

61



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

Centro de Investigación y Estudios Avanzados I. P. N.

ESTUDIO DE LA GGT COMO UNO DE LOS
MARCADORES TEMPRANOS DURANTE EL PROCESO
DE INICIACIÓN Y PROMOCIÓN EN LA
HEPATOCARCINOGENÉISIS *in vivo e in vitro*.

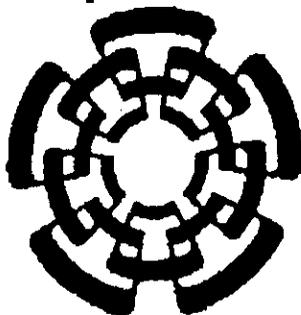
T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A
IMELDA MORALES FAJARDO

ASESOR: SAUL VILLA TREVIÑO

MEXICO, D. F.

2000

28/10/00





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del INP, bajo la dirección del Doctor Saúl Villa Treviño.

DEDICATORIA

A mi madre quien se esforzó y ayudó a cumplir mis metas

A mi hijo Javier Ulises que es mi inspiración

A Ulises quien me apoya y me ayuda en todo momento.

A Alicia

A mi abuelo y a mi tía Angeles

A mis amigos

Agradezco a la vida el que me haya brindado la oportunidad de tener a mi lado a mi madre, a Ulises y a mi hijo quienes fueron los pilares de la motivación para dominar los miedos y tener la oportunidad de la superación y sobre todo la satisfacción de ver realizado un paso mas en

mi vida

Eternamente agradecida

Imelda

AGRADECIMIENTOS

A Dr. Saúl Villa Treviño por la dirección y la asesoría durante el desarrollo de la tesis y además por su apoyo y comprensión.

A Samia Fattel Fazenda por la asesoría y el apoyo durante el desarrollo de la tesis además de su amistad y su cariño.

A Evelia Arce Popoca por su apoyo técnico en el tratamiento de ratas así como en la técnica de cirugías y en la preparación del material para mantenimiento de cultivos además de sus consejos y su amistad

A Sergio Hernández García por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio 50 del departamento Biología Celular

A Demetrio Sánchez Rodríguez por su valioso desempeño en la reproducción de la rata Fisher 344.

A José Juan Rivera Carmona por su apoyo y asesoría en fotografía

A Concepción Fierros Sela por su apoyo secretarial

A Ma Lourdes Alarcón por su colaboración en los cortes de tejidos.

ÍNDICE

Portada	pág. V
Creditos institucionales	pág. VII
Agradecimientos	pág. IX
Dedicatoria	pág. XI
Indice	pág. XIII
Figuras	pág. XV
Tablas	pág. XVII
Abreviaturas	pág. XIX
Resumen	pág. XX
Introducción	pág. 1
Objetivo	pág. 7
Metodología	pág. 8
Resultados	pág. 11
Discusión	pág. 22
Conclusiones	pág. 24
Bibliografía	pág. 27

FIGURAS

Fig. 1	Sobrevivencia de los hepatocitos cultivados	Pág 12
Fig. 2	Células GGT positivas	Pág. 13
Fig. 3	Aparición de células GGT + en los cultivos de hepatocitos	Pag. 14
Fig. 4	Cortes histologicos	pag 16
Fig. 5	Efecto de los diferentes tratamientos <i>in vitro</i>	Pág. 17
Fig. 6	Tratamiento <i>in vitro</i> de las ratas tratadas con DEN	Pág. 18
Fig. 7	Tratamiento <i>in vitro</i> de las ratas tratadas con 2AAF	pág. 19
Fig.8	Tratamiento <i>in vitro</i> en cultivo de hepatocitos de ratas tratadas <i>in vivo</i>	Pág. 20
Fig.9	Tratamiento <i>in vitro</i> en cultivo de hepatocitos de ratas tratadas <i>in vivo</i> . Células GGT+	Pág 21

TABLAS

Tabla 1	Los tratamientos in vitro	Pág 9
Tabla 2	Viabilidad de hepatocitos	Pag. 11

RESUMEN

La carcinogénesis es la inducción de tumores malignos en animales de experimentación. Los agentes carcinógenos alteran los controles de proliferación y de diferenciación, experimentalmente se han identificado tres etapas en este proceso: iniciación, promoción y progresión. La iniciación es la alteración del ADN, la promoción es la expansión clonal de células transformadas y puede ser reversible y la progresión es el desarrollo del tumor.

