única célula; esta célula, debe haber adquirido una cierta constitución cromatínica anormal.

En años subsiguientes, surgieron nuevos aportes. Heiberg y col. (1929) encontraron que las células cancerosas generalmente tenían un núcleo más grande que el de las células normales, si bien había algunos carcinomas con tamaño del núcleo igual o menor.

A los citogenetistas de aquella época les resultaba muy complicado estudiar los cromosomas de las células malignas, debido al poco desarrollo de la metodología.

El primero que comparó los cambios cromosómicos del cáncer primario con sus metástasis fue Andres (1932). Este autor demostró que en

las neoplasias el grado de anomalías cromosómicas era mucho más pronunciado que en el tumor primario. Así mismo, observó que podía haber células cancerosas con un número cromosómico normal. Sus estudios limitados por las técnicas disponibles, le permitieron concluir que los cambios cromosómicos no eran la causa del cáncer sino la consecuencia. Sin embargo, aceptó que una constitución cromosómica normal no excluiría una mutación génica como causa de neoplasia.

A mediados de 1950, se obtuvieron los primeros materiales de mamíferos en los cuales, los cromosomas tenían una calidad técnica como para ser estudiados. Se trataba de efusiones de tumor ascítico y exudados de líquido pleural.

Las primeras investigaciones realizadas en tumor ascítico de rata y ratón, realizadas por Makino (1951), Hauschka y col.(1951), Bayreuther (1952), demostraron que las células malignas podían ser diferenciadas de las células normales por sus propiedades citogenéticas.

En 1956, Tjio y Levan, desarrollaron las técnicas de cultivo de fibroblastos que permitieron establecer definitivamente el número de cromosomas en el hombre ( $2n = 46$ ).

Con los métodos disponibles de identificación de cromosomas hasta 1966, los 23 pares de cromosomas humanos podían agruparse en 7 clases en base a la posición del centrómero, largo del cromosoma, presencia de satélites y constricciones secundarias (Clasificación de Denver, 1960; Reunión de Londres, 1963; Conferencia de Chicago, 1966).

Durante los años subsiguientes, se intentó clasificar con más

precisión el complemento cromosómico mediante la aplicación de técnicas autorradiográficas con timidina tritiada ( $TdRH^3$ ) (Schmid, 1963; Gianelli, 1970; Miller, 1970). El agregado de  $TdRH^3$  durante la parte final del período de síntesis, permite reconocer las zonas de duplicación tardía. Esta técnica facilitó la diferenciación de los cromosomas del grupo B (4-5), del grupo D (13, 14 y 15), del grupo E (16, 17 y 18), el cromosoma Y y uno de los dos cromosomas X en las células del sexo femenino.

En 1970b, Caspersson y col., descubrieron que los cromosomas fluorescían diferencialmente cuando eran tratados con mostaza de quina-crina y observados con luz ultravioleta. Los cromosomas presentaban un patrón de bandeo que permitía identificar a los 22 pares de autosomas y al par sexual.

A partir de 1971, aparecieron numerosas técnicas de bandeo, siendo las bandas más comúnmente utilizadas: banda Q (Caspersson y col., 1970); banda G (Seabright, 1971); banda R (Dutrillaux y col., 1971); banda C (Arrighi y Hsu, 1971) y banda T (Dutrillaux, 1973).

En el cuarto Congreso Internacional de Genética Humana, que tuvo lugar en París en 1971 (Conferencia de París, 1971) y en reuniones subsiguientes (Conferencia de Baltimore, 1975 y ISCN, 1975) se estandarizó toda la nueva nomenclatura referente a los cromosomas humanos.

La metodología desarrollada primeramente en el hombre también se aplicó, posteriormente, en las distintas especies de la escala zoológica. Estas técnicas revelan zonas de tinción diferencial (bando cromosómico) a lo largo del cromosoma metafásico; en consecuencia, el cromos-

soma se ve como una continuidad de bandas claras y oscuras. Con la puesta a punto de estos métodos de tinción diferencial se han podido determinar numerosos rearrreglos cromosómicos. En neoplasias existen claras evidencias de cambios cromosómicos específicos como los observados en:

- Leucemia Mieloide Crónica (LMC) donde el 90% de los pacientes presentan el cromosoma Philadelphia (Ph<sup>+</sup>) en su médula ósea. Esta anomalía fue descrita por primera vez por Nowell y Hungerford en 1960. En 1970a, Caspersson y col. identificaron al cromosoma Ph<sup>+</sup> por bandeo como un 22q-. Posteriormente, Rowley (1973) determinó que el cromosoma Ph<sup>+</sup> no era una delección sino que se trataba de una translocación al cromosoma N°9 t(9, 22) (q34; q11).
- En linfoma de Burkitt, Manolov y Manolova (1972) describieron la presencia del cromosoma 14q+ en la mayoría de los casos estudiados. En 1976, Zech y col. demostraron que se trataba de una translocación entre el cromosoma 8 y 14 t(8; 14) (q24; q32).
- En meningiomas, el 90% de los pacientes presentan pérdida parcial o completa de un cromosoma N°22 (Mark y col., 1972; Zankl y col., 1972).
- En retinoblastoma se ha determinado una delección intersticial en el brazo largo del cromosoma N°13. Yunis en 1977, demuestra que la banda involucrada es la 13q14.
- En pólipos colónicos, se ha demostrado consistentemente trisomía 8 y 14 (Mark y col., 1973; Mitelman y col., 1974).
- En carcinoma de mama, se observó la trisomía parcial de la zona distal del brazo largo del cromosoma N°1 (Cruciger y col., 1976).

Cuando una anomalía cromosómica está consistentemente presente,

como el cromosoma Ph' o el 14q+, se asume que esta anormalidad citogenética (una traslocación específica en ambos casos) altera el control genético de la célula germinal normal a una célula progenitora de un clon neoplásico.

Levan, G. (1975a; 1977a) y Mitelman y col. (1976) resumen las anomalías cromosómicas observadas en una serie de neoplasias humanas. Del análisis de este estudio surge que las aberraciones se agrupan en determinados cromosomas específicos: 1, 7, 8, 9, 14, 17, 21 y 22.

En neoplasias humanas al igual que en las experimentales, la variación cromosómica no es al azar y se originan secuencias donde solamente unos pocos cromosomas están involucrados (Levan, A. y col., 1977).

En los tumores inducidos experimentalmente, como veremos más adelante, el agente inductor es de naturaleza conocida, por lo tanto, se puede establecer una buena relación entre cambio cromosómico y factor etiológico; en cambio, en los tumores humanos el factor desencadenante es casi siempre desconocido; en consecuencia, la correlación entre alteración cromosómica y etiología es solo una hipótesis. Sin embargo, la presencia de cambios cromosómicos específicos en determinadas enfermedades malignas sugiere que ellos no son sólo un epifenómeno.

Turpin y Lejeune (1965) en su libro: "Les Chromosomes Humains", se plantean la pregunta aún vigente: ¿son las variaciones del genoma las causas o la consecuencia del cáncer?. Ellos concluyen que las aberraciones cromosómicas no son probablemente ni la causa ni la consecuencia del cáncer sino el proceso neoplásico mismo.



Actualmente, los estudios en oncogénesis constituyen un area de investigación notablemente especializada y multidisciplinaria donde las alteraciones cariotípicas representan un aspecto crucial del problema.

#### 1.1.2. Línea germinal (stem line) y evolución clonal.

El concepto de que un tumor se desarrolla a partir de una única célula mutada o transformada que evoluciona clonalmente, es cada vez más aceptado.

Winge (1930) define stem-line refiriéndose a la línea germinal iniciadora de un clon anómalo. La línea germinal tumoral sufre cambios evolutivos que van desde alteraciones mínimas hasta el cariotipo aberrante de una etapa avanzada de cáncer.

Como señala Nowell (1976) en su trabajo, varios investigadores trabajando en tumores transplantables (Makino, 1956; Levan, 1958; Hauschka, 1961; Yosida, 1966; Grouchy, 1968) desarrollaron la hipótesis de que las líneas celulares tumorales eran de origen clonal describiendo la progresión neoplásica en términos de selección secuencial de subpoblaciones tumorales derivadas de un único progenitor común. Esta hipótesis sigue en vigencia y se cumple en la mayoría de las neoplasias. Los estudios citogenéticos han demostrado que en muchos tumores primarios todas las células presentan la misma anomalía cariotípica sugiriendo un origen unicelular. Por otra parte, cuando varios patrones cromosómicos se encuentran presentes en un determinado tumor, los cromosomas marcadores en cada célula demuestran que las diferentes subpo-

blaciones celulares derivan de una línea celular común.

Se entiende por cromosoma marcador aquel cromosoma que por re-  
arreglos ha adquirido una morfología distinta de los cromosomas de la es  
pecie. Su aparición es constante y específica para un clon celular per  
mitiendo identificarlo o marcarlo citogenéticamente.

En el modelo de Nowell (1976), en apoyo de la hipótesis de la  
evolución clonal, se considera que la liberación de las células de los  
mecanismos de control, ya sean éstos intracelulares, locales u hormona-  
les, produce el cambio de una célula normal a la primera célula neoplá-  
sica (etapa de iniciación). Esta célula posee una ventaja proliferati-  
va sobre las otras. En algunos casos, puede existir un período de la-  
tencia hasta que la célula es sacada de su estado interfásico G-0 a ac-  
tiva proliferación G-1.

La población neoplásica prolifera y, de tiempo en tiempo como  
resultado de la inestabilidad genética, se producen nuevas "mutantes"  
en la población celular que se expande. La mayoría de estas variantes  
son eliminadas por desventajas metabólicas o destrucción inmunológica  
pero, ocasionalmente, una célula tiene una ventaja adicional con respect  
o a las células normales y esta mutante se hace precursora de una nue-  
va población predominante. Este modelo representa lo observado en tumor  
es sólidos y leucemias cuando se manifiestan clínicamente (Fig.1).

Turpin y Lejeune (1965) consideran que los estadios intermedios  
en la evolución clonal no pueden ser prácticamente observados pero se  
puede reconstruir la historia del clon teniendo en cuenta que las célu-

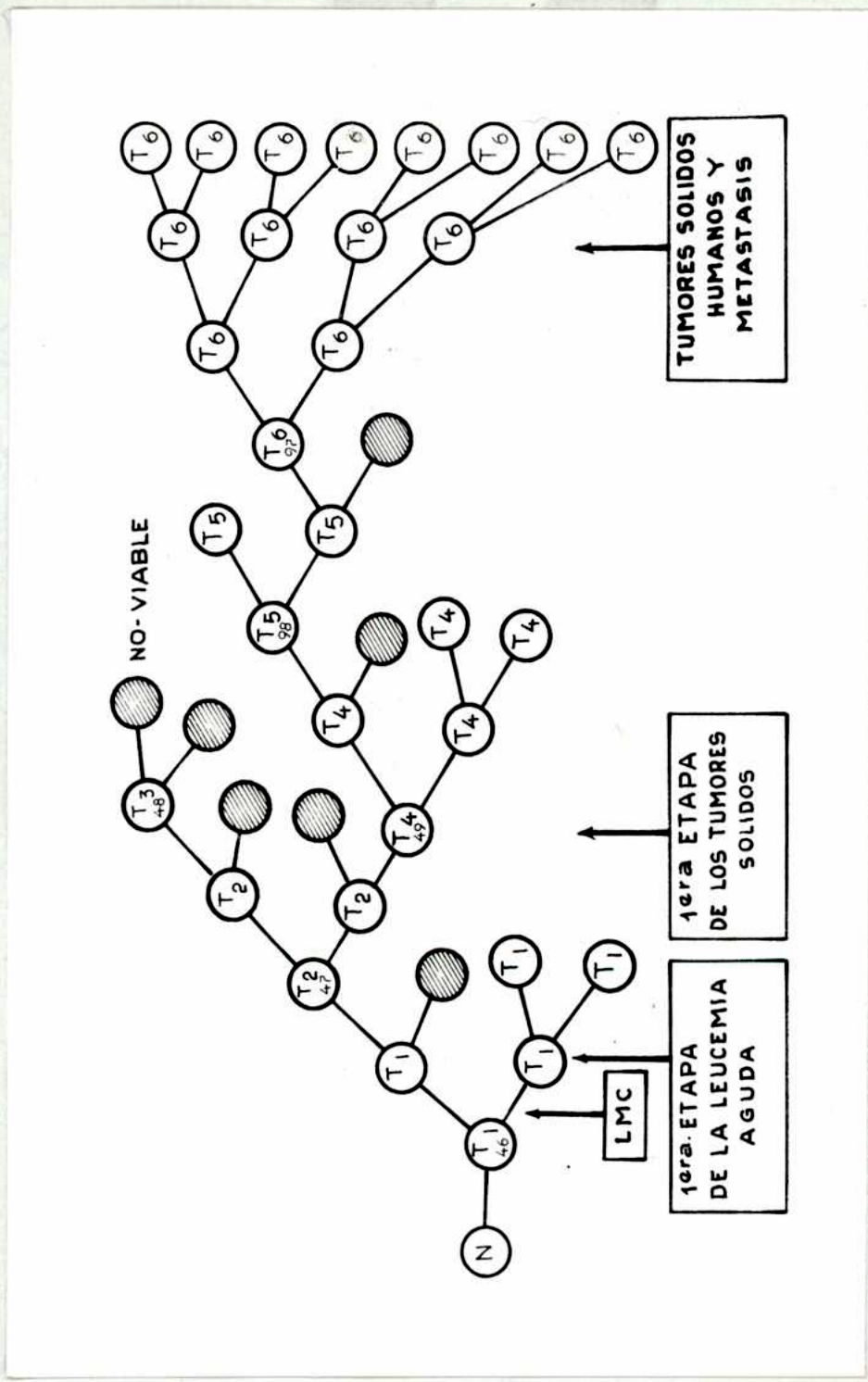


Fig. 1: Esquema de evolución clonal. Nowell (1976)

las menos aneuploides, las más próximas a la normal, representan los "fósiles" de esta evolución. Lejeune y col. (1963) estudiando una leucoblastosis congénita, ponen en evidencia una evolución clonal característica que representa el único caso en el cual fueron reconocidos todos los intermediarios entre el cariotipo de base y el clon mayoritario de 54 cromosomas. La acumulación de anomalías y la duplicación de cromosomas supernumerarios son las dos características principales de esta evolución. La tendencia a la duplicación de cromosomas supernumerarios normales o anormales también se ha demostrado en numerosas neoplasias humanas (Ising y col., 1957; Ishihara, 1959; Spriggs y col., 1962; Grouchy, 1963; Kiosoglou y col., 1963).

Steenis (1966) y Levan, A. (1966), trabajando con efusiones tumorales humanas, demostraron que la evolución cariotípica no era al azar: ciertos tipos de cromosomas tienden a aumentar en número y otros, a decrecer.

Es evidente que la participación cromosómica en la progresión tumoral está predeterminada e íntimamente asociada con el desarrollo del tumor. Generalmente, unos pocos cromosomas están regularmente afectados en el desarrollo de neoplasias humanas y experimentales.

El cariotipo se desarrolla en respuesta a las distintas presiones selectivas del medio ambiente. Por otra parte, ciertas deleciones o ciertos rearrreglos pueden ser más probables que otros y contribuir así a la variación del cariotipo.

Las excepciones a la hipótesis monoclonal son, por un lado, los

tumores de etiología viral donde, posiblemente, ha tenido lugar la infección de varias células adyacentes y, por otro lado, aquellas neoplasias donde un defecto genético familiar compromete cada célula del organismo y aumenta en gran medida su susceptibilidad al cambio neoplásico.

Las alteraciones cromosómicas estructurales observadas en tumores pueden ser clasificadas en:

- a) Cambios que afectan el cromosoma completo (heteroploidía);
- b) Cambios que comprometen adiciones o deleciones de porciones de cromosomas individuales (duplicaciones o deficiencias); y,
- c) Rearreglos del material genético (inversiones y translocaciones).

Hecht y col. (1977) proponen que la secuencia de los cambios cromosómicos en las células humanas cancerosas es la siguiente:

- 1) rotura cromosómica;
- 2) rearrreglo cromosómico en forma de una translocación "balanceada" originando un clon primario;
- 3) adición o sustracción de cromosomas produciendo desbalance (clon secundario); y,
- 4) más cambios numéricos y morfológicos resultando en mayor desbalance (clon terciario).

Las regiones de los cromosomas humanos se han podido clasificar según la frecuencia con que éstas se ven afectadas por cambios estructurales, en:

- 1) regiones restringidas donde ningún cambio es permitido;

2) regiones semi-restringidas donde cambios balanceados o adicionales de material están permitidos; y,

3) regiones sin restricción donde cualquier cambio es permitido.

Esta clasificación concuerda bien con la distribución en densidad de genes en tales regiones y está en relación inversa a la densidad de ADN repetitivo. Esta teoría genodemográfica se diagrama en el siguiente cuadro (Hecht, 1977):

<u>REGION</u>	<u>DENSIDAD DE GENES</u>	<u>DNA REPETITIVO</u>
Restringida	alta	baja
semi-restringida	media	media
no-restringida	baja	alta

El hecho de que los tumores se originen de una única célula no niega que los carcinógenos puedan afectar simultáneamente varias células en un tejido. Se sugiere que aunque varias células sean afectadas por el carcinógeno, el total macroscópico del tumor que se desarrolla, generalmente representa la progenie de una única célula o cuanto más, de unas muy pocas células. Presumiblemente, otras células neoplásicas o preneoplásicas, en el tejido expuesto, nunca proliferan exitosamente o son destruidas. No sería la pérdida, o ganancia de cromosomas específicos o loci génicos, los que son críticos para el establecimiento y progresión del estado neoplásico, sino más bien, una cuestión de desbalance entre varios genes localizados en distintos cromosomas.

El estudio de tumores sólidos humanos muestra que la inestabilidad genética puede hacerse más pronunciada a medida que la neoplasia evoluciona. En neoplasias avanzadas, se observa un amplio rango de variantes mitóticas en cada generación celular si se compara con las relativamente pocas variantes presentes en lesiones benignas.

Las bases de la inestabilidad genética adquirida no son conocidas pero, se han propuesto varias hipótesis:

- 1) La activación de un locus génico que aumente la posibilidad de una subsecuente no-disyunción y otros errores mitóticos. Tales genes son conocidos en *Drosophila* y también en familias humanas que parecen presentar una frecuencia aumentada de síndrome de Klinefelter, Turner y otras entidades que resultan de la no-disyunción durante meiosis. Existen también, los denominados síndromes de roturas cromosómicas (Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi, Ataxia Telangiectasia y Xeroderma Pigmentoso) con clones de células citogenéticamente anormales y una mayor incidencia de tumores en esos individuos con defecto génico heredado.
- 2) La labilidad genética de las células neoplásicas, en algunas circunstancias, revela la presencia continua del carcinógeno. Por ejemplo, un radioisótopo depositado podría tener efecto mutacional continuo dentro del tumor y, por lo tanto, estar implicado, no solamente en el evento inicial neoplásico, sino también en la progresión subsiguiente durante años.
- 3) Un virus oncogénico incorporado en las células puede producir no sólo la transformación neoplásica sino también rearrreglos génicos subsiguientes.

tes, aparentes en el tumor que se desarrolla. (Esta posibilidad es tá menos documentada).

- 4) Los cambios mutacionales dentro de una neoplasia pueden tener un papel en su inestabilidad genética. Por ejemplo, deficiencias en amino ácidos esenciales aumentan la frecuencia de no disyunción en cultivos celulares.

Llegamos así, a la pregunta clave: ¿cuál es el rol de las aberraciones cromosómicas en la transformación maligna y la formación de tumores?. Esta pregunta aún es difícil de contestar. Sabemos que la mayoría de los cánceres se originan en sucesivas etapas. En cuanto a la naturaleza de las etapas que involucran a los cromosomas, se postula el modelo de Levan, G. y col. (1977a) (Fig.2). Propone que el primer evento sería una interacción directa entre un agente carcinogénico y el material genético de un cromosoma comprometido en la transformación. La primera lesión puede ser suficiente por sí misma para transformar la célula. De este proceso surge una célula premaligna. El segmento cromosómico afectado necesitará amplificación en relación al segmento normal, aún presente, en el cromosoma homólogo no afectado; un mecanismo para ello, es la no-disyunción que lleva a trisomía con dos copias del cromosoma afectado. En una célula trisómica habrá un aumento relativo del producto génico aberrante dando por resultado, presumiblemente, una población celular más maligna. Otros procesos que llevan a iguales resultados son: pérdida del alelo normal por no disyunción o delección; duplicación del alelo afectado por translocación o intercambio de cromosomas homólogos. Cualquiera de estos eventos aumentará la cantidad relativa del materi



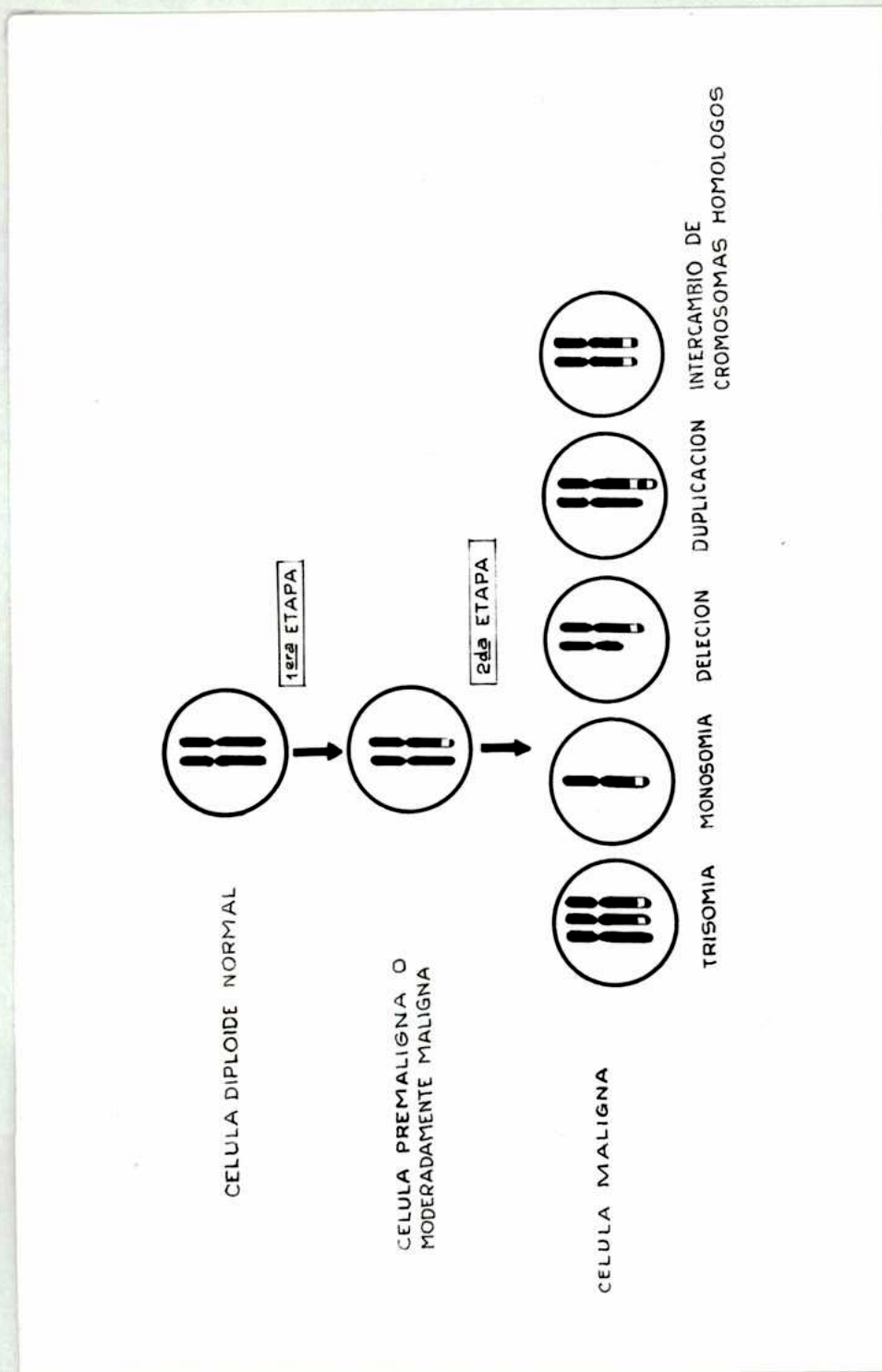


Fig. 2: Modelo hipotético para explicar el rol de las aberraciones cromosómicas en neoplasias (Levan,G., 1977a).

rial genético y del cromosoma afectado.

### 1.1.3. Alteraciones cromosómicas específicas inducidas experimentalmente.

Hacia fines de 1950, Ahlström del Instituto de Patología y Levan, A., del Instituto de Genética de la Universidad de Lund (Suecia), comenzaron un plan cooperativo en citogenética y cáncer que consistió en analizar los cambios cromosómicos durante los estadios tempranos de los tumores experimentales. Estos cambios cromosómicos tienen suma importancia en todos los niveles del desarrollo neoplásico. El hecho de no encontrar correlación entre cromosomas y enfermedad maligna, excepto en el caso de Leucemia Mieloide Crónica (LMC), había desmoralizado a muchos investigadores llegando algunos a considerar que el cromosoma Philadelphia (Ph') de la LMC no era más que una interesante excepción.

De acuerdo con Levan, A. y col. (1977) todos los tumores se caracterizan por patrones cromosómicos predeterminados, los cuales, están generalmente enmascarados por alteraciones cromosómicas accidentales asociadas al desarrollo tumoral.

Para poder distinguir entre alteraciones cromosómicas significativas y disturbios accidentales hubo que realizar planes de investigación donde se pudo controlar la mayor cantidad de variables posibles (etiología, genotipo del huésped, tipo de tejido, fijación, técnicas cromosómicas utilizadas, etc.).

En una serie de trabajos se demostró que algunos tumores experimentales tenían patrones de aberraciones cromosómicas no al azar, depen-

diendo del agente mutagénico (carcinógeno) utilizado (viral o químico). En tumores de etiología viral, tales como los sarcomas subcutáneos inducidos en ratas por virus Rous (RSV), se repite la trisomía para el cromosoma N°7 y subsecuentemente trisomía para el cromosoma N°13 y N°12. Esta secuencia muestra un patrón de evolución clonal fijo (Mitelman, 1971; 1972b; Levan, G. y col., 1976a).

En sarcomas primarios inducidos en ratones por RSV, Mark (1967b), demostró en forma constante la adición de un determinado cromosoma, el cual no fue identificado pues en aquella época no se aplicaban técnicas de bandeado cromosómico.

En leucemia espontánea de la cepa de ratones AKR, Dofuku y col. (1975) demostraron por técnicas de bandeado la trisomía para el cromosoma N°15 en 10 de 11 casos estudiados.

En tumores, químicamente inducidos, utilizando hidrocarburos policíclicos como el 7,12-dimetilbenzo( $\alpha$ )antraceno (DMBA), Mitelman y col. (1972a), indujeron una serie de sarcomas en ratas. Estos sarcomas eran histológicamente idénticos a los inducidos por RSV y, en ellos, se determinó un patrón cromosómico definido caracterizado por la trisomía del cromosoma N°2. Esta alteración citogenética nunca se observó en sarcomas inducidos por RSV. En base a estos estudios se pudo establecer que un tumor de etiología viral difería cromosómicamente de un tumor inducido químicamente. Por lo tanto, el factor etiológico juega un rol importante en la determinación de la evolución cromosómica del tumor.

El hallazgo de trisomía N°2 en los sarcomas de ratas inducidos

por DMBA coincide con los datos obtenidos por Kurita y col. (1968) y Rees (1969), en leucemias inducidas en ratas por inyecciones intravenosas del mismo agente químico. Ahlström (1974) también encontró trisomía N°2 en tumores epiteliales de ratas (cárcinomas) inducidos por pincelado de las orejas.

De estas experiencias se deduce que en estas neoplasias inducidas (sarcomas, leucemias y carcinomas) el agente inductor es un factor decisivo y determinante del patrón cromosómico de la población celular maligna.

Levan, G. y col. (1975b) trabajaron con otros hidrocarburos policíclicos estrechamente relacionados al DMBA, como son el metilcolantreno y benzopireno. Los resultados hallados coinciden con los datos obtenidos con DMBA, es decir, se observó nuevamente la trisomía del cromosoma N°2. La trisomía puede ser libre o estar involucrada en translocaciones con otros cromosomas dando lugar a la formación de cromosomas marcadores.

Sugiyama y col. (1978) han estudiado un gran número de leucemias inducidas en ratas por DMBA y 7,8,12-trimentilbenzo, antraceno (TMBA), y también han podido comprobar que el cromosoma N°2 se presenta por triplicado, con frecuencia diferente en cada caso. El hecho que dos agentes relacionados induzcan la misma alteración cromosómica en diferentes proporciones, enfatiza la precisión de los mecanismos involucrados y pone de manifiesto la importancia del agente inductor.

Popescu y Di Paolo (1977) realizando experiencias semejantes en

fibroblastos de embrión de rata in vitro, obtuvieron resultados muy si milares.

De todas estas experiencias surge que existe una especial interacción entre un determinado cromosoma y el carcinógeno. Esta interac-ción puede originar marcadores o roturas o un aumento de intercambio de cromátidas hermanas, pero lo que más a menudo sucede son cambios génicos submicroscópicos que conducen a la transformación neoplásica. La presencia de translocaciones y trisomías puede estar reflejando una etapa secundaria de amplificación de la lesión primaria produciendo células más malignas que aquellas transformadas originalmente.

Los datos obtenidos en citogenética en tumores experimentales se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Los cambios citogenéticos durante la oncogénesis llevan patrones cromosómicos que no son al azar.
2. Estos patrones cromosómicos están influenciados por el agente inductor. Esto indica una íntima interacción entre el material hereditario del huésped y el agente inductor.
3. Las variaciones cromosómicas específicas afectan solamente a unos pocos cromosomas, mientras que la mayoría de los cromosomas permanecen inalterados y solamente toman parte en los disturbios fortuitos.
4. Los cromosomas responsables de la desviación de la línea germinal son aquellos que llevan genes determinantes del desarrollo maligno.

