

14 202827
3



UNIVERSIDAD MOTOLINÍA, A. C.

ESCUELA DE QUÍMICA

Con Estudios Incorporados a la UNAM

INFLUENCIA DEL ESTRES CRONICO EN EL DESARROLLO DE NEOPLASIAS DEL SISTEMA NERVIOSO INDUCIDAS QUIMICAMENTE

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Titulo de QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

María Guadalupe Palencia Hernández

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1 9 9 0



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
Capítulo I. INTRODUCCION	1
Capítulo II. INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	5
2.1.- Agentes capaces de inducir la formación de neoplasias en animales de experimentación	6
2.1.1. Virus oncógenos	6
2.1.2. Radiaciones	8
2.1.3. Carcinógenos químicos	8
2.2.- Principales clases de carcinógenos químicos	9
2.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	9
2.2.2. Aminas aromáticas	10
2.2.3. Agentes alquilantes	11
2.2.4. Nitrosaminas	11
Capítulo III. PARTE EXPERIMENTAL	17
3.1.- Diagrama de flujo	17
3.2.- Método para el modelo control	18
3.3.- Método para el estudio estrés y cáncer	18
3.4.- Resultados	21
3.4.1. Histología normal del sistema nervioso	39
3.4.2. Estudio histopatológico	45
Capítulo IV. DISCUSION	53
Capítulo V. RESUMEN	56
Capítulo VI. CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA	59
APENDICE	64
8.1.- Material	64
8.1.1. Material biológico	64
8.1.2. Material de laboratorio	64
8.1.3. Reactivos	64
8.2.- Preparación de reactivos	66
8.3.- Técnica de hematoxilina-eosina	68

INTRODUCCION

Los carcinógenos químicos han sido empleados para inducir neoplasias intracraneales, así por ejemplo: la administración oral de acetilaminofluoreno, en la rata, produce gliomas, meningiomas y neurilemomas asociados a tumores en otros órganos (22).

La inyección intracerebral de una variedad de hidrocarburos carcinogénicos, en ratones, produce tumores cuya incidencia varía de acuerdo a la cepa de ratón. El período latente es relativamente largo: el tiempo promedio para el desarrollo de neoplasias intracraneales en roedores ha sido de 250 días para gliomas y 220 días para sarcomas, los tumores mixtos son producidos a menudo (32).

Experimentos de trasplantes, han sugerido que existen factores intrínsecos al huésped, que son muy importantes en la determinación de la apariencia citológica de las células tumorales (32).

Recientemente se han empleado dos métodos para la producción de neoplasias inducidas químicamente. Hosobuchi e Ishii han descrito la producción exitosa, en pocas semanas, de gliomas y gangliogliomas en hamsters recién nacidos y jóvenes, posterior al implante intracerebral de cerebros de embriones de animales cuyas madres fueron inyectadas intravenosamente con una sola dosis de dimetilbenzantraceno (13).

En años recientes un grupo de carcinógenos potentes, los compuestos N-nitrosos, han sido introducidos por Druckrey y cols. para la producción de una amplia variedad de neoplasias del sistema nervioso central y periférico (15). La metilnitrosourea y la dimetilnitrosourea inducen neoplasias en un alto porcentaje de ratas, cuando se administran intravenosamente o por ingestión, siendo el periodo latente, por ruta gástrica, de 200 días (25). Una sola inyección intravenosa de etilnitrosourea, en ratas preñadas con 18 días de gestación, induce una amplia variedad de neoplasias malignas en el cerebro y médula espinal (gráfica 1) (17).

También se ha reportado, que existe una estrecha relación entre estrés y desarrollo de neoplasias, la cual está sujeta a considerable controversia. Los componentes psicológicos del huésped son de suma importancia en la homeostasis, por lo que es necesario entender como el estrés pudiera afectar la evolución natural de una neoplasia. Un modelo de estrés y cáncer en animales puede ser importante para el estudio del cáncer en humanos, ya que se ha reportado que sujetos con inmunodeficiencias primarias o con inmunosupresión tienen mayor propensión para desarrollarlas (31).

Baker, en 1977, inyectó 3-metilcolantreno subcutáneamente en ratas, y estas fueron inmediatamente puestas a una temperatura de 2°C durante toda su vida, induciéndose de esta manera, estrés. Después de 300 a 600 días se observó que muy pocos animales presentaban neoplasias, tanto del grupo control, como

del grupo de animales estresados, concluyendo que no existía ninguna relación entre estrés y neoplasia (2). Kallis y Fuller, en 1968, inyectaron 3-metilcolantreno a ratones de 1 mes de edad y estos estuvieron sujetos a 10 electroconvulsiones. Sin embargo esto no afectó el desarrollo, las dimensiones o apariencia histológica de las neoplasias; sin embargo, al analizar los resultados por sexo, observaron que en los machos había aumento en la incidencia (14).

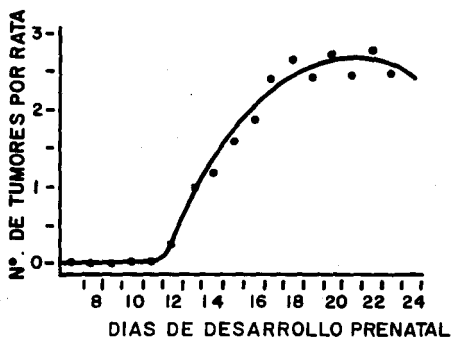
Por otro lado, Visitainer y cols., en 1982, sometieron un grupo de ratas a estrés con choques eléctricos de 600 v; dichas ratas ya habían sido implantadas con sarcomas Walker 256; observando al final del experimento una reducción de la posibilidad de rechazo (29).

Por lo tanto, debido a que existen diversas opiniones en cuanto al efecto del estrés sobre el desarrollo del cáncer, se quiere comprobar, con métodos propios, la posible influencia del estrés en el desarrollo de neoplasias del sistema nervioso central, inducidos químicamente.

En base a lo reportado en la literatura, nuestra hipótesis es: si se provoca estrés crónico en ratas Wistar expuestas en el periodo prenatal al etilnitrosourea, aumentará la frecuencia o la velocidad de crecimiento de las neoplasias en estos animales.

**SENSIBILIDAD DE LOS FETOS DE RATA, AL
CARCINOGENO QUIMICO ETILNITROSOUREA
EN RELACION AL TIEMPO DE DESARROLLO
PRENATAL**

(GRAFICA 1)



INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

A pesar de los múltiples estudios efectuados hasta ahora, el cáncer continua sin ser totalmente comprendido. La ignorancia actual resulta, de la limitada comprensión de los procesos celulares, del control genético y de la regulación celular en mamíferos. Muchos estudios confirman que, mientras no se tenga bien definido el cambio de regulación y control del crecimiento celular, no se tendrán soluciones terapéuticas para las neoplasias (5).

Según la definición de Willis en 1952, una neoplasia es una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede el de los tejidos normales, que no está coordinado con estos mismos, y que persiste el crecimiento aún después de cesar el estímulo que desencadenó el cambio. A esta definición se puede añadir, que la masa anormal carece de finalidad funcional y es prácticamente autónoma, ya que termina destruyendo al organismo a medida que el crecimiento del tejido neoplásico establece competencia con las células y tejidos normales, compitiendo por el suministro de energía y substratos nutritivos.

Las células de tumores benignos conservan, las características funcionales especializadas de sus células de origen, en proporción directa a su grado de diferenciación. La neoplasia benigna bien diferenciada, puede elaborar: mucina, hormonas y enzimas, etc., al igual que lo hacen las células normales que las originan (30).

La capacidad funcional de las neoplasias malignas es muy variable. En tumores malignos no diferenciados, todas las actividades metabólicas parecen estar destinadas a la síntesis de elementos celulares y a la mitosis, mientras que otras funciones especializadas están disminuidas o ausentes.

Las células cancerosas pueden elaborar productos no secretados normalmente por sus células de origen. En ocasiones, los tumores provocan efectos sistémicos sobre el huésped, al sintetizar hormonas, suprimir la inmunidad o elaborar factores que alteren la función del sistema nervioso central o médula ósea (15).

2.1. AGENTES CAPACES DE INDUCIR LA FORMACION DE NEOPLASIAS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Después de una larga serie de estudios experimentales, se ha visto que los principales agentes, capaces de inducir el desarrollo de neoplasias, se pueden clasificar de la siguiente manera:

- a) Virus oncógenos
- b) Radiaciones
- c) Productos químicos carcinógenos

2.1.1. Virus oncógenos. - Se conocen aproximadamente 150 virus oncógenos que afectan a los animales, de los cuales la tercera parte son DNA virus y el resto son RNA virus (27) (ver cuadro 1).

