

La histoquímica del cáncer

MIGUEL GUERRERO ALCAZAR*

SI SE TIENE cierta experiencia como morfologo, con suficiente práctica en el microscopio, es posible distinguir, con cierto margen de seguridad si una preparación microscópica en estudio es o no neoplásica. En proporción directa a la experiencia de quien estudia dicha preparación, quizá se llegue a diagnosticar la variedad de neoplasia recurriendo a tinciones con hematoxilina y eosina y posiblemente a un corto número de técnicas histológicas especiales que hagan resaltar alguna o algunas de las características de dichas neoplasias, ya que aquí, el aspecto morfológico tiene, por sí solo, importancia fundamental. Quede entonces consignado que en el estudio morfológico de una neoplasia no hay sustituto para la experiencia que implica haber visto muchas neoplasias y que el criterio diagnóstico fundamental es el aspecto morfológico.

¿Cuál es entonces el propósito del estudio histoquímico de las neoplasias? La opinión general de los investigadores es en el sentido de que los estudios histoquímicos tienen por objeto abordar el problema del cáncer (usando el término cáncer como sinónimo de neoplasia maligna), desde el punto de vista de la investigación, ya que las técnicas histológicas convencionales, por sí solas, en manos experimentadas, son decisivas desde el punto de vista diagnóstico.

MÉTODOS

Los métodos histoquímicos empleados en el estudio del cáncer son reflejo de las inquietudes de los bioquímicos cuando abordan la oncología desde su punto de vista. Como en el caso de los estudios bioquímicos, los

* Del Curso de Anatomía Patológica para graduados dirigido por el Dr. Isaac Costero. Instituto Nacional de Cardiología.

estudios histoquímicos carecen de cohesión, en el sentido de que no se les puede integrar en un cuerpo de doctrina.

Esta falta de cohesión es evidente si se considera que falta un factor común al problema de la carcinogénesis. Por tanto, los métodos se refieren a estudios sobre caracteres aislados de las neoplasias y como tales serán expuestos aquí.



Figura 1. Canales normales de glándula mamaria. Dos estructuras fibrosas se ven en la pared, circular y longitudinal. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.



Figura 2. Lóbulo normal de glándula mamaria en fase de evolución temprana. No hay diferencia significativa entre el estroma inter e intralobular. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.

ACIDOS NUCLÉICOS Y NUCLEOPROTEÍNAS

Nadie desconoce el papel de los ácidos nucleicos como transmisores de las características genéticas, a tal grado que se cree que los genes son moléculas de ácidos nucleicos, fundamentalmente de ácido desoxirribonucleico. Hay evidencia^{1,2} de que el ácido desoxirribonucleico (DNA) se combina con una histona y de que el ácido ribonucleico (RNA) se

combina con una proteína que no es histona, lo que sugiere una organización dual, química y funcional de los cromosomas. La presencia de RNA en el núcleo ha sido comprobada por Mellors y Hlinka³ y por Mellors, Stoholski y Beyer⁴ y representa el 15 por ciento del contenido nuclear. El DNA representa el 25 por ciento.

Caspersson y Santesson⁵ intentaron establecer los atributos morfológicos de las células cancerosas en términos de su contenido relativo de nucleoproteínas, su tipo y distribución, e incluían un gran núcleo con exceso de cromatina, rico en complejo DNA-proteína, gran nucléolo con RNA-proteína, citoplasma fuertemente basófilo que también contiene RNA-proteína etc.

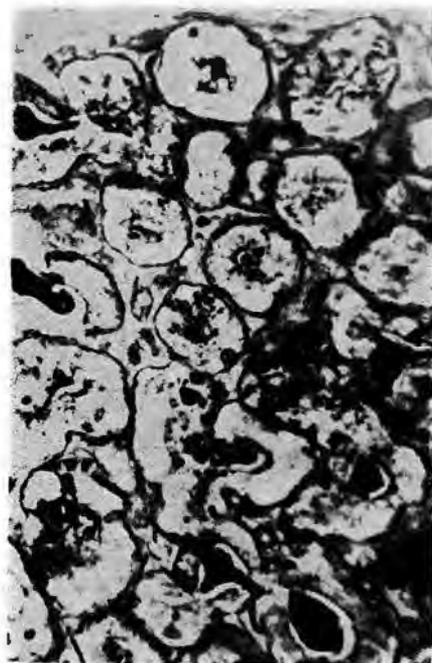


Figura 3. Lóbulo normal de mama en fase evolutiva tardía. Granulos PAS positivos intracitoplásmicos, evidentes, así como acumulación de material secretado en la luz. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.



Figura 4. Glándula mamaria menopáusic normal; no hay diferencia entre el estroma interlobular y el pericanalicular. Membranas basales bien conservadas. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.



Figura 5. Metaplasia apoerina en mastopatía quística. Los gránulos de secreción son claramente visibles en la célula. X 400 Técnica de Ritter y Oleson.