## 1.2. Bandeo cromosómico.

### 1.2.1. Bandeo G en ratones.

Los pares de cromosomas del ratón son acrocéntricos; con coloración estandar de Giemsa solamente un par de autosomas, el N°19 puede ser reconocido porque es el más pequeño y además posee una constricción secundaria. Los restantes cromosomas del complemento no son identificables. La presencia de una translocación en preparaciones estandar solamente puede ser reconocida si se presenta un cromosoma de longitud anormal: o muy largo o muy corto o cromosomas metacéntricos o submetacéntrico o fusión céntrica (translocación Robertsoniana).

Las técnicas de bandeo cromosómico con coloración fluorescente de quinacrina o con alguno de los métodos modificados de Giemsa han permitido un gran desarrollo en la citogenética de los ratones. Quince de los veinte grupos de ligamiento han sido asignados a cromosomas específicos. El patrón de bandeo de cada cromosoma es consistente de célula a célula y es el mismo dentro de cada cepa estudiada; las pequeñas diferencias encontradas radican en el tamaño de las constricciones secundarias típicas para cada cepa. Los cromosomas pueden ser identificados y los homólogos apareados sobre la base de su patrón de bandeo. Los cromosomas identificados de esta forma han sido medidos y ordenados en tamaño decreciente. Estos resultados han permitido crear un sistema para ordenar el cariotipo del ratón. Estos datos han sido publicados por el Comité de estandarización de la nomenclatura genética del ratón (1972).

Este Comité reunió el trabajo de cuatro laboratorios diferentes; para ello, se analizaron los trabajos de Dev y col. (1971); Schnedl (1971); Francke y col. (1971) y Buckland y col. (1971). Se compararon los cariotipos y los largos relativos de cada crómosoma y en base a estas publicaciones se determinó un único sistema numérico e idiograma de uso universal.

Los pares 11, 15 y 19 pueden presentar una constricción bien marcada a nivel del centrómero denominada por Levan, (1972), "rabbit ears".

Ocasionalmente, los pares 12 y 18 pueden presentar también esta característica. Esta variante cromosómica, presente muchas veces en uno de los homólogos, hace que existan diferencias de longitud entre los miembros de un par.

En 1973, Nesbitt y col., utilizando técnicas de bandeado G y Q publicaron un sistema de nomenclatura para los cromosomas del ratón de acuerdo con las recomendaciones del Comité de estandarización de 1972 (Fig. 3). En este trabajo se llegó a determinar hasta 312 regiones dentro del cariotipo del ratón y se propuso una nomenclatura para individualizar cada una de ellas.

Este sistema tiene la virtud de ser abierto en el sentido que se puede agregar más información (utilizando en un futuro técnicas de mayor resolución) sin alterar la designación básica.

Existen dos tipos de bandas: las mayores y las menores. Las bandas mayores pueden ser oscuras o claras y son fácilmente reconocidas aún

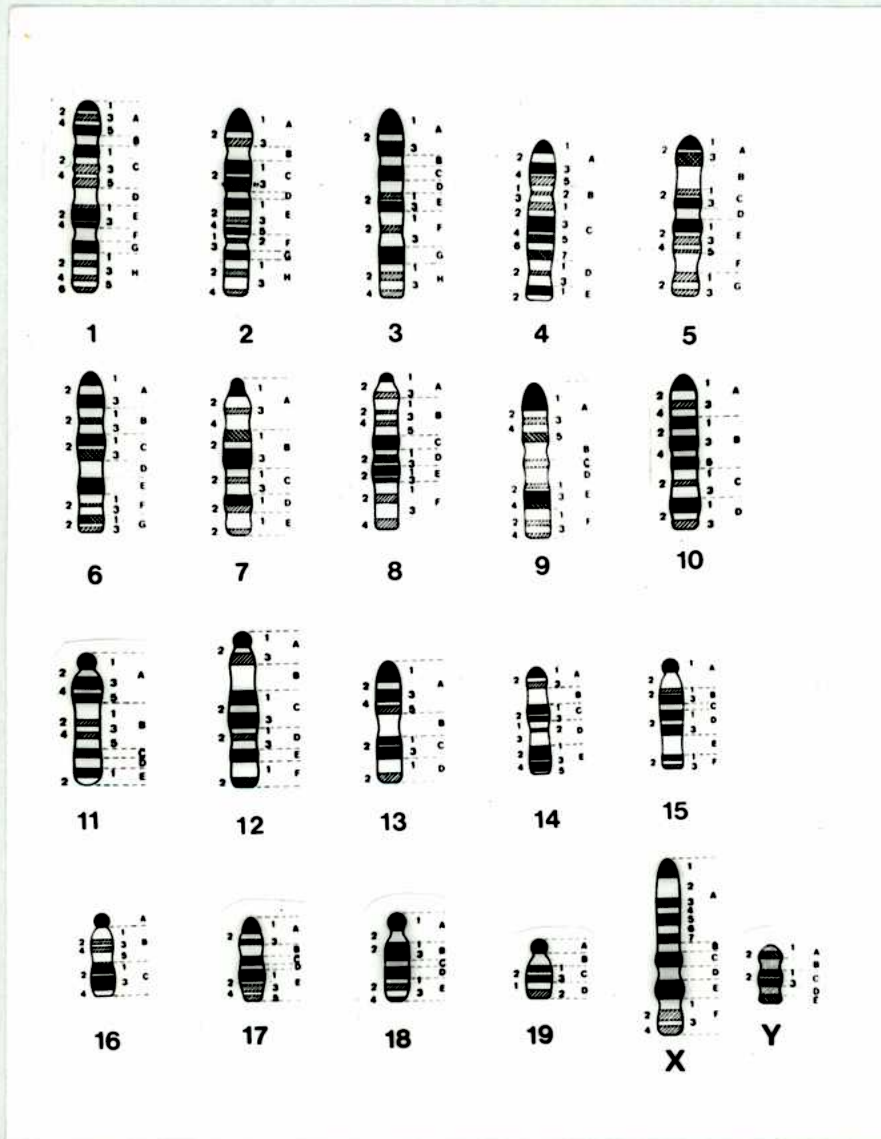


Fig. 3: Diagrama de Bando G en ratones normales (Nesbitt, 1973).



en preparados de poca calidad o en cromosomas contraídos y se designan con el N° del cromosoma y una letra mayúscula comenzándose desde la zona cercana al centrómero hacia el telómero.

En preparados de excelente calidad se pudo demostrar que las bandas mayores consistían de varias bandas menores y se designaron por el N° del cromosoma, la letra de la banda mayor de la cual forma parte y su propio número ordenándose desde la más próxima al centrómero hacia la más distal. En la Fig. 4 se observa el patrón de bandeo de una metafase normal ordenado de acuerdo al esquema anterior y siguiendo las normas del Comité de estandarización.

#### 1.2.2. Bandeo C (Heterocromatina) en ratones.

El término heterocromatina fue introducido por primera vez por Heitz (1928) para denotar cromosomas o regiones de cromosomas que están condensados en interfase y profase y que no se despiralizan en telofase como el resto de los cromosomas.

En los mamíferos, existen dos tipos principales de heterocromatina: 1) Heterocromatina constitutiva: es la heterocromatina que está presente en los cromosomas homólogos y puede visualizarse en preparados citológicos realizando técnicas de bandas C (Arrighi y Hsu, 1971; Kanda, 1976; Summer, 1972).

Estas técnicas consisten en desnaturalizar el DNA de los cromosomas metafásicos por calor o álcalis y luego, una posterior renaturalización in situ bajo condiciones controladas.



Fig. 4: Patrón de bandeado G en hembra y macho de ratón normal (Wurster, 1972)

2) Heterocromatina facultativa: resulta de la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las hembras. Esta inactivación es un mecanismo efectivo para reducir el número de cromosomas X funcionantes en el sexo femenino (esta heterocromatina no se colorea con bandeo C).

Trabajos recientes indican que el DNA de la heterocromatina constitutiva está compuesto por cortas secuencias de polinucleótidos repetidas cientos de veces, llamado DNA satélite.

El DNA satélite fue detectado por primera vez en 1960 por técnicas de gradiente de centrifugación (Kit, 1961) apareciendo como un componente de densidad diferente que el resto del DNA. Este DNA satélite se reasocia rápidamente después de la desnaturalización al calor, lo cual sugiere que está formado por secuencias polinucleotídicas repetidas (es por ello que, también, se lo llama DNA repetitivo).

Britten y Kohne, en 1968, determinaron que el DNA satélite está formado por secuencias de 150 a 300 bases repetidas un millón de veces. Este DNA repetitivo se encuentra en todos los eucariotes desde los protistas superiores hasta el hombre. En organismos superiores, especialmente en los mamíferos, el DNA repetitivo abarca entre el 30-40% del total del DNA y puede ser dividido en dos clases: a) una fracción de DNA altamente repetitivo o DNA satélite que comprende aproximadamente el 10% del DNA (por ejemplo, en el ratón) y consiste en secuencias cortas de 300 nucleótidos repetidas aproximadamente un millón de veces; y, b) una fracción de repetición intermedia que comprende un 20% del DNA total que consiste en familias de secuencias repetidas desde 100 hasta

100.000 veces.

En 1970, Pardue y Gall, usando técnicas de hibridización in situ demostraron que el DNA satélite del ratón hibridiza con el DNA de las regiones centroméricas de todos los cromosomas, excepto el cromosoma Y. En las interfases, el DNA satélite está asociado con la heterocromatina perinucleolar. También se ha podido determinar que el cromosoma Y del ratón posee DNA altamente repetitivo en los brazos largos y no en la zona centromérica.

El DNA repetitivo no se transcribe por lo tanto, se considera genéticamente inerte. Esta conclusión es apoyada por Flamm y col.(1969) pues el DNA satélite del ratón no hibridiza con RNA extraído de distintos órganos del mismo animal.

La heterocromatina constitutiva puede ser considerada como un tipo especial de cromatina que contiene la mayoría del DNA satélite. La heterocromatina normalmente tiene la propiedad de replicar tardíamente en el período de síntesis.

En la mayoría de los mamíferos, el DNA satélite se ubica preferencialmente en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas. Entre los animales estudiados existen especies que presentan grandes cantidades de heterocromatina constitutiva (ratón, ternero, chanchito de la India, hamster sirio y caballo) y especies que presentan pequeñas cantidades (Microtus californicus, Microtus montanus, Microtus agrestis, hamster chino y hombre)(Yunis y col., 1971).

En el ratón, la heterocromatina constitutiva puede ser fácilmenen

mente detectada aplicando cualquiera de las técnicas publicadas en la literatura. Los 40 cromosomas acrocéntricos del ratón poseen un gran bloque de heterocromatina constitutiva de ubicación centromérica, excepto en el cromosoma Y en el cual se localiza en los brazos largos (Fig. 5).

### 1.3. Tumorigénesis a cuerpo extraño

Se denomina tumorigénesis a cuerpo extraño al desarrollo tumoral a partir de la implantación de un cuerpo inerte en animales experimentales. Sobre el tema existen, en la literatura, varios trabajos: los más importantes son los de Bischoff y Bryson (1964), Bryson y Bischoff (1969), Ott (1970) y Bischoff (1972). Alrededor de 1940, varios grupos de investigadores, trabajando con ratas, observaron que éstas desarrollaban sarcomas en íntima relación con el material plástico implantado. Este tipo de tumor fue explorado más exhaustivamente durante la década del 50 por numerosos grupos de investigadores; entre ellos, Oppenheimer (1955), Nothdurft (1955), Zollinger (1952), y otros.

El rol etiológico del cuerpo extraño fue confirmado y se concluyó que la presencia física y la naturaleza del mismo eran responsables de la tumorigénesis.

En vista de que los implantes eran muy utilizados por los cirujanos, la mayoría de los trabajos de investigación, durante 1960, estuvieron relacionados con problemas de histocompatibilidad (Bischoff, 1972). Considerando la elevada frecuencia de implantes artificiales en el hombre por razones anatómicas, funcionales o estéticas, la incidencia de

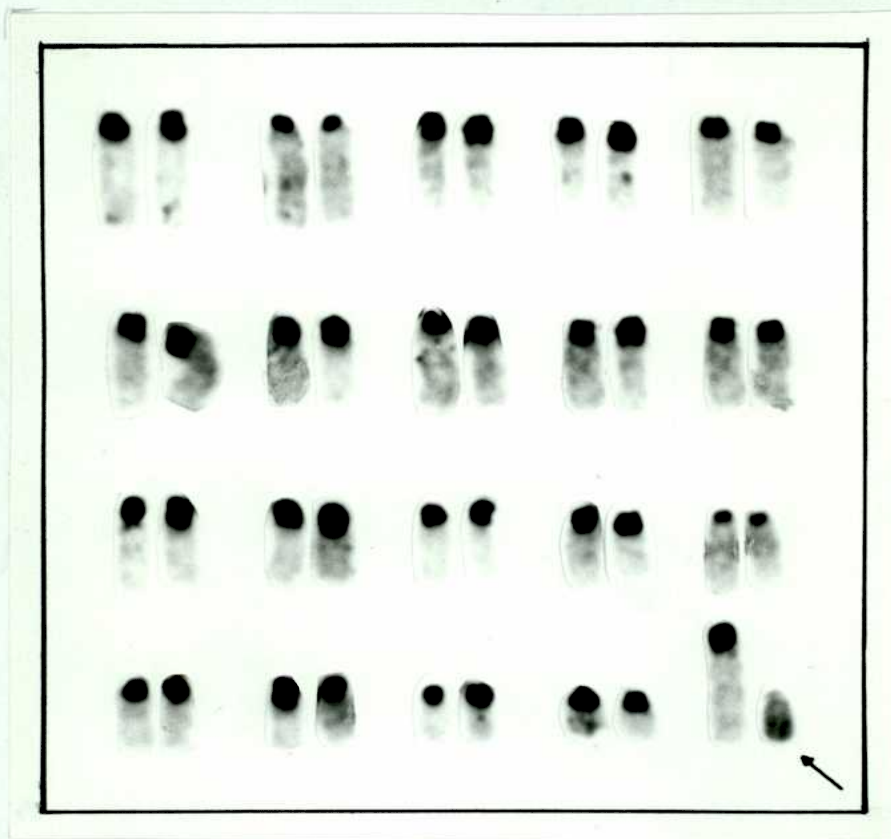


Fig. 5: Patrón de Bando C en una metafase de ratón normal.

tumores asociados al cuerpo extraño es sorprendentemente pequeña comparado con los tumores experimentales en ratas y ratones. Esto está registrado en varios seguimientos realizados en pacientes que han recibido implantes artificiales (Rubin y col., 1971), (De Cholnoky, 1970), (Spence, 1954), (Dutton, 1959), (Dukes y Mitchley, 1962) y otros.

Existen grandes diferencias entre el hombre y los roedores dado que estos últimos poseen una gran susceptibilidad a la tumorigénesis a cuerpo extraño. Esta diferencia puede deberse en parte a la latencia del tumor, ya que en los ratones los rangos van de 6-24 meses y, en el hombre, comparativamente, la latencia del tumor puede exceder la expectativa de vida en la mayoría de los casos. Burns (1972) reporta una latencia de 10 años para un sarcoma siguiente a la reparación arterial con teflon-dacron.

Thompson (1969) reporta un condrosarcoma 18 años después de la implantación de esferas de lucite. Ott (1970) ha tabulado todos los casos publicados hasta 1966; varios de ellos, con latencia de hasta 40 años. Es por ello que, actualmente, se recomienda un control estricto de los implantes artificiales, especialmente aquellos empleados con finalidad estética; en caso de ser necesaria la implantación a cuerpo extraño se debe tratar que éste sea lo más pequeño posible y someter, al paciente, a controles periódicos. A pesar de la baja frecuencia de los tumores a cuerpo extraño en el hombre, el problema no debe ser tomado con indiferencia.

En roedores, la tumorigénesis a cuerpo extraño ha sido usada como

un método para realizar estudios etiológicos de cáncer. Actualmente, se sabe que la implantación de material plástico inerte en ratas y otros animales de laboratorio, lleva, frecuentemente, a la formación de tumores sarcomatosos fácilmente transplantables en la cepa de origen.

En la literatura, existen muy pocos trabajos donde se realicen estudios citogenéticos en este tipo de tumor dado que se trata de un material muy difícil de estudiar por su consistencia sólida. Los trabajos de Banerjee y col. (1966), Brand y col. (1967a), Buoen y col. (1968), Johnson y col. (1970), son los únicos que describen aspectos cromosómicos en tumores inducidos por implantación de polímeros (plástico). La mayoría de los sarcomas a cuerpo extraño eran hiperdiploides o en el rango de hipo o hipertetraploidía. Se pudieron identificar distintos marcadores, tales como metacéntricos y dobles diminutos (Buoen y Brand, 1968); estos cromosomas anómalos pudieron ser detectados fácilmente sin aplicar técnicas de bandeado dado que el complemento normal del ratón consiste exclusivamente en cromosomas acrocéntricos, pero ninguno de los marcadores fue identificado como específico para los sarcomas a cuerpo extraño.

El desplazamiento en el nivel de ploidía fue interpretado como una consecuencia del comportamiento del crecimiento anaplásico.

La tumorigénesis a cuerpo extraño tiene lugar en la cápsula del tejido que se forma alrededor del implante como reacción al cuerpo extraño. En trabajos que datan de 1967, se llegó a determinar que los tumores de los animales inoculados y sus correspondientes transplantes, presentaban idénticas líneas germinales desde el punto de vista cromosómico.



Con los trabajos de Brand y col. (1967b), Johnson y col. (1970), se pudo determinar que estos tumores derivan de clones celulares específicos, firmemente agarrados a la superficie del implante presentes muchos meses antes del desarrollo tumoral. El implante de plástico puede ser cortado en pequeños fragmentos y transferido a animales receptores singneicos dando origen a un tumor de iguales características y con el mismo tiempo de aparición (latencia). En estos experimentos se usaron las cepas coisogénicas CBA/H y CBA/H T6; por lo tanto, el origen del tumor pudo ser verificado por la presencia del cromosoma marcador T6. Este marcador también permitió hacer una clara distinción entre estroma y células tumorales. Por lo tanto, las células tumorales pueden ser determinadas inequívocadamente, aún en conteos euploides y pseudodiploides. Los tumores originados a partir de trozos del mismo implante presentaron idénticas aberraciones cromosómicas e igual aneuploidía con histograma característico; ocasionalmente, se presentaron anomalías cromosómicas de naturaleza espontánea. Mientras que la mayoría de los tumores derivados de diferentes implantes, fueron claramente distintos en su cariotipo.

La población celular adherida al film de plástico parece no entrar en división; esto puntualiza la existencia de un único clon celular premaligno que reside sobre la superficie del implante en un estado de no división celular, muchos meses antes de la aparición del tumor. Se sospecha que existe un fenómeno específico de inhibición durante esta fase. Al final, la célula premaligna se despega del film e invade la cápsula tisular y se propaga produciendo el tumor dentro de las 4 semanas. Es por ello que, las células premalignas, nunca son encontradas en la

cápsula, excepto durante el último período antes de que aparezca el tumor.

El crecimiento tumoral es altamente invasivo localmente; no se observan metástasis en las distintas partes del organismo y esto es debido a que el crecimiento es rápido matando a los animales en un período relativamente corto (3-4 semanas) a pesar de que la latencia de los tumores es muy larga (10-15 meses).

En los trabajos de la literatura, no se ha encontrado ningún mar cador específico pero sí se pudo determinar que cada tumor posee una línea germinal específica, la cual se mantiene a través del trasplante en la cepa singeneica.

Bouen y col. (1968) realizaron un estudio citogenético en 70 tu mores inducidos por polímeros en ratones de la cepa CBA y describieron la existencia de un cromosoma marcador denominado "doble diminuto" (dm), por ser muy pequeño y presentarse de a pares en algunos de los tumores. La incidencia de este marcador fue muy baja.

Mark (1967) también describió esta anomalía cromosómica en tumores inducidos en ratones por inoculación del sarcoma de Rous (de pollo). Mark en su trabajo, sugirió la posibilidad de que ésto fuera el resultado de la hibridización de las células de pollo con las de ratón, puesto que el pollo posee en su cariotipo, numerosos microcromosomas.

Bouen y col. (1968) excluyen esta posibilidad dado que esta anomalía citogenética fue observada también en células de otras especies y en diferentes condiciones, incluyendo al hombre. Dado que esta anomalía

no fue observada en todos los tumores estudiados por Bouen, sino solamente en 5 de ellos, él concluye que se trata de un marcador de naturaleza espontánea.

Surge de esta revisión de los antecedentes bibliográficos sobre citogenética de los tumores inducidos por reacción a cuerpo extraño, que la identificación precisa de los cromosomas implicados en la formación de los marcadores permanece, aún, incierta. Esto se debe a que en los pocos trabajos publicados sobre el tema no se han aplicado técnicas de bandeado que permitan identificar los marcadores de las células malignas.

#### 1.4. Modelo experimental.

La implantación de cilindros huecos de plástico en ratones adultos de ambos sexos de la cepa BALB y la inoculación dos días más tarde en el interior de los mismos de células neoplásicas alogeneicas (linfoma S19 de la cepa de ratones AKR) dio por resultado la aparición de tumores alogeneicos con una incidencia del 53% y una latencia media de 40 días; es decir, una colonización celular con una corta latencia (Saal y col., 1972). El 47% de los animales que no desarrollaron tumores en esta corta latencia y que quedaron bajo observación, comenzaron a partir del séptimo mes a desarrollar tumores que mataron el 66% de los animales en un promedio de 10 meses; es decir, con larga latencia. Utilizando este modelo experimental, dos días después de la implantación de los Cilindros de Plástico (C.P.) fueron inoculadas, en lugar de células murinas alogeneicas, células neoplásicas humanas (injerto xenogeneico) de distin

tas patologías. Se pudo comprobar que a partir del séptimo mes, los lotes de animales así tratados comenzaron a mostrar una alta incidencia de tumores (62%) mientras que en el grupo control portador de los C.P. sin células, la incidencia de tumor fue significativamente menor (45%) (Pasqualini y cols., 1973). Todos los tumores estudiados, a pesar de tener una larga latencia con un promedio de 10 meses y con un rango de 7-16 meses (Tabla I)(Fig.6), fueron de crecimiento rápido y localizado sin producir metástasis llevando a la muerte del animal en alrededor de 20 días a partir de su aparición inicial.

En este trabajo de tesis se han utilizado exclusivamente los tumores de larga latencia inducidos en la cepa BALB. Los tumores estudiados fueron:

- a) tumores inducidos por el C.P.
- b) tumores inducidos por el C.P. + el agregado de células neoplásicas humanas
- c) tumores inducidos por el C.P. + el agregado de células neoplásicas murinas

Se determinó que, en todos los casos, eran tumores nacidos de novo por el efecto del C.P.; es decir, eran sarcomas que se pueden incluir dentro de una clasificación de tumorigénesis a cuerpo extraño (Pascucelli y col., 1973). El tumor se originó entre la cápsula que rodea el cuerpo extraño y el C.P., y en la vecindad de un granuloma; esto permite postular que el clon inicial de células transformadas se desarrolla en contacto con la superficie lisa del plástico (lucite), el

TABLA 1: INCIDENCIA DE TUMORIGENESIS A CUERPO EXTRAÑO

C.P.	+	INOCULO	FIBROSARCOMAS	
			Nº DE RATONES	%
C.P.			45/101	45
C.P.		CELULAS NEOPLASICAS HUMANAS	62/100	62*
C.P.		LINFOMA AKR	85/128	66*

\* Hay diferencia significativa con respecto al control aplicado  $\chi^2$



Fig. 6: Ejemplar de la cepa BALB portador de un sarcoma anaplásico.

que proveería un sitio privilegiado limitado por la cápsula conectiva. Los tumores estudiados consistían en masas sólidas voluminosas que crecían en el tejido subcutáneo adyacente al C.P. y no producían metástasis. Este tipo de tumor es muy vascularizado con algunos signos de necrosis y hemorragias. Las fibras reticulares constituyen una trama en la cual ni dos de células tumorales han sido atrapadas. En base a su morfología, estos tumores, histológicamente idénticos, fueron clasificados como sarcomas anaplásicos. Células en forma de huso constituyen la mayoría de la población tumoral; tienen un gran núcleo con cromatina dispersa irregular y usualmente más de un nucleolo; el citoplasma es rico en ribosomas casi sin mitocondrias y cuerpos de Golgi. Partículas virales tipo A fueron observadas dentro de las cisternas. Estas células se consideraron como células reticulares primitivas de naturaleza tumoral.

La tumorigénesis a cuerpo extraño, previamente descrita por Potter (1968) y Brand y col. (1972), ha sido confirmada con estos experimentos. La inoculación de células neoplásicas tanto humanas como murinas alogeneicas, incrementan significativamente la incidencia del tumor.

Todos los tumores fueron transplantables dentro de la cepa BALB demostrando que se trata de tumores nacidos de novo. En este tipo de neoplasia de larga latencia, se descarta la colonización celular, pues los tumores inducidos por el C.P. más el agregado de células alogeneicas (del linfoma S19 de la cepa AKR) nunca pudieron ser transplanta- dos en ratones de la cepa AKR y, en el caso de los tumores inducidos por el C.P. más el agregado de células neoplásicas humanas, los cariotii

pos de los tumores siempre fueron murinos (Larripa y Salum, 1976 ).

En cuanto al mecanismo etiológico responsable del desarrollo tumoral, no se lo conoce. Se postula que ambas células alogeneicas y xenogeneicas contienen un "agente" capaz de potenciar el efecto tumorigénico del implante de plástico. Además, este hecho se vería facilitado dado que el cilindro produce un efecto inmunodepresivo en el animal (Saal y col., 1972).

#### 1.5. Objetivo del trabajo.

Teniendo en cuenta como hipótesis de trabajo que la mayoría de los tumores estarían caracterizados por esquemas cromosómicos específicos, es que se encaró la investigación citogenética de tumores murinos primarios inducidos por reacción a cuerpo extraño y de sus respectivos trasplantes celulares. De la revisión bibliográfica sobre el tema, surge que existen muy pocos trabajos donde se hayan realizado estudios citogenéticos en este tipo de tumores, probablemente porque se trata de un fibrosarcoma, material muy compacto y fibroso. En los pocos trabajos publicados (Banerjee y col., 1966; Brand y col., 1967b; Buoen y col., 1968; Johnson y col., 1970) se determinó la presencia de ciertos cromosomas marcadores pero ninguno de ellos fue considerado específico para este tipo de tumor. La identificación de los cromosomas implicados en la formación de dichos marcadores no fue establecida pues no se habían aplicado técnicas de bandeado. La finalidad del presente trabajo de investigación fue realizar el estudio citogenético de los sarcomas anaplásicos murinos primarios inducidos por la implantación subcutánea de C.P.

a fin de determinar que alteraciones cromosómicas presentaban estos tumores.

Dado que la tumorigénesis a cuerpo extraño está significativamente aumentada cuando se inoculan células neoplásicas humanas o murinas dentro del C.P., se trató de comparar ambos procesos tumorigénicos (con y sin material neoplásico dentro del C.P.) con el objeto de poder determinar si existían cromosomas específicos implicados en cada caso.

A tal fin se determinó la línea germinal de cada tumor teniendo en cuenta el número modal, rango de Heteroploidía y presencia de marcadores. Estos últimos fueron caracterizados con técnica de Bando G y C.

El estudio citogenético permitió caracterizar perfectamente cada uno de los tumores primarios estudiados y sus respectivos transplantes dentro de la cepa singeneica.



## 2. MATERIAL Y METODOS

## 2.1. Tumores murinos.

La investigación se llevó a cabo en tumores primarios y en sus trasplantes celulares. Denominamos tumor primario al que se originó en el ratón BALB a partir de un C.P. implantado debajo de la piel con o sin el agregado de material neoplásico humano o murino que produce un tumor de novo y, trasplante, al primer pasaje in vivo de un tumor primario.

Todos los tumores primarios estudiados fueron de larga latencia (7-16 meses).

Todos los C.P. son de lucite de 1cm de diámetro y 1.5cm de largo. Ambos extremos están abiertos y pasados por la llama para quitarles el filo. Estos C.P. se dejan bajo luz ultravioleta durante toda la noche para su esterilización y, recién entonces, son implantados bajo la piel de animales anestesiados de la cepa BALB de ambos sexos y de 2-3 meses de edad. Dos días después de la implantación de los C.P., se inyectan células neoplásicas de distinto origen por intermedio de un trocar dentro del lumen del C.P.. Cada animal recibe 0.2ml de la suspensión celular a una concentración de  $5 \times 10^6$  cel/ml. El grupo control recibió los C.P. vacíos.

El material inoculado provino de:

- a) biopsias de linfomas humanos;
- b) líneas celulares derivadas de linfomas humanos;
- c) linfoma S19 de la cepa de ratones AKR.

### 2.1.1. Tumores primarios.

I. Inducidos por el C.P. más el agregado de material neoplásico:

a) de origen humano (injerto xenogéneo):

Tumor P119: Tumor primario inducido por un C.P. y la inoculación de células de una línea celular, denominada GH7, proveniente de un linfoma humano (Suárez y col., 1969).

Tumor P320: Idem P119

Tumor P323: Tumor primario inducido por un C.P. y la inoculación de células de una línea celular, denominada LDLT, proveniente de un linfoma humano (Sen y col., 1972).

Tumor P120: Idem P323.

Tumor P198: Tumor primario inducido por un C.P. y la inoculación de células de una línea celular, denominada Jijoye, proveniente de un linfoma de Burkitt.

Tumor P193: Tumor primario inducido por un C.P. y la inoculación de células de una biopsia de un linfoma folicular gigante.

Tumor P143: Tumor primario inducido por un C.P. y la inoculación de células de una biopsia de un paciente portador de un linfoma no Hodgkin.

b) de origen murino (injerto alógeno):

Tumor P10: Tumor primario inducido por un C.P. y la inoculación de células del linfoma S19 de la cepa de ratones AKR.

Tumor P365: Idem P10.

Tumor P346: Idem P10.

II. Inducidos por el C.P. solo, sin inoculación de células neoplásicas:

Tumor P249

Tumor P356

Tumor CS1

Tumor CS2

Tumor CS3

### 2.1.2. Transplantes.

Se realizó el estudio citogenético del primer pasaje in vivo de los tumores primarios anteriormente mencionados. Para realizar el trasplante tumoral, se toma un pequeño trozo del tumor primario, el cual es colocado por medio de un trócar subcutáneamente en ratones BALB, sin-geneicos. Al cabo de unos 7 a 10 días comienza a desarrollarse el tumor el cual es extraído y estudiado citogenéticamente.