Entre los DNA virus sólo se han estudiado en detalle los de polio (Py), de vacuolización de simios (SV-40) y los adenovirus humanos; los RNA virus más estudiados son: virus aviario de leucemia-sarcoma, virus del leucemia-sarcoma murino y virus de tumor mamario murino.

Cuando las células son afectadas por DNA virus, pueden seguir dos vías mutuamente exclusivas. En la primera vía, las células del huésped natural sufren la llamada infección productiva, en la cual el virus se multiplica y la célula muere. En la segunda vía, las células del huésped bloquean la multiplicación del virus, y bajo ciertas condiciones, hasta el 40% de las células pueden transformarse en neoplasias. Esta última es considerada una infección abortiva, ya que las células no mueren sino que son estimuladas para replicarse (13,27).

En infecciones abortivas que originan la formación de neoplasias, sólo tienen lugar algunas de las primeras etapas de las infecciones productivas. El DNA viral y las proteínas capsulares no se reúnen en viriones, en su lugar, una porción de DNA del virus infectante se inserta en el genoma de la célula, y se multiplica con él. Así, el virus modifica el genotipo de la célula huésped, y origina expresiones fenotípicas que se describirán más adelante como transformación neoplásica. Consecuentemente, no pueden recuperarse viriones infecciosos de células transformadas. Tiene interés el hecho de que cada célula transformada reproduce varias copias de los genes virales, de manera que amplía la influencia oncogénica del virus (3).

Los RNA virus oncógenos son interesantes porque se sospecha que algunos de ellos pueden provocar neoplasias en el hombre; en cambio, en los animales provocan espontáneamente cáncer como leucemia-sarcoma en el pollo o leucemia y tumores mamaros en el ratón, etc. A diferencia de los DNA virus, los RNA virus pueden simultáneamente ir multiplicando y transformando células huéspedes sin destruirlas. Por lo tanto, puede aislarse el agente en líneas celulares tumorales y mediante el microscopio electrónico observar partículas virales tipo C en el interior de las células neoplásicas (28).

2.1.2. Radiaciones.- La radiación es un potente carcinógeno, tanto en animales, como en el hombre. No se sabe si la radiación altera directamente al DNA o la expresión fenotípica del genoma. Se piensa que la energía radiante produce varias alteraciones, entre la que se encuentran principalmente:

- 1) Acelera el envejecimiento, lo cual significa una mayor frecuencia de mutaciones espontáneas, y cáncer.
- 2) Activa a los virus oncógenos.
- 3) Altera el microambiente de las células.
- 4) Estimula a las células para que proliferen, originando errores mitóticos que desarrollan mutantes más vigorosos que producen tumores (5,27).

2.1.3. Carcinógenos Químicos.- En 1975 se reportaron agentes ambientales causantes del cáncer, cuando se relacionó la elevada frecuencia de cáncer del escroto en deshollinadores, con la exposición crónica de hollín en chimeneas (27).

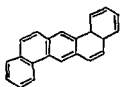
En 1975, Yamagiwa e Ichikawa obtuvieron el primer modelo químico experimental de cáncer, pincelando repetidamente la oreja del conejo con alquitrán; más tarde investigadores británicos comprobaron que el alquitrán contenía hidrocarburos aromáticos policíclicos fuertemente carcinógenos. Después de estas observaciones iniciales, se ha comprobado que centenares de productos químicos son carcinógenos en animales (23).

2.2. PRINCIPALES CLASES DE CARCINOGENOS QUIMICOS

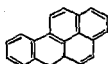
Se señalan brevemente algunas de las principales clases de carcinógenos químicos.

- a) Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- b) Aminas aromáticas.
- c) Agentes alquilantes.
- d) Nitrosaminas.

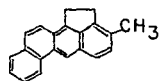
2.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. - Fueron los primeros que se aislaron, y constituyen algunos de los agentes carcinógenos más potentes. Los más estudiados son: dibenzoantraceno, benzopireno, y 3-metilcolantreno (27).



dibenzoantraceno



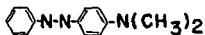
benzopireno



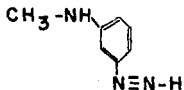
3-metilcolantreno

Estos agentes son capaces de provocar "in vitro" transformación neoplásica de diversos tipos celulares obtenidos de varias especies, y de inducir neoplasias "in vivo" en la mayoría de los animales de laboratorio. Pincelando con ellos la piel de los animales, aparecen neoplasias locales; inyectándolos por vía subcutánea, desencadenan sarcomas; introducidos a un órgano determinado, provocan neoplasias en el lugar de la inyección (15,27).

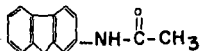
2.2.2. Aminas aromáticas.- Es un grupo que contiene carcinógenos potentes, de los cuales los más estudiados son: N-dimetil-4-aminoazobenceno (DMAB), N-metil-4-aminoazobenceno (MAB), 2-acetilaminofluoreno (AAF) y 2-naftilamina (5).



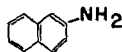
N-dimetil-4-aminoazobenceno



N-metil-4-aminoazobenceno



2-acetilaminofluoreno



2-naftilamina

Muchos datos favorecen la idea, de que la actividad carcinógena de los metabolitos próximos de MAB y AAF guardan relación con su fijación covalente al carbono 8 de la desoxiguanosina; aunque también se fijan al RNA y a las proteínas. Por lo tanto, las aminas aromáticas, como los hidrocarburos policíclicos, pueden fijarse al DNA y alterar su estructura. Cabe señalar que el DMAB fué utilizado en un tiempo como aditivo de alimentos para colorear la margarina, y que el AAF se investigó como posible insecticida (5).

2.2.3. Agentes alquilantes.- Los principales son: beta propiolactona y los epóxidos. A diferencia de otros carcinógenos, los agentes alquilantes no necesitan conversión metabólica, sino que se fijan directamente a los grupos nucleófilos del DNA, RNA y proteínas. La posición N-7 de la desoxiguanosina parece ser su lugar preferido de fijación. La guanina alquilada queda tan modificada, que se une con la quinina en lugar de la citosina. Tal apareamiento anormal constituye, en esencia, una mutación (4).

2.2.4. Nitrosaminas.- Se transforman en agentes que donan grupos metilo y etilo al RNA, DNA y probablemente también a la guanina.

La etionina, tetracloruro de carbono, uretano, y diversos metales inorgánicos como: berilio, cadmio, cobalto y níquel, reaccionan con varios compuestos dentro del núcleo induciendo neoplasias (9).

Magee y Barnes, en 1956, y muchos otros autores han enfatizado la importancia de convertir los compuestos N-nitrosos en agentes alquilantes del DNA que parecen inducir neoplasias. El DNA cerebral, etilado con etilnitrosourea (ENU), es eliminado más lentamente que el DNA hepático etilado de la misma rata. Por lo tanto, se reporta que esta nitrosamida tiene característica de inducir tumores neuroectodérmicos, en casi el 100% de los animales recién nacidos, después de una sola exposición transplacental al carcinógeno (24).

El descubrimiento de la acción carcinogénica de los compuestos nitrosos, y el uso de esos compuestos para la inducción de tumores neurales da un estímulo tremendo a la neurooncología experimental. Druckrey y colaboradores observaron que los compuestos nitrosos tienen un notable efecto organotrópico: diferentes compuestos producen tumores en un órgano en particular.

Las nitrosamidas son fuertemente neurotróficos, y ellos son los carcinógenos de preferencia en el estudio experimental de las neoplasias neurales. El ENU y MNU cumplen los requerimientos de un modelo ideal para inducir tumores neurales por las siguientes razones:

- 1) Inducen una alta incidencia de tumores, preferencial y consistentemente, en el sistema nervioso después de la administración por varias rutas sistémicas.

2) Las neoplasias producidas son semejantes, morfológica y biológicamente, a los tumores que ocurren naturalmente en el hombre y los animales.

3) Los compuestos nitrosos están presentes en el medio ambiente con un riesgo potencial para el hombre y los animales.

Los tumores inducidos con estas nitrosamidas tienen las siguientes características:

1) No son distribuidos casualmente por todo el sistema nervioso, sino que se desarrollan en ciertos sitios preferencialmente, como son: las áreas periventriculares y la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales.

2) Más de un tumor puede ocurrir en cualquier animal, además de que pueden estar presentes en el mismo cerebro, neoplasias macroscópicas, microtumores y grupos de células neoplásicas tempranas.