En el modelo de hepatocarcinogénesis, que fue utilizado en este trabajo, experimentalmente se pueden inducir eficazmente poblaciones de células anormales en el hígado, ya que éste metaboliza activamente a los carcinógenos y en este órgano se puede inducir fácilmente la proliferación. Las lesiones preneoplásicas se identifican con todo rigor por un marcador enzimático, la γ -glutamil traspeptidasa GGT enzima que se expresa en las células transformadas.

Se realizaron cultivos primarios de hepatocitos de las ratas tratadas, se detectó la expresión de la GGT histoquímicamente y se analizó la sobrevivencia de las células a lo largo del tiempo. Adicionalmente se estudió el efecto de 2 concentraciones de un promotor en los tratamientos *in vitro*.

El tratamiento *in vivo* fue determinante ya que cuando se administró el iniciador el promotor y el estímulo proliferativo las células en cultivo sobrevivieron por periodos 3 o 4 veces mayores a los de hepatocitos de las ratas no tratadas. Este tratamiento alargó el tiempo de sobrevivencia de los hepatocitos y aumentó el número de células GGT positivas.

El análisis comparativo de los tratamientos completos *in vivo* también nos demuestra que el tiempo de tratamiento *in vivo* es un factor importante en la sobrevivencia de los

hepatocitos *in vitro*, ya que los tratamientos por 270 días *in vivo* tuvieron los hepatocitos con la mayor sobrevivencia y el mayor aumento progresivo de células GGT positivas.

Los cultivos de los hepatocitos de las ratas tratadas *in vivo*, no modificaron su comportamiento *in vitro* cuando se les adicionó el promotor. Mediante la estrategia de los experimentos *in vivo* e *in vitro* pudimos establecer un seguimiento de la etapa de promoción estudiando la expresión de las células GGT positivas que son las células preneoplásicas presentes en los focos.

INTRODUCCIÓN.

El cáncer existe desde tiempos inmemorables, prueba de ello son los vestigios de tumores malignos encontrados en los fósiles de dinosaurios y en las momias de Egipto. Aunque no tenemos datos de la incidencia de cáncer en esos tiempos, conocemos que éste se presenta en los individuos, principalmente, en la edad adulta y en la vejez, pero también en la primera etapa de la vida. En Estados Unidos existe información epidemiológica de un incremento en la mortalidad por cáncer durante el siglo XX. En la actualidad el cáncer, ocupa el segundo lugar en el cuadro de causas de muerte, y en 1997 en el mundo se diagnosticaron 6.5 millones de nuevos casos de cáncer.

El 90% de los cánceres son producidos por causas ambientales, principalmente por los compuestos químicos que nos rodean: como son medicamentos, conservadores de alimentos, pesticidas, los relacionados con tabaquismo, productos industriales, etc.; (Ghia 1989). Las radiaciones a las que nos vemos expuestos a lo largo de nuestra vida, los virus que introducen su material genético a la célula, causando serias alteraciones y de manera indirecta la depresión, la tensión y la angustia son otros de los agentes generadores de cáncer (Sarkar, et. al 1995).

El cáncer es una multiplicación desmesurada y descontrolada de las células que da como resultado una protuberancia, esta característica unida a una pérdida de los rasgos de diferenciación de las células, son las alteraciones fundamentales de las neoplasias. Éstas pueden ser benignas o malignas; las primeras tiene una cápsula o pared bien delimitada que la separa del tejido circundante y permanece así por tiempo indefinido. En cambio la neoplasia maligna no forma una estructura circunscrita y local, las células atraviesan la membrana basal del tejido donde se originan y migran hacia la matriz extracelular, ahí penetran a los vasos sanguíneos o linfáticos y a través de ellos se diseminan a órganos remotos en donde los colonizan.

Las características de una célula cancerosa, también se expresan cuando se cultivan en el laboratorio, se reconocen por ser inmortales, indiferenciadas, tener una proliferación descontrolada,

aún en contacto con otras células o en ausencia de un anclaje sólido.

Los tumores malignos son carcinomas o sarcomas según se deriven de los epitelios o del tejido conectivo; o leucemias o linfomas si se derivan del sistema hematopoyético o los tumores que se originan del sistema nervioso central.

CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL

Existen muchas sustancias químicas que se han identificado como carcinógenos tanto en animales como en seres humanos se ha determinado epidemiológicamente, que para que induzcan tumores, se requiere de un contacto con ellos de manera constante y por periodos largos. Esto se ha constatado experimentalmente en los modelo multietapas de carcinogénesis (Barret 1993).

La carcinogénesis es la inducción de tumores malignos en animales de experimentación por medio de tratamientos con sustancias químicas, radiaciones o virus, todos ellos agentes que alteran los controles de proliferación y de diferenciación. Experimentalmente se han identificado tres etapas en este proceso: iniciación, promoción y progresión (Barrett 1993, Goldsworthy et. al. 1983, Rosales 1983 Pitot et.al. 1991). Del estudio de la carcinogénesis experimental se ha ahondado en los mecanismos de acción de los agentes etiológicos, los aspectos que tienen en común y la generalización que a partir de ello constituye nuestra concepción de la carcinogénesis.

La iniciación es la alteración del ADN producida por el carcinógeno que no es reparada por las enzimas correspondientes y por lo tanto, durante la replicación de DNA se incorpora como un daño permanente y heredable. (4.Dragan et al. 1994, Barret 1993 Pitot et al 1991). La frecuencia de mutaciones por sustancias químicas, a la dosis máxima tolerada sucede en una 1 de cada 10,000 células de ahí que para tener éxito en la inducción de tumores es necesario el efecto del promotor y el estímulo proliferativo. Como ejemplo, los hepatocitos que se inician con una dosis única de 200 mg/ kg de la dietilnitrosamina DEN, en una rata de 120g, el peso del hígado de 5g tendrá 7×10^8 hepatocitos y por lo tanto 7×10^4 células mutadas, o células iniciadas.

En la promoción ocurre una expansión clonal de las células iniciadas y ésta puede ser reversible. Las células iniciadas requieren la influencia constante de un agente promotor para que se consolide la neoplasia (Barret 1993, Pitot et. al, 1988, Talamas 1983, Villa 1990, Pitot et al, 1991).

Durante la progresión tumoral se manifiesta el desarrollo del cáncer. En esta etapa; dentro del clon neoplásico, se presentan subpoblaciones cada vez más aberradas genéticamente y con gran heterogeneidad celular. Ocurren cambios genéticos progresivos y acumulativos como: pérdida de alelos, aneuploidía y amplificación genética, etc. Las células transformadas adquieren autonomía en relación al resto de las células, invaden las áreas vecinas y pueden colonizar órganos distantes. (3 Dragan et al, 1994).

Para estudiar la carcinogénesis se han diseñado modelos para producir tumores en diferentes órganos como son la piel, tráquea, pulmón e hígado, ya que son tejidos que metabolizan carcinógenos químicos. Algunos de ellos tienen ciertas ventajas, en el hígado se puede inducir la proliferación celular mediante la hepatectomía parcial, la cual, si se presenta de manera simultánea con el daño genético origina mutaciones de manera eficiente y la sumatoria de estas mutaciones da lugar a que aparezcan las células transformadas (Dragan et al. 1994, Rojas 1994, Rosales 1982).

Hepatocarcinogénesis Química.

El modelo de la generación de tumores en el hígado por compuestos químicos es útil y en él se pueden seguir adecuadamente las etapas de la carcinogénesis ya que los tumores van apareciendo de forma secuencial. Este modelo ha sido usado como herramienta en la demostración de las diferentes etapas de la hepatocarcinogénesis y en el estudio del mecanismo de acción de carcinógenos (Goldsworthy et al., 1983).

En este sistema se han estudiado una gran variedad de carcinógenos; la DEN dietilnitrosamina (Zalatnai, Lapis 1994, Richmond 1996); la dimetilnitrosamina DMN (Josephy et al., 1995); el fenobarbital FB (3Dragan et al., 1994, Asamoto 1989), el 2-nitropropanol (Shuichi 1994); el 2-acetilaminofluoreno 2Aaf (Yuan y kun 1994, Rosales 1984), etc. Los compuestos

químicos carcinogénicos, se han podido clasificar en iniciadores o en promotores o en ambos. Experimentalmente estos efectos son separables, en las etapas iniciales y se han obtenido poblaciones celulares específicas, posiblemente hepatocitos iniciados, los cuales aparecen en cúmulos de pocas células, los que se denominan focos y crecen hasta formar nódulos. Estas poblaciones de hepatocitos preneoplásicos en etapas posteriores, dan lugar a hepatocarcinomas bien diferenciados (Rojas 1994, González 1987).