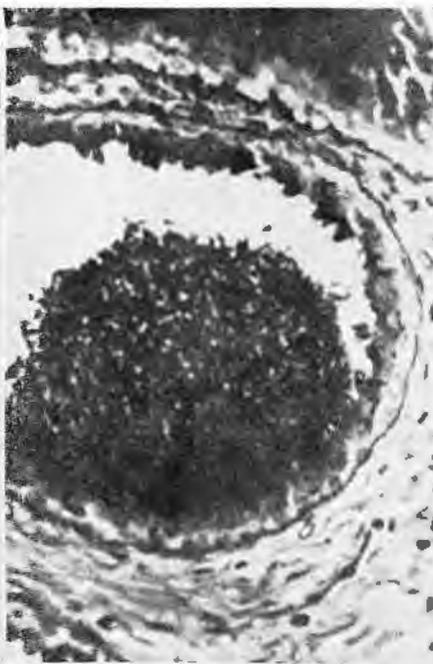


Figura 6. Mastopatía fibroquística. Las membranas basales están bien definidas. No hay cantidad importante de mucopolisacáridos ácidos en el estroma. X 200. Técnica de Ritter y Oleson.

Los métodos histoquímicos empleados en el estudio de las nucleoproteínas son los siguientes: reacción de Feulgen; método de la pironina-verde de metilo de Unna-Pappenheim; métodos de extracción con ácido tricloroacético, desoxirribonucleasa y ribonucleasa; método de los hidroxifluorones de Turchini; métodos de absorción de rayos ultravioleta. Casi todos los métodos anteriores pueden usarse en forma cuantitativa.

En el carcinoma espinocelular cutáneo, respiratorio, vesical o uterino, está aumentado el contenido de DNA en relación con el de las células homólogas normales en un 90 por ciento^{6, 7, 8 y 9}. En adenocarcinomas y cánceres variados, se ha encontrado un aumento de DNA en 60 por ciento de las lesiones estudiadas. En el ratón se encontró aumentado en siete tipos de carcinomas, un melanoma, cuatro sarcomas y en uno de tres linfomas^{10, 11, 12, 13, 14 y 15}. En los carcinomas *in situ*, las leucoplasias

y varias lesiones precancerosas, el contenido en DNA también está aumentado pero de modo menos constante. En general, de los tumores pigmentarios de la piel, los que más contienen DNA son el carcinoma basocelular y el melanoma maligno; en cambio, los núcleos del nevo azul contienen poco¹⁶.

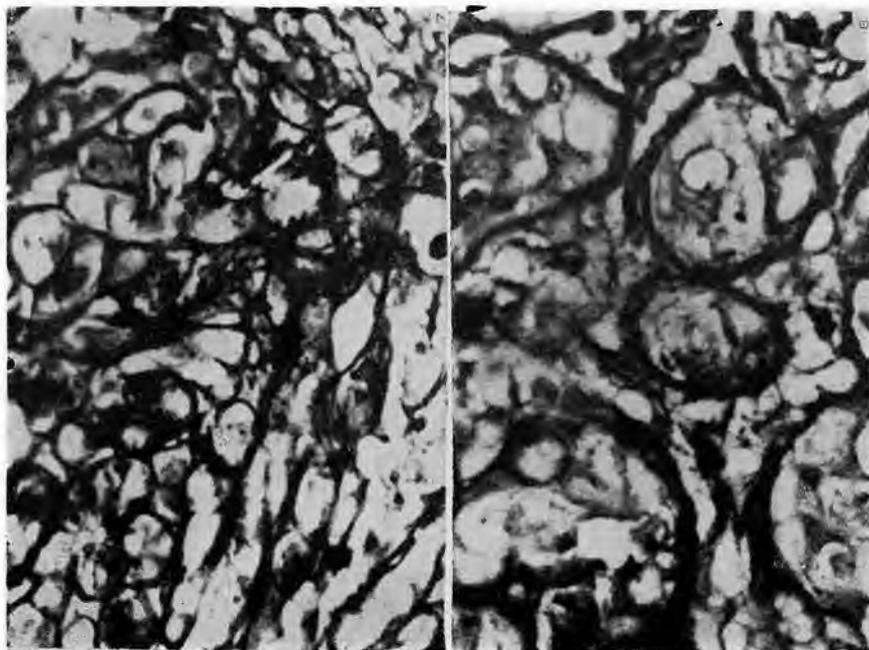


Figura 7. Adenosis esclerosante en glándula mamaria adulta. Se ve distorsión arquitectónica con pérdida de las membranas basales. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.

Figura 8. Carcinoma lobular in situ de glándula mamaria. Los núcleos de células neoplásicas están rodeados por una membrana basal. En la preparación teñida el estroma intralobular es azul. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.

CARBOHIDRATOS

Las técnicas histoquímicas para carbohidratos han sido empleadas más como técnicas histológicas especiales que como técnicas histoquímicas propiamente dichas. Así, Ozzello¹⁷ y Ozello y Speer¹⁸ han encontrado alteraciones importantes en la membrana basal de los conductos galactóforos en casos de carcinoma mamario de origen intracanalicular.

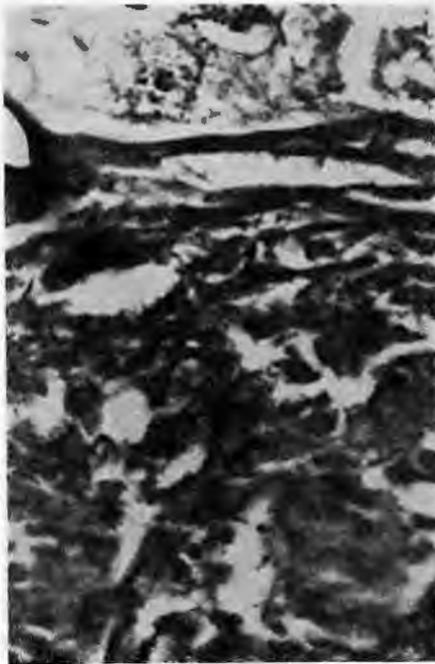


Figura 9. Carcinoma intracanalicular de glándula mamaria. Un foco de carcinoma intracanalicular rodeado por una clara membrana basal se ve en la parte alta de la fotografía. Abajo, los nidos de carcinoma infiltrante carecen de membrana basal. Estroma en azul. X 400. Técnica de Ritter y Oleson.