El ENU tiene una acción preferencial transplacentar y neonatal: una sola dosis induce tumores neurales en casi el 100% de los recién nacidos, de madres que fueron inoculadas durante el segundo período de gestación. Las neoplasias, además, se encontraron en varias partes del sistema nervioso, como en el cerebro, médula espinal, nervios craneales y nervios periféricos.

Los tumores se desarrollan en nervios craneales, a los 190 ± 50 días; en médula, a los 210 ± 70 días; en nervio periférico, a los 245 ± 45 días; y en cerebro, a los 245 ± 80 días. La susceptibilidad del sistema nervioso disminuye rápidamente con el aumento de la edad, y en ratas adultas el sistema hematopoyético está más frecuentemente involucrado en el proceso neoplásico.

La metilnitrosourea y etilnitrosourea fueron los primeros agentes usados por Druckrey y colaboradores, para inducir tumores neurogénicos, mediante inyecciones intravenosas en pequeñas dosis a ratas adultas gestantes, dando como resultado tumores malignos del cerebro y médula espinal, en un lapso de tiempo de 240-400 días después. La incidencia, distribución, periodo de latencia e histología de los tumores inducidos por ambos, son influenciados por la especie, edad y sexo de los animales; así como, por la dosis y modo de aplicación del carcinógeno (27).

Por otro lado, se reporta que existe una gran cantidad de variables psicológicas que están involucradas en el desarrollo del cáncer (5). LaBarba, en 1970, concluye que los tumores inducidos en animales pueden estar influenciados por variables experimentales, tales como: tipo de tumor, y aplicación de estrés. Aunque el estrés es un tema de mucha controversia, existe una definición que es utilizada: Un estresor es una estímulo aversivo; el estrés se origina cuando se expone a un estresor; y la respuesta al estrés se refiere a los cambios

psicológicos inducidos. Se ha demostrado que causa cambios en los animales de experimentación, como por ejemplo: agresividad, nerviosismo, y aumento en los niveles hormonales (1). Uno de los mejores ejemplos se ha demostrado en ratas que desarrollan respuesta intensa de estrés, cuando se someten a choques eléctricos, desarrollando secundariamente ulceración estomacal, pérdida de peso, y niveles altos de corticosterona y norepinefrina (26).

Es necesario dilucidar, si el estrés participa en el desarrollo de neoplasias, por lo que la identificación de factores mediadores de estrés son importantes; sin embargo, la naturaleza de los mediadores y su efecto sobre el desarrollo de un tumor, aún son objeto de estudio. En la literatura, se ha reportado que el estrés causa supresión del sistema inmune dependiente del timo y la bolsa de Fabricio; y seguido a éste se dá el crecimiento tumoral. Diversos grupos celulares del sistema inmune pueden participar en el control del cáncer, como son linfocitos T citotóxicos (LRCs), macrófagos, polimorfonucleares y células asesinas naturales (31).

Cuadro 1. Virus oncógeno

A.- Virus DNA (aproximadamente 50)

1. Grupo de virus de papiloma
virus de papiloma de conejo, hombre, perro, vaca y otros

2. Virus del grupo polioma
virus polioma (murinos)
(SV 40) virus de simios

3. Adenovirus
adenovirus humanos (31 cepas, de las cuales 12 por lo menos provocan tumores en animales recién nacidos, transforman células "in vitro" o producen ambos fenómenos)
adenovirus de simio (seis virus)
adenovirus aviarios (dos virus)
adenovirus bovinos

4. Herpes virus (datos todavía no concluyentes)
linfoma de Burkitt (humano)
carcinoma de Lucke (de la rana)

B.- Virus RNA (unos 100 aproximadamente)

1. Virus aviario de leucemia-sarcoma (Rous) (20 o más)

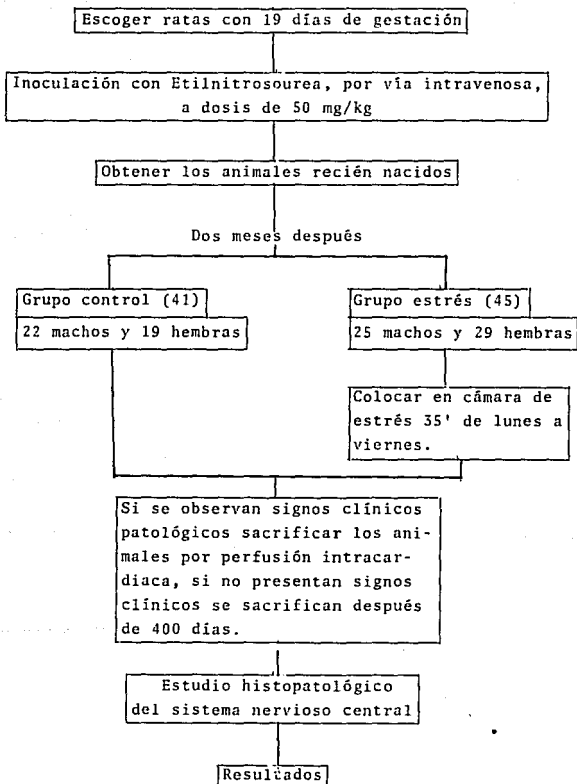
2. Virus de leucemia-sarcoma murinos
(no establecido todavía el número de tipos)

3. Virus de tumor mamario murino (tres tipos)

4. Virus de leucemia-sarcoma de gato, criceto, rata y cobayo.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMA DE FLUJO



3.2. METODO PARA EL MODELO CONTROL

Para iniciar con el modelo de estrés y cáncer se hizo un estudio piloto para corroborar el funcionamiento del etilnitrosourea (ENU) con el siguiente método:

- 1.- Escoger 20 ratas Wistar con 19 días de gestación.
- 2.- Inocular estas ratas con etilnitrosourea (ENU) por vía intravenosa: 50 mg/kg disuelto en cloruro de sodio al 0.9% (0.5 ml) (ver apéndice).
- 3.- Esperar al nacimiento de las crías (dos días después de la inoculación).
- 4.- Mantener las crías con sus madres hasta cumplir 60 días de edad (número total de crías, 187 animales).
- 5.- Separar por sexo (87 ratas machos y 100 ratas hembras).
- 6.- Mantenerlas en buenas condiciones de sanidad y alimentación, hasta que presenten los primeros signos clínicos de tumor o que cumplan 400 días de vida postnatal.

3.3. METODO PARA EL ESTUDIO ESTRES-CANCER

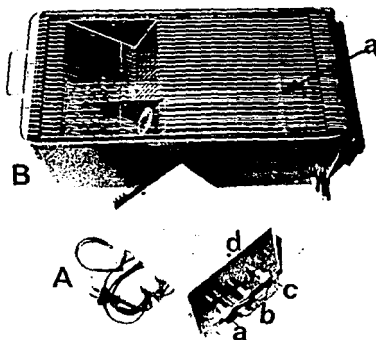
Una vez comprobado que funcionaba el modelo para producir tumores en ratas Wistar, se procedió a realizar el estudio de "Estrés y Cáncer" de la siguiente manera:

- 1.- Obtener 10 ratas Wistar con 19 días de gestación.
- 2.- Inocular estos animales con 50 mg/kg de etilnitrosourea (ENU) por vía intravenosa disuelto en cloruro de sodio al 0.9% (0.5 ml) (ver apéndice).
- 3.- Esperar el nacimiento de las crías (dos días después de la inoculación).

- 4.- Mantener las crías con sus madres hasta cumplir 60 días de edad, (número total de crías, 86).
 - 5.- Separar al azar en dos grupos:
 - a) Grupo control con 41 ratas (22 machos y 19 hembras)
 - b) Grupo estrés con 45 ratas (25 machos y 20 hembras)
 - 6.- Mantener ambos grupos en las mismas condiciones de sanidad y alimentación, en cajas de acrílico (máximo 4 animales en cada una) a una temperatura de 22°C y controlando estrictamente el ciclo día/noche.
 - 7.- Colocar las ratas del grupo estrés en la cámara de estrés experimental 5 días a la semana (de lunes a viernes) durante 35 minutos; dicha cámara es de color rojo para producir acondicionamiento. (Figura 1). Cada 5 minutos sonarizar una alarma y 2 segundos después aplicar una descarga eléctrica de 30 mA de intensidad y 0.75 segundos de duración, a través de una reja de acero colocada en la base de la cámara.
- NOTA: El estrés crónico es producido a través de la vía somatosensorial (auditiva, visual y dolor físico).
- 8.- Seguir el mismo procedimiento para machos y hembras.
 - 9.- Mantener el procedimiento experimental para estrés desde los 60 días de vida postnatal hasta los 400 días de edad.
 - 10.- Cuando los signos clínicos de tumor sean evidentes, sacrificar los animales por perfusión intracardiaca, con formilina al 10% en buffer de fosfato (apéndice).
 - 11.- Realizar el estudio histopatológico de las neoplasias extraídas de los animales, siguiendo la técnica de Hematoxilina Eosina (apéndice).