### 2.2. Técnicas citogenéticas directas.

- Se inoculan los animales que presentan un desarrollo tumo-  
ral adecuado con colchicina, a una concentración de 1µg/gr de peso del  
animal intraperitonealmente. Al cabo de 4-5 horas, se sacrifica el ani-  
mal y se extrae una pequeña biopsia, la cual es triturada por medio de  
un bisturí. Se recogen las células, se lavan y luego, son sometidas a  
la acción de la solución hipotónica de ClK al 0,53%, durante 20 minutos.

Finalmente, se fija el material con ácido acético glacial y alcohol metílico en una proporción 1:3, realizando tres lavados como mínimo. La sus pensi ón celular obtenida es extendida en porta-objetos, perfectamente limpios, y por último, coloreados con Giemsa 1:10 de agua corriente.

Esta misma técnica se puede desarrollar haciendo una pequeña variante, la cual consiste en inocular la colchicina dentro de la masa tumoral.

- Otra técnica directa aplicada fue extraer una pequeña biopsia de la masa tumoral disgregando las células por acción de tripsina. Resuspender las células en medio de cultivo que contiene colchicina a una concentración de 1µg/ml durante 2 horas; al cabo de este tiempo, se continúa exactamente igual que en la técnica anterior.

Todas estas variantes dieron escasos resultados dado que el material utilizado estaba compuesto por tumores sólidos muy fibrosos con frecuentes zonas de necrosis y, por este motivo, se recurrió a las técnicas de cultivo "in vivo" y/o "in vitro".

### 2.3. Técnicas citogenéticas aplicando técnicas de cultivo.

#### 2.3.1. Técnica de cultivo "in vivo".

Consiste en cultivar células en una cámara de difusión (C.D.) en la cavidad intraperitoneal del ratón.

La C.D. consta de un anillo de lucite de 10mm de diámetro por 3mm de altura, el cual está cerrado en ambas caras por filtro Milli

pore de  $0,22\mu$  impermeable a las células pero que deja pasar los líquidos nutrientes del animal hacia ella (Capalbo, 1964).

La técnica consistió en:

- a) homogeneizar el tumor a estudiar en medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium);
- b) 0,2 ml de la suspensión celular a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  cel/ml es introducida a través de un pequeño orificio que posee el anillo, el cual es taponado con parafina después de introducir las células;
- c) las C.D. son implantadas en la cavidad peritoneal de animales singéneicos mediante una incisión quirúrgica de la pared abdominal;
- d) después de 8-10 días, las C.D. son recuperadas y tratadas con pronasa al 0,5% durante 30 minutos para disolver el coágulo celular que se forma dentro de ellas;
- e) la suspensión celular es lavada y centrifugada de 2 a 3 veces;
- f) el pellet obtenido se resuspende en medio de cultivo que contiene colchicina  $1\mu\text{g/ml}$  durante 3-5 horas, con el fin de detener el mayor número de células en metafase;
- g) el material celular es sometido a la acción de la hipotónica de CLK al 0,53% durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$ ;
- h) luego, las células son fijadas en alcohol metílico-ácido acético glacial en una proporción 3:1, durante 30 minutos y 3 cambios sucesivos;
- j) finalmente, se realiza el extendido y se colorea con Giemsa 1:10 de agua corriente durante 10 minutos (Rumi y col., 1974).

Generalmente, se siembran de 10 a 12 C.D. por tumor; en el momento de la extracción, se sacan de 5 a 6 C.D. y si el número de meta

fases no es suficiente, se realiza el repique de las cámaras restantes dividiendo el material contenido en las C.D. e introduciéndolo nuevamente en la cavidad intraperitoneal por 8 días más.

### 2.3.2. Técnica de cultivo "in vitro".

Esta técnica consiste en cultivar pequeñas biopsias de los tumores en un medio de cultivo adecuado suplementado con suero fetal bovino; de este modo, se logró obtener líneas celulares de corto término (P10-P249) y de largo término (P119-P193-CS1-CS2-CS3).

Se procedió de la siguiente manera:

- a) Se toma una pequeña biopsia del tumor;
- b) se tripsina con agitación permanente;
- c) la suspensión celular se lava en medio de cultivo MEM;
- d) se siembra en frascos planos con medio de cultivo MEM más 20% de suero fetal bovino más 100u de penicilina y 100µg de streptomycin;
- e) cuando la monocapa celular está confluyente, observada al microscopio invertido, se realiza el primer repique;
- f) una vez que el cultivo ha completado nuevamente la monocapa, se vuelve a tripsinar y así sucesivamente.

Las líneas celulares obtenidas, actualmente se encuentran congeladas. A partir de estas líneas celulares derivadas de los tumores murinos se pudo realizar el estudio citogenético; para ello se debe:

- g) agregar colchicina 0.µg/ml durante una hora;
- h) despegar la monocapa celular utilizando tripsina (enzima proteolítica que destruye la sustancia intercelular);

- i) recoger el material, centrifugar y descartar el sobrenadante;
- j) someter al pellet celular a la acción de la solución hipotónica CLK al 0,53%;
- k) fijar en ácido acético glacial-alcohol metílico (1:3), tres cambios como mínimo;
- l) realizar los extendidos y colorear con Giemsa 1:10 de agua corriente durante 10 minutos.

### 2.3.3. Técnica de cultivo de embrión.

- a) Sacrificar una hembra preñada entre 12-17 días de gestación de la cepa BALB;
- b) extraer, en forma estéril, cada uno de los embriones;
- c) procesar, en forma individual, cada uno de ellos cortándolos con dos bisturís hasta dejar reducido el tejido a una pulpa;
- d) sembrar a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml en frascos de cultivo planos con medio MEM más 20% de suero fetal bovino más antibiótico;
- e) incubar a 37°C durante 48 horas y observar al microscopio invertido. Cuando la monocapa celular está confluyente, realizar el primer repique.

A partir de este momento, para realizar el estudio citogenético, se continúa como en la técnica anterior, punto f.

### 2.4. Técnicas de bandeo cromosómico.

#### 2.4.1. Técnica de bandeo G.



Aplicando la técnica de Marina Seabright (1971), con algunas modificaciones:

- a) los extendidos, realizados al frío, se dejan envejecer por lo menos durante una semana;
- b) se hidratan en buffer pH7;
- c) se someten a la acción de la tripsina a una concentración de 0,1%, durante un tiempo variable, generalmente entre 15 segundos y 5 minutos, dependiendo del preparado;
- d) se vuelve a pasar por el buffer pH7 para cortar la acción de la tripsina;
- e) se colorea con Giemsa (1ml/4ml de buffer) durante 3 minutos;
- f) se lava el preparado con agua corriente;
- g) se seca al aire;
- h) se observa al microscopio con objetivo de inmersión 100x.

#### 2.4.2. Técnica de bandeó C.

Aplicamos la técnica de Arrighi y Hsu (1971) y la de Kanda (1976), con ligeras modificaciones en ambas técnicas.

La primera de ellas, consiste en:

- a) Tratar los preparados de 7-30 días de antigüedad con 0,2N de HCl a temperatura ambiente durante 30 minutos;
- b) lavar con agua destilada 3 cambios;
- c) sumergir los preparados en NaOH 0,03M durante 15 segundos a 1 minuto, según el preparado;
- d) pasar los preparados por 5 cambios de alcohol 70°;

- e) pasar los preparados por 3 cambios de alcohol 96°;
- f) dejar secar;
- g) incubar toda la noche en 2xSSC a 65°C;
- h) pasar nuevamente por alcohol 70° (5 veces);
- i) colorear con Giemsa 1:50 de buffer pH6,8 durante 30 minutos.

y, la segunda técnica, consiste en:

- a) Tratar los preparados de 7-30 días de antigüedad con HCl 0,2N, durante 30 minutos;
- b) lavar con agua destilada;
- c) incubar en  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  al 5% desde 15 segundos a 1 minuto (dependiendo del preparado);
- d) lavar con agua destilada varias veces;
- e) incubar en 2xSSC una hora a 60°C;
- f) lavar con agua destilada;
- g) teñir con Giemsa 1/50 de buffer pH6,8 durante 30 minutos.

## 2.5. Técnica autorradiográfica.

Al material a estudiar se le adiciona  $\text{TdrH}^3$  en una concentración de 0,1  $\mu\text{C}/\text{ml}$ . La  $\text{TdrH}^3$  es incorporada al DNA neoformado y, posteriormente, es revelada mediante la autorradiografía, método que aprovecha las partículas emitidas por el Tritio que impresionan la emulsión nuclear reduciendo la sal de plata que, al ser revelada, aparece en forma de gránulos.

Una vez obtenidos los preparados que han incorporado el i-

sótopo radioactivo, se sumergen en la emulsión TNB12 de Kodak, se dejan incubar en completa oscuridad y sequedad durante 10 días; al cabo de este tiempo, se realiza la revelación (revelador Kodak D-19b, durante 2 a 5 segundos) y fijación de los preparados (fijador Kodak F-5, durante 5 segundos) y, finalmente, se colorean con Giemsa al 2,5% en buffer de Sörensen a pH6,4-6,5 durante 30 minutos.

## 2.6. Apéndice Estadístico

Intervalos de confianza para la media:

$$P \left( \bar{X} - t_{m,\alpha} \frac{S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + t_{m,\alpha} \frac{S}{\sqrt{n}} \right) = 1 - \alpha, \text{ donde:}$$

$\bar{X}$ : media muestral

$\alpha$ : nivel de significación

m: grados de libertad = n-1

n: tamaño de la muestra

S: desvio estandar muestral

P: probabilidad

t: variable "t" de Student

$\mu$ : media poblacional

### 3.1. Datos obtenidos en ratones normales.

Para obtener datos sobre ejemplares normales de la cepa BALB, se trabajó con embriones de 15 días. Para ello, se sacrificó una hembra preñada a la cual se le extrajeron en forma estéril los fetos, los cuales fueron cultivados in vitro en forma individual (ver Material y Métodos).

Se trabajó con los primeros repiques pues, a medida que el cultivo evoluciona, pueden aparecer alteraciones cariotípicas propias del cultivo in vitro prolongado. Cuando se realiza tinción estandar con Giemsa (Fig. 7), los 40 cromosomas acrocéntricos del ratón sólo pueden ser ordenados en forma tentativa por tamaño decreciente dado que la morfología es igual en todos ellos. Aplicando la técnica G se pudo identificar y ordenar los pares de homólogos de acuerdo a su patrón de bandeado (Figs. 8 y 9) siguiendo las recomendaciones del Comité de Estandarización de la nomenclatura Genética del ratón.

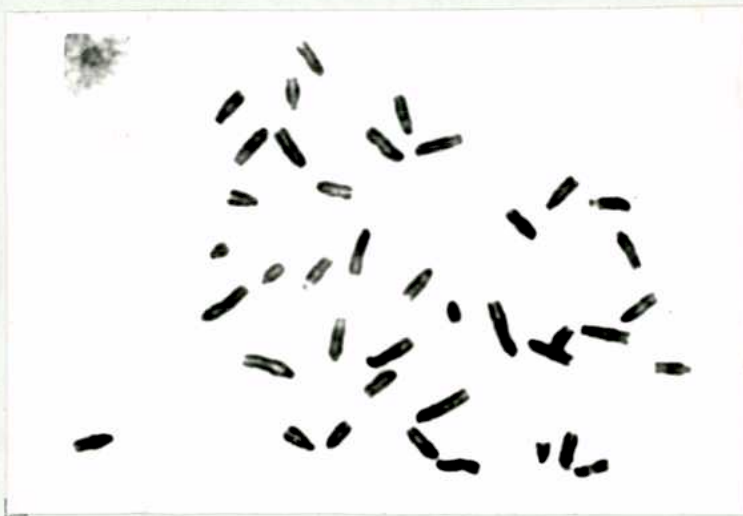


Fig. 7: Metafase de ratón normal con tinción estandar.

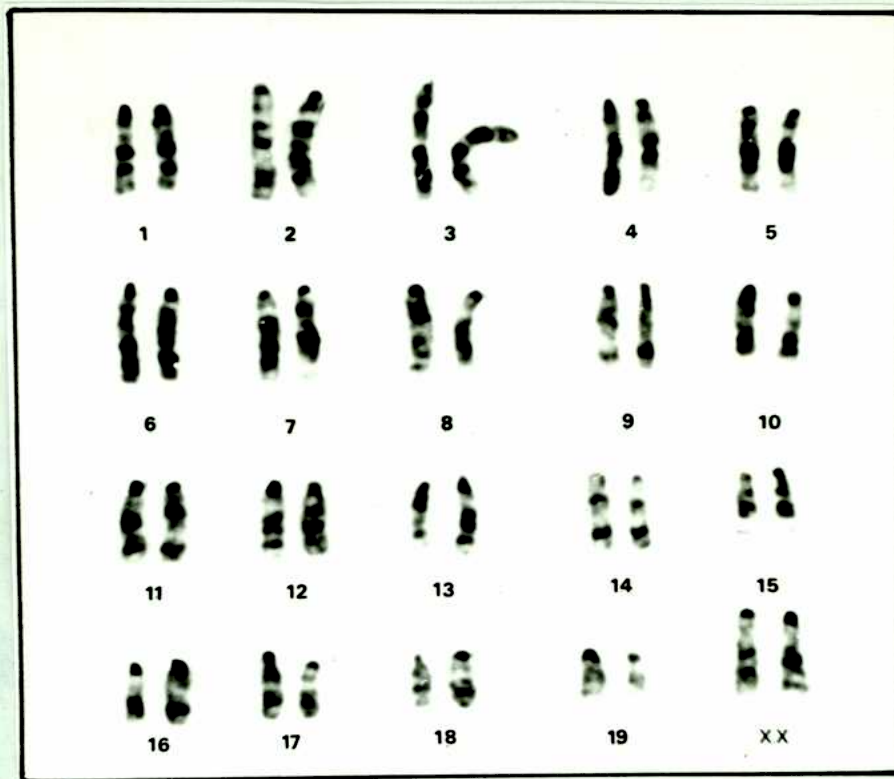


Fig. 8: Patrón de Bandeado G en una hembra normal

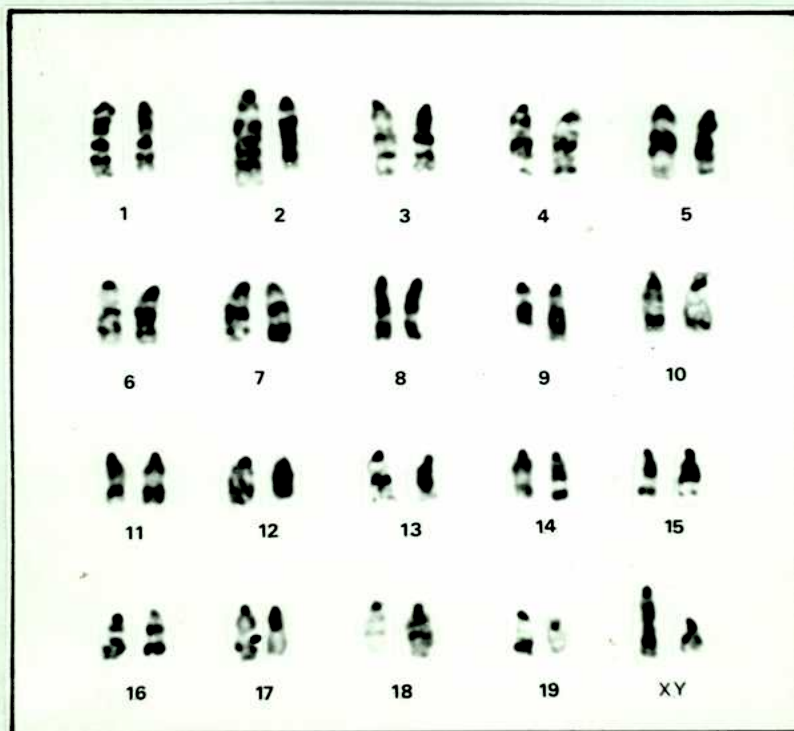


Fig. 9: Patrón de Bandeado G en un macho normal

La técnica de bandeo C permitió localizar los bloques de heterocromatina constitutiva, normalmente ubicados en la zona centromérica de todos los cromosomas (excepto en el cromosoma Y donde se observa en los brazos largos) (Figs. 10 y 11).

Con este material se obtuvieron buenos preparados, los cuales fueron procesados con las técnicas de bandeo G y C (ver Material y Métodos). Estos resultados obtenidos en los ejemplares sanos fueron considerados nuestros patrones normales con los cuales se compararon los cariotipos obtenidos en los tumores murinos estudiados.



- Fig.10: Bando C en una hembra normal



Fig.11: Bando C en un macho normal

### 3. RESULTADOS

.

### 3.2. Datos obtenidos en los tumores murinos primarios.

Recurriendo a los distintos métodos de cultivo, in vivo e in vitro, se estudiaron citogenéticamente 15 tumores murinos de larga latencia, inducidos por reacción a cuerpo extraño (C.P.) en la cepa BALB, con ó sin agregado de material neoplásico humano o murino (el modelo experimental empleado está extensamente explicado en el punto 1.4. de la Introducción).

Si bien todos los tumores estudiados fueron clasificados histológicamente como sarcomas anaplásicos, citogenéticamente cada uno de ellos presentó líneas germinales bien específicas.

En todos los casos, el cariotipo de los tumores fue murino y los rangos de heteroploidía más frecuentemente observados, fueron el diploide y tetraploide, coincidiendo con lo publicado en la literatura (Brand y col., 1967). Las líneas triploides se presentaron esporádicamente.

Todos los tumores por reacción a cuerpo extraño de larga latencia son tumores de novo; por lo tanto, se descarta la colonización celular pues en el caso de los tumores inducidos por el C.P. más el agregado de células alogeneicas de la cepa AKR nunca pudieron ser transplantadas a ratones AKR y en el caso de los tumores inducidos por el C.P. más el agregado de células neoplásicas humanas los cariotipos de los tumores siempre fueron murinos.

La incidencia de tumor agregando al C.P. material neoplási-



co murino (66%) o humano (62%) fue significativamente mayor que en el grupo control que lleva los C.P. solos sin células (45%). El incremento de la incidencia de tumor provocada por el agregado de células neoplásicas tanto murinas como humanas, se debería a algún "factor" capaz de potenciar el efecto tumorigénico del implante.

Para realizar el estudio citogenético de los tumores primarios se recurrió a técnicas de cultivo in vivo e in vitro, pues los métodos directos dieron escasos resultados. En cada caso se analizaron entre 30 y 40 metafases; las mejores fueron fotografiadas y cariotipadas.

### 3.2.1. Datos obtenidos aplicando la técnica de cultivo in vivo.

Los tumores estudiados son muy fibrosos y constituyen masas compactas con frecuentes zonas de necrosis; es por ello, que las técnicas directas son de muy bajo rendimiento mitótico por lo tanto se adaptó la técnica de cultivo in vivo en C.D. para realizar el estudio citogenético de los sarcomas anaplásicos murinos (ver Material y Métodos).

En los casos en el que el rendimiento mitótico no fue suficiente en la primera extracción se realizaron repiques del contenido de las C.D. incubándolas durante 8 días suplementarios. En algunos casos, se realizaron hasta 4 repiques in vivo hasta obtener una cantidad suficiente de metafases que permita realizar el estudio citogenético. La siguiente Tabla muestra el rendimiento obtenido con este método en los tumores donde la primera incubación no fue suficiente:

## NUMERO DE METAFASES

TUMOR	CULT. PRIMARIOS	PASAJES				TOTAL
		1	2	3	4	
P193	15	20	15	25	27	102
P119	10	0	15	16		41
P143	30	40	45			115
P249	25	31	34			90

A continuación se describen los marcadores cromosómicos y las características citogenéticas halladas en cada uno de los tumores estudiados.

Cromosoma marcador es aquel que por rearrreglos ha adquirido una morfología distinta de los cromosomas de la especie, cuya aparición es constante y específica para un clon celular al cual permiten identificar o marcar citogenéticamente.

Dado que en el ratón los 40 cromosomas son acrocéntricos, cualquier cambio en la morfología permite individualizar a un marcador.

En los tumores estudiados, se han individualizado varios cromosomas marcadores con técnica estandar.

m (minute): marcador minúsculo, denominado así por ser de menor tamaño que el par N°19 del ratón normal.

dm (doble minute): marcador cromosómico denominado así por presentarse

de a pares. Se trata de una estructura cromosómica muy peculiar sumamente pequeña ( $0,1-0,5\mu$ ). Se presenta en número variable, desde un par hasta varios cientos por célula. Muchas veces resulta difícil poder contabilizarlos con exactitud porque los más pequeños se encuentran en el límite de resolución del microscopio. Como su nombre lo indica, se presentan de a pares, representando las dos cromatidas hermanas. Estas se separan más prematuramente que en el resto de los cromosomas de tamaño normal. Hasta el momento actual, esta alteración cromosómica ha sido descrita únicamente en procesos malignos.

MLA: Marcador Largo Acrocéntrico. Denominado así por ser de mayor tamaño que el par N°1 del ratón normal.

MSM: Marcador Submetacéntrico. Producto de la translocación Robertsoniana o fusión céntrica entre dos cromosomas acrocéntricos de tamaño diferente.

MM: Marcador Metacéntrico. La formación de este marcador puede ser el resultado de dos procesos diferentes:

a) producto de la translocación Robertsoniana o fusión céntrica entre dos cromosomas acrocéntricos de igual tamaño, ó

b) formación de un isocromosoma.

Cualquiera de estos dos procesos pueden dar origen al marcador MM. Dado que en los tumores los pares de homólogos suelen estar aumentados, el hecho de producirse la fusión

céntrica entre dos cromosomas homólogos no implicaría nuli somía para dicho par.

Con la técnica de cultivo in vivo se pudieron estudiar los siguientes tumores:

a) Sarcomas anaplásicos murinos inducidos por el C.P. más el agregado de material neoplásico humano:

P119

P320

P323

P120

P198

P193

P143

b) Sarcomas anaplásicos murinos inducidos por el C.P. más el agregado de células neoplásicas murinas:

P365

P346

c) Sarcomas anaplásicos murinos inducidos por el C.P. solo, sin células:

P356

P249

La TABLA II resume los datos obtenidos.

TUMOR P119:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 52 y 87 cromosomas. El número más frecuente fue 74, encontrándose el 59% de las células entre 71 y 82 cromosomas.

Presentó un marcador m (en 1 ó más ejemplares) en el 40% de las metafases estudiadas. No se observaron figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 12).

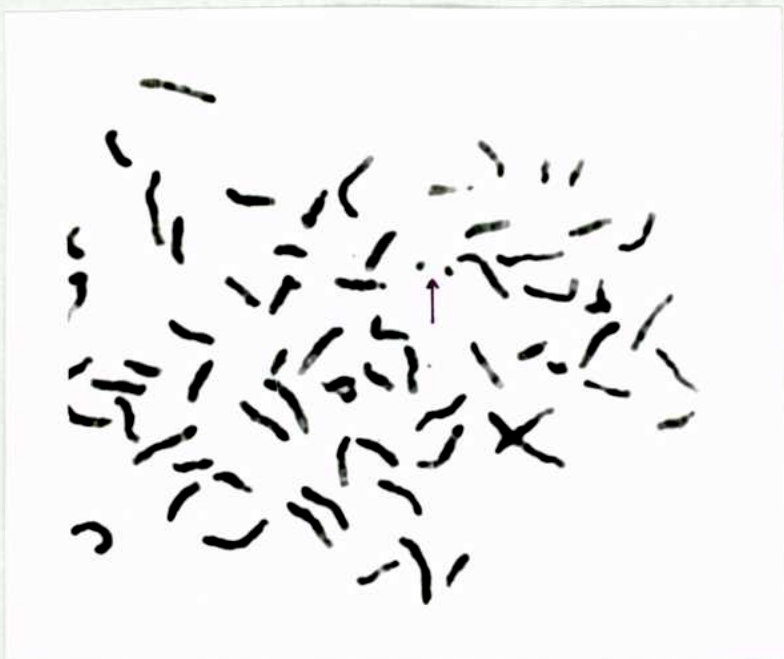


Fig. 12. Metafase del tumor P119 donde se observa el marcador m

TUMOR P320:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 53 y 96 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 86 observándose el 65% de las células entre 79 y 91 cromosomas.

Presentó un marcador m (en 1 ó 2 ejemplares) en el 25% de las metafases estudiadas.

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador SM. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig.13).

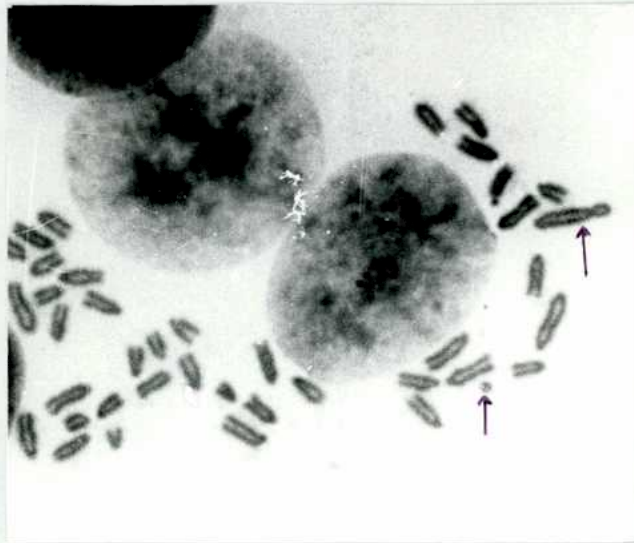


Fig. 13. Metafase del tumor P320 donde se observa el marcador m y el marcador SM.

TUMOR P323:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 69 y 99 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 83, encontrándose el 55% de las células entre 82 y 90 cromosomas.

Presentó un marcador m (en 1 ó 2 ejemplares) en el 40% de las metafases estudiadas.

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador MM. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 14).



Fig. 14. Metafase del tumor P323 donde se observa el marcador m y el marcador MM.

TUMOR P120:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 62 y 98 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 81, observándose el 50% de las células entre 77 y 84 cromosomas.

Presentó un marcador m (en 1 ó más ejemplares) en el 30% de las metafases estudiadas.

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador MM. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 15).



Fig. 15. Metafase del tumor P120 donde se observa el marcador m.



TUMOR P198:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 39 y 75 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 42, encontrándose el 47% de las células entre 40 y 47 cromosomas.

Presentó un marcador MLA (en 1 ó 2 ejemplares) en el 80% de las metafases estudiadas. No se observan figuras de pulverización pero sí algunas roturas de cromátides (Fig. 16).

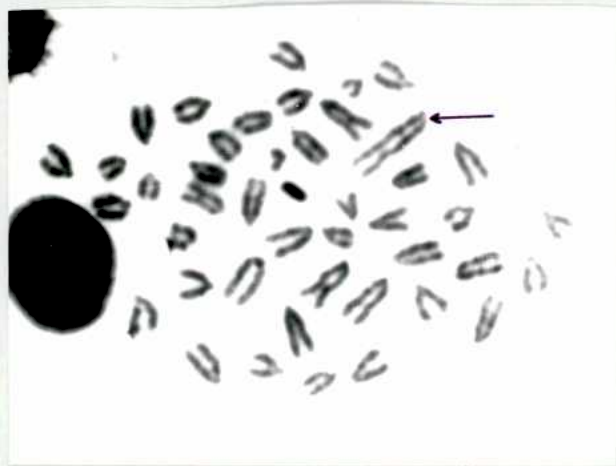


Fig. 16. Metafase del tumor P198 donde se observa el marcador MLA.

TUMOR P193:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 60 y 76 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 66. Las células se hallan distribuidas homogéneamente dentro del rango de ploidía.

Presentó un marcador dm en casi todas las células estudiadas. Además, se observaron los marcadores MLA, MM, en baja proporción. Esporádicamente, suele encontrarse un marcador SM.

Se observan algunas figuras de pulverización. No hubo rotura de cromátides (Fig. 17).

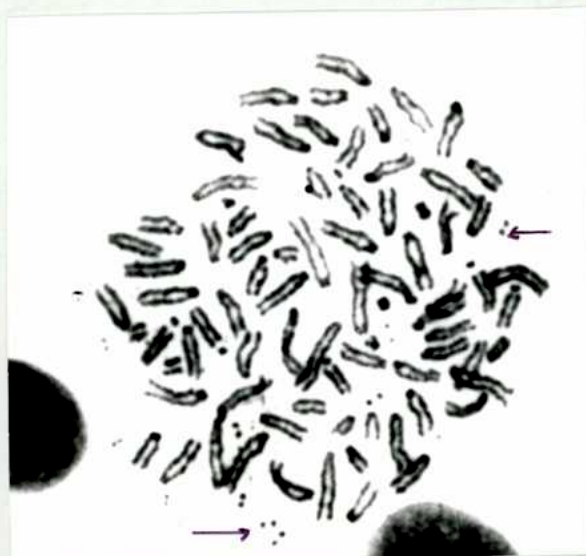


Fig. 17. Metafase del tumor P193 donde se observa el marcador dm.

TUMOR P143:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 40 y 84 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 41 encontrándose, en el 38% de las células entre 40 y 44 cromosomas.

Presentó un marcador SM (en 1 ó 2 ejemplares) en el 80% de las metafases estudiadas. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 18).

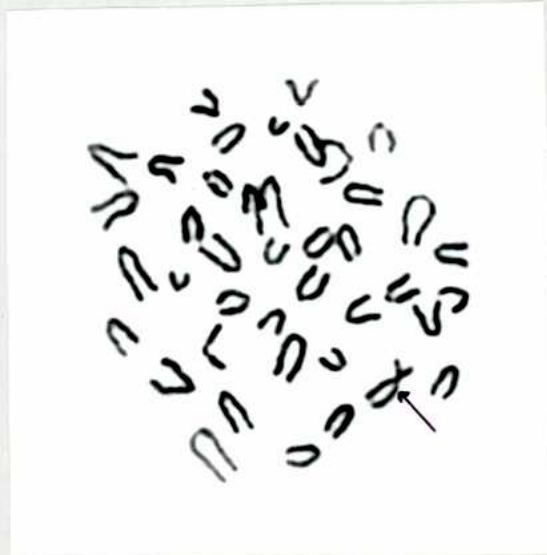


Fig. 18. Metafase del tumor P143 donde se observa el marcador SM.

TUMOR P365:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 58 y 92 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 72, observándose el 58% de las células entre 68 y 80 cromosomas.

No presentó marcador cromosómico y no se observan figuras de pulverización ni roturas de cromátides (Fig. 19).