El modelo de hepatocarcinogénesis en roedores ofrece ventajas y éstas se pueden incrementar si el modelo *in vivo* se complementa *in vitro* con cultivos primarios de hepatocitos. En este modelo mixto se pueden aplicar dosis precisas de carcinógenos en el animal íntegro, de acuerdo a su peso, y en uno de sus lóbulos observar y regular su efecto *in vivo* y del resto del hígado obtener suspensiones de hepatocitos las cuales se pueden adicionar *in vitro* una amplia gama de procedimientos complementarios. Una aplicación de este modelo mixto, muy importante y de gran utilidad es aplicable como un ensayo de toxicidad (Marché et al 1996).

Durante el desarrollo de lesiones preneoplásicas en los órganos de animales y de seres humanos, numerosas enzimas se modifican; éstas se usan como indicadores, y (Marché 1995) se catalogan en positivos o negativos, en los primeros su concentración aumenta, mientras que en los segundos disminuye o desaparece (González 1987). Estos marcadores han permitido hacer un seguimiento de las alteraciones que se presentan en las etapas de la carcinogénesis (Dragan et al.1994;Richmond et al.1995).

Los marcadores enzimáticos, han servido para el análisis secuencial de las nuevas poblaciones celulares y para determinar la etapa del proceso carcinogénico en la que aparecen. En estos experimentos se trata de controlar la exposición de cada uno de los estímulos que son relevantes en la patogénesis del cáncer y tratar de estudiar por separado los efectos de los iniciadores y de los promotores (Rosales1982).

Entre los marcadores enzimáticos positivos de células preneoplásicas se encuentran la γ -Glutamil transpeptidasa GGT y las glutati6n-S-transferasas GSTs (Sambasiva et al,1988, Pitot et

al., 1989, Kitagawa 1980), aunque estas dos moléculas se encuentran en sitios diferentes en la célula, ambas se expresan en el proceso de hepatocarcinogénesis química. Por medio de tinciones histoquímicas la GGT se detecta después de que se administra el carcinógeno, principalmente en donde aparecen los focos de hepatocitos. En carcinomas hepatocelulares de seres humanos también se encuentra en altas concentraciones. La GGT liberada de la membrana celular puede ser detectada en el suero, principalmente en pacientes con enfermedades hepáticas, lo que la hace una prueba importante para el diagnóstico de cáncer (Goodspeed et al., 1989). En los tejidos normales la actividad GGT se encuentra localizada en células que tienen una función excretora o de absorción, como son el riñón, el páncreas y las vesículas seminales. (González 1987).

Las enzimas del metabolismo del glutatión particularmente GGT y GST aparecen en la mayoría de las alteraciones preneoplásicas después de un tratamiento con agentes iniciadores y promotores (Pitot 1989), y la GGT sirve como marcador durante las diferentes etapas de la carcinogénesis química, tanto *in vivo* como *in vitro* (Marché et al. 1995, González 1987, Stenius, et. al. 1994, Ghia y Meneto. 1989, Goodspeed et al 1989).

En muchas lesiones preneoplásicas se observan niveles altos de la GGT y éstos pueden estar relacionados con la hidrólisis del GSH. En las zonas del hígado donde aparece la GGT también se presentan niveles altos de GSH intracelular (González 1987). De hecho se han realizado estudios de los mecanismos moleculares que se involucran en la acción de diferentes carcinógenos ya que intervienen varios factores algunos ampliamente estudiados, que son los que regulan la expresión de genes para el metabolismo de glutatión (Pitot et. al. 1989).

El GSH es necesario para la detoxificación de carcinógenos así como para la replicación de la célula. La inducción de GGT en hepatocitos lesionados permite que estas células utilicen glutatión extracelular y preserven sus niveles. La inducción GST protege a los hepatocitos del daño producido por los agentes promotores (Hendrich y Pitot. 1987).

Durante el proceso de hepatocarcinogénesis, los sistemas que utilizan glutatión GSH y el estado de óxido-reducción se ven alterados y existen dos maneras de mantenerlos en niveles

adecuados: disminuyendo su utilización o bien incrementado su síntesis (Goodspeed et al 1989, González 1987, Pitot et al., 1989). En este sentido en las células de las lesiones preneoplásicas se presenta una disminución de la mono oxidasa de citocromo P-450, por lo que se ahorra GSH reduciendo el número de metabolitos producidos (Gonzalez 1987, Habib et. al. 1994), de la misma forma disminuyen los niveles de la epóxido hidrolasa, lo cual es proporcional al número de epóxidos que podrían reaccionar con el GSH (González 1987).