CAMARA DE ESTRES EXPERIMENTAL

FIGURA 1



- A.- a) Regulador de la intensidad de la descarga eléctrica.
b) Regulador del tiempo de retraso.
c) Regulador del tiempo de duración.
d) Sonido de alarma.
- B.- Caja de acrílico de color rojo.
a) Base de metal conectado a corriente eléctrica.

3.4. RESULTADOS

En el modelo de inducción de tumores en ratas Wistar con etilnitrosourea, se observó que hubo desarrollo de neoplasias del sistema nervioso central y periférico en 89 (89.88%) de 99 hembras y 77 (88.50%) de 87 machos, con un tiempo promedio de 240 días en el cual los animales presentaron tumor (Gráfica 2).

Este mismo modelo se realizó con 110 animales, 50 hembras y 60 machos de los cuales 40 (92%) y 53 (88.33%) respectivamente desarrollaron neoplasias del sistema nervioso con un tiempo promedio de 256 días.

Como se observó que es un buen método para inducir tumores del sistema nervioso, se utilizó para el estudio de estrés y desarrollo de neoplasias inducidas químicamente, en el cual se obtuvo lo siguiente: se desarrollaron neoplasias del sistema nervioso central y periférico en 26 (63%) de 41 animales control y en 31 (69%) de 45 animales del grupo estrés.

El tiempo promedio para la manifestación clínica de los tumores fué 260 ± 78 días para las ratas del grupo control y 262 ± 91 días para los animales del grupo estrés (Tabla 1 y gráfica 3).

En el análisis de resultados por sexo, 13 (68%) de 19 animales hembras y 13 (59%) de 22 animales machos del grupo con-

trol desarrollaron neoplasias del sistema nervioso central y periférico. El tiempo promedio de manifestación clínica fué de 267 \pm 88 y 255 \pm 68 días respectivamente. En el grupo estrés 18 (72%) de 25 ratas machos y 13 (65%) de 20 animales hembras desarrollaron neoplasias del sistema nervioso central y periférico con un promedio de manifestación clínica de 264 \pm 86 y 260 \pm 96 días respectivamente (tabla 1 y gráfica 4).

Al realizar la prueba de t student se encontró que: no hay diferencia significativa para $p \geq 0.05$ entre el grupo control y grupo estrés, lo mismo se observa al comparar por sexo ambos grupos. Para corroborar esto se hizo la prueba de ji cuadrada y se encuentra que no hay diferencia significativa para $p \geq 0.01$, tanto entre los grupos como entre los sexos.

Para calcular el promedio, desviación estandar, t student y ji cuadrada se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$t_{\text{student}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sp \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n}}}$$

$$DS = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Los síntomas clínicos de las ratas con tumores cerebrales fueron: dificultad para respirar, posición curva y pelo erizado (fotografía No. 1), pérdida de equilibrio y apetito, presentando finalmente estado de coma. Los animales con tumores medulares presentaron: parálisis de miembros inferiores y posteriormente en miembros superiores o viceversa (fotografía 2 y 3).

En ambos casos estos síntomas se pueden presentar en un periodo que varía desde días hasta semanas (tabla 3).

Posteriormente se sacrificaron las ratas para practicarles el estudio histopatológico donde se encontraron diversos tipos de tumores, que fueron:

Astrocitoma
Linfoma
Oligodendroglioma
Glioblastoma
Schwanoma
Meningioma
Glioma Mixto
(tabla 2)

Los sitios de predilección de los tumores de ratas que fueron tratadas con ENU son: hipocampo, substancia blanca subcortical, ganglios basales, corteza cerebral y médula espinal; en esta última los tumores se localizan más frecuentemente en las regiones torácicas y lumbar como se muestra en la fotografía No. 10.

Cabe mencionar que hubo algunos tumores que fueron visibles macroscópicamente, como se muestra en las fotografías 4 y 5; otros, que se encontraban fuera del cerebro, como se muestra en las fotografías No. 6 y 7, los cuales desplazan el cerebro o lo comprimen dificultando así su funcionamiento normal; en la fotografía No. 8 se muestra un tumor en el nervio periférico, el cual impedía a la rata caminar normalmente, y por último tenemos un caso extraño, puesto que la rata no desarrolló cráneo y el tumor solo se cubría con la piel, lo cual también pudo deberse a un defecto congénito (fotografía No. 9).

La medida de los tumores fué de 13 mm en promedio como se puede observar en la tabla 4.

En la tabla 6, se muestra un resumen de las características ya reportadas en la literatura de los diferentes tumores, y al compararlas con las observadas en este estudio no hay diferencia, además, con esto se pueden comprender mejor las fotografías.

Considerando que este estudio es importante, se realizó un estudio histológico de las diferentes regiones donde se localizaron los tumores, en cortes normales de animales de la misma cepa, y así de este modo poder hacer una comparación entre lo normal y lo patológico. (Tabla 5).

CAMPANA CRONOLOGICA DE DESARROLLO DE
TUMORES INDUCIDOS POR ENU EN RATAS
DEL GRUPO MODELO

(GRAFICA 2)

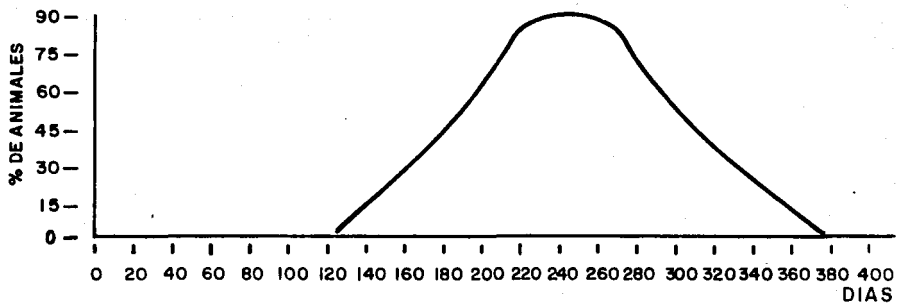
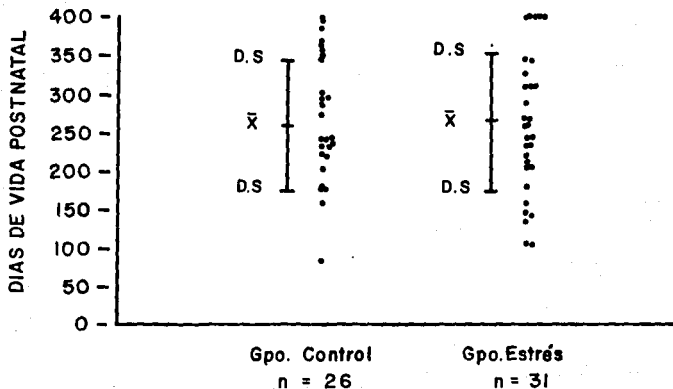


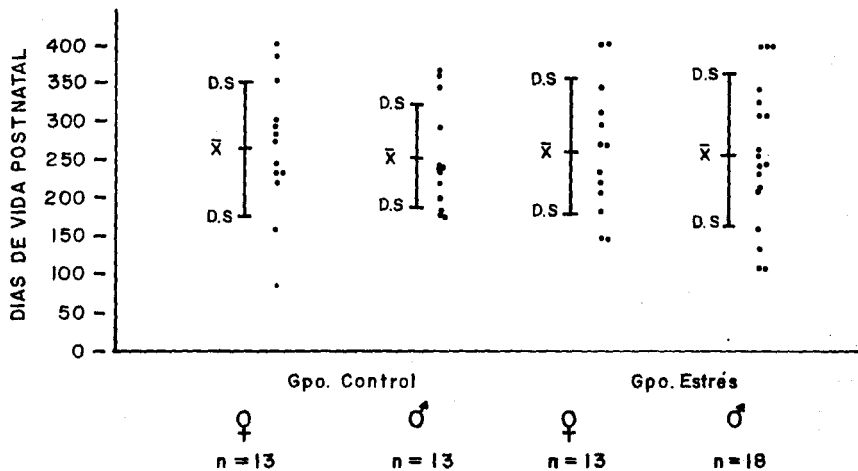
TABLA DEL TIEMPO DE EVOLUCION DE LOS
TUMORES EN DIAS
(TABLA 1)