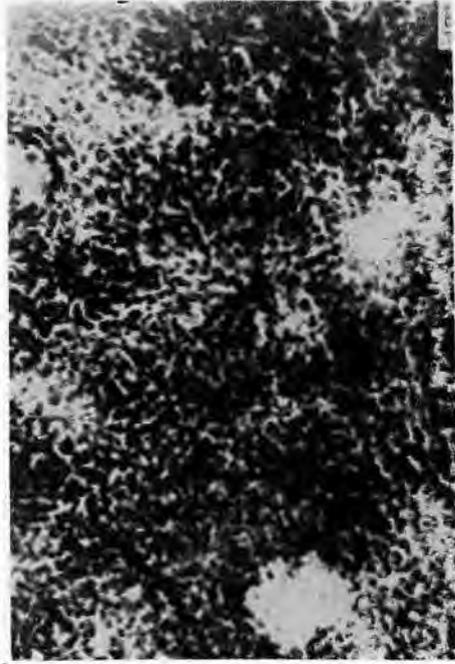


Figura 10. Sarcoma primario de células reticulares. Fosfatasa ácida en negro. Corte por congelación. Método de Gomori.

La fusión de las membranas basales coinciden con alteraciones que permiten colegir que el carcinoma probablemente está a punto de producir metástasis, cuando se estudian con ácido peryódico-Schiff o con hierro coloidal-PAS según técnica de Ritter y Oleson. El ácido peryódico-Schiff y el azul alciano pueden servir con ventaja para confirmar la naturaleza mucoide de un carcinoma gástrico o de un tumor de Krukenberg, por ejemplo.

ENZIMAS

Greenstein¹⁰ ha estudiado la actividad enzimática de los tejidos normales y de los neoplásicos transplantados a ratones y ratas, y ha for-

mulado algunas conclusiones generales relacionadas con la actividad enzimática de las neoplasias. Cada tejido normal se caracteriza por un tipo de distribución de la actividad enzimática que puede distinguirlo de otros tejidos. Aunque los tumores tienen cualitativamente las mismas enzimas que los tejidos normales, frecuentemente ocurre una reducción cuantitativa, sobre todo en enzimas de gran actividad de modo que los valores enzimáticos para los tumores, habitualmente caen hacia los extremos de la escala de valores normales y los tumores tienden a converger, enzimáticamente, a un tipo común de tejido. Sin embargo, un tumor puede, en sus primeras etapas, retener algo de la actividad enzimática del tejido que le dió origen.

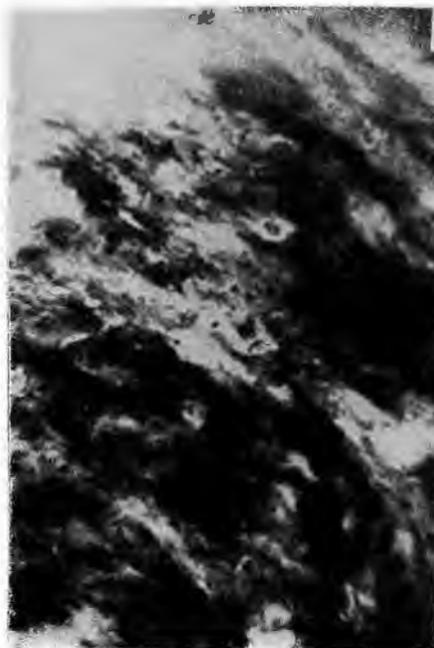


Figura 11. Hueso: sarcoma osteogénico de un tipo que produce muy poco tejido osteoide. Fosfatasa alcalina en negro en células tumorales malignas que en este campo están infiltrando tejido conectivo el cual carece de actividad. Corte por congelación. Método de Gomori.

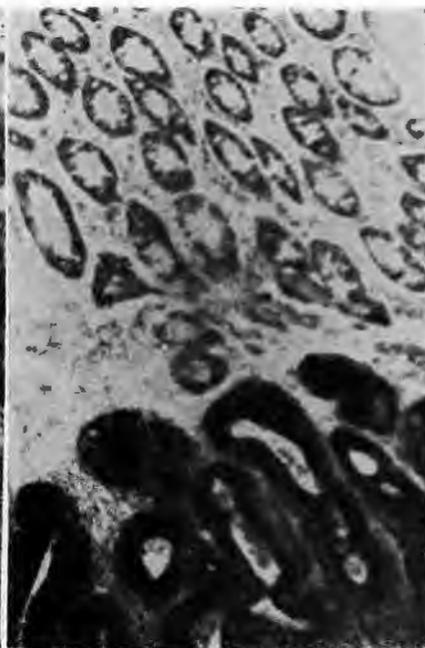


Figura 12. Adenocarcinoma primario de colon. La actividad de la fosfatasa (en negro), en células cancerosas es alta en contraste con la del tejido epitelial normal homólogo (gris pálido). Método de Gomori.