Para el estudio de la etapa de la promoción *in vivo* en tiempos cortos utilizamos el modelo de hepatocarcinogénesis de Farber modificado (Farber y Solt 1979), pero existen ciertos aspectos que dada su complejidad sería difícil estudiarlos en el animal entero ya que se tendrían que tener grupos muy numerosos lo cual implica un alto costo y un proceso tardado. Esta es la justificación de complementar el modelo *in vivo* con el modelo *in vitro* para poder dar seguimiento a las suspensiones celulares de los hígados provenientes de las ratas tratadas.

HIPOTESIS.

Que en el modelo *in vivo* de Solt y Farber modificando podemos seguir los procesos de iniciación y promoción *in vitro* por medio de cuantificar la capacidad de proliferación y la expresión de marcadores enzimáticos.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la iniciación y la promoción *in vivo* en el modelo de hepatocarcinogénesis y de seguimiento, a su establecimiento y consolidación *in vitro* en cultivos primarios de hepatocitos.

METAS.

1. Analizar la expresión de la GGT en los cultivos primarios hepatocitos después de 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 días de establecido el cultivo.

2. Analizar el efecto del promotor 2-AAF sobre un cultivo primario de hepatocitos obtenido de ratas tratadas con el esquema modificado de Farber.

METODOLOGÍA.

Se utilizaron, ratas Fischer 344 (Richmond 1996), machos, de 180 a 220g, a tiempo 0 recibieron 100 mg / kg, DEN como iniciador, Sigma, lote 105H0008 y 20mg / kg de 2AAF como promotor, Sigma, lote 119-0413, por vía intragástrica los días 7, 8, 9. Al décimo día se les practicó una hepatectomía de 75% del hígado, a estos grupos se les llamó completos. Se asignaron 6 grupos de ratas como controles; uno, con sólo el iniciador; otro con solo el 2-AAF; un tercero con solo la hepatectomía parcial; el cuarto con el iniciador y la hepatectomía; el quinto con el 2-AAF y la hepatectomía, el último y sexto grupo sin tratamiento alguno; a estos grupos se les llama incompletos. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. Adicionalmente se estudiaron ratas con el tratamiento completo y sacrificados 270 y 300 días después del inicio del tratamiento

Cultivo primario de hepatocitos.

Se anestesió la rata con éter etílico, se colocó en la mesa de disección, se limpió la piel con benzal Terrier al 30%. Se hizo la laparotomía y los intestinos se desplazaron hacia el lado izquierdo de la rata para exponer la vena porta la que se canuló con aguja de calibre 18 y se conectó a una bomba peristáltica. Previamente a la perfusión del hígado se ligó uno de los lóbulos a nivel del hilio vascular y se extrajo. La perfusión se inició pasando la solución TD salino 1x con EGTA a 37°C durante 3 min a una velocidad de 15 ml por min que nos permitió quelar los iones de calcio; después de 15 segundos de perfusión con el TD, se cortó la vena cava inferior a la altura de los riñones para dar salida a la sangre y al líquido de perfusión, después se pasaron 50 ml de la solución de colagenasa de Sigma lote 122H6817 con un flujo de un ml por min. Al término de la perfusión se cortó el hígado y se puso en una caja Petri estéril, se añadieron 5 ml de medio F12 se sacudió el hígado para obtener la dispersión celular. Se hizo una dilución 1:10 de la suspensión con medio para determinar el número de células por ml en el hematocitómetro. El lóbulo previamente extraído se cortó se adhirió a un caucho, se le agregó 2-metil butano, se congeló con nitrógeno líquido y se preservó a -80°C hasta la elaboración los cortes para las pruebas histoquímicas.

De la suspensión de hepatocitos se sembraron 8×10^5 células por caja y se hicieron 4 grupos con diferentes tratamientos *in vitro* (Tabla.I). Esto con el propósito de estudiar el efecto de los diferentes tratamientos *in vivo* e *in vitro* sobre proliferación celular *in vitro* y esta a su vez relacionada con la expresión de GGT⁺.