GRUPO CONTROL		GRUPO ESTRES	
♀	♂	♀	♂
402	182	146	160
220	363	270	258
242	348	268	135
157	365	346	402
385	179	296	402
233	245	311	206
354	241	223	211
83	243	402	345
303	235	182	232
232	175	402	326
294	220	146	402
287	202	207	107
273	293	234	248
			263
			107
			311
			245
			311
$\bar{x} \pm D.S.$ 267 ± 88	$\bar{x} \pm D.S.$ 253 ± 68	$\bar{x} \pm D.S.$ 264 ± 86	$\bar{x} \pm D.S.$ 260 ± 96
$\bar{x} \pm D.S.$ 260 ± 78		$\bar{x} \pm D.S.$ 262 ± 91	

ANIMALES QUE PRESENTARON TUMOR DEL GRUPO
CONTROL Y DEL GRUPO ESTRES
(GRAFICA 3)



ANIMALES QUE PRESENTARON TUMOR DEL GRUPO
CONTROL Y DEL GRUPO ESTRES
SEPARADOS POR SEXO
(GRAFICA 4)



**PORCENTAJE DE LOS TUMORES DESARROLLADOS EN LAS
RATAS ESTUDIADAS
(TABLA 2)**

TIPO DE TUMORES	GRUPO CONTROL			
	N° de CASOS		% del TOTAL	
	♀	♂	♀	♂
ASTROCITOMA	0	0	0 %	0 %
LINFOMA	0	2	0 %	15.4%
OLIGODENDROGLIOMA	4	4	30.8%	30.8%
GLIOBLASTOMA	0	0	0 %	0 %
SCHWANOMA	1	1	7.7%	7.7%
MENINGIOMA	7	6	53.8%	46.2%
GLIOMA MIXTO	1	0	7.7%	0 %
TOTAL	13	13	100%	100%

GRUPO ESTRES			
N° de CASOS		% del TOTAL	
♀	♂	♀	♂
5	6	38.5%	33.3%
4	3	30.8%	16.7%
3	3	23.0%	16.7%
0	2	0 %	11.1%
0	0	0 %	0 %
1	4	7.7%	22.2%
0	0	0 %	0 %
13	18	100%	100%

TABLA DEL TIEMPO PROMEDIO (DIAS) DE EVOLUCION
DE LOS DIFERENTES TUMORES
(TABLA 3)

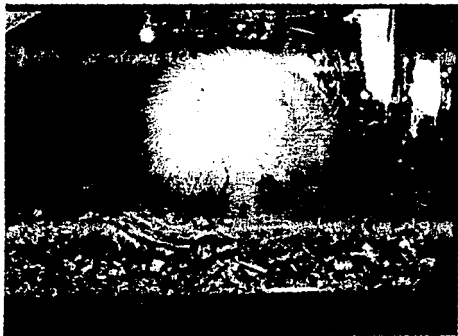
TIPO DE TUMOR	GRUPO CONTROL		\bar{x}		GRUPO ESTRES		\bar{x}	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
ASTROCITOMA					296	258		
					223	402		
	0	0	0	0	402	402	305.6	305.3
					402	211		
					205	248		
					311			
LINFOMA	0		0		146	160		
		241		267	268	135	226.5	167
		293			346	206		
					146			
OLIGODENDROGLIOMA	354	365			270	345		
	294	235			311	402		
	273	220	306	255.5	182	263	254	336.6
	303	202						
GLIOBLASTOMA	0	0	0	0	0	311	0	278
						245		
SCHWANOMA	157	179	157	179	0	0	0	0
MENINGIOMA	402	182				107		
	220	363				107		
	242	348				327		
	233	245	258.8	259.3	234	232	234	193
	83	243						
	303	175						
	287							
GLIOMA MIXTO	232	0	232	0	0	0	0	0

TABLA DE MEDIDAS
DE LOS TUMORES
ENmm
(TABLA 4)

TIPO DE TUMOR	GRUPO CONTROL		\bar{x}		GRUPO ESTRES		\bar{x}	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
ASTROCITOMA	0	0	0	0	15 10 0.5 0.5 10	10 10 15 10 15	7.2	11.6
LIN FOMA	0	12 14	0	13	30 20 20 15	20 10 30	21.3	20
OLIGODENDROGLIOMA	10 13 13 15	13 14 10 13	12.7	10	15 20 10	10 13 10	15	11
GLIOBLASTOMA	0	0	0	0	0	10 15	0	12.5
SCHWANOMA	13	10	13	10	0	0	0	0
MENINGIOMA	15 10 13 20 10 15 13	10 10 25 13 15 10	13.7	13.8	10	0.5 15 20 20	10	13.8
GLIOMA MIXTO	12	0	12	0	0	0	0	0

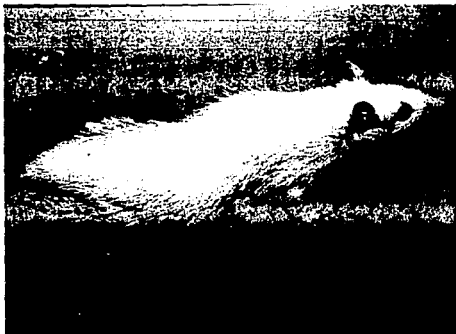
1. POSICION Y ASPECTO DE LAS RATAS AL DESARROLLAR

TUMOR CEREBRAL



2. POSICION DE LAS RATAS AL DESARROLLAR

TUMOR MEDULAR



3.



4. TUMOR DESARROLLADO EN EL MAXILAR



5. RETINOBLASTOMA



6. TUMOR DESARROLLADO EN EL ANGULO PONTO-
CEREBELOSO DERECHO



7. TUMOR QUISTICO EN EL BULBO OLFATORIO



8. TUMOR DESARROLLADO EN NERVIPO PERIFERICO



9. GRAN NEOPLASIA CEREBRAL QUISTICA



10. TUMOR DESARROLLADO EN MEDULA



11. CORTE TRANSVERSAL DE CEREBRO DE RATA CON TUMOR



3.4.1. HISTOLOGIA NORMAL DEL SISTEMA NERVIOSO. (TABLA 5).

Cerebro

Corteza cerebral.- Está constituida por neuronas, fibras, neuroglia y vasos sanguíneos. Gran parte de las células son piramidales, estrelladas o fusiformes y están dispuestas en forma laminar. En un corte se observan seis capas: capa molecular, integrada por fibras de células que vienen de capas profundas que cursan paralelas a la superficie y algunos cuerpos neuronales pequeños; capa granulosa externa de cuerpos neuronales pequeños triangulares; la capa de células piramidales o de células grandes piramidales y muchas células pequeñas granulosas; la capa granulosa interna de células granulosas estrelladas pequeñas; la capa ganglionar o piramidal interna, integrada por células piramidales de tamaño grande y mediano y la capa de células polimorfas o multiformes.

Substancia blanca.- Se encuentra por debajo de la corteza cerebral y está integrada por haces de fibras mielínicas que pasan en todas direcciones. (Fotografía A y B).

Cerebelo

Corteza cerebelosa.- Muestra tres capas: una capa externa molecular con pocas neuronas pequeñas y muchas fibras amielínicas, una capa media con una hilera de células grandes, denominadas células de Purkinje, y una capa interna granulosa con numerosos cuerpos neuronales pequeños.

Las células de la capa granulosa son pequeñas, con tres a seis dendritas cortas y un cilindro eje amielínico que asciende a la capa molecular, en donde se divide en dos ramas externas que cursan en la longitud de un pliegue.

CONTINUACION (TABLA 5)

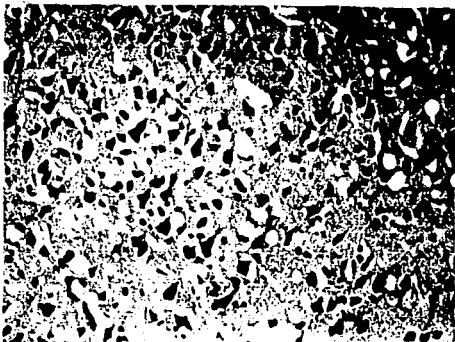
Las células de Purkinje son grandes y tienen forma de "redoma" con varias dendritas principales que entran a la capa molecular como una trama en abanico con extensiones ramificadas en sentido perpendicular al pliegue. Las células de la capa molecular son pequeñas y de forma estrellada. (Fotografía C y D).