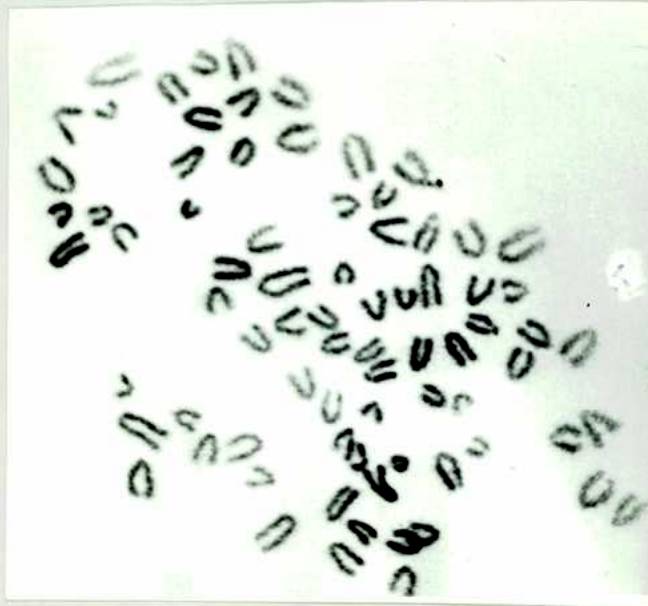


Fig. 19. Metafase del tumor P365.

TUMOR P346:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 60 y 92 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 76, encontrándose el 70% de las células entre 63 y 81 cromosomas.

Presentó un marcador MM, de gran tamaño (en 1 ó más ejemplares) en el 50% de las metafases estudiadas.

Esporádicamente, suele observarse otros marcadores: m, SM y un pequeño MM. No se observan figuras de pulverización pero, sí algunas roturas de cromátides (Fig. 20).



Fig. 20. Metafase del tumor P346 donde se observa el marcador MM y el marcador m.

TUMOR P356:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 41 y 85 cromosomas. Se observó un comportamiento bimodal donde los números cromosómicos más frecuentes fueron 43 y 84 cromosomas encontrándose el 25% de las metafases entre 41 y 45 cromosomas y el 32% de las metafases entre 79 y 84 cromosomas.

No presentó marcadores cromosómicos y no se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 21).

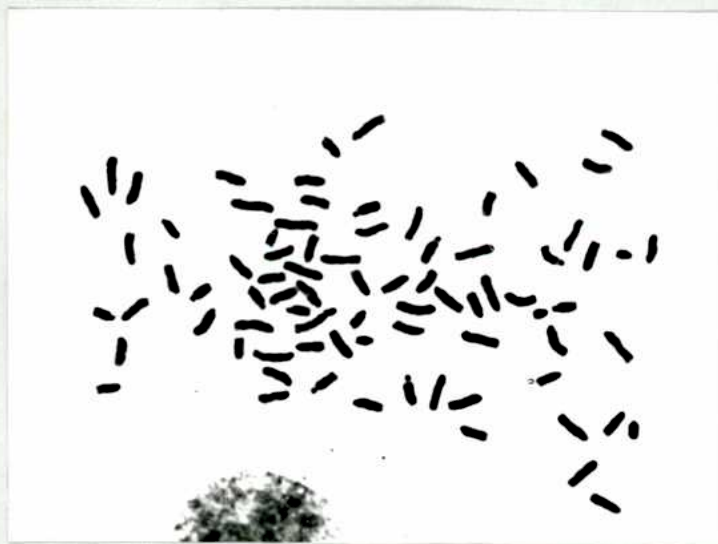


Fig. 21. Metafase del tumor P356.

TUMOR P249:

Se determinó un rango de Heteroploidía entre 39 y 86 cromosomas. Presentó un comportamiento bimodal donde los números más frecuentes fueron 42 y 82 cromosomas encontrándose el 31% de las metafases entre 39 y 44 cromosomas y el 38% entre 77 y 85 cromosomas.

Presentó un marcador SM (en 1 ó más ejemplares) en el 31% de las metafases estudiadas. Esporádicamente, suele observarse un marcador m. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 22).

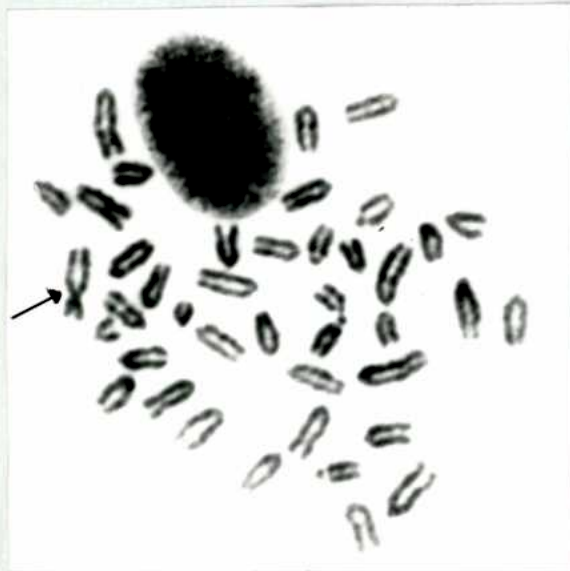


Fig. 22. Metafase del tumor P249 donde se observa el marcador SM.

TABLA II: CARACTERIZACION CITOGENETICA DE LOS TUMORES APLICANDO LA TECNICA DE CULTIVO IN VIVO.

C.P. + MAT. NEOPL.HUMANO	HETEROPL.	N° MODAL	MARC.	MARC./ CEL.	OTROS MARC.	PULVERIZ.	ROTURAS
P119	52-87	74	40% <i>m</i>	1 ó +	-	No	No
P320	53-96	86	25% <i>m</i>	1 ó 2	SM	No	No
P323	69-99	83	40% <i>m</i>	1 ó 2	MM	No	No
P120	62-98	81	30% <i>m</i>	1 ó +	MM	No	No
P198	39-75	42	80% <i>MLA</i>	1 ó 2	<i>m</i>	No	SÍ
P193	60-76	66	<i>dm*</i>	1-50	<i>MLA</i> <i>MM</i> <i>SM</i>	SÍ	No
P143	40-84	41	80% <i>SM</i>	1 ó 2	-	No	No
<hr/>							
C.P. + MAT. NEOPL.MURINO							
<hr/>							
P365	58-92	72	-	-	-	No	No
P346	60-92	76	50% <i>MM</i>	1 ó +	<i>SM</i> <i>m</i> <i>MM**</i>	No	SÍ
<hr/>							
C.P. SOLO							
<hr/>							
P356	41-85	43 84	-	-	-	No	No
P249	39-86	42 82	31% <i>SM</i>	1	<i>m</i>	No	No

\* : En casi todas las células.

\*\* : pequeño.



### 3.2.2. Datos obtenidos aplicando la técnica de cultivo in vitro.

La técnica in vitro fue aplicada para el estudio de los tumores murinos dado que los métodos directos dieron escasos resultados. Esta técnica consistió en extraer una pequeña biopsia del tumor a estudiar, disgregar las células e incubarlas en un medio de cultivo adecuado suplementado con suero fetal bovino (ver Material y Métodos). Se estudiaron los primeros repiques para evitar las modificaciones propias debidas al cultivo in vitro prolongado.

De este modo, se pudieron estudiar los siguientes tumores murinos primarios:

a) Sarcomas anaplásicos inducidos por el C.P. más el agregado de células neoplásicas humanas:

P119

P193

b) Sarcomas anaplásicos inducidos por el C.P. más el agregado de las células neoplásicas murinas:

P10

c) Sarcomas anaplásicos inducidos por el C.P. solo, sin células:

P249

CS1

CS2

CS3

A continuación, se describen las características citogenéticas halladas en cada uno de los tumores estudiados, aplicando la técnica de cultivo in vitro. La TABLA III resume los datos obtenidos.

TUMOR P119:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de largo término, denominada línea P119, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 51 y 89 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 65 encontrándose el 75% de las células entre 60 y 78 cromosomas.

Presentó un marcador m (en 1 ó más ejemplares) en el 30% de las metafases estudiadas. Esporádicamente, suele observarse un marcador MLA. No presentó figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 23).

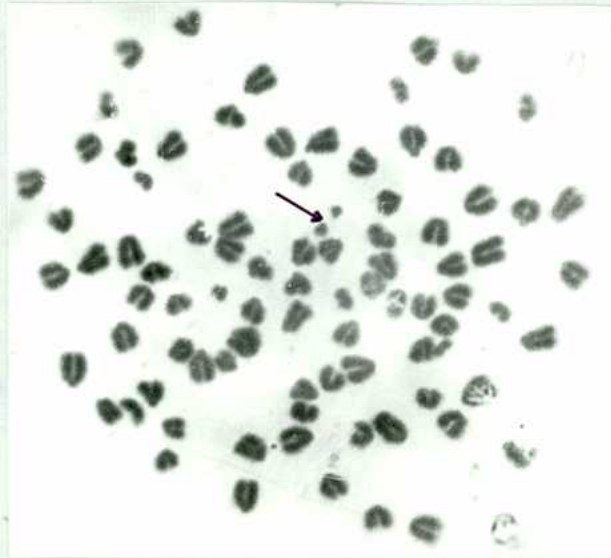


Fig. 23. Metafase del tumor P119 donde se observan los marcadores m

TUMOR P193:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de largo término, denominada Línea P193, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 50 y 130 cromosomas. El número más frecuente fue de 69 observándose el 69% de las células entre 60 y 72 cromosomas. Presentó varios marcadores:

- a) dm: se obtuvo en casi todas las células estudiadas (en número variable).
- b) MLA: en el 98% de las células estudiadas (en 1 ó más ejemplares).
- c) MM: en el 15% de las células estudiadas (en 1 ejemplar).

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador SM y un m. Se observan algunas figuras de pulverización. No hubo rotura de cromátides (Fig. 24).

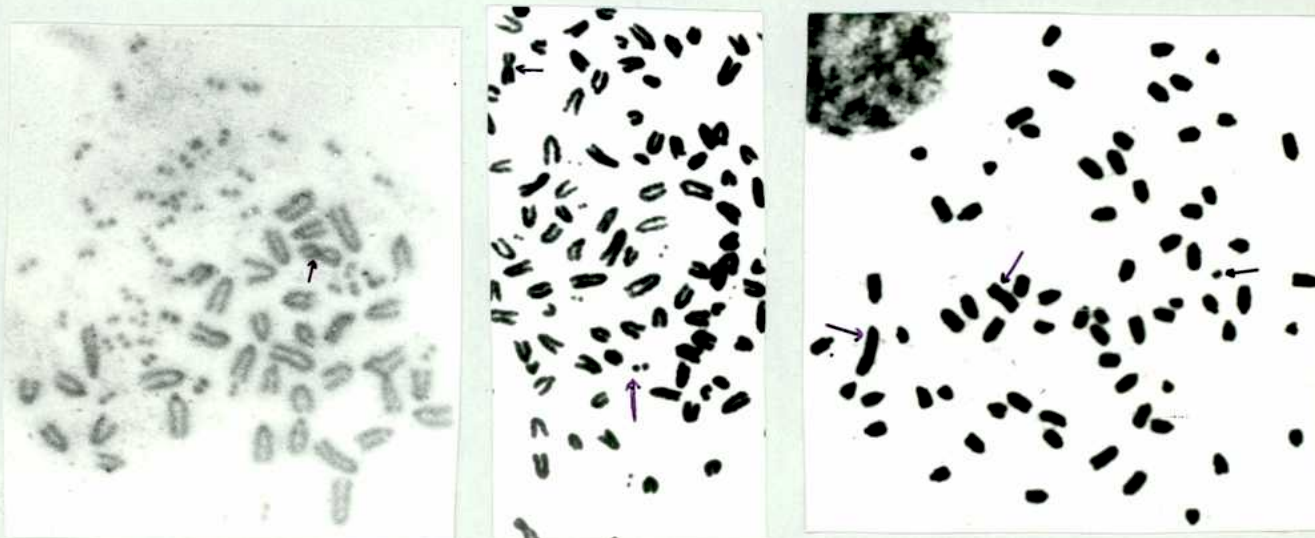


Fig. 24. Metafasas del tumor P193 donde se observan los marcadores dm, MLA, MM y m.

TUMOR P10:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de corto término, denominada línea P10, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 38 y 75 cromosomas. Se observó un comportamiento bimodal donde los números cromosómicos más frecuentes fueron 39 y 70 cromosomas, encontrándose el 30% de las metafases entre 38 y 42 cromosomas y el 50% de las metafases entre 79 y 84 cromosomas.

Presentó un marcador MM (en 1 ó más ejemplares) en el 10% de las metafases estudiadas. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 25).

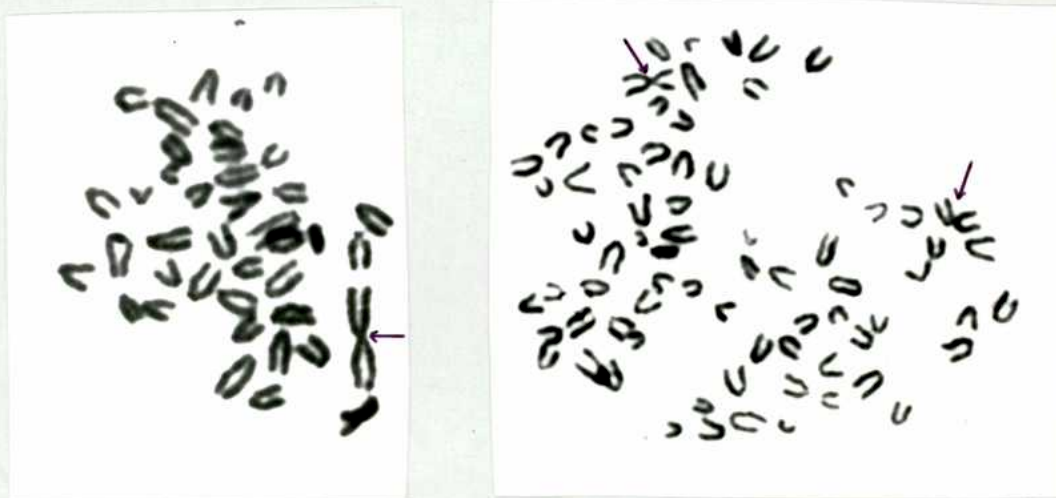


Fig. 25. Metafases del tumor P10 donde se observa el marcador MM.

TUMOR P249:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de corto término, denominada línea P249, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 40 y 84 cromosomas con un comportamiento bimodal donde los números cromosómicos más frecuentes fueron 40 y 81 cromosomas, encontrándose el 31% de las metafases entre 40 y 42 cromosomas y el 32% de las metafases entre 80 y 84 cromosomas.

Presentó un marcador m en muy larga proporción. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig.26).

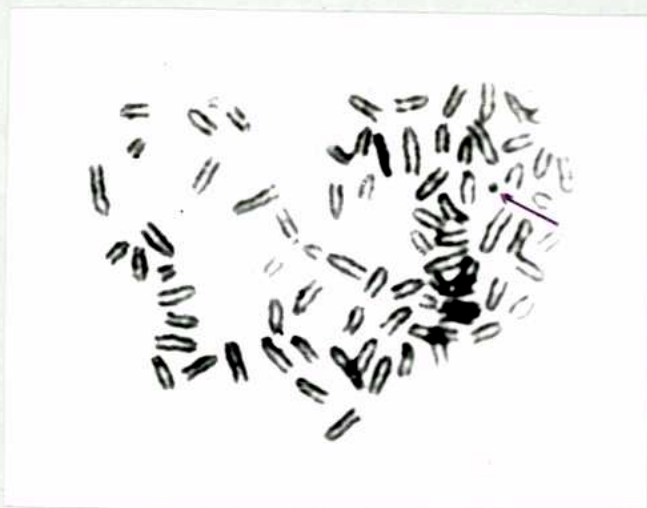


Fig. 26. Metafase del tumor P249 donde se observa el marcador m.

#### TUMOR CS1:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de largo término, denominada línea CS1, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 30 y 86 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 59 cromosomas encontrándose el 76% de las células estudiadas entre 52 y 64 cromosomas.

Presentó varios marcadores cromosómicos:

- a) dm en casi todas las células estudiadas (en número variable).
- b) MLA en el 91% de las células estudiadas (en 1 sólo ejemplar).
- c) MM en el 35% de las células estudiadas (en 1 sólo ejemplar).

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador SM. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig. 27).

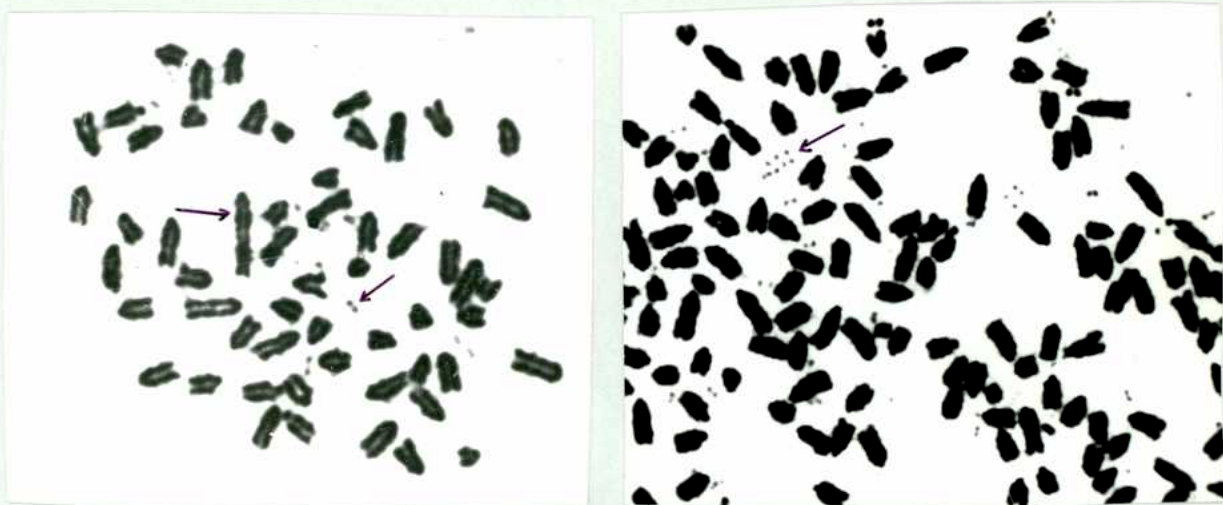


Fig. 27. Metafasas del tumor CS1 donde se observan los marcadores dm y MLA.

TUMOR CS2:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de largo término, denominada línea CS2, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 44 y 92 cromosomas. El número cromosómico más frecuente fue de 66 encontrándose el 57% de las células entre 64 y 74 cromosomas.

Presentó varios marcadores cromosómicos:

- a) dm en casi todas las células estudiadas (en número variable).
- b) MLA en el 50% de las células estudiadas (en 1 solo ejemplar).
- c) MM en el 14% de las células estudiadas (en 1 solo ejemplar).

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador SM y m. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig.28).

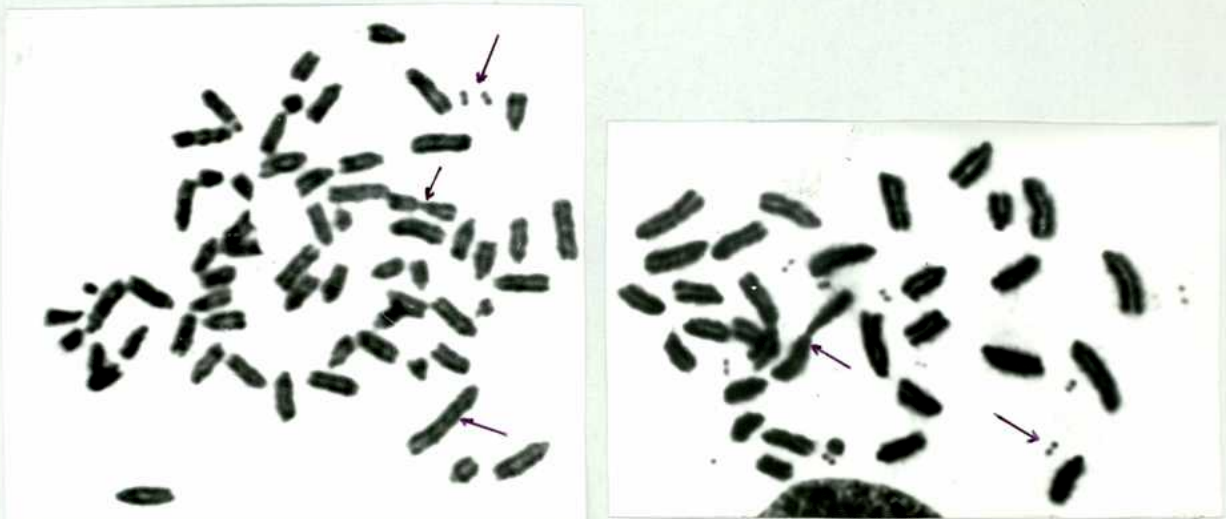


Fig.28. Metafasas del tumor CS2 donde se observan los marcadores dm, MLA y MM.

### TUMOR CS3:

A partir de una biopsia de este tumor, se obtuvo una línea celular de largo término, denominada línea CS3, que permitió caracterizar al tumor. El estudio se realizó durante los primeros repiques. Se determinó un rango de Heteroploidía entre 42 y 93 cromosomas con un comportamiento bimodal donde los números cromosómicos más frecuentes fueron 44 y 89 cromosomas encontrándose el 44% de las metafases entre 42 y 47 cromosomas y el 41% de las metafases entre 85 y 93 cromosomas.

Presentó varios marcadores cromosómicos:

- a) dm en casi todas las células estudiadas (en número variable).
- b) MLA en el 66% de las células estudiadas (en 1 sólo ejemplar).
- c) MM en el 22% de las células estudiadas (en 1 sólo ejemplar).

Esporádicamente, suele encontrarse un marcador SM y un m. No se observan figuras de pulverización ni rotura de cromátides (Fig.29).

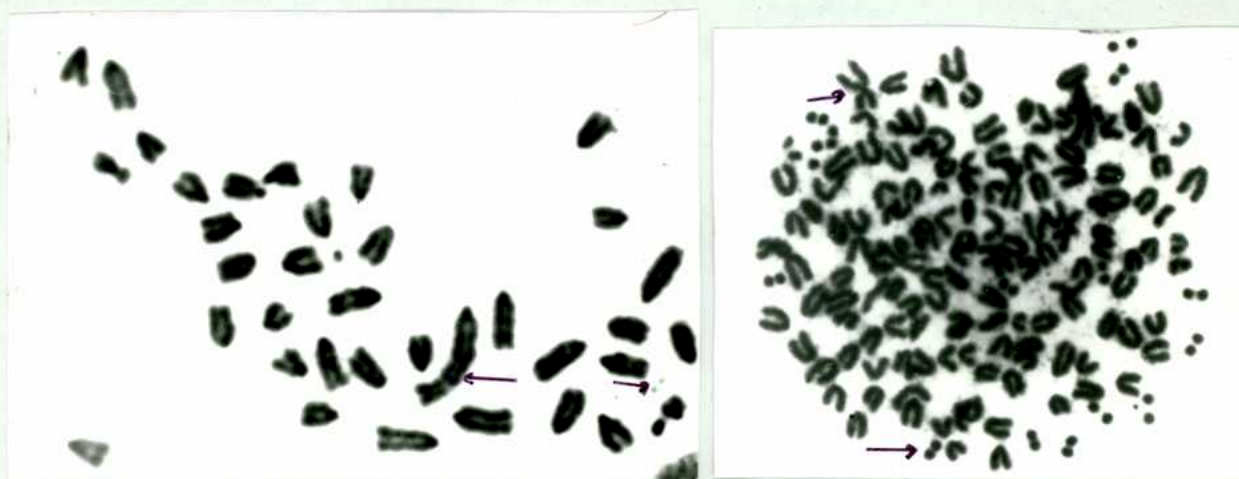


Fig.29. Metafases del tumor CS3 donde se observan los marcadores dm y MLA.



TABLA III: CARACTERIZACION CITOGENETICA DE LOS TUMORES APLICANDO LA TECNICA DE CULTIVO IN VITRO.

C.P. + MAT. NEOPL. HUMANO	HETEROPL.	Nº MODAL	MARC.	MARC./ CEL.	OTROS MARC.	PULVERIZ.	ROTURAS
P119	51-89	65	30% <i>m</i>	1 ó +	MLA	No	No
P193	50-130	69	dm* 98%MLA 15%MM	1-50 1 ó 2 1	SM m	Sí	No
<hr/>							
C.P. + MAT. NEOPL. MURINO							
P10	38-75	39 70	10%MM	1 ó 2	-	No	No
<hr/>							
C.P. SOLO							
P249	40-84	40 81	-	-	m	No	No
CS1	30-86	59	dm* 91%MLA 35%MM	1-100 1 1	SM	No	No
CS2	44-92	66	dm* 50%MLA 14%MM	1-50	SM m	No	No
CS3	42-93	44 89	dm* 66%MLA 22%MM	1-50 1 1	m SM	No	No

\* : En la mayoría de las células estudiadas.

3.2.3. Coincidencia de datos aplicando las técnicas de cultivo in vivo e in vitro.

En el caso de los tumores P193, P119 y P249, se pudo realizar el estudio citogenético tanto in vivo como in vitro. Por lo tanto, se pudo comprobar que los datos obtenidos aplicando ambas técnicas eran coincidentes dentro de ciertos límites considerando la variabilidad celular (Tabla IV).

TABLA IV: CARACTERIZACION CITOGENETICA DE LOS TUMORES P193, P119 Y P249 APLICANDO LAS TECNICAS DE CULTIVO IN VIVO E IN VITRO.

	P193		P119		P249	
	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
Heteroploidía	60-76	50-130	52-87	51-89	39-86	40-84
Nº modal	66	69	74	65	42 82	40 81
Marcadores	dm*	dm* 98%MLA 15%MM	40%m	30%m	31%SM	-
Marc./cél.	1-50	1-50 1 ó 2 1	1 ó +	1 ó +	1	-
Otros marc.	MLA MM SM	SM	-	MLA	m	m
Pulverización	Sí	Sí	No	No	No	No
Roturas	No	No	No	No	No	No

\* : Se presenta en todas las células estudiadas.

De acuerdo con los datos de la Tabla IV, se comprobó que el mismo tumor, procesado por diferentes técnicas de cultivo (in vivo e in vitro) presentaba coincidencia en los principales parámetros citogenéticos (ploidía, número modal, presencia de marcadores) indicando que en estos tumores, las líneas germinales se han conservado muy semejantes independientemente de la metodología empleada para su estudio.

En los tumores P193 y P119, se ha obtenido coincidencia pues presentaban cercano rango de Heteroploidía y los mismos marcadores cromosómicos.

En el caso del tumor P249, se observó que los conteos cromosómicos se encontraban dentro de rangos definidos pero, no se encontró coincidencia total en los marcadores cromosómicos. Es por ello, que se considera que, en este caso, las líneas germinales desarrolladas están emparentadas.

#### 3.2.4. Determinación de marcadores específicos.

De la serie de tumores estudiados, 4 (P193, CS1, CS2 y CS3) presentaron coincidencia de alteraciones cromosómicas pues, en ellos, se observaron los mismos cromosomas marcadores: dm, MLA y MM, en diferentes proporciones:

LÍNEA CELULAR	dm	MLA	MM
CS1	+	91%	35%
CS2	+	50%	14%
CS3	+	66%	22%
P193	+	98%	15%

Dado que 4 tumores murinos de novo presentaban coincidencia citogenética, se consideró de suma importancia aplicar las técnicas de bandeo para conocer los cromosomas implicados en la formación de los marcadores y determinar si se trataba del mismo tipo de rearrreglo en to dos los casos.

El haber obtenido líneas celulares de largo término de es tos 4 tumores, facilitó el estudio pues se disponía de abundante material de buena calidad.

El marcador doble diminuto (dm) en los 4 tumores se comporta de la misma manera. Aplicando la técnica de bandeo G, los dm se tiñen en forma despareja siendo la característica más constante una coloración grisácea muy pálida, que en la mayoría de los casos, los hace pasar totalmente desapercibidos. Los dm de mayor tamaño suelen presentar alguna zona de tinción más oscura (Fig. 30).

Con bandeo C, los dm parecen desaparecer pues ellos se comportan como heterocromatina constitutiva negativa; por lo tanto, re sulta muy difícil visualizarlos con esta técnica (Fig. 31).

En los 4 tumores se determinó que el origen del marcador era la misma translocación. La técnica de bandeo G demostró, con toda claridad, que el marcador MLA era una translocación en tandem entre el cromosoma 1 y el 16  $t(1q;16q)$ . El cuerpo principal de ambos cromosomas se mantuvo en la translocación. El cromosoma N°16 forma la parte proximal adonsándosele distalmente el cromosoma N°1, el cual pare ce perder la zona centromérica. Dado que el centrómero funcional es

del cromosoma N°16, la forma más correcta de describir el marcador es  $der(16) \ t(1q; 16q)$  (Fig. 32). Este rearrreglo se demostró en los 4 tumores: P193, CS1, CS2 y CS3 (Fig. 33).

Con bandeo C se pudo determinar que todos los cromosomas poseían la clásica banda de Heterocromatina constitutiva centromérica, típica del ratón. En los 4 tumores, el marcador MLA presentó una única Banda de Heterocromatina comportándose igual que el resto de los cromosomas (Fig. 34).

En el tumor P193, se observó esporádicamente (con bandeo C) un nuevo cromosoma marcador de menor tamaño que el MLA que presentaba una Banda extra de Heterocromatina constitutiva por debajo del centrómero (Fig. 35). Este nuevo marcador no fue observado en el resto de los tumores, y se lo denominó Mc (marcador en Bando C).

En los 4 tumores se determinó el origen del marcador MM, que presente en menor proporción, era la misma translocación. La técnica de Bando G demostró con toda claridad que se trataba de una translocación Robertsoniana entre dos cromosomas N°10  $Rb(10.10)$  o de un isocromosoma de brazo largo del cromosoma N°10  $I(10q)$  (Fig. 36).

Resulta difícil decir cuál de los dos mecanismos fue el responsable del origen del marcador pues en los tumores, los pares de homólogos generalmente están aumentados en número. Por lo tanto, la fusión céntrica entre dos homólogos no implicaría nulisomía para dicho par.