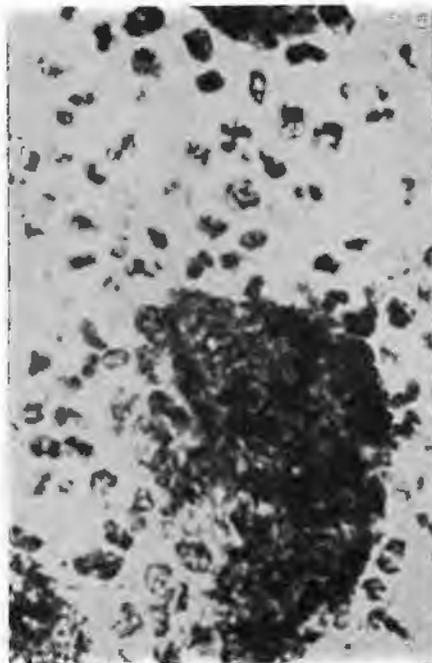


Figura 13. Osteoclastoma. Células gigantes con intensa actividad de la fosfatasa ácida. Método del fosfato de plomo. X 210.



Figura 14. Hueso craneal fetal que muestra intensa actividad de la fosfatasa ácida en un osteoclasto apoyado contra el periostio de la tabla interna. Método de azorreactivos. XX 210.

Fosfatasa

La actividad más intensa de la fosfatasa ácida, según puede demostrarse histoquímicamente ocurre en el epitelio prostático, benigno o maligno del hombre. No hay diferencia en la actividad de las fosfatasa ácidas entre los adenocarcinomas muy diferenciados y los poco diferenciados en la próstata normal o en tumores prostáticos benignos. Las metástasis de los tumores prostáticos tienen también alto contenido en fosfatasa ácidas y este es un carácter diferencial entre las metástasis de adenocarcinomas de origen prostático y las de tumores de otros sitios; este hecho puede ser aprovechado desde el punto de vista terapéutico paliativo^{20, 21}. Algunos carcinomas mamarios se han identificado histoquímicamente como de origen prostático más bien que inducidos por acción hormonal

por prolongada terapéutica estrogénica administrada como tratamiento paliativo del carcinoma prostático.

Todas las células gigantes, incluyendo osteoclastos y macrófagos contienen fosfatasa ácida. En las células gigantes de los huesos, la fosfatasa ácida está presente no solo en las células tumorales multinucleadas gigantes, sino también en las células del estroma del tumor, por lo que puede diferenciarse de tumores que no sean de hueso. El sarcoma de células reticulares, de origen óseo, en cambio, tiene moderada actividad de fosfatasa ácida, mientras que el tumor de Ewing y el sarcoma osteogénico casi no contienen. El sarcoma de células reticulares de hueso en cambio no muestra actividad de fosfatasa alcalina, el sarcoma de Ewing tiene poca actividad y el sarcoma osteogénico tiene mucha²². Los tejidos epiteliales normales (excepto el prostático), tienen muy poca actividad de fosfatasa. Sin embargo, cuando dichos tejidos sufren una alteración neoplásica, aumenta la actividad de la fosfatasa ácida, particularmente en pólipos y carcinomas del estómago e intestino^{23, 24}.

Los sarcomas de partes blandas no tienen habitualmente actividad de fosfatasa ácida²³. Hay fosfatasa ácida en el nevo de unión, en los nevos diferenciados y en el melanoma maligno, mientras que el nevo intradérmico tiene menor actividad²⁰, observación esta que apoya, al menos en parte, el concepto de que los melanomas son de origen epidérmico más bien que de origen neural, según opina Allen²⁵.

La localización histoquímica más intensa para la fosfatasa alcalina se encuentra en los osteoblastos benignos y malignos y en las células endoteliales²². La displasia fibrosa y el fibroma osificante contienen abundante fosfatasa alcalina; asimismo el sarcoma osteogénico, aunque no tenga actividad osteoblástica muestra gran actividad de fosfatasa alcalina²⁶. La demostración histoquímica de la fosfatasa alcalina en las células del tejido tumoral afirma el tipo osteoblástico y sirve para distinguirlos de los fibroblásticos y osteoclastos como el fibrosarcoma medular y el tumor de células gigantes o de la reacción simpática del fibrosarcoma, del sarcoma de células reticulares y de otras neoplasias óseas, que tienen baja actividad de la fosfatasa alcalina. El hallazgo de fosfatasa alcalina en frotis por aspiración es útil en el diagnóstico^{27, 28}. La actividad de la fosfatasa alcalina persiste en tumores de hueso que han sufrido trasplantes sucesivos como ocurre con el sarcoma de Wagner todavía positivo después de 139 trasplantes y con el de Ridgeway también positivo después de 67 trasplantes aunque para entonces ya no se podía cla-



Figura 15. Pólipo mucoso maligno. Superficie del pólipo hacia la derecha. Las zonas oscuras muestran alteraciones malignas en ambas tinciones: histoquímica (deshidrogenasa succínica) y hematoxilina eosina. X 40.



Figura 16. Hiperplasia focal. Glándulas mucosas normales hacia la derecha y glándulas hiperplásicas a la izquierda X 85 (Colon).

sificar a ninguno de los dos tumores como osteogénicos por su aspecto morfológico²².

El epitelio intestinal, el de los conductos biliares y el cartílago muestran moderada actividad de fosfatasa alcalina. Los tumores de la corteza suprarrenal y los sinoviomas muestran actividad de fosfatasa alcalina, mientras que el linfoblastoma, el neuroblastoma y el sarcoma de células reticulares no. Al investigar la especificidad histoquímica de las fosfatasas, Comori²⁹ encontró que la distribución de la fosfamidasa a pH 5 era única en su género. Encontró grandes cantidades en los tumores epiteliales malignos, particularmente en los carcinomas de aparato digestivo, próstata, mama, pulmón y riñón. La intensidad de la reacción parece estar en razón directa del grado de malignidad, con una curiosa excepción:

todos los pólipos del intestino grueso, independientemente de que sean benignos o malignos, tienen gran actividad de fosfamidasa en el epitelio.