Hipocampo.- Se encuentran gran cantidad de células piramidales y un gran número de fibras nerviosas que corren hacia la capa molecular. (Fotografía E).

Médula.- En un corte transversal se puede observar en el centro la zona de substancia gris en forma de H compuesta por neuronas y alrededor la substancia blanca compuesta por fibras nerviosas.

Núcleos basales.-Donde se encuentran gran cantidad de cuerpos neuronales y fibras nerviosas. (Fotografía F).

A) CORTEZA CEREBRAL



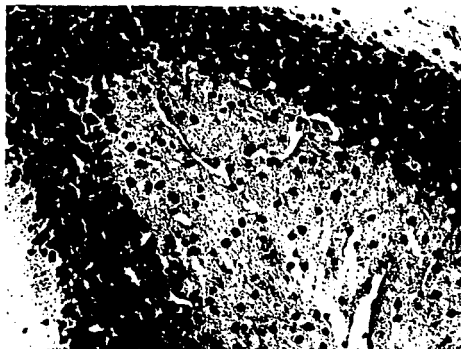
B) SUBSTANCIA BLANCA



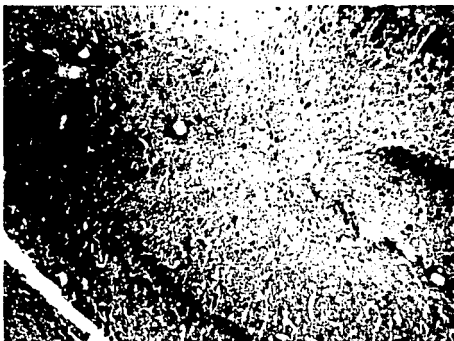
C) CORTEZA CEREBELOSA



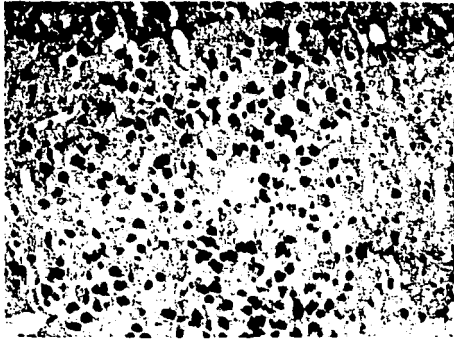
D) CELULAS DE PURKINJE



E) HIPOCAMPO



F) GANGLIOS BASALES



3.4.2. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO:

CARACTERISTICAS DE LOS DIFERENTES TUMORES

(TABLA 6)

TUMOR	CELULA DE ORIGEN	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS
Astrocitoma (Fotografía 12 y 13).	Astroцитos	Tumor difusamente infiltrante, sin límites nítidos.	Proliferación de astrocitos sin atípicas celulares con raras figuras de mitosis, sin necrosis y sin proliferación vascular.
Glioblastoma (Fotografía 14)	En la mayoría de los casos astrocitos, pero ocasionalmente células apéndice-marias u oligodendrocitos.	Tumores no encapsulados, pero aparentemente de límites nítidos, gris-rosados, de consistencia suave y aspecto finamente granular. Puede haber áreas amarillentas de necrosis o áreas de hemorragia.	Células con intensa atipia, numerosas mitosis, áreas de necrosis con pseudoempalizadas a su alrededor y proliferación vascular marcada.
Oligodendroglioma (Fotografía 15 y 16).	Oligodendrocitos	Tumor de límites aparentemente nítidos, gris-rosados, con áreas gelatinosas, áreas amarillentas de necrosis, áreas de hemorragia y calcificaciones.	Células de núcleos redondos, uniformes y citoplasma presentando típico halo perinuclear, áreas de necrosis, hemorragia, calcificación y degeneración mucóide.

CONTINUACION (TABLA 6)

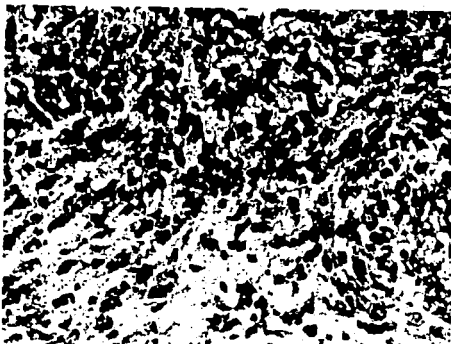
<p>Glioma mixto (Fotografía 17).</p>	<p>Depende del tumor. La mayoría incluyen astrocitos y oligodendrocitos o astrocitos y células ependimarias.</p>	<p>Generalmente uno de los tipos celulares predomina y el aspecto macroscópico se asemeja a los tumores de este tipo celular.</p>	<p>Neoplasia constituida por dos o más tipos celulares, generalmente bien diferenciados.</p>
<p>Meningioma (Fotografía 18).</p>	<p>Células aracnoidales.</p>	<p>Tumores firmes, castaños, de límites nítidos, tendiendo a ser esféricos y firmemente adheridos a la duramadre.</p>	<p>Hay diferentes tipos histológicos, muchas veces presentes en diferentes áreas del mismo tumor: meningotelial (células con núcleo esférico, citoplasma pálido, dispuestas en grupos o formando remolinos), fibroblástico (células alargadas, de núcleos densos y fusiformes, formando haces), transicionales (nódulos de células meningoteliales separadas por haces de meningioma fibroblástico) y angioblásticos (de comportamiento clínico más agresivo).</p>

CONTINUACION (TABLA 6)

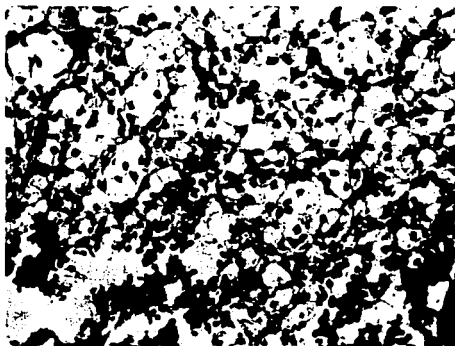
Schwanoma	Células de Schwann	Tumores de nervios periféricos, que aumentan el diámetro del nervio y que pueden ser disectados de éste, con relativa preservación de la función.	Hay dos áreas o tejidos: Antoni A, compuesto de células alargadas formando haces y Antoni B, con células de citoplasma vacuolizado y núcleo redondeado.
Linfoma	Discutida; células reticulares por células de la microglía.	De límites poco nítidos, muchas veces multifocal y puede infiltrar las meninges.	Proliferación de células de tamaño y forma variables con muchas células linfocitoides. Tienden a formar manguitos perivasculares.

Lucien J. Rubinstein, M.D.: Tumors of the central nervous system. Ed. AFIP. 1985, (16).

12. ASTROCITOMA CEREBRAL
(100 aumentos)



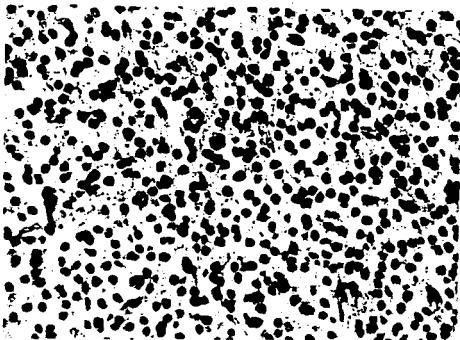
13. ASTROCITOMA CEREBELAR
(125 aumentos)



14. GLIOBLASTOMA MULTIFORME
(100 aumentos)



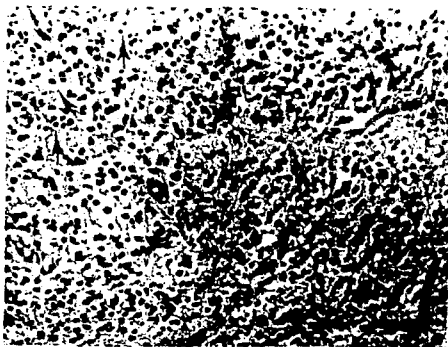
15. OLIGODENDROGLIOMA
(100 aumentos)



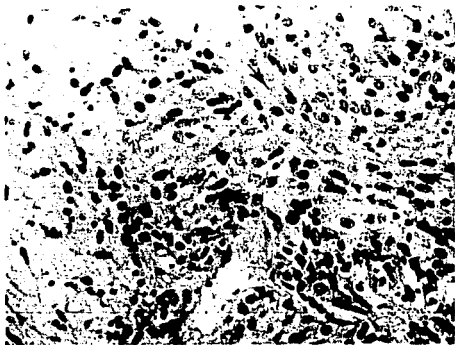
16. PERIFERIA DEL OLIGODENDROGLIOMA
(40 aumentos)



17. GLIOMA MIXTO
(40 aumentos)



18. MENINGIOMA
(40 aumentos)



DISCUSION

Una gran cantidad de reportes han postulado la posibilidad de que el estrés modifique la evolución de las neoplasias. Shekelle y cols. por ejemplo, reportaron que la depresión aumenta al doble el riesgo de cáncer (21). Pettingale y cols. (11) han reportado diferencias en la evolución de carcinomas mamarios dependiendo de si la actitud de la paciente es de lucha, aceptación o desesperación, cuando la actitud es de lucha, mostraron una evolución significativa más favorable, si la actitud es de rechazo, aceptación o desesperación, registraron niveles más altos de estrés que pacientes con tumores mamarios benignos y malignos (20). Cassileth y cols., en un estudio prospectivo con 359 pacientes con neoplasias malignas, demostraron que la biología de la enfermedad parece predominar sobre la influencia potencial del estilo de vida o variables psicosociales (6).