TABLA I

Tratamiento <i>in vivo</i> ^{a)}	Tratamiento <i>in vitro</i> ^{b)}
9 tratamientos	Ninguno
9 tratamientos	DMSO
9 tratamientos	2 ^o AF 5×10^{-7}
9 tratamientos	2 ^o AF 15×10^{-7}

a) Las ratas recibieron diferentes tratamientos y fueron sacrificadas después de 25 días de iniciado el tratamiento en 1.-Completo, 2.-Completo 270 días, 3.-Completo 300 días, 4.-DEN, 5.-2AAF, 6.-Hepatectomía, 7.-DEN y Hepatectomía, 8.-2AAF y Hepatectomía, 9.- Sin tratamiento.

b) 8×10^5 hepatocitos en cajas de 35mm de diámetro

Detección histoquímica de γ -glutamil transferasa en hepatocitos en cultivo.

La determinación histoquímica de la GGT se desarrolló ya que esta forma un colorante azo que es quelado con un ión cúprico lo cual da un producto rojo insoluble en el sitio de la reacción. Los hepatocitos cultivados en cajas o en los cubreobjetos, se lavaron con 2 ml de medio sin suero, se fijaron, 30 min. con acetona fría; puede usarse también una solución de glutaraldehído al 3%. Se incubaron de 30 a 40 min a 25°C con solución 1x de GMNA, se enjuagaron dos veces con solución Tris y se incubaron 2 min con una solución de 0.1M de sulfato cúprico. Los núcleos se contratiñeron, con hematoxilina. Los cubreobjetos se montaron en con bálsamo de Canadá y las cajas con glicerina. Los resultados se registraron mediante fotografías.

Determinación del DNA, para conocer el número de células totales en una caja.

Este ensayo colorimétrico consiste en la interacción de la difenilamida con la desoxirribosa, básicamente se requiere la precipitación del DNA, su hidrólisis ácida y el ensayo colorimétrico para

la detección de desoxirribosa (Leyva 1974).

Se rasparon las células de las cajas con un gendarme en 400 μ l de PBS x 1 y se pasaron a tubos Eppendorf, se les adicionaron 400 μ l de PBS para enjuagar cada caja, se centrifugaron y se sonicaron 1 min. Para el blanco y tubos problema se adicionaron 350 μ l de tris más 50 μ l de albúmina (la albúmina como acarreador de ADN). Para precipitar las moléculas se resuspendieron en 400 μ l de ácido perclórico 0.4 M y se dejaron una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después de centrifugar 3 min a 10,000 rpm se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla con una varilla y la hidrólisis ácida se realizó en 330 μ l de ácido perclórico 1 M a 70° C por 30 min, posteriormente se centrifugó por 5 min. a 10,000 rpm. Se tomaron 60 μ l de sobrenadante se adicionaron 120 μ l de cromóforo y se dejaron en incubación 30°C durante toda la noche.

Soluciones:

La solución de difenil amina se preparó con 1.5 g disuelto en 100 ml de ácido acético glacial y 1.5 de ácido clorhídrico concentrado y a 1 ml de cromóforo se le agregaron 10 μ l de acetaldehído.

Medición de las áreas bajo la curva.

Para medir la diferencia en porcentaje del comportamiento de los hepatocitos en relación a los diferentes tratamientos éste se expresó en % comparado con el control entre las curvas. Se dibujó el área bajo la curva en cada una de las gráficas elaborada a la misma escala, se recortaron y se pesaron en la balanza analítica. Se determinó la relación porcentual con respecto al área de la gráfica de tratamiento completo como el 100%.

RESULTADOS.

Los hígados de las ratas sometidas a tratamiento completo y sacrificadas a los 25 días de iniciado el experimento presentan nódulos y las suspensiones celulares obtenidas de ellos, menor viabilidad que el control. Los hígados de las ratas a las que se les aplicaron tratamientos incompletos no muestran nódulos y sus respectivas suspensiones celulares tienen una viabilidad más alta que las anteriores, siendo 72% en las primeras y de 80% a 90% en las segundas respectivamente. Tal vez esta diferencias se deba a que los hepatocitos de las ratas que tuvieron el tratamiento completo no se recuperan en 25 días del daño producido ya que ratas con el tratamiento completo y sacrificadas a los de 300 días de iniciado el tratamiento cuando ya están recuperadas, la viabilidad aumenta hasta el 86% (Tabla II).