Otras enzimas hidrolíticas

Aunque hay muchas esterasas hidrolíticas en los epitelios normales, la mayoría de los carcinomas estudiados histoquímicamente no tienen actividad esterásica. Notables excepciones a esta regla son los carcinomas papilíferos e indiferenciados del tiroides y algunos carcinomas espinocelulares del esófago y de los bronquios. Algunos hepatomas contienen lipasa (esterasa que hidroliza lípidos), mientras que los colangiomas y los carcinomas metastásicos a hígado no la contienen²². En la carcinogénesis hepática inducida en la rata por el p-dimetilaminoazobenceno, hay disminución y pérdida de la actividad lipásica en las lesiones precancerosas así como en los tumores derivados de dichas lesiones. La actividad de esterasas está frecuentemente disminuída en hepatomas que se originan en ratones alimentados con tetracloruro de carbono³¹.

La beta glucuronidasa se encuentra bioquímicamente en concentraciones altas en los órganos que responden a estímulos estrogénicos y en cánceres que se originan en los órganos antedichos, sobre todo en mama, útero y ovario³². La actividad de esta enzima ha sido demostrada histoquímicamente en el epitelio canalicular de tumores benignos y en células carcinomatosas de la glándula mamaria humana³³.

Enzimas respiratorias

Llamamos enzimas respiratorias o de óxido-reducción, a aquellas que activan dos hidrógenos de un metabolito del ciclo metabólico común o de otros puntos del metabolismo intermediario, y los transportan a una serie constante de compuestos que actúan como transportadores de hidrógeno que finalmente se unen al oxígeno para formar agua. El paso de electrones (de los hidrógenos) por esta cadena de transportadores tiene como efecto la liberación gradual de energía que contiene una molécula de glucosa. Esta energía química es atrapada en un enlace químico en el sitio donde se libera, por la unión del difosfato de adenosina con un ion fosfato inorgánico del medio interno. La energía se atrapa en el enlace de dicha unión. Se forma así el trifosfato de adenosina (ATP), que es un acumulador químico de energía y que es fácilmente hidrolizado por la adenosín trifosfatasa, para poner en libertad la energía atrapada, de modo que el organismo pueda usarla en sus funciones vitales: reacciones de

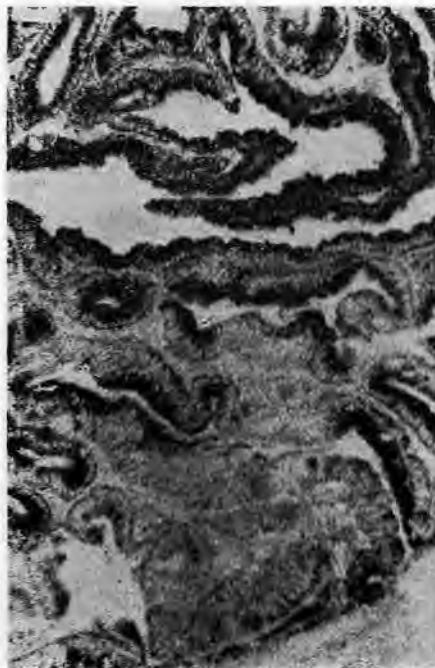


Figura 17. Carcinoma. Nótese la relativa intensidad de la tinción periluminal. Deshidrogenasa succínica. X 100 (Colon).



Figura 18. Carcinoma de colon. Diaforasa ligada al DPN. Nótese la intensa tinción de las glándulas tumorales, algunas de las cuales tienen epitelio relativamente plano. X 140.

síntesis orgánicas, contracción muscular, secreción, energía nerviosa, etc. Tanto el paso de electrones por la cadena de aceptores como el atrapamiento de energía por los fosfatos de adenosina son reacciones acopladas. Al fallar una, falla la otra y el individuo muere por anoxia tisular. Las sales de tetrazolio se reducen (aceptan hidrógenos), en presencia del metabolito adecuado, cuando la enzima respiratoria específica está presente en el tejido. Las sales de tetrazolio son sales incoloras, solubles en agua, que al ser reducidas forman compuestos cromáticos, insolubles, llamados formazanes. Si nosotros preparamos un medio de incubación que contenga algún metabolismo, como ácido succínico y una sal de tetrazolio a pH adecuado, podremos descubrir en un corte, los sitios de actividad de la deshidrogenasa, en el caso anterior de la del ácido succíni-

co, o bien deshidrogenasas ligadas a los piridín nucleótidos, las diaforasas, la citocromo oxidasa, etc.

Según Black y colaboradores³⁴, los carcinomas tienden a retener y hasta sobrepasar el nivel de actividad de las deshidrogenasas encontradas en el epitelio de origen. Así, en el carcinoma mamario, se observó el cambio de tetrazolio a formazán más rápidamente que en el tejido mamario normal o en el fibroadenoma³⁵. Asimismo, las células epiteliales malignas en las secreciones vaginal y cervical tenían más actividad que la mayoría de las células benignas.