Experimentalmente se ha reportado que, cuando células tumorales P815 y sarcomas Walker 256 fueron transplantadas respectivamente en ratones y ratas, el crecimiento del tumor fué mayor en animales estresados en forma aguda comparativamente a los controles (29). Sin embargo, las células malignas transplantadas tienen diferentes cargas genéticas y mecanismos de patogénesis tumoral que no han sido dilucidados.

En el presente estudio el estrés se inició desde temprana edad, y se mantuvo crónicamente, cuando las ratas tenían

buena salud y los mecanismos celulares de transformación maligna no se llevaba a cabo; entonces si el mecanismo de inmunidad molecular que controla la malignidad fuera influenciada por el estrés, se esperaría encontrar un menor desarrollo de neoplasias inducidas por etilnitrosourea en animales no estresados o una alta incidencia de tumores en animales estresados; sin embargo lo que muestran estos resultados es lo contrario, parece que el estrés no tiene ninguna influencia sobre carcinogénesis como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4; donde los controles fueron comparados con los animales estresados, por lo tanto las variables genéticas, biológicas y experimentales fueron las mismas. La larga duración de las circunstancias estresantes pudo haber inducido tolerancia al sonido o dolor en los animales experimentales pero hubo cambios en los animales durante el tiempo que se mantuvieron sujetos al estrés como son: temblor de todo el cuerpo, lloriqueo, defecación excesiva, agresividad etc. lo cual no se presentó en los animales controles.

Se han descrito muchos cambios secundarios al estrés en el sistema inmune (disminución de los linfocitos T citotóxicos e inmunosupresión); en el sistema endócrino (aumento de hormonas como corticosterona y norepinefrina en plasma), y en el sistema nervioso cambios secundarios al estrés, como en el funcionamiento de las neuronas, y esos cambios pudieran teóricamente influenciar el desarrollo biológico de las neoplasias. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que el estrés crónico tenga influencia en el desarrollo de tumores

inducidos químicamente y hay que desechar la idea de que el estrés tenga un efecto potencial sobre la carcinogénesis.

Estadísticamente no se encontraron diferencias en frecuencia o en tiempo de desarrollo del tumor entre animales controles y animales estresados; la frecuencia fué ligeramente más alta en machos del grupo estrés, que en los del grupo control; sin embargo, ésta diferencia no fué significativa, dado que los valores de p obtenidos a partir del estudio estadístico de t student fué $p \geq 0.05$ y para la χ^2 fué $p \geq 0.01$, lo cual indica que no existe diferencia significativa entre los dos grupos.

En el estudio histopatológico no se observa ninguna variación en cuanto a la morfología celular de los tumores desarrollados en el grupo estrés comparado con los controles. La medida de los tumores es igual a la ya reportada por Druckrey y cols. (7), por lo cual se corrobora que éste método de inducción de tumores es reproducible.

RESUMEN

Estados psicológicos involucran la pérdida de control, depresión y además está asociado con un aumento en la incidencia del cáncer (1). La influencia de variables psicológicas sobre el desarrollo del cáncer es difícil de determinar en humanos. Algunos investigadores han reportado que el estrés induce aumento de la tumorigenicidad, y otros han encontrado retardo en el desarrollo de tumores. La hipótesis de este trabajo se basa en estos estudios y otros similares, donde el provocar estrés crónico en ratas Wistar expuestas al carcinógeno químico etilnitrosourea afecta la incidencia de tumores del sistema nervioso.*

Por lo tanto, para corroborar esto, se realizó un estudio de estrés crónico y cáncer en ratas con las cuales se formaron dos grupos: el grupo control con 41 animales y el grupo experimental con 45 ratas. El grupo control solo fué expuesto al carcinógeno químico ENU y el grupo experimental fué expuesto al carcinógeno químico ENU y además se les produjo estrés crónico desde los 60 días hasta los 400 días de edad por vía visual, auditiva y sensorial, aplicándose electrochoques de 30 mA, con 0.75 segundos de duración, cada 5 minutos durante 35 minutos, durante 5 días a la semana. Una vez observados los datos clínicos del tumor, los animales fueron sacrificados para proseguir con el estudio histopatológico.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

El desarrollo de neoplasias se presenta en el 63% de los animales control y el 69% de los animales del grupo estresado, con un promedio de manifestación clínica de 260 ± 78 y 262 ± 91 días respectivamente. En el análisis por sexo, se encontró que el 59% de machos y 68% de hembras del grupo control desarrollaron neoplasias y en el grupo experimental el 72% de machos y 65 de hembras. El tiempo promedio de manifestación clínica para el grupo control fué de 253 ± 68 y 267 ± 88 días respectivamente, y para el grupo experimental fué de 260 ± 96 y 264 ± 86 días respectivamente.

En el estudio histopatológico se encontró que la morfología celular es igual para los tumores de ambos grupos y estadísticamente no hay diferencias significativas para $p \geq 0.05$ en la t student y $p \geq 0.01$ para ji cuadrada entre grupos y sexos.

Al haber realizado este estudio se llegó a la conclusión de que el estrés no tiene ninguna influencia en la carcinogénesis producida por carcinógenos químicos

CONCLUSIONES

El modelo desarrollado por Druckrey y cols. (7), pudo ser reproducido en el laboratorio, puesto que se indujo la aparición de tumores en 89% de los animales tratados. Por lo tanto, se puede considerar un modelo útil de carcinogénesis, que además permite la manipulación de variables extrapolables al hombre, ya que se considera que el hombre está expuesto al estrés durante períodos a veces prolongados en el transcurso de su vida.

Este estudio sugiere que el estrés no tiene relación con el desarrollo de neoplasias del sistema nervioso, aunque algunos autores han reportado que influye en el sistema inmune, hormonal y nervioso. Sin embargo para tener una visión más completa, se tendría que realizar nuevamente pero registrando la actividad de estos sistemas, lo cual no fué contemplado en los objetivos del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ader R.: Psichoneuroimmunology. Ed. New York Academic Press. 1981.
- 2.- Baker D.F.: Influence of a chronic environmental stress on the incidence of methylcolantrene induced tumors. Cancer Research 37: 3939-44, 1977.
- 3.- Berg P.: The viral genome in trasformed cells. Porc. Roy. Soc. London (Biool.). 177: 65, 1971.
- 4.- Brookes P. and Lawly P.D.: The reactions of mono and difunctional alkylating agents with nuclear acids. Biochem. J. 80: 496, 1981.
- 5.- Cairns J.: The origin of human cancers. Nature. 289: 353-57, 1981.
- 6.- Cassileth B.R., Lusk E.J., Brown L.L., Miller C.: Psycho-social correlates of survival in advanced malignant disease. N. Engl. J. Med. 312: 1551-55, 1985.
- 7.- Druckrey H., Ivankovic S. and Preussman R.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single enjection of etylntirosourea to pregnant rats. Nature. 210: 1378-79, 1966.