Este rearrreglo se demostró en los 4 tumores: P193, CS1, CS2,

y CS3 (Fig. 37).

La técnica de bandeado C demostró en el marcador MM la presencia de dos bloques de heterocromatina constitutiva centromérica (en espejo) indicando que no hubo pérdida de material (Fig. 38).

Con la técnica de bandeado G se pudieron identificar otros cromosomas marcadores cuya aparición fue muy esporádica. Se trata de los marcadores MSM1, MSM2, MSM3 y MSM4:

MSM1: Consiste en una translocación Robertsoniana entre el cromosoma N°1 y el N°18. Rb (1.18). Se observó en el tumor CS1.

MSM2: Consiste en una translocación Robertsoniana entre el cromosoma N°10 y el N°18. Rb (10.18). Se observó en el tumor CS1 y CS3.

MSM3: Consiste en una translocación Robertsoniana entre el cromosoma N°15 y el N°18. Rb (15.18). Se observó en el tumor CS1 y CS2.

MSM4: Consiste en una translocación Robertsoniana entre el cromosoma N°3 y el N°19. Rb (3.19). Se observó en el tumor P193.

Estos marcadores fueron hallados en muy baja proporción y no siempre estuvieron presentes en todos los tumores; en consecuencia, no se consideran específicos en este tipo de tumor por reacción a cuerpo extraño.

Dado que los tumores presentaban una marcada heteroploidía a fin de determinar si la frecuencia de aparición de cada tipo cromosómico era al azar o específica del desarrollo tumoral, se analizaron 10 cariotipos bandeados de cada tumor teniendo en cuenta todos los cromosomas identificados, aún los implicados en la formación de marcadores y se excluyeron los no identificados (Bianchi M. y col. 1977).

El par sexual no se incluyó por ser un par heteromórfico. Se analizó el número de copias de los 19 autosomas en 10 metafases de cada tumor obteniéndose un valor promedio para cada uno de ellos por célula (Tablas Va,b; VIa,b; VIIa,b y VIIIa,b).

El promedio de todos los valores encontrados de cada par autosómico da una estimación del valor esperado, este valor representa la frecuencia esperada para cada tipo cromosómico de homólogos si la hiperdiploidía compromete al azar cada uno de ellos.

En los histogramas I, II, III y IV se grafica la diferencia entre el valor encontrado y esperado, lo cual nos permite visualizar rápidamente que pares de autosomas se encuentran en exceso o en defecto.

Al realizar la valoración estadística, aplicando intervalos de confianza del 95% para la media se obtuvieron los siguientes resultados:

- El tumor CS1 presentó una media general de  $2,78 \pm 0,22$  (semi amplitud del intervalo de confianza del 95% para la media (Grafico I)).
- El tumor CS2 presentó una media general de  $3,07 \pm 0,23$  (Grafico II).
- El tumor CS3 presentó una media general de  $2,96 \pm 0,21$  (Grafico III).
- El tumor P193 presentó una media general de  $3,19 \pm 0,19$  (Grafico IV).

En los Graficos I, II, III y IV se marcan los intervalos de confianza de cada par autosómico lo cual permite distinguir cuales de ellos se encuentran significativamente afectados por pérdidas o ganancias.

- En el tumor CS1 los cromosomas 1,2,5 y 7 presentaron pérdidas y los cromosomas 16 y 18 presentaron ganancias (Grafico I).
- En el tumor CS2 los cromosomas 3,4,6,8 y 12 presentaron pérdidas y los cromosomas 16 y 19 presentaron ganancias (Grafico II).

- En el tumor CS3 los cromosomas 2,5,6 y 8 presentaron pérdidas y los cromosomas 16, 18 y 19 presentaron ganancias (Grafico III).
- En el tumor P193 el cromosoma 6 presentó pérdidas y el cromosoma 16 presentó ganancias.

Del análisis de los datos se deduce que los cromosomas 16, 18 y 19 siempre presentaron una marcada tendencia al aumento en los 4 tumores, aún en los casos donde el valor no fue significativo. En cuanto al cromosoma N°6 presentó pérdidas significativas en 3 de los tumores (CS2, CS3 y P193) y en el tumor CS1 presentó una tendencia a la disminución.

Los cromosomas 2,5 y 8 presentaron una marcada tendencia a la disminución en los 4 tumores.

Los resultados obtenidos indicarían que determinados pares de autosomas estarían específicamente involucrados en pérdidas o ganancias.



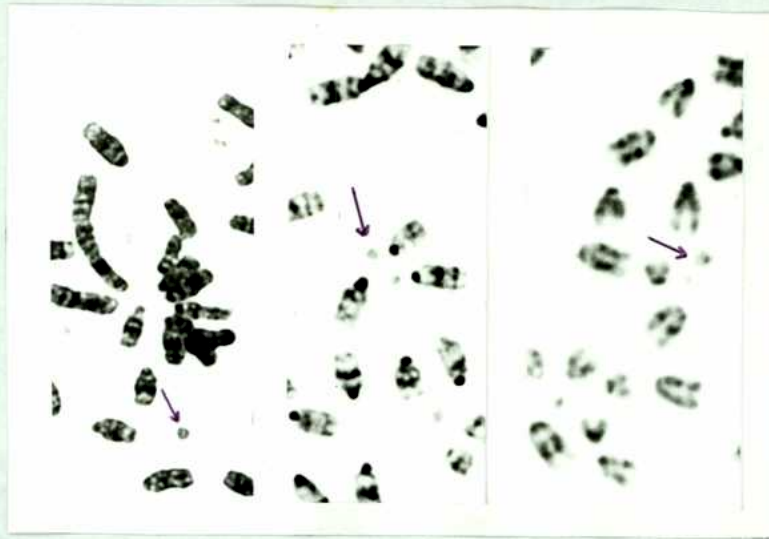


Fig. 30: Aspecto de los dm después de aplicar la técnica de Bandeado G.

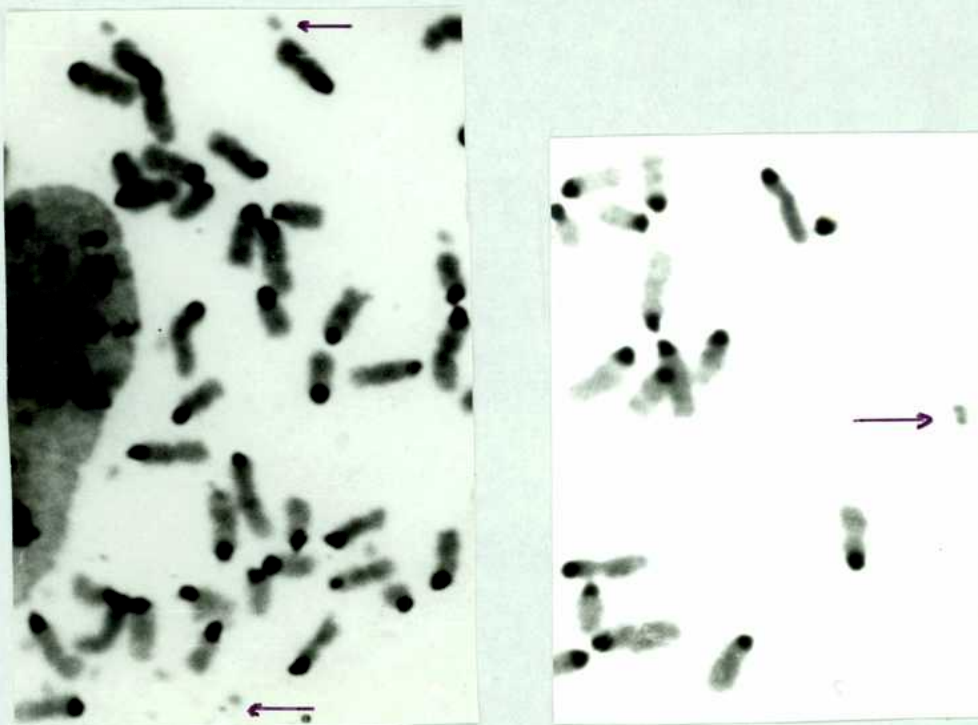


Fig. 31: Aspecto de los dm después de aplicar la técnica de Bandeado C.

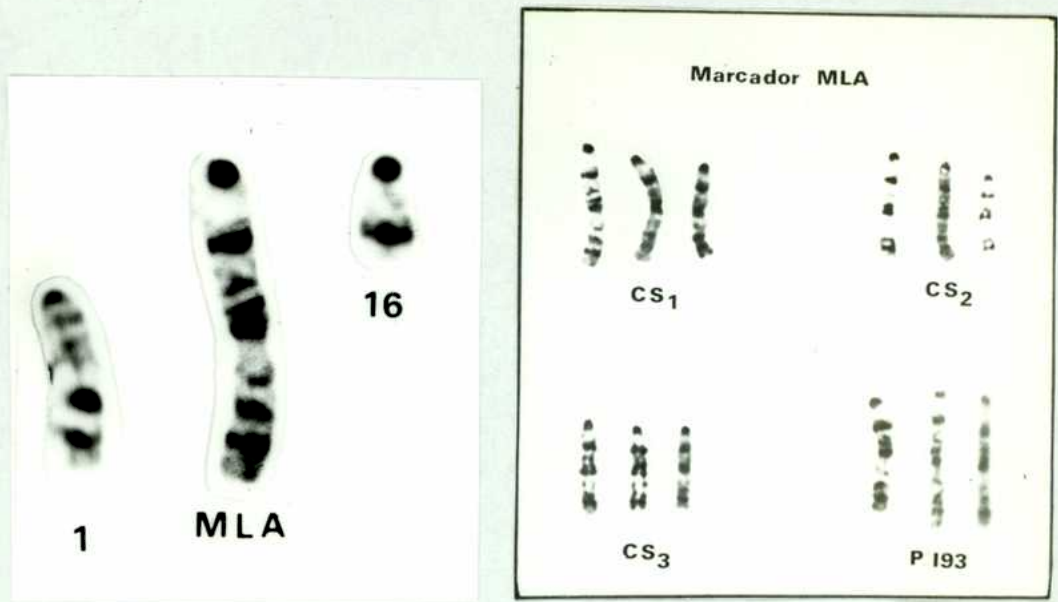


Fig.32: a. Compuesto mostrando el marcador MLA y los cromosomas 1 y 16, involucrados en la translocación  
 b. Tres ejemplares del marcador MLA en los tumores CS1, CS2, CS3 y P193.

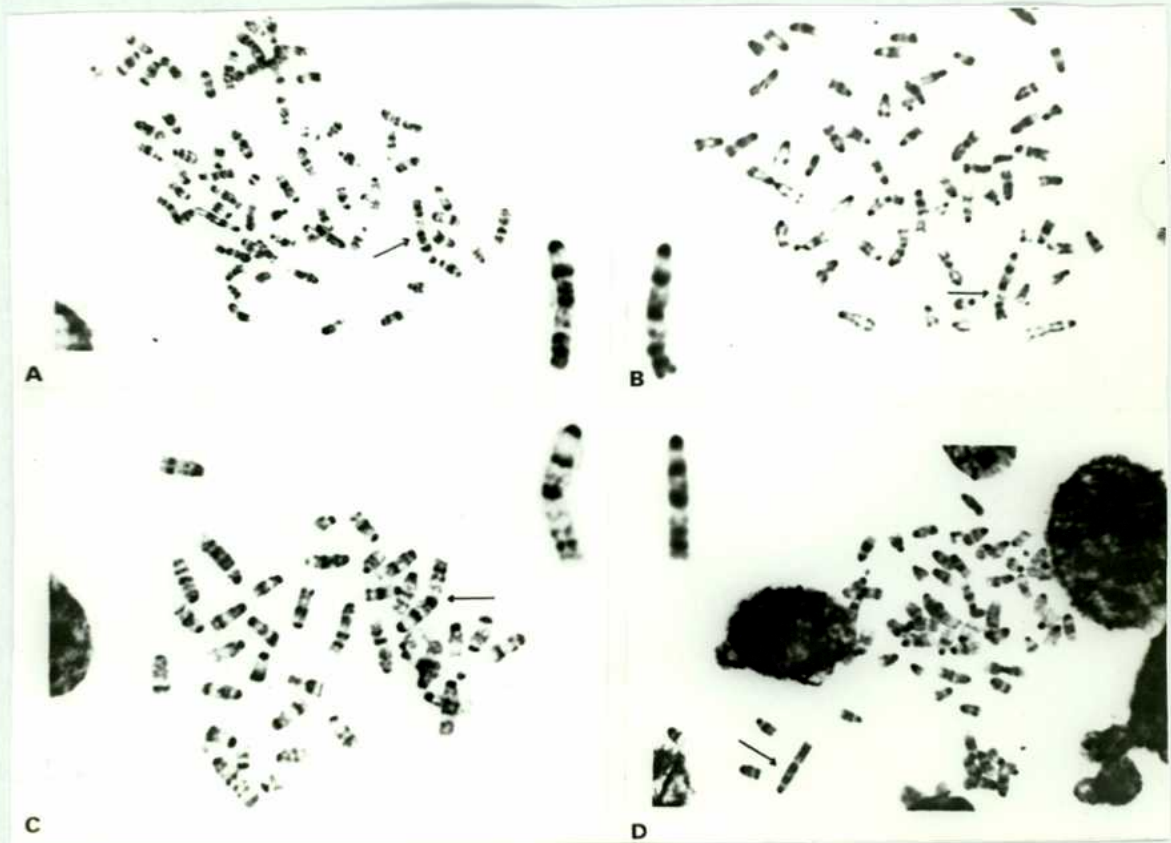


Fig. 33: Cuatro metafases de los tumores: P193(A), CS1(B), CS2(C) y CS3 (D) donde se observa el marcador MLA

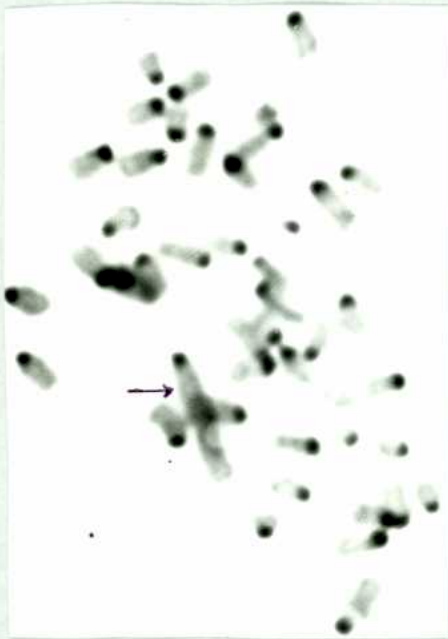
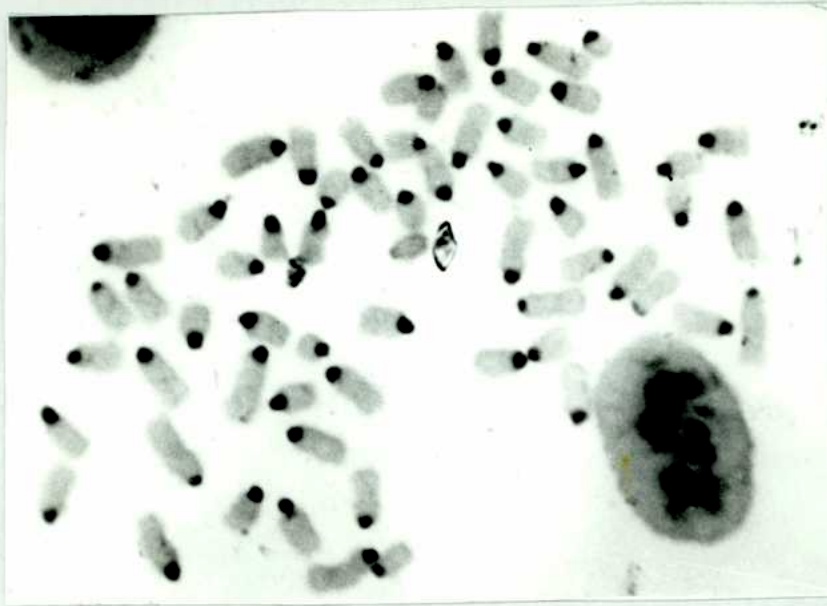


Fig. 34: a. Metafase poliploide donde todos los cromosomas presentan la banda de heterocromatina constitutiva.  
b y c. Metafase donde se observa el marcador MLA con una única banda de heterocromatina constitutiva.

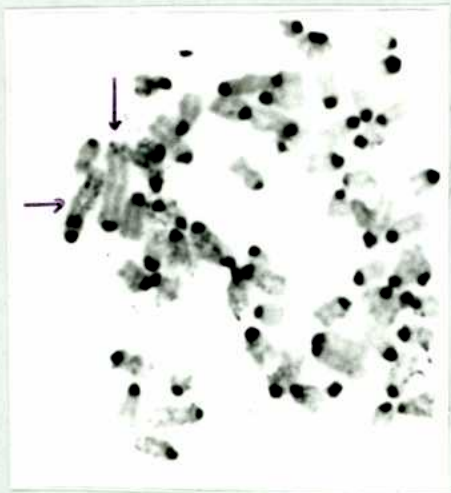


Fig. 35: Metafases del tumor P193 donde se observa el marcador MLA y el marcador Mc con una banda extra de heterocromatina constitutiva.

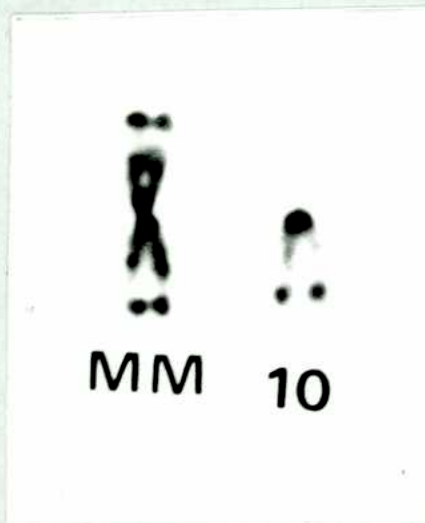


Fig. 36: Compuesto donde se observa el marcador MM y el cromosoma 10 involucrado en la translocación.

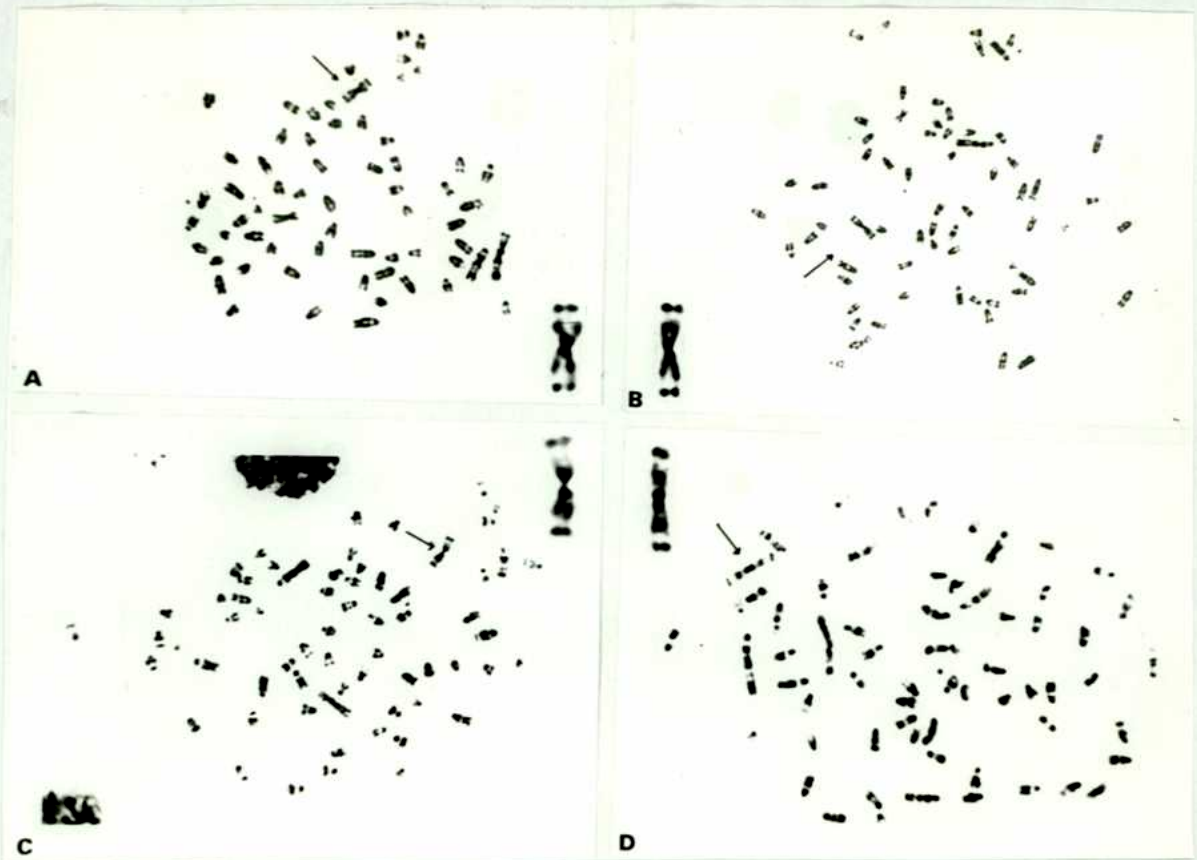


Fig. 37: Cuatro metafases de los tumores P193, CS1, CS2 y CS3 donde se observa el marcador MM.

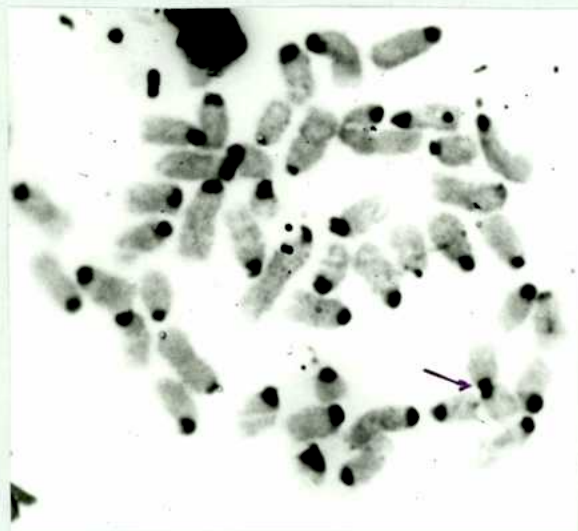


Fig. 38: Aspecto del marcador MM con técnica de bandeo C.

TABLA Va: DISTRIBUCION CROMOSOMICA EN 10 CELULAS DEL TUMOR CS1.

META- FASE	N°CROMO- SOMAS	P A R E S C R O M O S O M I C O S										M A R C A D O R E S				NO IDEN- TIFICADOS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	16	17	18	19	X	Y	dm	MLA	MM	MSM
1	60	1	2	1	2	2	3	1	3	3	2	5	4	2	3	4	3	1	6	5	1	1	+	1			4
2	40	1	2	2	1	1	3	1	2	2	2	3	2	2	1	2	1	4	3	5	1	-	+	1			2
3	30	1	2	2	2	2	2	1	1	-	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	-	-	+	1			-
4	56	2	2	3	2	2	2	2	2	5	2	2	3	2	2	1	3	5	5	-	2	-	+	1	1		5
5	56	2	2	2	3	2	4	2	2	3	2	1	3	2	3	2	4	4	3	5	1	-	+	-		4	
6	63	1	3	2	2	2	2	-	3	2	3	3	3	3	3	6	1	4	8	1	-	-	+	1	1		6
7	64	1	2	3	3	3	2	-	2	2	5	3	3	2	1	4	4	6	6	5	1	-	+	1	1		4
8	66	-	2	3	6	2	2	2	1	3	5	2	3	4	6	3	2	4	5	4	-	1	+	1	1		4
9	64	1	2	3	3	1	2	1	3	2	5	3	2	2	3	2	4	4	6	7	2	-	+	1	1	1*	3
10	61	-	2	1	1	2	2	2	3	3	2	2	3	2	2	2	7	5	5	6	1	-	+	1	1		6

\* : Tipo 1 - Rb(1.18)

TABLA Vb: DISTRIBUCION DE LOS 19 AUTOSOMAS DEL RATON EN 10 CELULAS DEL TUMOR CS1

N° GROMOSOMAS	N U M E R O D E C O P I A S										,PROMEDIO POR CELULA	DIFERENCIA ENCONTRADO- ESPERADO
	0	1	2	3	4	5	6	7	8			
1		2	6	2							2.0	-0.78
2			9	1							2.1	-0.68
3		2	4	4							2.2	-0.58
4		2	4	3			1				2.5	-0.28
5		2	7	1							1.9	-0.88
6			7	2	1						2.4	-0.38
7	2	4	4								1.2	-1.58
8		2	4	4							2.2	-0.58
9	1		4	4		1					2.5	-0.28
10			4	1	2			3			4.0	+1.22
11		2	3	4		1					2.5	-0.28
12			3	6	1						2.8	+0.02
13			8	1	1						2.3	-0.48
14		2	3	4			1				2.6	-0.18
15		2	4	2	2						2.4	-0.38
16			1	2	3	2		1	1		4.5	+1.72
17		2	1		4	2	1				3.6	+0.82
18		1		2	1	3	2	1			4.5	+1.72
19	1	1			1	4	1	1	1		4.6	+1.82
											2.78	

TABLA VIa: DISTRIBUCION CROMOSOMICA EN 10 CELULAS DEL TUMOR CS2.

META- N° CROMO- FASE SOMAS	P A R E S C R O M O S O M I C O S																		MARCADORES						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	dm	MLA	MM	MSM
1	69	2	4	2	2	2	3	3	3	2	4	2	2	3	4	4	3	6	7	-	-	+	1	1*	7
2	67	2	4	2	2	2	3	2	3	4	4	2	3	3	6	2	4	5	5	1	1	+	2		3
3	53	-	2	2	2	2	2	2	3	5	2	1	4	3	2	4	4	5	4	-	-	+	1	1	-
4	54	3	3	2	2	4	2	2	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3	4	-	-	+	1	1**	1
5	65	1	2	2	2	4	2	3	2	3	4	4	3	2	4	4	4	6	8	-	-	+	1	-	-
6	70	4	3	2	3	1	2	2	2	4	3	3	2	4	4	5	5	4	7	-	1	+	2	2	3
7	40	2	2	2	1	2	1	2	2	2	3	2	2	1	3	3	2	2	1	3	-	+	1	1	1
8	54	2	2	2	1	1	3	2	2	2	3	2	3	2	2	6	2	2	4	-	1	+	1	1	6
9	61	1	2	3	1	1	3	3	2	1	4	2	2	3	3	2	4	5	11	-	1	+	1	1	3
10	62	2	2	2	2	2	3	2	3	3	2	2	3	2	3	6	3	5	8	-	1	+	1	3	3

\* : Tipo 3 - Rb(15.18)

\*\* : Tipo 2 - Rb(10.18)



TABLA VIb: DISTRIBUCION DE LOS 19 AUTOSOMAS DEL RATON EN 10 CELULAS DEL TUMOR CS2.

NUMERO DE COPIAS

Nº CROMOSOMAS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	PROMEDIO POR CELULAS	DIFERENCIA ENCONTRADO-ESPERADO
1		1	2	4	2		1			3.1	+0.03
2			6	2	2					2.6	-0.47
3			9	1						2.1	-0.97
4		3	6	1						1.8	-1.27
5		3	5		2					2.1	-0.97
6		1	7	2						2.1	-0.97
7			5	5						2.5	-0.57
8			8	2						2.2	-0.87
9		1	3	6						2.5	-0.57
10			1	2	2	2		2	1	4.8	+1.73
11			5	2	3					2.8	-0.27
12		1	7	2						2.1	-0.97
13		1	4	4	1					2.5	-0.57
14			3	5	2					2.9	-0.17
15			3	3	2	1	1			3.4	+0.33
16				2	2	3		3		5.0	+1.93
17			2	3	4	1				3.4	+0.33
18		1	1		2	4	1	1		4.4	+1.33
19				1	3	1		2	2	6.1	+3.03

3.07

TABLA VIIa: DISTRIBUCION CROMOSOMICA EN 10 CELULAS DEL TUMOR CS3.

META- FASE	N°CROMO- SOMAS	P A R E S C R O M O S O M I C O S																		MARCADORES			NO IDEN- TIFICADOS					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y		dm	MLA	MM	MSM	
1	57	1	2	3	2	2	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	3	5	4	5	-	1	+	1				1
2	56	1	3	2	3	2	3	3	3	3	5	2	2	2	5	3	2	3	5	-	1	+	1					-
3	64	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	6	5	3	5	6	-	-	+	1	1				4
4	50	1	1	1	1	2	1	4	2	4	4	3	2	3	3	4	2	4	2	1	-	+	1					1
5	60	2	2	2	3	2	1	3	2	2	2	3	5	2	2	4	4	8	4	-	1	+	1				3	
6	68	2	3	4	4	2	2	5	3	8	3	4	5	2	3	2	3	3	3	2	-	+	1				2	
7	48	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	6	-	-	+	1				1	
8	59	1	2	3	2	2	2	3	1	3	3	2	2	3	3	5	3	4	8	-	1	+	1			1*	2	
9	59	2	3	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	3	5	6	-	1	+	1				6	
10	62	1	1	1	1	2	2	2	1	-	3	4	4	2	3	6	2	4	10	1	1	+	1	1				6

\* : Tipo 2 - Rb(10.18)

TABLA VIIb: DISTRIBUCION DE LOS 19 AUTOSOMAS DEL RATON EN 10 CELULAS  
DEL TUMOR CS3

NUMERO DE COPIAS

Nº CROMOSOMAS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PROMEDIO POR CELULAS	DIFERENCIA ENCONTRADO- ESPERADO
1			6	4								2.4	-0.56
2		3	4	3								2.0	-0.96
3		2	5	2	1							2.2	-0.76
4		2	5	2	1							2.2	-0.76
5			10									2.0	-0.96
6		2	7	1								1.9	-1.06
7			3	5	1	1						3.0	+0.04
8		2	5	3								2.1	-0.86
9	1		4	3	1				1			2.9	-0.06
10			2	4	2	2						3.4	+0.44
11			4	4	1	1						2.9	-0.06
12			6	2	1	1						2.7	-0.26
13			5	3	1	1						2.8	-0.16
14			4	6								2.6	-0.36
15			3	5		1	1					3.2	+0.24
16				1	4	2	1	2				4.9	+1.94
17			3	5	1	1						3.0	-0.04
18				2	4	3			1			4.5	+1.54
19			1	1	1	2	3		1		1	5.5	+2.54
												2.96	

TABLA VIIIa: DISTRIBUCION CROMOSOMICA EN 10 CELULAS DEL TUMOR P193.