Falta averiguar si este aumento de actividad ocurre en todos los carcinomas o solamente en los mamarios, pues hay informes contradicto-

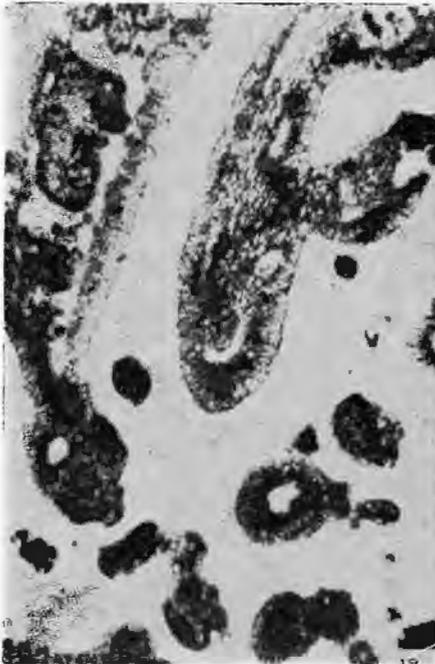


Figura 19. Carcinoma de colon. Diaforasa ligada al DPN. Límite del tumor. Células tumorales escasamente diferenciadas en la porción baja de la fotografía. X 110.

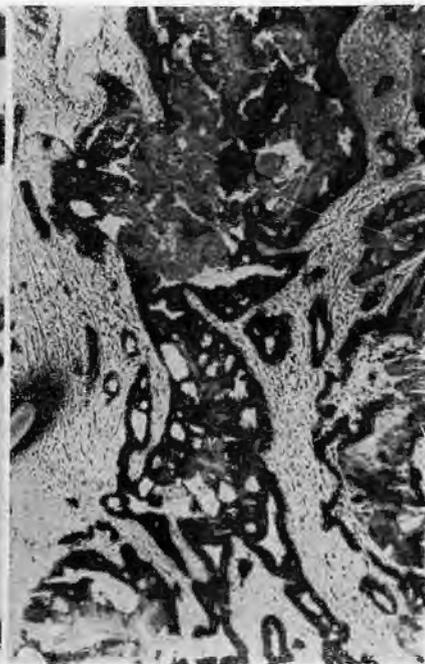


Figura 20. Carcinoma del colon. Nótese las variaciones en intensidad de la tinción en diferentes porciones del tumor con glándulas tumorales aisladas. La periferia del tumor muestra agregados teñidos más intensamente. X 30.

rios, más recientes, con técnicas más depuradas, que muestran disminución de la actividad de las deshidrogenasas. Así, Carruthers y colaboradores³⁶ encontraron disminuída la actividad de deshidrogenasas ligadas al difosfopiridín nucleótido y al trifosfopiridín nucleótico en cánceres cutáneos. Estos autores encontraron específicamente que en homogeneizados de epidermis normal y epidermis maligna de ratas lo siguiente: la actividad de la citocromo reductasa ligada al TPN, o estaba ausente o solo había huellas en la epidermis normal del ratón; actividad parecida del mismo sistema enzimático se encontró en epidermis hiperplásica, papilomas y carcinomas. La actividad de la citocromo reductasa ligada al DPNH fue el doble en la epidermis normal y en tres de cada cuatro carcinomas espinocelulares que en la epidermis hiperplásica y en los papilomas. La actividad de las diaforasas (parte del sistema de las reductasas), en epi-



Figura 21. Carcinoma del colon. Hay tumor bien diferenciado en la parte externa de la muscular (arriba); poco diferenciado en la subserosa (abajo). Diaforasa ligada al DPN.



Figura 22. Carcinoma del intestino grueso. Mucosa arriba, carcinoma en la submucosa. Diaforasa ligada al TPN. X 40.

dermis normal y en epidermis con lesiones benignas fue mucho mayor que la encontrada en la epidermis hiperplásica o en los carcinomas. Claro que los hallazgos anteriores fueron hechos en ratón y es muy difícil saber si estos hallazgos son válidos para la especie humana.

Wattenberg³⁷ caracterizó histoquímicamente cinco enzimas respiratorias en mucosa normal de colon, en lesiones proliferativas benignas y en el carcinoma del intestino grueso. Las enzimas investigadas fueron la diaforasa ligada al DPN, la diaforasa ligada al TPN, la deshidrogenasa succínica, la alfa glicerofosfato deshidrogenasa y la monoamino oxidasa. Sus resultados pueden resumirse del siguiente modo: la mucosa normal del intestino delgado reaccionó de igual modo en el intestino delgado de pacientes con carcinoma que en la mucosa normal de pacientes con pólipos y diverticulitis. La diaforasa ligada al DPN fue intensa en las células del epitelio superficial y las de las bases de las criptas. La diaforasa ligada al TPN tuvo la misma distribución pero en menor intensidad. La deshidro-



Figura 23. Bloque igual a la anterior. Diaforasa ligada al DPN. X 40.

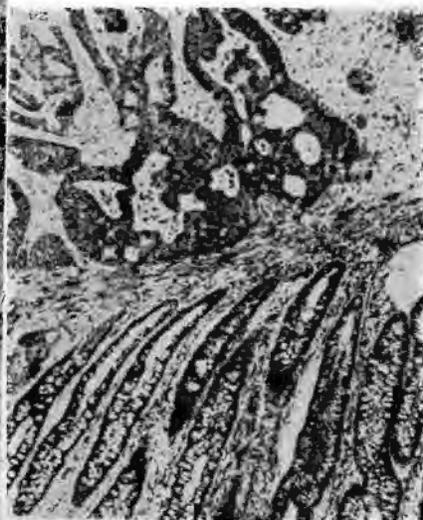


Figura 24. Bloque igual al anterior. Hematoxilina y eosina. X 40.

genasa succínica, la alfa glicerofosfato deshidrogenasa y la monoamino oxidasa fueron moderadamente intensas en la mucosa normal. Las más intensas fueron la deshidrogenasa succínica y la monoamino oxidasa.