- 8.- Fox B.H., Newverry B.J.: Impact of psychoendocrine systems in cancer and immunity. J. Behav. Med. 1: 45-133, 1984.
- 9.- Furst A. and Haro R.T.: Possible mechanism of metal ion carcinogenes. In Bergmann E.D. and Pullman, B. (Eds). New York U.S.A., 1964.
- 10.- Greene M.: Effect of oncogenic DNA viruses on regulatory mechanism of cells. Fed. Proc. 29: 1265, 1970.
- 11.- Greer H.S., Morris T., Pettingale K.W. Psychological response to breast cancer: Effect on outcome. Lancet II: 785-87, 1985.
- 12.- Hall J.G.: Emotin and Immunity. Lancet II: 326-27, 1985.
- 13.- Hosobuchi Y. and Ishii S.: A new approach to hidrocarbon-induced brain tumors. Arch. Neurol. 16: 664-75, 1967.
- 14.- Kaliss N. and Fuller J.L.: Incidence of lymphatic leukemia and methylcolantrene induced cancer in laboratory mice subjected to stress. Journal of the National Cancer Institute. 41: 967-81, 1968.
- 15.- Lacrum O.D., Rajemsky M.F.: Heterogeneity and selection of neoplastic neurogenic rat cells in vivo and in vitro. Anticancer Res. 3 (3): 187-94, 1983.

- 16.- Lucien J., Rubinstein M.D.: Tumors of the central nervous system. Ed. AFIP. Washington D.C., 1985.
- 17.- Mackawa A., Matsuoka C.: Organ-specific carcinogenicity of N-methyl-N-Nitrosourea in F 344 and ACI/N rats. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 109 (3): 178-82, 1985.
- 18.- Maddox J.: Psychoimmunology before its time. Nature 309: 400-1, 1984.
- 19.- Meares A.: Cancer, Psychosomatic illness and hysteria. Lancet II: 1037-38, 1981.
- 20.- Priestman T.J., Prestman S.G., Bradshaw C.: Stress and breast cancer. Br. J. Cancer 51: 492-98, 1985.
- 21.- Skekelle R.B., Raymor W.J. Osterfeld A.M., Garron D.C.: Psychological depression on 17 year resk of death from cancer. Psychosom. Med. 43: 117-125, 1981.
- 22.- Snell K.C., Stewart H.L., Morris H.P., Wagner B.P. and Ray F.E.: Intracranial neurelemoma and meduloblastoma induced in rats by the dietary administration of N,N-2,7 Fluorenylene bisacitamide. Nat. Cancer Inst. Monogr. 51: 85-103, 1961.
- 23.- Steren R.: N-Nitroso compound: A perspective on human exposure. Lancet 629-31, 1983.

- 24.- Stoica G., Koestner A.: Diverse spectrum of tumors in male sprague-Damly rats following single high doses of N-Nitrosourea (ENU). Am. J. Pathol. 116 (2): 319-26, 1984.
- 25.- Stroobant G., Brucher J.M.: Etude de tumeurs nerveuses obtenues par l'administration de methylnitrosoureae au rat. Neurochirurgie 14: 515-35, 1968.
- 26.- Suienson R.W. and Vogel N.H.: Plasma catecholamina and corticosterona as well as brain catecholamina changes during coping in rats exposed to stressful foot shock. Pharmacology Biochemistry and behavior 18: 689-93, 1983.
- 27.- Thomas D.G.Y., Graham D.I.: Brain Tumors: Scientific Basis, Clinical Investigation and Current Therapy. Ed. Butterworths 1980.
- 28.- Vigier P.: RNA oncogenic viruses: structure replication and oncogenicity. Progr. Med. Virol. 12: 240, 1970.
- 29.- Visitainer M.A.: Tumor rejection in rats after inescapable or escapable shock. Science 216: 437-39, 1983.
- 30.- Willis R.A.: The spread of tumors in the human body. Ed. London, Butterworth and Co., England, 1952.

- 31.- Yoshihara H., Tanaka N., Osita K.: Suppression of natural killer cell activity by surgical stress in cancer patients and the underlying mechanisms. Acta Med. Okayama 40 (2): 113-19, 1986.
- 32.- Zimmerman H.M. The natural history of intracranial neoplasms, with special reference to the gliomas. Amer. J. Surg. 93: 913-24, 1957.

APENDICE

8.1. MATERIAL

8.1.1. Material biológico

- 30 ratas de la cepa Wistar

8.1.2. Material de laboratorio

- Cámara de estrés experimental (Fabricada en el laboratorio de Bioingeniería del I.N.N.N.)
- Cajas de acrílico de 47x32x20cm (Complan, S.A., México)
- Nutricubos Purina, alimento para roedores
- Jeringas desechables de 1 ml
- Cajas de Koplín
- Vasos de precipitado de 250, 500 y 1000 ml
- Probetas de 250 ml
- Frascos ámbar para almacenar los colorantes
- Agitadores magnéticos
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Balanza analítica (Sartorius 1265 MP)
- Cubre bocas
- Guantes desechables

8.1.3. Reactivos

- Etilnitrosourea (ENU) NO. N-8509, (Sigma Chemical Company, U.S.A.)
- Solución de cloruro de sodio (NaCl) 0.9% (PISA)
- Eter (Merck)

- Formalina al 37% (Baker)
- Fosfato de sodio dibásico anhidro, Na_2HPO_4 (Baker)
- Fosfato de sodio monobásico, NaH_2PO_4 (Baker)
- Agua destilada
- Alcohol absoluto
- Alcohol de 96°
- Yodo
- Tiosulfato de sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Baker)
- Hematoxilina de Harris
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Baker)
- Oxido mercúrico, HgO (Baker)
- Acido clorhídrico, HCl (Baker)
- Hidróxido de amonio, NH_4OH (Baker)
- Acido acético, CH_3COOH (Baker)
- Eosina

8.2. PREPARACION DE REACTIVOS

SOLUCION DE FORMALINA NEUTRAL AMORTIGUADA

Formalina al 37%	100 ml
Fosfato de sodio monobásico	4 g
Fosfato de sodio dibásico	6.5 g
Agua destilada	900 ml

SOLUCION ALCOHOLICA DE YODO AL 1%

Yodo	1 g
Alcohol del 96°	100 ml

SOLUCION DE TIOSULFATO DE SODIO AL 5%

Tiosulfato de sodio	5 g
Agua destilada	100 ml

ALCOHOL ACIDO AL 1%

Alcohol al 70%	250 ml
Acido clorhidrico	2.5 ml

AGUA AMONICAL

Hidróxido de amonio	2.5 ml
Agua corriente	250 ml

EOSINA

Eosina	2 g
Alcohol de 96°	640 ml
1 gota de ácido acético por cada 100 ml	

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina de Harris	5 g
Sulfato de amonio	100 g
Oxido mercurico	2.5 g
Agua destilada	1000 ml
Alcohol de 96°	50 ml

Preparación:

Disolver 5 g de hematoxilina de Harris en 50 ml de alcohol de 96°. Disolver 100 g de sulfato de amonio en 1000 ml de agua, y calentar hasta disolver completamente. Agregar la solución de hematoxilina, y calentar 1 minuto, enfriar, filtrar 10 veces y después agregar de 2 a 4 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml.

8.3. TECNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

- 1.- Hacer cortes de 4 micras del tejido incluido en parafina.
- 2.- Desparafinar en xilol durante 15 minutos, pasar a alcohol absoluto 3 minutos, alcohol de 96° 3 minutos, alcohol al 70% 3 minutos y, por último hidratar en agua bidestilada 3 minutos.
- 3.- Colocar las preparaciones o cortes histológicos en un mordiente a base de solución alcohólica de yodo al 1% durante 10 a 15 minutos.
- 4.- Lavar con agua de la llave.
- 5.- Colocarlas en una solución de tiosulfato de sodio al 5% durante 5 minutos.
- 6.- Lavar 3 minutos con agua de la llave.
- 7.- Pasar por agua destilada.
- 8.- Teñir con hematoxilina de Harris de 10 a 15 minutos.
- 9.- Lavar con agua corriente y después con agua destilada por 3 minutos.
- 10.- Decolorar con alcohol ácido al 1% durante 15 segundos.
- 11.- Lavar con agua destilada rápidamente.
- 12.- Agregar al tejido, agua amoniacal hasta obtener el viraje (de púrpura a azul).
- 13.- Lavar con agua corriente por 5 minutos.
- 14.- Enjuagar con agua destilada por 1 minuto.
- 15.- Colocar las preparaciones en eosina durante 15 segundos a 2 minutos.
- 16.- Eliminar el exceso con alcohol al 70%, durante 2 minutos agitando continuamente.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 17.- Deshidratar en alcohol de 96° por 5 minutos. .
- 18.- Después en alcohol absoluto, 5 minutos.
- 19.- Aclarar en xilol, 2 cambios de 3 minutos cada uno.
- 20.- Montar con resina ó bálsamo de Canadá.