META- N°CROMO- FASE SOMAS	P A R E S C R O M O S O M I C O S																			M A R C A D O R E S			NO IDEN- TIFICADOS			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	dM		MLA	MM	MSM
1	60	-	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3	3	6	4	3	3	7	-	1	+	1	1	1*	3
2	61	-	2	3	2	2	3	3	2	3	4	3	3	2	-	4	3	9	6	2	-	+	2			-
3	65	2	3	3	5	3	2	2	3	3	4	3	3	2	2	3	3	2	5	1	1	+	1	1		5
4	62	1	3	3	4	4	2	4	4	3	2	2	4	5	3	3	4	2	2	2	-	+	1			-
5	61	3	3	4	2	2	2	3	2	2	3	2	3	3	4	2	2	3	6	-	-	+	1			7
6	68	4	5	4	5	4	2	3	3	3	2	3	2	4	2	3	2	3	2	-	-	+	2			7
7	70	-	4	2	2	3	3	6	2	2	5	2	4	4	2	2	4	3	6	6	-	+	1	1**	6	
8	67	2	3	3	3	2	2	2	2	4	4	2	3	3	4	3	3	6	4	-	-	+	1			8
9	66	2	4	3	2	2	2	3	2	4	5	4	3	2	3	6	3	3	3	-	1	+	1			5
10	65	1	2	2	3	2	1	3	2	3	4	3	2	2	4	5	4	5	6	5	1	-	+	1		4

\* : Tipo 1 - Rb(1.18)

\*\* : Tipo 4 - Rb(3.19)

TABLA VIIIb: DISTRIBUCION DE LOS 19 AUTOSOMAS DEL RATON EN 10 CELULAS  
DEL TUMOR P193.

NUMERO DE COPIAS

Nº CROMOSOMAS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PROMEDIO POR CELULAS	DIFERENCIA ENCONTRADO- ESPERADO
1		1	4	3	1	1					2.7	-0.49
2			3	4	2	1					3.1	-0.09
3			1	7	2						3.1	-0.09
4			5	2	1	2					3.0	-0.19
5			5	3	2						2.7	-0.49
6		1	6	3							2.2	-0.99
7			4	4	1		1				3.0	-0.19
8			5	4	1						2.6	-0.59
9			5	3	2						2.7	-0.49
10			1	3	3	2	1				3.9	+0.71
11			4	3	3						2.9	-0.29
12			5	4	1						2.6	-0.59
13			4	4	2						2.8	-0.39
14			3	4	2	1					3.1	-0.09
15	1		2	3	2	1	1				3.2	+0.01
16				1	3	4	1	1			4.8	+1.61
17			2	6	1	1					3.1	-0.09
18			2	3	1		3			1	4.4	+1.21
19			2	1	1	2	2	1	1		4.8	+1.61
											3.19	

HISTOGRAMA N°I: Distribución de la diferencia encontrado esperado para cada par autosómico en el tumor CS1.

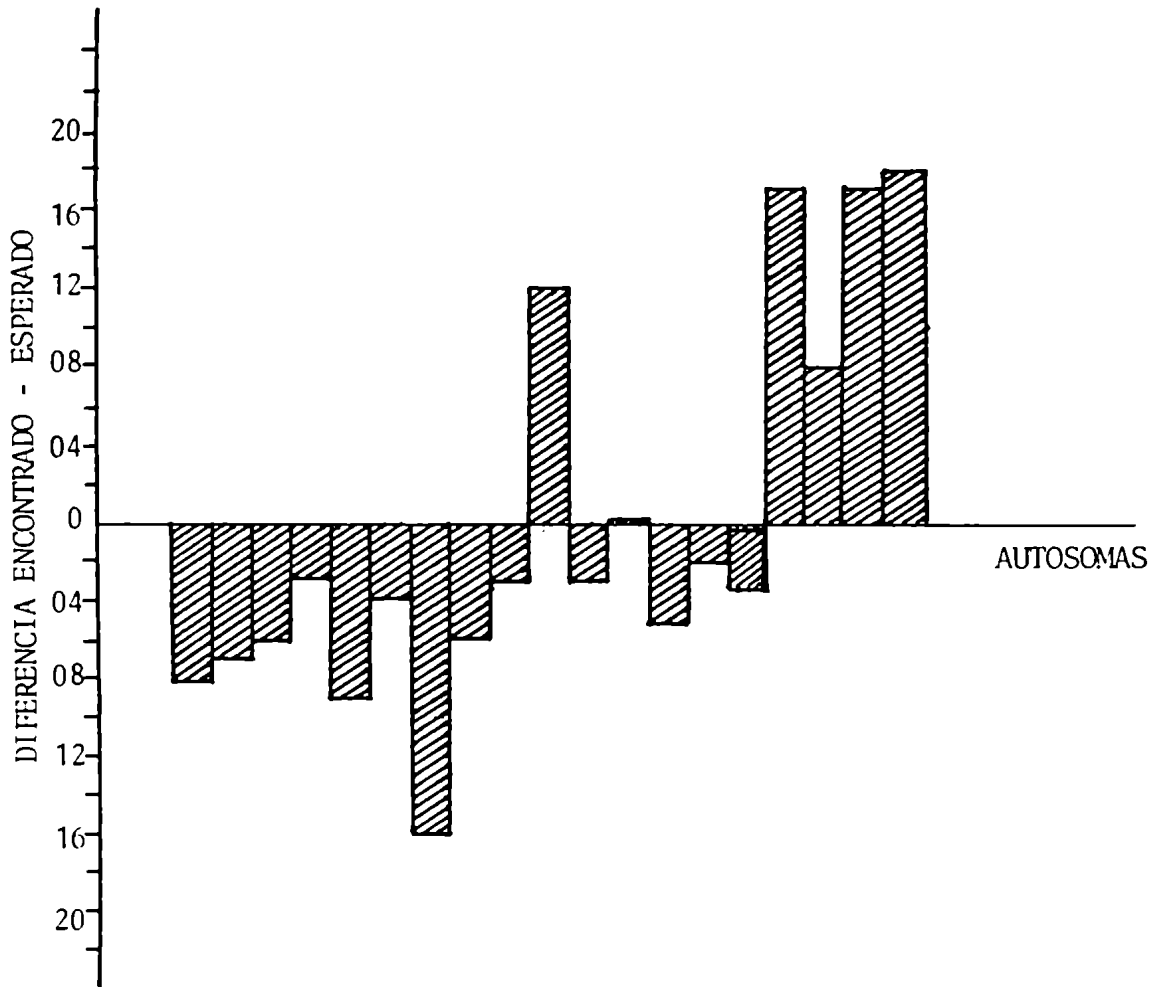
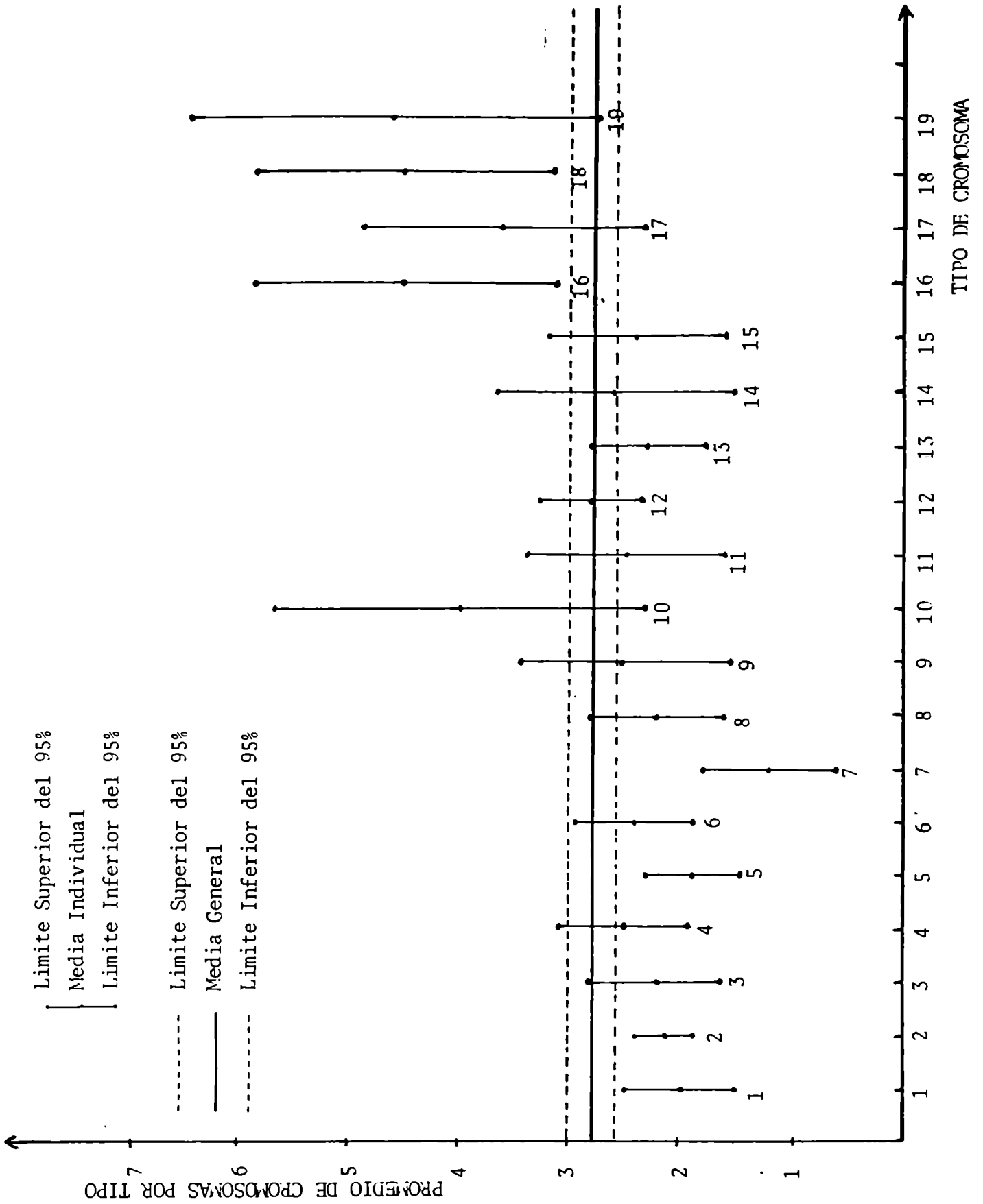
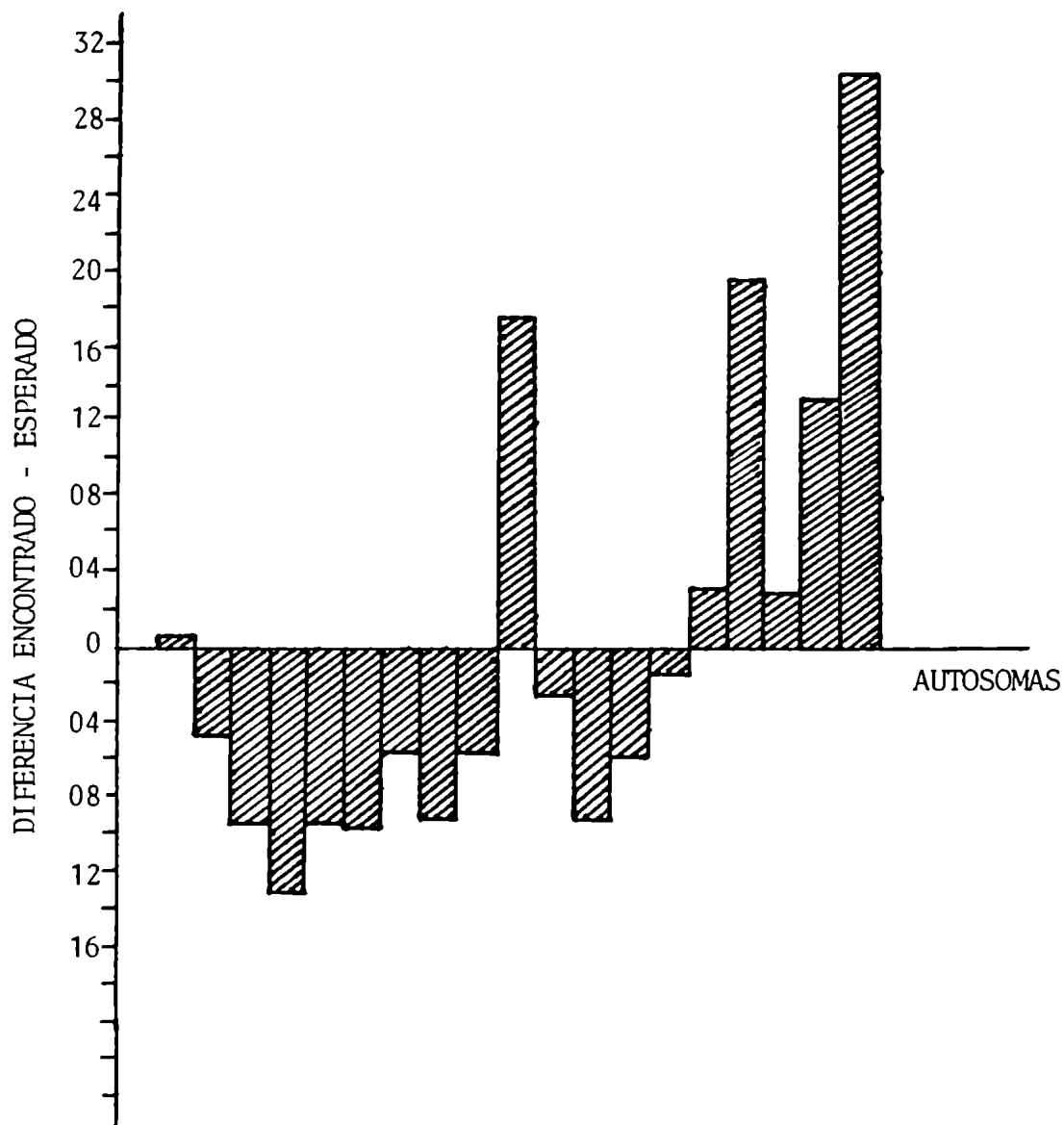


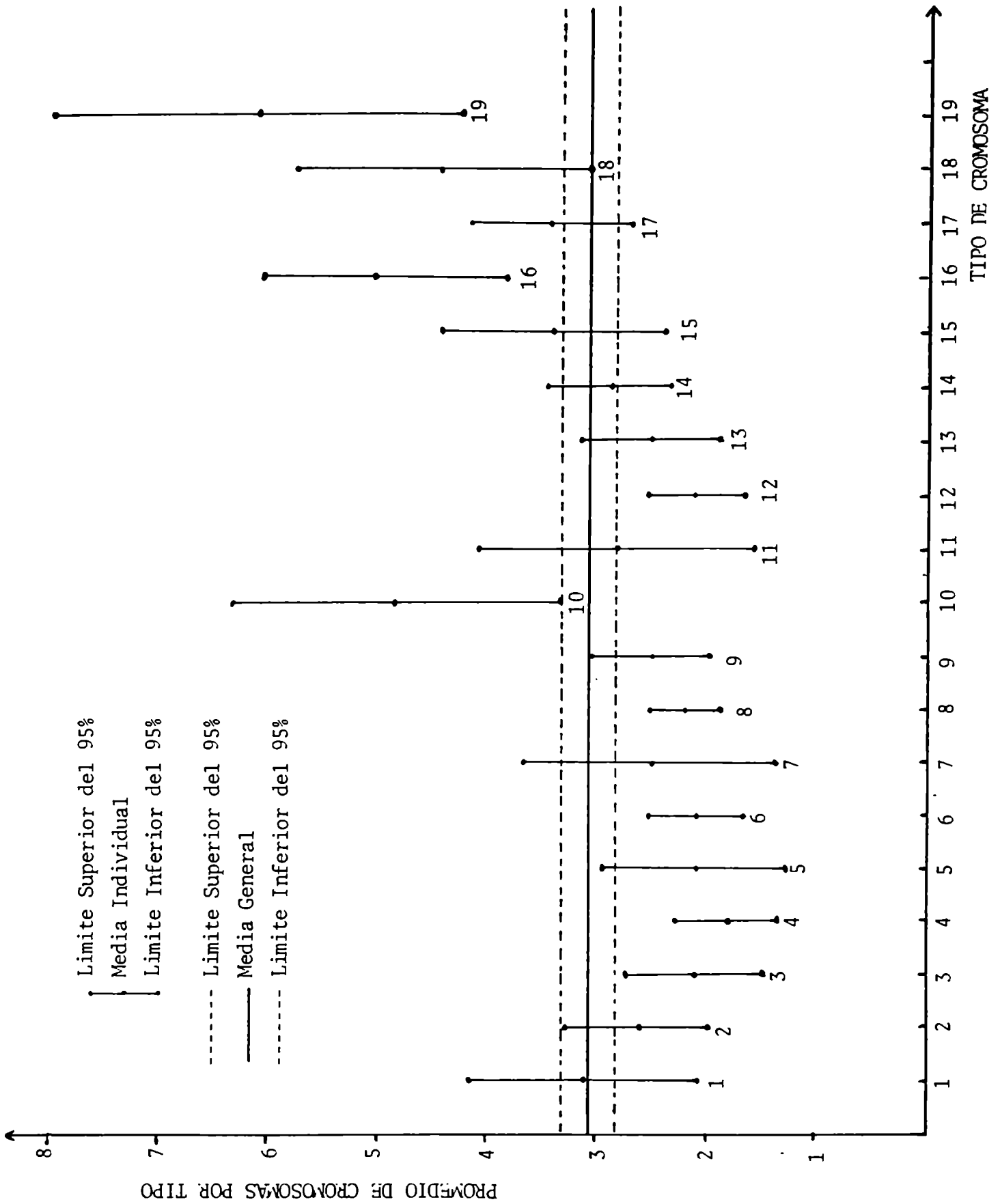
GRAFICO I : TUMOR CS1



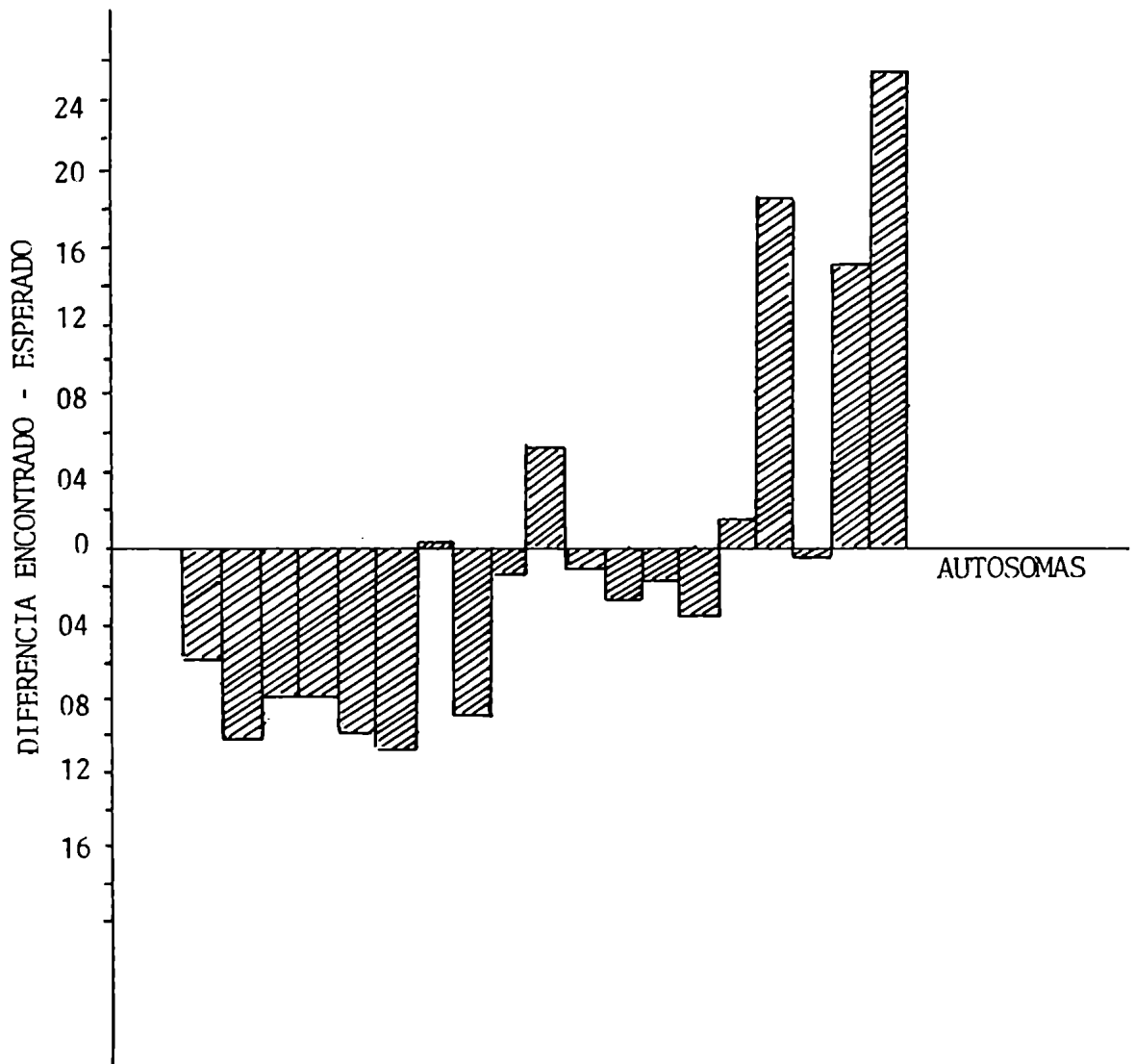
HISTOGRAMA N°II: Distribución de la diferencia encontrado esperado para cada par autosómico en el tumor CS2.

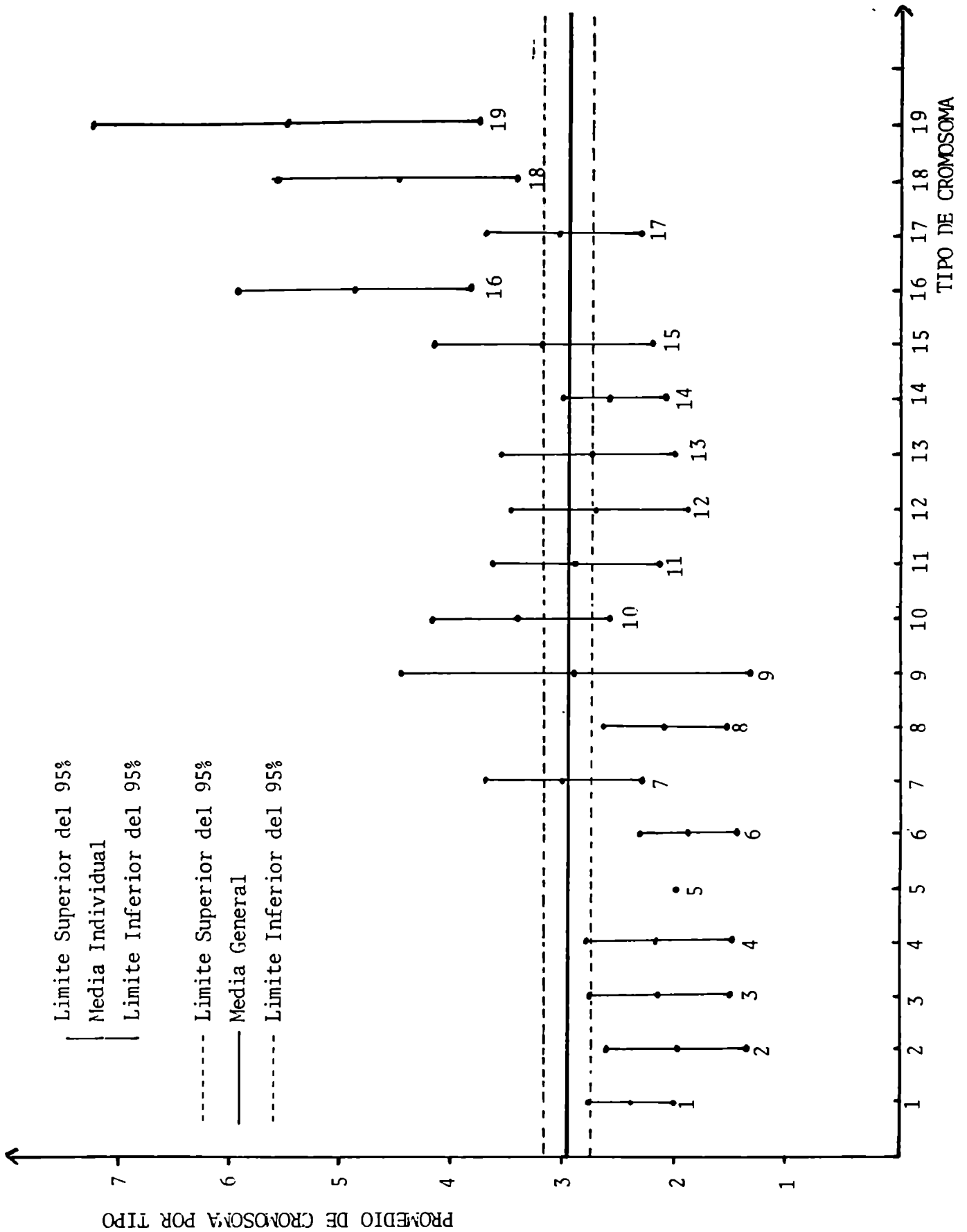






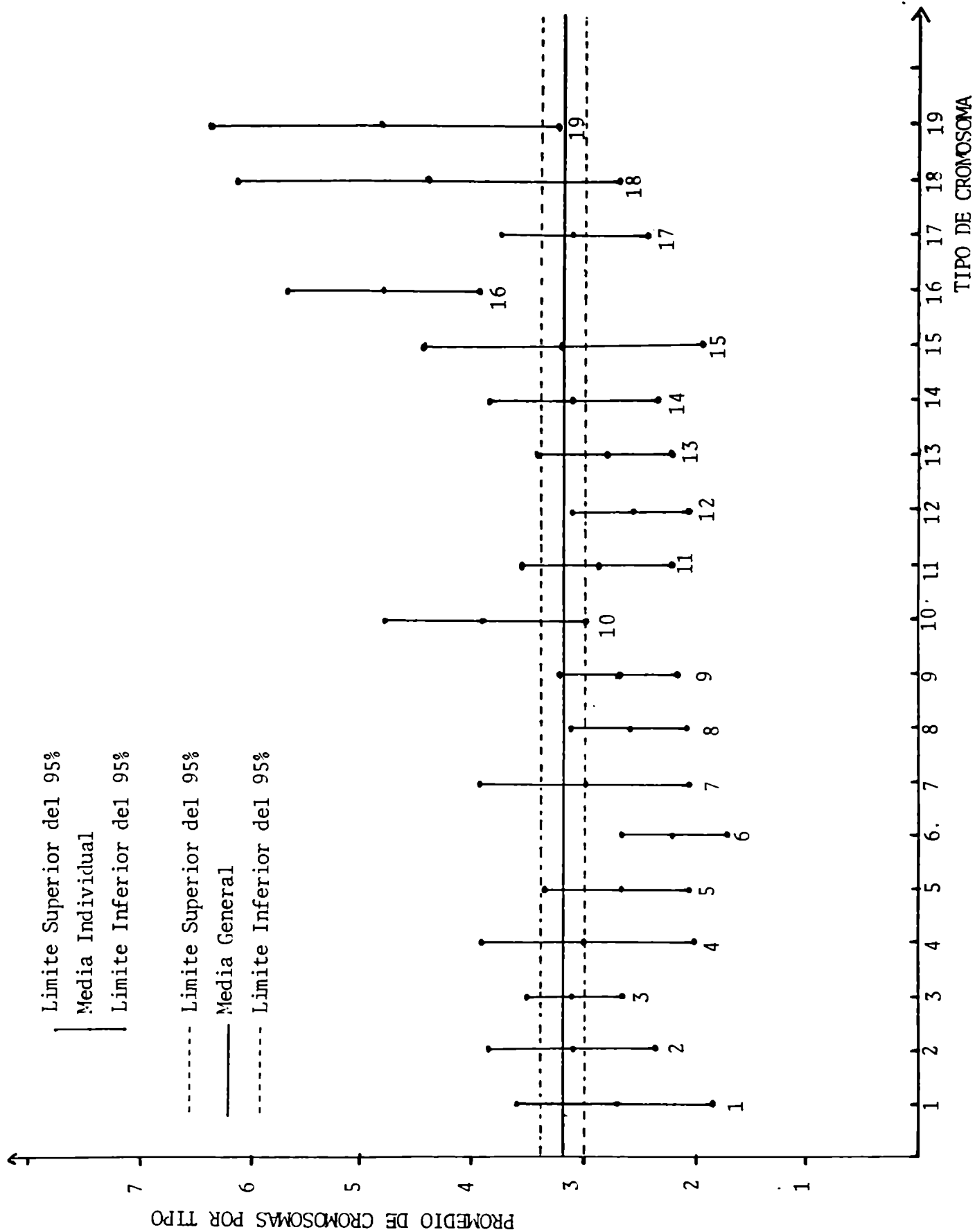
HISTOGRAMA N°III: Distribución de la diferencia encontrado esperado para cada par autosómico en el tumor CS3





HISTOGRAMA N°IV: Distribución de la diferencia encontrado esperado para cada par autosómico en el tumor P193.





### 3.3. Datos obtenidos en los trasplantes.

Se realizó el estudio citogenético del primer pasaje in vivo del tumor original (o sea, el trasplante dentro de la cepa singeneica).

Los tumores obtenidos por trasplante no presentan un período de larga latencia pues, en este caso, existe un proceso de colonización celular el cual no requiere un período de tiempo largo.

Para realizar el trasplante, una pequeña biopsia del tumor se coloca en un trocar el cual se inyecta subcutáneamente en ratones de la cepa singeneica. Al cabo de 7-10 días, ya comienza a insinuarse la aparición del tumor que continúa desarrollándose matando al ratón en aproximadamente 30-35 días.

El estudio histológico demuestra que se trata de sarcomas anaplásicos idénticos a los tumores originales que le dieron origen.