En el carcinoma del colon y del recto el autor encontró, que tanto las células muy diferenciadas como las poco diferenciadas reaccionaron intensamente para las diaforasas ligadas al DPN y al TPN, más intensamente para la primera que para la segunda. La tinción más intensa fue en áreas de actividad proliferativa como en la margen invasora de las neoplasias, en la periferia de los agregados celulares del tumor y en algunos grupos de células aisladas. La tinción más débil fue en áreas de degeneración, como en la parte central de las masas tumorales y en regiones adyacentes a una ulceración o a áreas notablemente inflamadas. Una gran proporción de células poco diferenciadas mostró intensa reacción. Las células carcinomatosas mostraron débil reacción a la deshidrogenasa succínica, a la alfa glicerofosfato deshidrogenasa y a la monoamino oxidasa (al contrario de lo que ocurre en los carcinomas cutáneos del ratón).

Las áreas de hiperplasia focal de la mucosa cercanas al carcinoma mostraron disminución de los depósitos de formazán al investigar deshidrogenasa succínica, alfa glicerofosfato deshidrogenasa y monoamino oxidasa. Las células de la porción profunda de la cripta se tiñeron más intensamente. En los pólipos adenomatosos se observaron varios tipos de reacciones que son paralelas a las del carcinoma. Un hecho notable es la presencia de intensa actividad de la deshidrogenasa succínica, de la alfa glicerofosfato deshidrogenasa y de la monoamino oxidasa en las porciones profundas de las glándulas atípicas. En los pólipos malignos los elementos carcinomatosos reaccionan de modo similar a como lo hace el carcinoma invasor.

Parece ser que la disminución de la deshidrogenasa succínica, de la alfa glicerofosfato deshidrogenasa y de la monoamino oxidasa en los carcinomas podría deberse a que dichas enzimas no se sintetizan con suficiente rapidez en zonas de intenso crecimiento celular, como lo demuestran las experiencias de Pearson, Grose y Green³⁸ quienes encontraron disminuídas dichas enzimas en hígado regenerados de ratones C3H a los que se había practicado hepatectomía parcial.

Otras enzimas

Pearse y Peppel³⁰, usando o-acetil-5-bromoindoxilo como sustrato, caracterizaron una peptidasa en el carcinoide y en las células de Kuls-

chitsky, que quizá tenga relación con la secreción de 5-hidroxitriptamina (serotonina) que dichas células producen.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Los métodos histoquímicos para el estudio del cáncer pueden servir como técnicas histológicas especiales cuando se trata de dilucidar el estado de las membranas basales, como en los cánceres intracanaliculares de mama, para ver si hay invasión incipiente del estroma, y así determinar la magnitud de la resección operatoria; en casos de tumores sospechosos de ser osteoblásticos (fosfatasa alcalina), o de origen prostático (fosfatasa ácida). La beta glucuronidasa puede ser positiva en tumores que responden a terapéutica estrogénica.

2. Las técnicas para enzimas respiratorias, con resultados contradictorios, permanece, al menos hasta la fecha, en terreno puramente especulativo, mientras no se conozca mejor el metabolismo en problemas de carcinogénesis, pero tiene un futuro prometedor desde el punto de vista de la investigación. Lo mismo sucede con el estudio de ácidos nucleicos, cuyo futuro es prometedor en el campo de la genética tumoral.

3. Seguimos creyendo, que a la fecha, el aspecto morfológico de la lesión estudiada al microscopio con técnicas habituales, sigue siendo el criterio diagnóstico fundamental.

REFERENCIAS

1. Mirsky, A. E. y Ris, H.: *The chemical composition of isolated chromosomes*. J. Gen. Physiol. 31:1-18, 1947.
2. Mirsky, A. E. y Ris, H.: *The desoxiribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance*. J. Gen. Physiol. 34:451-462, 1951.
3. Mellors, R. C. y Hlinka, J.: *Quantitative cytology and cytopathology. IV. Interferometric measurement of the anhydrous organic mass (dry weight) of genetic material in sperm nuclei of the mouse, the rat and the guinea pig*. Cell Res. 9:128-134, 1955.
4. Mellors, R. C., Stoholski, A., y Beyer, H.: *Quantitative cytology and cytopathology. III. Measurement of the organic mass of sets of chromosomes in germinal cells of the mouse*. Cancer 7:873-883, 1954.
5. Caspersson, T., y Santesson, L.: *Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumors*. Acta radiol. (suppl) 46:1-105, 1942.
6. Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R. y Davis, A. M.: *A microspectrophotometric study of the desoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues*. Am. J. Path. 30:65-85, 1954.
7. Mellors, R. C., Keane, J. F., Jr., y Papanicolaou, G. N.: *Nucleic acid content of the squamous cancer cell*. Science 116:265-269, 1952.

8. Metais, P. y Mandel, P.: Teneur en acide désoxipentosenucléique des leucocytes chez l'homme normal et à l'état pathologique. *Compt. rend. Soc. de biol.* 144:277-279, 1950.
9. Stowell, R., E.: Histochemical observations on nucleic acids in homologous normal and neoplastic tissues. *Symp. Soc. Exper. Biol.* 1:190-205, 1947.
10. Bader, S.: Distribution of desoxyribose nucleic acid in tumor nuclei. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 82:312-315, 1953.
11. Carnes, W. H., Weissman, N. y Goldberg, B.: Desoxyribonucleic acid (DNA) content of mouse ascites tumor cells determined microphotometrically. *Fed. Proc.* 11:410, 1952.
12. Golberg, L., Klein, E. y Klein, G.: The nucleic acid content of mouse ascites tumor cells. *Exper. Cell Res.* 1:543-570, 1950.
13. Klein, G.: Comparative studies of mouse tumors with respect to their capacity for growth as "ascites tumors" and their average nucleic acid content per cell. *Exper. Cell Res.* 2:518-573, 1951.
14. Mellors, R. C., Hlinka, J., Kupfer, A., y Sugiura, K.: Quantitative cytology and cytopathology. II. The quantity of nucleic acid in individual nuclei of normal and neoplastic tissues of the mouse. *Cancer* 7:779-800, 1954.
15. Pearson, B., Novikoff, A. B. y Morrione, T. G.: The histochemical localization of alkaline phosphatase during carcinogenesis in rats fed p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 10:557-564, 1950.
16. Cawley, E. P., MacManus, J. F. A. y Wheeler, C. E.: Observations on the desoxyribonucleic acid component of skin pigmented tumors. *J. Invest. Dermat.* 27:9-14, 1956.
17. Ozzello, L.: The behaviour of basement membranes in intraductal carcinoma of the breast. *Am. J. Path.* 35:885-887, 1955.
18. Ozzello, L. y Speer, F. D.: The mucopolysaccharides in the normal and diseased breast. Their distribution and significance. *Am. J. Path.* 34:993-1009, 1958.
19. Greenstein, J. T.: *Biochemistry of Cancer*, 2nd. Ed. Nueva York, Academic Press, Inc., 1954.
20. Changus, G. W.: Identification of metastatic prostatic carcinoma. *Fed. Proc.* 11:410-411, 1952.
21. Reiner, L., Rutenburg, A. M. y Seligman, A. M.: Acid phosphatase activity of human tumors. *J. Histochem. Cytochem.* 3:395-396, 1955.
22. Gomori, G.: The study of enzymes in tissue sections. *Am. J. Clin. Path.* 16:347-352, 1946.
23. Gomori, G.: Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch. Path.* 32:189-199, 1941.
24. Lemon, H. M. y Wisseman, Jr. C. L.: Acid phosphomonoesterase activity of human neoplastic tissue. *Science* 109:233-235, 1949.
25. Allen, A. C.: *The Skin*. St. Louis Missouri, C. B. Mosby Co., 1954.
26. Woodward, H. Q.: Quantitative studies of beta-glycerophosphatase activity in normal and neoplastic tissues. *Cancer* 9:352-366, 1956.
27. Schajowicz, F.: Aspiration biopsy in bone lesions. *Cytological and histological technique*. *J. Bone & Surg.* 37A:465-471, 1955.

28. Schajowicz, F. y Cabrini, R. L.: *Histochemical studies of bone in normal and pathological conditions. With special reference to alkaline phosphatase, glycogen and mucopolysaccharides.* J. Bone & Surg. 36B:474, 489, 1954.
29. Gomori, G.: *Histochemical demonstration of sites of phosphamidase activity.* Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 69:407-409, 1948.
30. Mark, D. D.: *Distribution of lipase in preneoplastic and neoplastic states induced in the rat liver by p-dimethylaminoazobenzene.* Arch. 49:545-554, 1950.
31. Stowell, R. E., Lee, C. S., Tsuboi, K. K. y Villasana, A.: *Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride.* Cancer Res. 11:345-353, 1951.
32. Fishman, W. H. y Anlyan, A. J.: *Beta-glucuronidase activity in human tissue. Some correlations of malignant growth and with the physiology of reproduction.* Cancer Res. 7:808-817, 1947.
33. Seligman, A. M., Nachlas, M. M., Manheimer, L. H., Friedman, O. M. y Wolf, G.: *Development of new methods for the histochemical demonstration of hydrolytic intracellular enzymes in a program of cancer research.* Ann. Surg. 130:333-341, 1949.
34. Black, M. M., Opler, S. R. y Speer, F. D.: *Observation on the reduction of triphenyltetrazolium chloride by normal and malignant human tissue.* Am. J. Path. 26:1097-1102, 1950.
35. Strauss, F. H., Cheronis, M. D., y Strauss, E.: *Demonstration of reducing enzymes system in neoplasms and living mammalian tissues by triphenyltetrazolium chloride.* Science 108:113-115, 1948.
36. Carruthers, C., Woernley, D. L., Baumler, A. y Davis, B.: *The activity of piridin nucleotide-cytochrome reductases, cytochrome oxidase, and diaphorase in epidermis in various stages of malignant transformation.* Cancer Res. 19:330-333, 1959.
37. Wattenberg, L. E.: *A histochemical study of five oxidative enzymes in carcinoma of the large intestine in man.* Am. J. Path. 35:113-137, 1959.
38. Pearson, B. Grose, F. y Green, R.: *Histochemical changes in liver succinic dehydrogenase during rapid growth following partial hepatectomy.* Am. J. Path. 35:139-151, 1959.
39. Pearse, A. G. E. y Pepperlr, W. J.: *A probable peptidase in carcinoid tumors.* Nature, 179:589, 1957.