El estudio citogenético se realizó a partir de una pequeña biopsia del tumor. Esta es procesada con los mismos métodos utilizados en la obtención de metafases de los tumores murinos primarios.

En todos los casos en que se estudió el tumor original y su trasplante, se pudo demostrar que éstos presentaban las mismas características citogenéticas con igual o cercano número de cromosomas y coincidencia de marcadores lo cual indica que la línea germinal del tumor original se mantiene a través del trasplante.

La Tabla IX resume los datos obtenidos en los tumores primarios y sus trasplantes.

TABLA IX: DATOS OBTENIDOS EN LOS TUMORES PRIMARIOS Y SUS RESPECTIVOS  
TRANSPLANTES EN LA CEPA SINGENEICA.

		HETEROPL.	N° MODAL	MARC.	MARC./ CEL.	OTROS MARC.	PULVERÍZ.	ROTURAS
	#	60-76	66	dm*	1-50	MLA	Sí	No
	P193 ##	53-76	71	dm*	1-50	MM SM MLA MM	No	No
	#	52-87	74	40%m	1 ó +	-	No	No
	P119 ##	48-84	81	10%m	1 ó +	-	No	Sí
	#	53-96	86	25%m	1 ó 2	SM	No	No
	P320 ##	42-90	83	30%m	1 ó +	SM	No	No
	#	69-99	83	40%m	1 ó 2	MM	No	No
	P323 ##	42-84	43 82	20%m	1 ó +	-	No	No
	#	39-75	42	80%MLA	1 ó 2	m	No	Sí
	P198 ##	41-45	44	40%MLA	1	-	No	No
	#	58-92	72	-	-	-	No	No
	P365 ##	43-88	80	-	-	-	No	No
	#	60-92	76	50%MM	1 ó +	SM	No	Sí
	P346 ##	54-87	79	50%MM	1 ó +	SM m	No	No
	#	39-86	42 82	31%SM	1	m	No	No
	P249 ##	42-82	82	-	-	m	No	No
	#	41-85	43 84	-	-	-	No	No
	P356 ##	42-84	44 80	-	-	-	No	No

# : Tumor Primario    ##: Primer pasaje in vivo

\* : Observado en la mayoría de las células estudiadas

### 3.4. Sobrevida de las células neoplásicas humanas inoculadas dentro del cilindro.

Las células neoplásicas humanas inoculadas dentro del C.P. aumentan significativamente la incidencia del tumor (Ver el punto 1.4 de la Introducción).

Dado que se trata de un tumor de novo de larga latencia, es importante saber cuánto tiempo perduran las células neoplásicas humanas dentro del C.P. sabiendo que se trata de un material xenogéneo. Para ello, se ideó el siguiente ensayo:

1. Se implantó subcutáneamente el C.P. en una serie de 12 ratones de la cepa BALB, los cuales fueron dejados durante 7 días para dar tiempo a que se forme el tapón celular en ambos extremos del C.P.
2. Transcurridos los 7 días, se inyecta dentro de los C.P. 0.2 ml de una suspensión de células neoplásicas humanas marcadas con  $TdH^3$  a una concentración de  $5 \times 10^6$  cél/ml (en este caso se utilizó la línea celular GH7 proveniente de un linfosarcoma humano).

Para realizar la marcación se hacen crecer las células en un medio de cultivo que contiene  $TdH^3$  en una concentración de  $1 \mu\text{C}/\text{ml}$  durante 72hs. Se realizó marcación continua para asegurarse que todas las células del cultivo incorporaran el isótopo radioactivo.

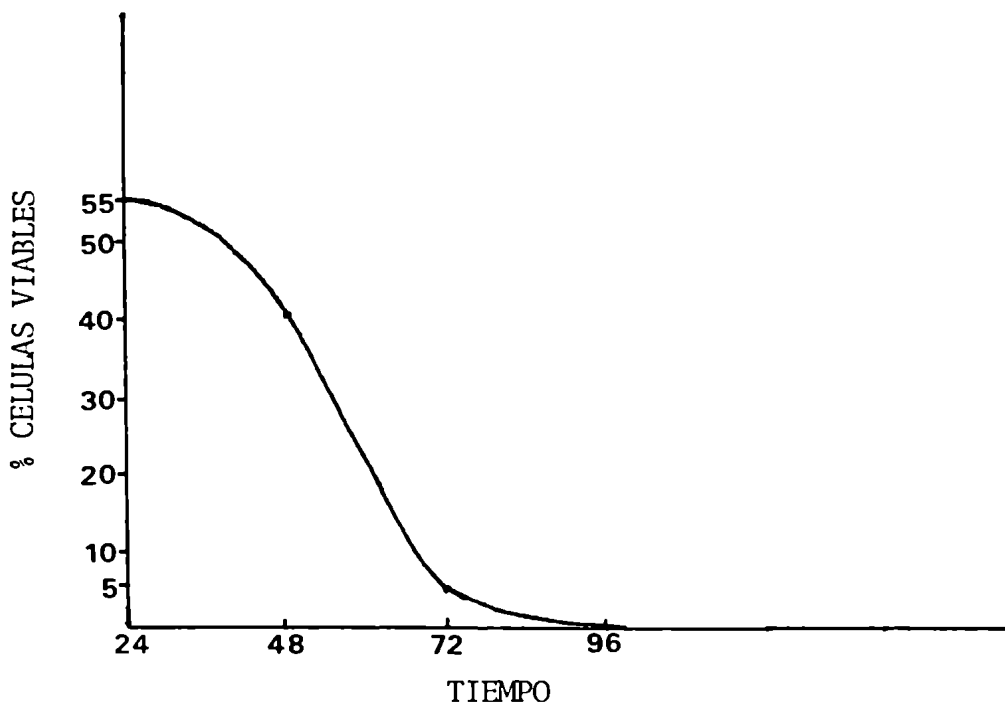
3. A partir de ese momento, los ratones fueron procesados diariamente extrayéndoseles el suero que se acumula dentro de los C.P. y trabajándolo con los métodos habituales de citogenética hasta obtener los extendidos los cuales, son procesados por el método autorradiográfico



lo que permite visualizar con toda claridad hasta que día sobreviven las células neoplásicas humanas dentro del C.P.

La TdrH<sup>3</sup> incorporada al DNA neoforado durante el cultivo in vitro es la que se revela luego mediante la autorradiografía (método que aprovecha las partículas emitidas por el tritio que impresionan la emulsión nuclear reduciendo la sal de plata que al ser revelada aparece en forma de gránulos). La presencia de estos gránulos densos permite identificar fácilmente a las células humanas de las murinas que no poseen esta característica (Fig. 39).

Los resultados de estos trabajos indican que el mayor número de células humanas inoculadas dentro del C.P. sobreviven hasta 48 hs. y un pequeño porcentaje logra llegar hasta las 72 hs. (ver gráfico).



Los datos indican que el porcentaje de células marcadas dentro del cilindro es máximo entre las 24 y 48 hs. A las 72 hs., la sobrevivencia de las células humanas es mínima (5%) y finalmente, a las 92 hs., no se observan células humanas en los preparados.

Por lo tanto, esto indicaría que el material humano es capaz de potenciar la incidencia de tumor en ratones portadores de C.P., permaneciendo activo durante las primeras 48 hs., y luego, la sobrevivencia va decayendo.

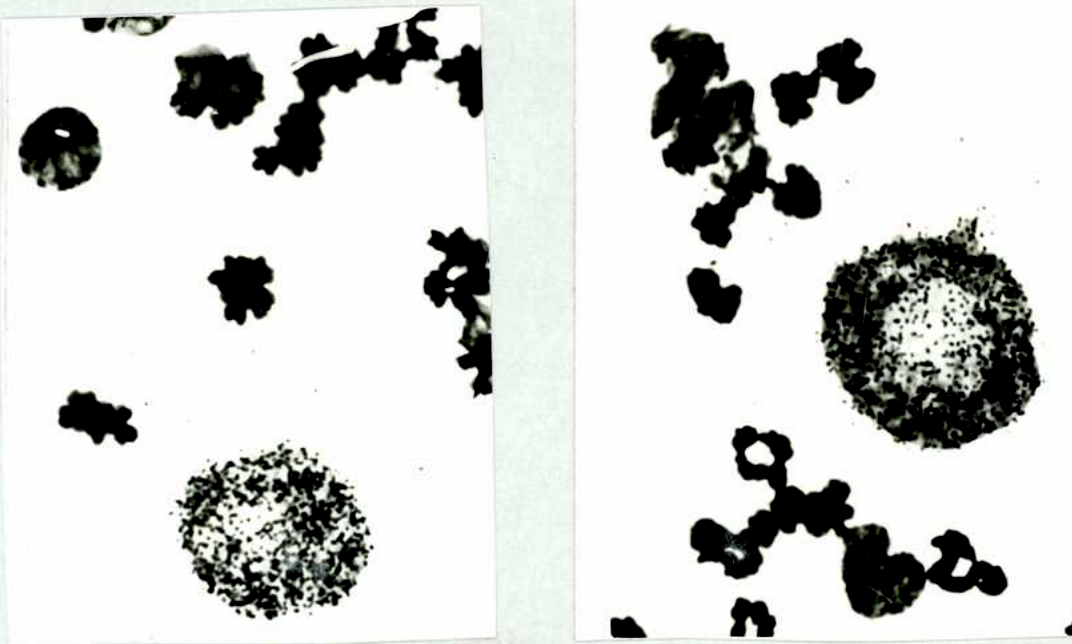


Fig. 39: Células marcadas con timidina tritiada ( $\text{tdrH}^3$ ) provenientes de la línea GH7.

#### 4. D I S C U S I O N

#### 4.1. Estudio citogenético de los tumores murinos primarios.

Actualmente, se sabe que la implantación de material plástico inerte en ratones y otros animales de laboratorio, lleva frecuentemente a la formación de tumores sarcomatosos fácilmente transplantables en la cepa de origen.

En este trabajo de tesis, se utilizaron ejemplares de la cepa BALB a los cuales se les implantó subcutáneamente un C.P., con o sin inoculación de material neoplásico. El inóculo provino de biopsias de linfomas humanos (injerto xenogéneo) o del linfoma S19 de la cepa AKR (injerto alogéneo).

Los tumores murinos primarios inducidos por reacción a cuerpo extraño (C.P.) son tumores de novo de larga latencia (7-16 meses). En todos los casos, se descartó la colonización celular dado que los trasplantes celulares solo fueron posibles en la cepa BALB (Pasqualini, 1973), y en el caso de los tumores inducidos por el C.P. más el agregado de células neoplásicas humanas, los cariotipos siempre fueron murinos (Larripa y col., 1976).

En base a su morfología, estos tumores fueron clasificados como sarcomas anaplásicos. A pesar que todos los tumores presentaron idéntica histología, el estudio citogenético reveló la presencia de líneas germinales diferentes en muchos de ellos.

Quando al C.P. se le agrega material neoplásico<sup>humano</sup> o murino, el efecto tumorigénico del C.P. es significativamente aumentado indicando

do que el material neoplásico ejerce un efecto potenciador del desarrollo tumoral.

Los tumores estudiados constituyen masas sólidas y compactas que crecen en el tejido subcutáneo adyacente al implante. Las técnicas citogenéticas directas no dan resultados positivos dada la naturaleza del material. Es por ello que existen muy pocos trabajos donde se describen los aspectos citogenéticos de la tumorigénesis a cuerpo extraño. Los únicos trabajos publicados sobre el tema corresponden al período 1966-1970 (Banerjee y col., 1966; Brand y col., 1967a; Buoen y col., 1968; Johnson y col., 1970), momento en el cual no se aplicaban técnicas de bandeado. Por lo tanto, los marcadores fueron determinados únicamente con técnica estandar de acuerdo a la morfología (diferente a los cromosomas normales del ratón).

Dadas las dificultades técnicas que presentaba el estudio citogenético de los tumores, además de realizar el cultivo in vitro, de pequeñas biopsias tumorales, se aplicó la técnica de cultivo in vivo, técnica que consiste en cultivar las células tumorales dentro de una C. D., en la cavidad intraperitoneal del ratón.

La aplicación de ambas técnicas de cultivo, permitió realizar el estudio en todos los casos, tanto en los tumores primarios como en sus trasplantes.

En los tumores P119, P193 y P249, se aplicaron exitosamente ambas técnicas de cultivo comprobándose que con cualquiera de los métodos utilizados, los resultados eran coincidentes indicando que la metodo

logía aplicada no introduce alteraciones en la línea germinal del tumor en estudio. Esto permitió homologar los resultados obtenidos con las distintas técnicas.

Analizando las tablas .II y III, donde se resumen todos los datos citogenéticos obtenidos en los tumores estudiados, se puede concluir que en la mayoría de los casos los rangos de Heteroploidía más observados, fueron el tetraploide y el diploide. Estos datos están de acuerdo con las observaciones de otros autores (Banerjee y col., 1966: en tumores inducidos por polímeros; Mark, 1968: en tumores inducidos por virus Rous; Yosida y col., 1967: en tumores inducidos por adyuvante de Freund).

Johnson (1970), comenta en su trabajo que existiría una relación entre mayor anaplasia y tendencia hacia el estado tetraploide. Al respecto, se puede decir que los tumores estudiados, fueron clasificados todos como sarcomas anaplásicos muy indiferenciados y el rango tetraploide fue el que prevaleció.

En cuanto a los marcadores más frecuentemente observados, fueron:

- m (minute): este pequeño marcador es muy frecuente en los tumores. Se trata de un cromosoma de menor tamaño que el par N°19, del ratón normal que podría originarse por ruptura de los cromosomas normales. Este marcador fue observado más frecuentemente en los tumores inducidos por el C.P. más el agregado de material neoplásico humano, aunque no se pue

de decir que sea exclusivo de estos tumores dado que también se lo observó en otros tumores pero en forma más esporádica (TABLAS II y III).

- dm (double minute): marcador cromosómico muy peculiar. Consiste en unos pequeños cuerpos cromatínicos que se presentan de a pares. Esta aberración cromosómica se observa en número y tamaño variables. Los dm fueron observados solamente en cuatro tumores; uno de ellos provino de la inoculación de un C.P. más material neoplásico humano y, en los tres restantes, surgieron a partir de la inoculación de un C.P. vacío.

Los dm de mayor tamaño pueden, algunas veces, ser confundidos con los m, pero realizando técnicas de bandeo y observándolos minuciosamente, se comprueba que existen grandes diferencias entre ellos que hacen imposible confundirlos.

Diferencias entre los marcadores m y dm: En general, los m son de mayor tamaño que los dm. Los m son céntricos; las cromátides hermanas migran correctamente durante la división celular; con técnica de bandeo C dan resultados positivos (Het.C+). En cambio, los dm no presentan función centromérica y con técnica de bandeo C son heterocromatina negativa (Het.C-). Los m se observan tanto en células malignas como en no malignas. Los dm, hasta el momento actual, se han descrito únicamente en procesos netamente malignos. Los m se mantienen durante largos períodos en los cultivos in vitro, no ocurriendo lo mismo con los dm (Levan y col., 1977).

- MLA (marcador largo acrocéntrico): Como su nombre lo indica, es más largo que el par N°1 del ratón normal. Este marcador puede ser el producto de la translocación o de una duplicación. La técnica de bandeo G, determinó que se trataba de una translocación en tandem del cromosoma N°1 y del cromosoma N°16  $t(1q;16q)$ . El cuerpo principal de ambos cromosomas se mantuvo en la translocación. El cromosoma N°16 forma la parte proximal del marcador el cual lleva la función centromérica; el cromosoma N°1, pierde su zona centromérica. Dado que el centrómero funcional es el del cromosoma N°16, la forma de describir al marcador, es la siguiente: der 16  $t(1q;16q)$ . Este marcador fue observado en varios tumores pero, en cuatro de ellos, se pudo determinar que se trataba de la misma translocación, encontrándose en los mismos tumores que presentaron dm.
- MM (marcador metacéntrico): Este marcador es producto de la translocación Robertsoniana entre dos cromosomas de igual tamaño. Cuando se aplicó la técnica de bandeo G, se determinó que se trataba de una fusión céntrica entre dos cromosomas del par 10. No se descarta la posibilidad de un isocromosoma, ya que en los tumores estudiados el par 10 está aumentado, el hecho de producirse la translocación entre dos homólogos, no determinaría nulisomía para dicho par. Por lo tanto, se proponen los dos mecanismos como posibles formadores del



marcador (Rb(10.10) o I(10q), respectivamente).

Marcadores metacéntricos fueron observados en muchos tumores pero, en cuatro de ellos, se determinó que se trataba del mismo rearrreglo Rb(10.10). Este marcador fue observado en los tumores que presentaron dm y MLA.

Cuatro tumores de novo (P193, CS1, CS2 y CS3) presentaron alteraciones cromosómicas coincidentes.

Mc (marcador detectado con bandeo C): Se trata de un cromosoma de mayor tamaño que el par N°1 del ratón y de menor tamaño que el marcador MLA, que presentó una banda extra por debajo del centrómero. La banda extra del marcador Mc podría representar un incremento del contenido génico por un proceso de heterocromatinización.

La técnica de bandeo C localiza la heterocromatina constitutiva que, en el ratón, es de ubicación centromérica. Todos los tumores estudiados presentaron, en todos los cromosomas, la clásica banda de heterocromatina sin alteraciones en su distribución. El marcador Mc apareció esporádicamente en el tumor P193 siendo ésta la única diferencia observada con bandeo C.

El hallazgo de las mismas aberraciones cromosómicas asociadas, (dm, MLA y MM), indicaría que está en juego un mecanismo no al azar señalando que las alteraciones cariotípicas están en íntima relación con el desarrollo tumoral.

Brand y col. (1967) trabajando con tumores inducidos por

polímeros, observó la presencia de marcadores excesivamente largos, otros muy cortos y metacéntricos, posiblemente se trate de los marcadores MLA, m y MM, descritos en este trabajo.

Buhen y col. (1968) describieron la presencia de dm en cinco de setenta tumores inducidos por film de plástico. Este autor consideró a los dm como aberraciones cromosómicas espontáneas.

La consistencia de los marcadores encontrados (dm, MLA,MM) en los tumores estudiados indicaría que estas no son alteraciones espontáneas sino que serían aberraciones cromosómicas vinculadas con el desarrollo de la línea germinal maligna, las cuales estarían inducidas por el agente inductor desencadenante del desarrollo tumoral.

Un rasgo característico en estos tumores es que todas las alteraciones estructurales encontradas son producto de translocaciones, donde la integridad intracromosómica se conserva, aún en los cromosomas implicados en la formación de los marcadores. Nunca se observaron inversiones, deleciones o duplicaciones que determinaran cambios dentro del cromosoma. Rara vez se observaron roturas de cromátidas y figuras de pulverización. El tumor P193 presentó pulverización celular en escasa proporción.

La pulverización consiste en la fragmentación cromosómica de uno o todos los cromosomas del complemento. Este fenómeno puede estar producido por distintos agentes: mutágenos, análogos deoxirribósidos y virus (Takagi y col., 1969). Poco se sabe acerca del mecanismo de este proceso.

Cuando se analizó la variación numérica de los tumores que presentaban coincidencia de marcadores, se determinó que estos tumores tenían mayor incidencia de pérdidas y ganancias cromosómicas en ciertos pares autosómicos demostrando que la variación no era al azar.

Para realizar este estudio se analizaron diez cariotipos bandeados de cada uno de los tumores y se ordenaron de acuerdo a las recomendaciones del Comité de Estandarización de la Nomenclatura Genética del ratón (1972). Teniendo en cuenta todos los cromosomas (aún los que formaban parte de los marcadores) y descartando los no identificados, se calculó un valor medio esperado de frecuencia de aparición de cada tipo cromosómico de homologos, considerando que todos los pares se comportan de la misma manera (Bianchi M. y col. 1977) (Tabla Va,b; VIa,b; VIIa,b; VIIIa,b).

Los resultados obtenidos aplicando intervalos de confianza del 95% para la media indican que los tumores inducidos por reacción a cuerpo extraño presentan un comportamiento característico en cuanto a pérdidas y ganancias cromosómicas.

El par 16 se encontró significativamente aumentado en todos los casos; los pares 18 (en CS1 y CS3) y 19 (en CS2 y CS3) se encuentran significativamente aumentado en dos de los tumores y en los dos restantes se observa una marcada tendencia al aumento que no alcanza un nivel significativo debido a las fluctuaciones muestrales.

Los datos obtenidos muestran claramente que las alteraciones numéricas encontradas en los tumores estudiados no son al azar ya

marcadores cromosómicos están íntimamente relacionados a neoplasias.

Los dm son unos pequeños cuerpos cromatínicos cuyo tamaño oscila entre  $0.1\mu$  -  $0.5\mu$ , los más pequeños son muy difíciles de visualizar pues se encuentran en el límite de resolución del microscopio óptico.

Se presentan como pequeños puntos duplicados dentro de la metafase en número variable de uno a varios cientos por célula. Como su nombre lo indica, los dm se observan de a pares y se interpreta que representan las dos cromátidas hermanas. La conclusión de que los dm contienen DNA está fundamentada por su coloración con Feulgen, su incorporación de  $\text{TrH}^3$  y su tinción diferencial después de dos ciclos de replicación en presencia de 5-bromodesoxiuridina.

La tinción de los dm es siempre más débil que la de los cromosomas normales. Esto puede ser debido a su pequeño tamaño o a un menor grado de contracción.

Ultraestructuralmente, las fibras cromatínicas de los dm se comportan como las de los cromosomas metafásicos (Barker y col., 1979a).

En cuanto a la replicación del DNA, se ha demostrado que los dm replican al mismo tiempo que la eucromatina y temprano, durante el período S (Lubs y col., 1966).

Los dm fueron observados, por primera vez, en exudado pleural con células metastásicas de un carcinoma de pulmón (Spriggs y col., 1962). En material humano ha sido observado en varias oportunidades:

neuroblastoma (Cox y col., 1965; Levan y col., 1968; Sandberg y col., 1972; Balaban-Malenbaum y col., 1977); en meduloblastoma (Cox y col., 1965; Lubs y col., 1966); rhabdomiosarcoma (Cox y col., 1965; White y col., 1967); en glioma (Hansteen, 1967; Mark, 1970a; Mark, 1971); en retinoblastoma (Mark, 1970b); en leucemia (Todd y col., 1968; Pierre y col., 1971); en carcinoma de ovario (Atkin y col., 1977); en cáncer de colon (Miles, 1967); en carcinoma de tiroides (Jones y col., 1967) y en cáncer de mama (Barker y col., 1979b).

En animales, los dm fueron observados por primera vez, por Mark (1967a), quien los individualizó en seis tumores de 91 sarcomas primarios inducidos por virus Rous.

Recopilando toda la información hasta el momento, los dm han sido encontrados en aproximadamente 40 tumores humanos y en 29 tumores animales.

En los tumores humanos, la mayoría de ellos fueron neurogénicos y, en los tumores experimentales, fueron principalmente, sarcomas. Se detalla a continuación, los hallazgos en los tumores animales:

- 10 casos inducidos por virus
- 5 casos inducidos por film de plástico
- 10 casos inducidos por metilcolantreno y benzopirene
- 4 casos inducidos por C.P. (estos últimos son los tumores presentados en este trabajo de Tesis)..

El hecho que los dm se comporten como los cromosomas y tengan la capacidad de permanecer durante largos períodos en las poblacio-

nes celulares, indicaría a priori, que ellos son céntricos; sin embargo, las observaciones directas indican que son acéntricos. Muchos autores consideran que los dm serían fragmentos cromosómicos, más probablemente céntricos, dado que entre los dos cuerpos cromatínicos existe una zona acromática, presumiblemente la región centromérica.

Si los dm representan fragmentos céntricos de los cromosomas, entonces, en las células de ratón, ellos serían heterocromáticos dado que en esta especie, las áreas paracentroméricas son ricas en heterocromatina. Sin embargo, cuando se realizó la técnica de bandeo C en los tumores estudiados, los dm resultaron ser heterocromatina constitutiva negativa (Het-C-), indicando que ellos no se originaban de esas zonas. Los dm se tiñen aún más débilmente que las zonas pálidas de los cromosomas normales. Estas observaciones, están de acuerdo con lo descrito por otros autores (Levan y col., 1976b; Barker y col., 1978).

Llamativamente, los dm tiñen pálidamente con todas las técnicas ensayadas: bandas Q,G,R y C.

El hallazgo de los dm restringidos a desarrollos tumorales y que se mantienen durante largos períodos in vivo, sugiere que juegan un rol en la evolución de la línea germinal maligna.

Los dm, en los tumores inducidos por reacción a cuerpo extraño, se observaron tanto in vivo como in vitro, indicando que ellos no pueden ser considerados artefactos causados por las condiciones de cultivo. A medida que aumenta el número de pasajes in vitro, disminuye la cantidad de dm. Este hallazgo coincide con las observaciones de otros

investigadores, donde se demuestra que los dm tienden a perderse en los cultivos in vitro prolongados. Cuando las células portadoras de dm, son implantadas nuevamente in vivo, éstas comienzan a incrementar (Donner y col., 1968; Biedler y col., 1973; Levan y col., 1977). Estas experiencias apoyan la hipótesis que los dm tienen ventajas selectivas in vivo, pero no in vitro. Posiblemente, por esta causa, tienden a eliminarse durante el desarrollo in vitro.

Se sospecha que las células con dm son más eficientes en vencer las defensas del huésped. Los dm producirían un desbalance genético aumentando la capacidad del crecimiento tumoral, tal vez, por un mecanismo de amplificación de genes estimulantes de la viabilidad tumoral (Levan y col., 1977b).

Recientes trabajos (Levan y col., 1978; Barker y col., 1978) demuestran que durante metafase-anafase, los dm no presentan atracción hacia las fibras del huso mitótico y se concluye que los dm no presentan función centromérica. A pesar de ello, los dm son incluidos en los núcleos telofásicos pues son transportados hacia los polos adheridos al material nucleolar que generalmente queda unido a las terminaciones de los cromosomas metafásicos. Las dos mitades hermanas de los dm no se separan y van hacia el mismo polo. Por lo tanto, la distribución es totalmente al azar y esto explicaría la variabilidad numérica de los dm de célula a célula. A pesar de este comportamiento único de los dm, en cada ciclo celular, algunos de ellos quedan resagados formando micronúcleos, lo cual disminuiría su número. Pero, la persistencia de los dm por largos períodos, indicaría que las pérdidas serían compensadas de algún

modo. Se postula que las células con dm poseen ventajas selectivas sobre las otras. Otra posibilidad, es que bajo ciertas condiciones los dm puedan sufrir una replicación no programada.

Hasta ahora, el origen y naturaleza de los dm y su relación con cáncer, no ha sido aclarada. Existen varias hipótesis que tratan de explicar su aparición pero, ninguna es concluyente:

- Los dm serían el producto de la fragmentación cromosómica de zonas homogéneamente teñidas (Balaban - Malenbaum y col., 1977).
- Los dm serían el resultado de amplificación de regiones subcromosómicas (Levan y col., 1977).
- Los dm podrían originarse de novo durante cada ciclo celular (Levan y col., 1976b).
- Los dm serían de origen extracromosómico, análogos a los episomas de los sistemas procariotas (Barker y col., 1979).
- Los dm podrían ser de origen viral (Levan y col., 1976b).

En cuanto a los HSR (regiones cromosómicas homogéneamente teñidas) representan grandes zonas dentro del cromosoma de coloración homogénea, hasta ahora han sido descritas en células malignas, especialmente en líneas celulares derivadas de neuroblastoma humano, o en líneas celulares resistentes a metotrexate.

Recientes evidencias bioquímicas han demostrado que líneas celulares derivadas de ratón y hamster resistentes a metotrexate poseen niveles muy incrementados de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), por lo tanto existe una amplificación génica a nivel de los genes estructurales que codifican para la DHFR. Estos trabajos identifican dos tipos de repetición: a) de tipo estable la cual se mantiene a través de las suce-



sivas generaciones y b) de tipo inestable la cual se va perdiendo a través del tiempo.

Numberg y col. (1978) trabajando con una línea (derivada de ovario de hamster chino) resistente, con altos niveles de DHFR, demostraron una amplificación génica estable, donde las copias génicas extras estaban localizadas en una región cromosómica expandida, llamada HSR, esta zona nunca está presente en la línea CHO sensible.

Aplicando la técnica de hibridización in situ se demuestra que los genes extras están específicamente localizados en la región correspondiente al HSR.

Kaufman y col. (1979) trabajando con líneas celulares derivadas de ratón resistentes a metotrexate demostraron una amplificación inestable asociada a pequeños elementos cromosómicos denominados dm, dado que los dm son acéntricos y segregan al azar durante la mitosis, este tipo de amplificación tiende a perderse en las sucesivas generaciones.

Células tumorales que presentan dm. & HSR que no hayan sido seleccionadas con metotrexate tendrían genes repetidos que representarían diferentes secuencias necesarias para la supervivencia celular.

Los dm y HSR de diferentes tumores pueden representar secuencias genéticamente heterogéneas a pesar de sus características morfológicas y citológicas semejantes (Barker y col. 1979b).

Existen grandes similitudes entre las HSR y los dm:

- Los dm y las HSR tiñen homogéneamente con bandeado G
- Los dm y las HSR son heterocromatina constitutiva negativa
- Los dm y los HSR son de replicación temprana dentro del período S

Las similitudes en estructura y comportamiento hace pensar

en ambos como mecanismos de amplificación génica cambiando el balance genotípico en favor de una mayor oncogenicidad.

#### 4.2. Estudio citogenético de los trasplantes.

La inoculación de C.P. en ratones de la cepa BALB, lleva a la formación de tumores primarios, fácilmente transplantables en la cepa de origen.

Se denomina trasplante al primer pasaje in vivo del tumor original en la cepa singeneica.

Los tumores primarios son tumores de novo de larga latencia (7-16 meses), mientras que los trasplantes son colonizaciones celulares en la cepa singeneica, que sólo requieren un período muy corto para producir el desarrollo tumoral (7-10 días).

Cuando se realiza el estudio histológico se demuestra que se trata de sarcomas anaplásicos idénticos a los tumores originales que le dieron origen.

El estudio citogenético reveló, en todos los casos estudiados, que el trasplante presentaba las mismas características citogenéticas con igual o cercano número de cromosomas y coincidencia de marcadores, indicando que la línea germinal del tumor primario se mantiene a través del trasplante. Estos datos están de acuerdo con las observaciones de otros autores (Mitelman, 1972b; Russell y col., 1974).

La línea germinal que caracteriza al tumor primario posee ventajas adaptativas y proliferativas, probablemente, debido a los cam-

bios cromosómicos sufridos. Por lo tanto, estas células tienen mayor probabilidad de colonizar al nuevo huésped originando un sarcoma con las mismas características del tumor primario. Esto fue corroborado en todos los casos estudiados (TABLA IX), dado que siempre se observó persistencia de la constitución citogenética del tumor original a través del trasplante.

#### 4.3. Comentarios finales.

Se ha cumplido con el objetivo de este trabajo de Tesis, cuya finalidad consistió en realizar el estudio citogenético de los sarcomas anaplásicos murinos primarios inducidos por la implantación subcutánea de un C.P. a fin de determinar que alteraciones cromosómicas presentaban estos tumores.

Dado que la tumorigénesis a cuerpo extraño esta significativamente aumentada cuando se inoculan células neoplásicas humanas ó murinas dentro del C.P. se compararon ambos procesos tumorigénicos con el objeto de poder determinar si existían cambios cromosómicos específicos en cada caso.

El estudio citogenético reveló que tanto los tumores inducidos por un C.P. vacío, como los que llevan material neoplásico presentaron el mismo tipo de alteraciones cromosómicas y los mismos rangos de heteroploidía, prevaleciendo en todos los casos el rango tetraploide.

El marcador m se presentó en mayor proporción en los tumores inducidos por el C.P. conteniendo material neoplásico humano, aunque no

fue exclusivo de estos tumores, dado que también se lo observó en la mayoría de los sarcomas pero en forma más esporádica.

En cuatro sarcomas primarios (tres inducidos por un C.P. solo: CS1, CS2, CS3 y uno inducido por un C.P. más el agregado de material neoplásico humano: P193) las alteraciones cualitativas y cuantitativas fueron coincidentes dado que se observaron las mismas aberraciones cromosómicas: dm, MLA y MM y las mismas alteraciones numéricas con un aumento preferencial de los pares 16, 18 y 19 y una disminución en el par 6.

Esto demuestra que cuatro tumores primarios distintos presentaron las mismas alteraciones cromosómicas relacionadas al desarrollo tumoral y probablemente desencadenadas por el agente inductor.

El hecho que el tumor P193 presente las mismas alteraciones que los tumores CS1, CS2 y CS3 demuestra que el material neoplásico capaz de aumentar la incidencia tumoral no introduce variaciones en el cuadro citogenético; por lo tanto, el material neoplásico sólo produciría un efecto potenciador del desarrollo tumoral sin producir diferencias histológicas ni citogenéticas.

Cuando se realizó el estudio de la sobrevivencia del material neoplásico humano dentro del C.P., se pudo determinar que las células malignas sobreviven hasta 72 horas; esto indicaría que el material humano capaz de potenciar la incidencia tumoral sólo permanece activo durante 2 ó 3 días, período muy corto en relación con la larga latencia del tumor. El mecanismo responsable del desarrollo tumoral no se lo conoce pero, se sospecha el efecto tumorigénico del C.P.

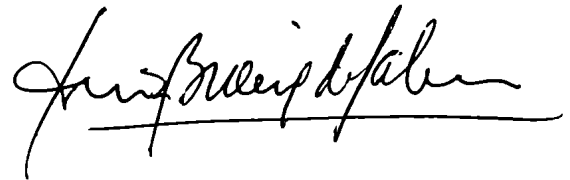
Actualmente, existen claras evidencias de cambios cromosómicos no al azar tanto en neoplasias humanas como experimentales indicando que el material hereditario del huésped está íntimamente involucrado en el desarrollo tumoral. Las aberraciones cromosómicas consistentes en cáncer reflejan un desarrollo en multi-etapas de la malignidad.

La transformación original puede involucrar cambios submicroscópicos que llevaría a una condición premaligna y los cambios posteriores determinarían la progresión hacia estados de incrementada malignidad.

## 5. C O N C L U S I O N E S

## CONCLUSIONES

- La tumorigénesis a cuerpo extraño presenta alteraciones cromosómicas que no son al azar.
- Existe una asociación específica entre los marcadores dm, MLA y MM.
- Los tumores estudiados presentan dm, anomalía cromosómica descripta únicamente en procesos malignos.
- Las pérdidas y ganancias cromosómicas afectan determinados pares autosómicos, lo cual demuestra un balance intercromosómico específico.
- Los trasplantes celulares en la cepa singeneica mantienen la línea germinal del tumor original.
- No existen diferencias citogenéticas entre la tumorigénesis provocada por un C.P. vacío y la potenciada por material neoplásico.
- En los tumores estudiados se ha podido comprobar la presencia de alteraciones cromosómicas (tanto numéricas como estructurales) coincidentes, probablemente determinadas por el agente inductor.



## 6. RESUMEN



## RESUMEN

La implantación subcutánea de un C.P. en ratones de la cepa BALB produce la formación de tumores sarcomatosos fácilmente transplantables en la cepa singeneica. Estos sarcomas son tumores primarios de novo de larga latencia (7 - 16 meses), en los cuales se descarta la colonización celular dado que los trasplantes celulares solo son posibles en la cepa de origen. Este tipo de tumor se lo incluye dentro de la clasificación de tumorigénesis a cuerpo extraño.

Cuando se inoculara material neoplásico humano o murino dentro del C.P., la incidencia de tumor aumenta significativamente. Las células neoplásicas sobreviven hasta 72 hrs. dentro del C.P. indicando que el material capaz de potenciar el desarrollo tumoral solo permanece activo durante 2 ó 3 días.

Histológicamente, todos los tumores fueron clasificados como sarcomas anaplásicos.

El estudio citogenético se realizó en 15 tumores determinándose en todos ellos la línea germinal teniendo en cuenta el rango de heteroploidía, número modal y presencia de marcadores. Cuatro tumores presentaron líneas germinales coincidentes pues, poseían idénticos marcadores cromosómicos (dm, MLA,MM); e igual distribución en cuanto a las pérdidas y ganancias cromosómicas con un aumento preferencial en los pares 16, 18 y 19 y una disminución en el par 6.

El hecho de haber determinado los mismos hallazgos citogenéticos en cuatro tumores primarios distintos (3 inducidos por un C.P. vacío y el restante inducido por un C.P. inoculado con material neoplásico humano) indica que no existen diferencias entre la tumorigénesis provocada por

el cuerpo extraño sólo y la potenciada por material neoplásico.

En cuanto a los trasplantes celulares en la cepa singeneica, se concluye que se produce una colonización celular donde las células con ventajas selectivas (línea germinal) son las que van a colonizar al nuevo huésped desencadenando un tumor con las mismas características citogenéticas del tumor primario del cual deriva.

Los sarcomas estudiados son un tipo de tumor experimental donde también se ha podido comprobar la existencia de cambios cromosómicos no al azar, durante el desarrollo tumoral. Probablemente influenciados por el agente inductor.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AHLSTROM, U. (1974). Chromosome of primary carcinomes induced by 7, 12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene in the rat. Hereditas, 78: 235-244.
- ANDRES, A.H. (1932). Zellestudien an Menschenkrebs. Der chromosomale Bestand im Primär-tumor und in der metastase. Z. Zellforsch mikrosk And, 16: 88-122.
- ARNOLD, J. (1879). Uber feinere struktur der Zellen unter normalen und pathologischen Bedingungen. Virchows Arch. Pathol. Anat. 77: 181-206.
- ARRIGHI, F., HSU, T. C (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics, 10: 81-86.
- ATKIN, N.B., PICKTHOLL, V.J. (1977). Chromosomes 1 and 14 in ovarian cancers. Heterochromatin variants and structural changes. Hum. Genet. 38: 25-28.
- BALABAN-MALENBAUM, G., GILBERT, F. (1977). Double minute chromosome and homogeneously staining regions in chromosomes of human neuroblastoma cell lines. Science, 198: 739-742.
- BALTIMORE CONFERENCE (1975). Third International Workshop on human gene mapping. Birth defects: original article series XII, 7, 1976, The National Foundation, New York.
- BANERJEE, M.R., BATES, R.B (1966). Prevalence of Heterploidy in plastic film-induced primary sarcomas. Brit. J. Cancer 20: 555-563.
- BARKER, P.E., HSU, T.C. (1978a) Are double minute chromosome?. Exp. Cell Res. 113: 457-458.
- BARKER, P.E., STUBBLEFIELD, E (1979a). Ultrastructure of double minutes from a human tumor cell line. J. Cell, Biology 83: 663-666.
- BARKER, P.E., HSU, T.C. (1979b). Double minutes in human carcinoma cell lines with special reference to breast tumors. J. Natl. Cancer Inst. 62: 257-262.
- BAYREUTHER, K. (1952). Der chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. Z. Naturforsch 7b: 554-557.
- BIANCHI, M., LARRAMENDY, M., MERANI, S., BIANCHI, N., ZABALA, J. (1979). Cambios cromosómicos específicos del sarcoma 180 ascítico murino (S 180 A) Mendeliana 2 (1): 25-37.
- BISCHOFF, F., BRYSON, C. (1964). Carcinogenesis through solid state surfaces. Prog. Exp. Tumor Res. 5: 85.
- BISCHOFF, F. (1972). Organic polymer biocompatibility and toxicology. Clin. Chem. 18: 869.
- BOVERI, T. (1914). Zur Frage der Entstehung malignen Tumoren. S. 1-64, Jena: Gustav Fischer.

- BRAND, K.G., BUOEN, L.C., BRAND, I. (1967a). Premalignant cells in tumorigenesis induced by plastic film. Nature (Lond.) 213: 810.
- BRAND, K.G., BUOEN, L.C., BRAND, I. (1967b). Carcinogenesis from polymer implants: New aspects from chromosomal and transplantation studies during premalignancy. J.Natl. Cancer Inst. 39: 663-679.
- BRAND, K.G., BUOEN, L.C., BRAND, I. (1972). Antigen-deficient cell variants in preneoplastic foreign-body reaction of mice. J.Natl. Cancer Inst. 49: 459-465.
- BRITTEN, P.J., KOHNE, P.E. (1968). Repeated sequences in DNA. Science 161: 529-540.
- BRYSON, C., BISCHOFF, F. (1969). The limitations of safety testing. Prog. Exp. Tumor Res. 11: 100.
- BUCKLAND, R.A., EVANS, H.I., SUMNER, A.T. (1971). Identifying mouse chromosomes with the ASG technique. Exp. Cell. Res. 69: 231-236.
- BUOEN, L.C., BRAND, K.G. (1968). Double minute chromosomes in plastic film induced sarcomas in mice. Naturwissenschaften 3: 135-136.
- BURNS, W.A., KANHOUWA, S., TILLMAN, L., SAINI, N., HERRMAN, J.B. (1972). Fibrosarcoma occurring at the site of a plastic vascular graft. Cancer 29: 66-72.
- BIEDLER, J.L., HELSON, L., SPENGLER, B.A. (1973). Morphology and growth tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res. 33: 2643-2652.
- CAPALBO, E.E., ALBRIGHT, J.F., BENNETT, W.Z. (1964). Evaluation of the diffusion chamber culture technique for the study of the morphological and functional characteristics of lymphoid cells during antibody production. J. Immunol. 92: 243.
- CASPERSSON, T., GAHRTON, G., LINDSTEN, J., ZECH, L. (1970a). Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. Exp. Cell. Res. 63: 238-240.
- CASPERSSON, T., ZECH, L., JOHNSON, C. (1970b). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp. Cell. Res. 60: 315-319.
- CASPERSSON, T., ZECH, L., JOHNSON, C., MODEST, E.J. (1970c). Identification of human chromosomes by DNA binding fluorescent agents. Chromosoma 30: 215-227.
- CHICAGO CONFERENCE (1966). Standardization in human cytogenetics. Birth

defects: original article series. II: N°2. New York. The National Foundation.

- COMMITTEE ON STANDARDIZED GENETIC NOMENCLATURE FOR MICE (1972). Standard karyotype of the mouse Mus musculus. The Journal of Heredity 63: 69-72.
- COX, D., YUNCKEN, C., SPRIGGS, A.I. (1965). Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood. Lancet 1: 55-58.
- CRUCIGER, Q.V., PATHAK, S., CAILLEAU, R. (1976). Human breast carcinomas: Marker chromosomes involving 1q in seven cases. Cytogenetic and Cell Genet. 17: 231-235.
- DE CHOLNOKY, T. (1970). Argumentation mammoplasty : survey of complications in 10,941 patients by 265 surgeons. Plast. Reconstruct. Surg. 45: 573.
- DENVER REPORT (1960). A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. Lancet i, 1063-1065.
- DEV, V.G., GEWAL, M.S., MILLER, D.A., KOURI, R.E., HUTTON, J.J., MILLER, O.J. (1971). The Quinacrine fluorescence karyotype of Mus musculus and demonstration of strain differences in secondary constrictions. Cytogenetics 10: 436-451.
- DOFUKU, R., BIEDLER, J.L., SPENGLER, B.A., OLD, L.J. (1975). Trisomy of chromosome 15 in spontaneous leukemia of AKR mice. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 1515-1517.
- DONNER, L., BUDENIK, J. (1968). Minute chromatin bodies in two mouse tumours induced in vivo by Rous sarcoma virus. Folia Biol. 14:86-88.
- DUKES, C.E., MITCHLEY, B.C. (1962). Polyvinyl sponge implants: Experimental and chemical observations. Brit.J. Plast. Surgery 15: 225.
- DUTRILLAUX, B., LEJEUNE, J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R. Acad.Sci. (Paris) Serie D272: 2638-2640.
- DUTRILLAUX, B. (1973). New system of chromosome banding. The T bands. Chromosoma 41: 395-402.
- DUTTON, J. (1959). Acrybe investment of intracranial aneurysms. Brit. Med.J. 2: 597.
- FLAMN, W.C., WALKER, M.B., Mc CALLUM, (1969). Some properties of the single strands isolated from the DNA of the nuclear satellite of the mouse (Mus musculus). J.Med.Biol. 40: 423-443.
- FRANCKE, V., NESBITT, M. (1971). Identification of the mouse chromosou

- mes by quinacrine mustard staining. *Cytogenetics* 10: 356-366.
- GIANNELLI, F., HAMERTON, J.L. (1970). Human chromosomes DNA synthesis. *Monographs in Human Genetics*. (L. Beckman, M. Houge eds.) Vol. N° 5, Karger Basel.
  - GROUCHY, J. de, VALLEÉ, G., LAMY, M. (1963). Analyse chromosomique directe de deux tumeurs malignes. *C. R. Acad. Sci.* 256: 2046-2048.
  - HAUSCHKA, T.S., LEVAN, A. (1951). Characterization of five ascites tumors with respect to chromosome ploidy. *Anat. Rec.* 111: 467.
  - HANSEMAN, D. Von (1890). Über asymmetrische Zellteileng in Epithelkrebsen und deren kologische Bedeuteeng. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 119: 299-326.
  - HANSTEEN, I.L. (1967). Chromosome studies in glial tumors. *Europ. J. Cancer*, 3: 183-191.
  - HECHT, F., KAISER-McCAW, B. (1977). Chromosome and genes in human cancer cells: multidisciplinary approaches to a unitary genodemographic hypothesis *Chromosome Today* Vol 6: 357-361. A.de la Chapelle and M. Sorsa eds.
  - HEIBERG, K.H., KEMP, T. (1929). Über die Zahl der Chromosomen in Carcinomzellen beim Menschen. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 273: 693-700.
  - ISCN (1978). An International System for human cytogenetic nomenclature: Birth Defects. Vol. XIV N°8 New York. The National Foundation.
  - ISHIHARA, T. (1959). A chromosome study in five near diploid human tumor. *Jap. Journ. Genet.* 34: 23-27.
  - ISING, V., LEVAN, A (1957). The chromosomes of two highly malignant tumors. *Acta Path. Micro. Scand.* 40: 13-24.
  - JOHNSON, K.H., BUON, L.C., BRAND, J., BRAND, K.G. (1970). Polymer tumorigenesis: Clonal determination of histopathological characteristics during early preneoplasia: relationships to karyotype, mouse strain and sex. *J. Natl. Cancer Inst.* 44: 785-793.
  - JONES, G.W., SIMKORIC, D., BIEDLER, J.L. (1967). Human anaplastic thyroid carcinoma in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 426-428.
  - KANDA, N. (1976). Banding Pattern observed in human chromosomes by the notified BSG technique. *Hum. Genet.* 31: 283-292.
  - KAUFMAN, R.J., BROWN, P.C., SCHIMKE, R.T. (1979). Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate resistant cells are associated with double minute chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76:5669-5673.
  - KIOSSOGLU, K.A., ROSENBAUM, E., MITUS, W.J., DAMESHEK, W (1963). Multiple chromosome aberrations in Down's syndrome associated with twinning in acute granulocytic leukemia. *Lancet* ii, 944-945.

- KIT, S. (1961). Equilibrium sedimentation in density gradient of DNA reparation from animal tissue. *J. Mol. Biol.* 3: 711-716.
- KURITA, Y., SUGIYAMA, T., NISHIGUKA, Y. (1968). Cytogenetic studies on rat leukemia induced by pulse doses of 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene. *Cancer Res.*, 28: 1738-1752.
- LARRIPA, I., SALUM, S.B. (1976). Coincidencia de marcadores en dos líneas tumorales de origen murino. VII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Ushuaia. Del 12 al 17 de Junio 1976.
- LEJEUNE, J., BERGER, R., HAINES, M., LAFOURCADE, J., VIOLATTE, J., SOTGE, P., TURPIN, R. (1963). Constitution d' un clone a 54 chromosomes au cours d' une leucoblastose chez une enfant mongolienne. *C.R. Acad.Sci.* 256: 1195-1197.
- LEVAN, A., HSU, T.C., STICH, H.F. (1962). The idiogram of the mouse. *Hereditas* 48: 676-687.
- LEVAN, A. (1966). Non-random representation of chromosome types in human tumor stem-lines. *Hereditas* 55: 28-38.
- LEVAN, A., MANOLOW, G., CLIFFORD, P. (1968). Chromosomes of a human neuroblastoma: A new case with accessory minute chromosomes. *J.Natl.Cancer Inst.* 41: 1377-1387.
- LEVAN, G., MITELMAN, F. (1975a). Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. *Hereditas* 79: 156-160.
- LEVAN, G., LEVAN, A. (1975b). Specific chromosome changes in malignancy. Studies in rat sarcomas induced by two polycyclic hydrocarbons. *Hereditas* 79: 161-198.
- LEVAN, G., MITELMAN, F. (1976a). G-banding in Rous rat sarcomas during serial transfer: significant chromosome aberrations and incidence of stromal mitoses. *Hereditas* 84: 1-4.
- LEVAN, G., MANDAHL, N., BREGULA, V., KLEIN, G., LEVAN, A., (1976b). Double minute chromosomes are not centromeric regions of the host chromosomes. *Hereditas* 83: 83-90.
- LEVAN, G., MITELMAN, F. (1977a). Chromosomes and the ethiology of cancer. *Chromosome Today*. Vol.6: 363-371. A.de la Chapelle and M.Sersa eds.
- LEVAN, G., MANDAHL, N., BENGTSSON, B.O., LEVAN, A. (1977b). Experimental elimination and recovery of double minute chromosomes in malignant cell populations. *Hereditas* 86: 75-90.



- LEVAN,A., LEVAN,G., MITELMAN,F. (1977). Chromosomes and cancer. Hereditas 86: 15-30.
- LEVAN,A., LEVAN,G. (1978). Have double minutes functioning centromeres?. Hereditas 88: 81-92.
- LONDON REPORT (1963). The London Conference on the normal human karyotype. Cytogenetics 2: 264-268.
- LUBS, H.A., SALMON,J.H., FLAMIGAN,S. (1966). Studies of a glial tumor with multiple minute chromosomes. Cancer 19: 591-599.
- MAKINO,S. (1951). Some observations on the chromosomes in the Yoshida sarcoma cells band on the homoplastic and heteroplastic transplantations. A preliminary report. Grann 42: 87-90.
- MANOLOV,G., MANOLOVA,J. (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. Nature (Londres) 237: 33-44.
- MARK,J. (1967a). Double minutes a chromosomal aberration in Rous sarcomas in mice. Hereditas 57: 1-22.
- MARK, J. (1967b). Chromosome analysis of ninety one primary Rous sarcomas in the mouse. Hereditas 57: 23-82.
- MARK,J. (1968). Relationships of chromosomal and pathological findings in Rous sarcoma. Virus induced tumors in the mouse. Inst.J.Cancer 3: 663-676.
- MARK,J. GRANBERG,I. (1970a). The chromosomal aberration of double minutes in three gliomas. Acta Neuropathol. 16: 194-204.
- MARK,J. (1970b). Chromosomal analysis of a human retinoblastoma. Acta Ophthalmol. (Kbb). 48: 124-135.
- MARK,J. (1971). Chromosomal characteristic of neurogenic tumours in adults. Hereditas 68: 61-100.
- MARK,J., LEVAN,G., MITELMAN, F. (1972). Identification of by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. Hereditas 71: 163-168.
- MARK,J., MITELMAN,F., DENCKER,H., NORRYD,C., TRANBERG,K.G. (1973). The specificity of the chromosomal abnormalities in human colonic polyps: A cytogenetic study of multiple polyps in a case of Gardner's syndrome. Acta Pathol.Microbiol., Scand. (A) 81: 85-90.
- MILES, C.P. (1967). Chromosomic analysis of solid tumours.II Twenty-six epithelial tumors. Cancer 20: 1274-1279.

- MILLER, O.J. (1970). Autoradiography in Human Chromosomes. *Advan. Hum. Genet.* 1: 35-130.
- MITELMAN, F. (1971). The chromosomes of fifty primary Rous rat sarcomas *Hereditas* 69: 155-186.
- MITELMAN, F., LEVAN, G. (1972a). The chromosomes of primary 7, 12-dimethylbenz ( )anthracene induced rat sarcomas. *Hereditas* 71: 325-334.
- MITELMAN, F. (1972b). Predetermined sequential chromosome changes in serial transplantation of Rous rat sarcomas. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 80A: 313-328.
- MITELMAN, F., MARK, J., NILSSON, P.G., DENCKER, H., NORRYD, C., TRANBERG, K.G. (1974). Chromosome banding pattern in human colonic polyps. *Hereditas* 78: 63-68.
- MITELMAN, F., LEVAN, G. (1976). Clustering of aberration to specific chromosomes in human neoplasms: II. A survey of 287. *Hereditas* 82: 162-174.
- NESBITT, M., FRANCKE, V. (1973). A system of nomenclature for band patterns of mouse chromosomes. *Chromosoma* 41: 146-158.
- NOWELL, P.C., HUNGERFORD, D.A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497.
- NOWELL, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* Vol. 194: 23-28.
- NOTHDURFT, H. (1955). Uber die Sarkomauslosung durch Fremdkorperimplantation bei Rotten in abhangigkeit von der Korregion. *Naturwissenschaften* 49: 18.
- NUNBERG, J. H., KAUFMAN, R.J., SCHIMKE, R.T., URLAUB, G., CHASIN, L.A. (1978). Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5553-5556.
- OPPENHEIMER, B.S., OPPENHEIMER, E.T., DONISHEFSKY, I., STOUT, R.P., EIRICH, F.R. (1955). Further studies of polymers as carcinogenic agents in animals *Cancer Res.* 15: 333-342.
- OPPENHEIMER, B.S., OPPENHEIMER, E.T., STOUT, A.P., WILLHITE, M., DONISHEFSKY, I. (1958). The latent period in carcinogenesis by plastic in rats and its relation to the pre-cancerous stage. *Cancer* 11: 204.
- OTT, G. (1970). Fremdkorpersarkome. *Exp. Med. Pathol. Clin.* 32: 1-6.
- PARDUE, M.L., GALL, J.G. (1970). Chromosome localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358.
- PARIS CONFERENCE (1971). Standardization in human cytogenetics. Birth defects Original Article Series III: N°7, New York, The National Foundation (1972).

- PASQUALINI, C.D., SAAL, F., SCHWARTZ, L., THACZEWSKI, L. (1973). Tumor development in mice bearing a plastic cylinder and inoculated with human neoplastic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 283-286.
- PASCUCELLI, H., FILIPPA, D.A., PASQUALINI, C.D. (1973). Tumor de larga latencia inducido en ratones por cilindro de lucite o vidrio. *Medicina* 33: 572-583.
- PIERRE, R.V., HOAGLAND, K.C., LINMAN, J.W. (1971). Microchromosomes in human preleukemia and leukemia. *Cancer* 27: 160-175.
- POTTER, M. (1968). Résumé of the current status of the development of plasma-cell tumors in mice. *Cancer Res.* 28: 1891-1896.
- POPESCU, N.C., DI PAOLO, J.A. (1977). Vulnerability of specific rat chromosomes to in vitro chemically induced damage. *Inst. J. Cancer* 19: 419-433.
- REES, E.D. (1969). Chromosomal aberrations in rat marrow cells following intravenous polycyclic hydrocarbons. Possible basis for a carcinogen bioassay. Univ. Kentucky, Tobacco Health Res. Inst. Proc. Tobacco Health Workshop. p.18-32.
- ROWLEY, J.D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia indentified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature (Londres)* 243: 290-293.
- RUBIN, L.R., BROMBERG, B.E., WALDEN, R.H. (1971). Long term human reaction to synthetic plastics. *Surf. Gynecol. Obstet.* 132: 603.
- RUMI, L., LARRIPA, I., SALUM, S.B., PASQUALINI, C.D. (1974). An improved method for cytogenetic studies of solid murine tumors. *Europ. J. Cancer* 10: 771-772.
- RUSSELL, S.W., FRANCKE, V., BUETTNER, L., COCHRANE, C. (1974). Modes of growth and spread of a transplantable virus producing murine (Moloney) sarcomas. Karyotype analysis. *J. Natl. C. Inst.* 53: 801-806.
- SAAL, F., COLMERAUER, M.E.M., BRAYLAN, C.R., PASQUALINI, C.D. (1972). Tumor growth in allogenic mice bearing a lucite cylinder. *J. Natl. Cancer Inst.* 49: 451-458.
- SANDBERG, A.A., SAKURAI, M., HALDSWORTH, R.N. (1972). Chromosomas and causation of human cancer and leukemia. VIII DMS chromosomes in a neuroblastoma. *Cancer* 29: 1671-1697.
- SCHMID, N. (1963). DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics* 2: 175-193.

- SCHNEDL, W. (1971). The karyotype of the mouse. *Chromosoma* 35: 111-116.
- SEABRIGHT, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* ii: 971-972.
- SEN, L., SUAREZ, H.G., SALUM, S.B., PAVLOVSKY, S., PAVLOVSKY, A., BACHMANN, A.E. (1972). In vitro transformation of peripheral human lymphocytes by autologous malignant DNA. *Medicina* 32: 428-436.
- SPENCE, W.T. (1954). From-fitting plastic cranioplastic. *J. Neurosurg.* 11: 219.
- SPRIGGS, A.I., BADDINGTON, M.M. (1962). Chromosomes of human cancer cells. *Br. Med. J.* 2: 1431-1435.
- SPRIGGS, A.I., BADDINGTON, M.M., CLARKE, C.M. (1962). Carcinoma in situ of the cervix uteri some cytogenetic observations. *Lancet* i: 1383.
- STEENIS, H. van (1966). Chromosomes and cancer. *Nature* 209: 819-821.
- STROEBE, H. (1892). Zur Kenntnis Verschiedenen cellulärer Vorgänge und Erscheinungen in Geschwülsten. *Beitr. Pathol. Anat.* 11: 1-38.
- SUAREZ, H.G., SALUM, S.B., PAVLOVSKY, S., RUIBAL, B., PAVLOVSKY, A. (1969). Culture in vitro d' une lignée cellulaire provenant d'un lymphosarcome humain. *Int. J. Cancer* 4: 880-890.
- SUMNER, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304.
- SUGIYAMA, T., UENAKA, H., UEDA, N., FUKUHARA, S., MAEDA, S. (1978). Reproducible chromosomal changes of polycyclic hydrocarbon-induced rat leukemia: Incidence and chromosome banding pattern. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 153-160.
- TAKAGI, N., AYA, T., KATO, H., SANDBERG, A. (1969). Relation of virus-induced cell fusion and chromosome pulverization to mitotic events. *J. Natl. Cancer Inst.* 43: 335-347.
- THOMPSON, R.J., ENTIN, S.D. (1969). Primary extraskelatal chondrosarcoma. *Cancer* 23: 936-939.
- TODD, A.S., WOOD, S.M., ROBERTSON, J. (1969). A case of leukemia showing mixed myeloid and lymphoid characteristics and an unusual chromosome pattern. *J. Clin. Pathol.* 22: 743.
- TURPIN, R., LEJEUNE, J. (1965). *Les chromosomes humains*. Gauthier-Villars Paris.

- TJIO, J., LEVAN, (1956). The chromosome number of man. Hereditas . 42: 1-6.
- WINGE, Ö (1930). Zytologische Untersuchungen über die Natur malignen Tumoren II. Zellkarzinome bei Mäusen. Z. Zellforsch.mikr. Anat. 10: 683-735.
- WHITE, L., COX, D. (1967). Chromosome changes in a rhabdomyosarcoma during recurrence and in cell culture. Br. J. Cancer 21: 684-693.
- WURSTER, D.H. (1972). Mouse chromosomes identified by trypsin-Giemsa (T-G) banding cytogenetics 11: 379-387.
- YOSIDA, T.H., ISMAI, H.T., MORIWAKI, K. (1967). Cytogenetical and biochemical studies of 19 primary plasma cell neoplasms induced in BALB/c mice. Am. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan 18: 13-15.
- YUNIS, J.J., YASMINEH, W. (1971). Heterochromatin satellite DNA and cell function. Science 174: 1200-1209.
- YUNIS, J.J., CHANDLER, M.E. (1977). The chromosomes of man, clinical and biological significance. Am. J. Pathol. 88: 466-495.
- ZANKL, H., ZANG, K.D. (1972). Cytological and cytogenetical studies in Brain tumors. IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as N°22 by fluorescence technique. Humangenetik. 14: 167-169.
- ZECH, L., HOGHEND, V., NILSSON, K., KLEIN, G. (1976). Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. Int. J. Cancer 17: 47-56.
- ZOLLINGER, H.V. (1952). Experimentelle Erzeugung maligner Nierenkapsel tumoren bei der Ratte durch Druckreig. Schweiz Z. Pathol. Bakteriol. 15: 666