Tabla II

Días transcurridos hasta el sacrificio	Tratamiento	Viabilidad
25	Sin tratamiento	90% ⁺⁻
25	D2AAFH (completo)	72% ⁺⁻
25	Solo DEN	85% ⁺⁻
25	DEN y Hepatectomía	80% ⁺⁻
25	Solo 2AAF	82% ⁺⁻
25	2AAF y Hepataectomía	81% ⁺⁻
300	D2AAFH (completo)	86% ⁺⁻

Viabilidad de los hepatocitos de las suspensiones celulares obtenidas de los diferentes tratamientos.

Los cultivos de los hepatocitos elaborados de las ratas que recibieron diferentes tratamientos fueron seguidos hasta que desaparecieron, que en algunos casos fueron hasta 70 días (Fig. 1). Los hepatocitos en cultivo de las ratas que no recibieron tratamiento sobrevivieron 14 días, mientras que los hepatocitos de ratas que fueron sometidas al tratamiento completo tuvieron una sobrevivida que se

prolongó hasta los 42 días (Fig. 1A y 1B). Parece ser que los tres factores involucrados en la generación de un hepatocarcinoma el iniciador, el promotor y el estímulo proliferativo le confieren a los hepatocitos la posibilidad de proliferar y de tener una sobrevida de cuatro veces más que la de los hepatocitos de las ratas no tratadas. (fig.1 A y B).

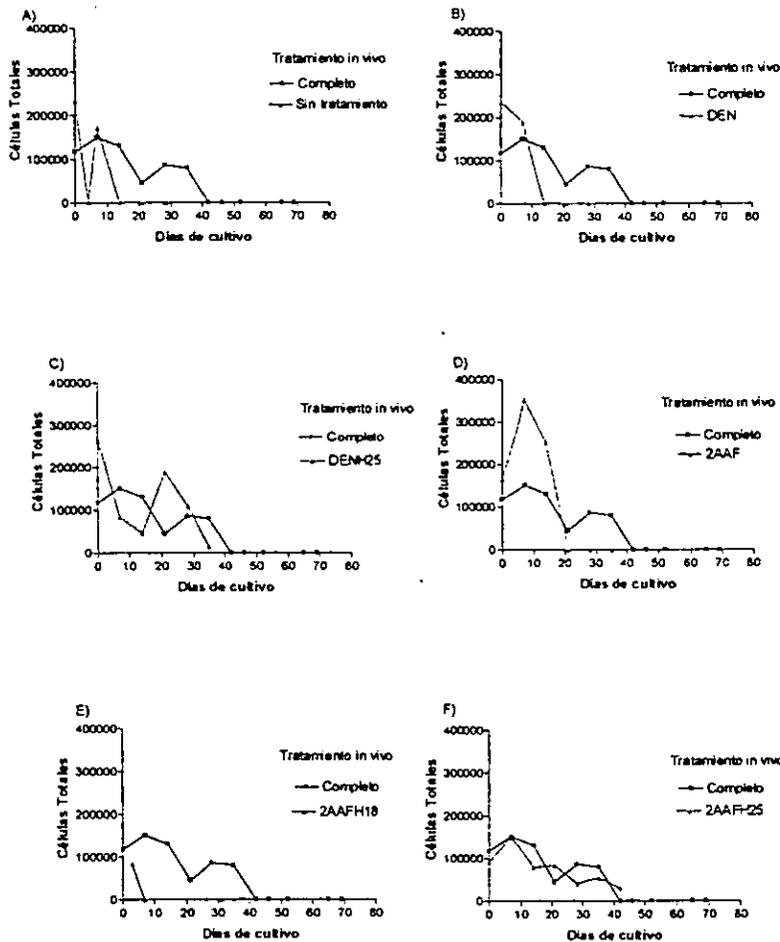


Figura1: Sobrevivencia de los hepatocitos cultivados

Por otro lado la administración *in vitro* de solamente 2AAF se refleja en una capacidad

aumentada de proliferación de los hepatocitos, pero ésta es solo la mitad de los hepatocitos de las ratas con tratamiento completo (fig1 D).

La administración *in vivo* de 2AAF, y la posterior aplicación del estímulo proliferativo mediante la hepatectomía y el sacrificio 8 días después de la hepatectomía y a los 18 días de iniciado el experimento, se reflejan en un escaso efecto proliferativo (fig 1E) mientras que cuando se llevó a cabo a los 15 días después de la hepatectomía, 25 días después de iniciado el experimento, el grado de proliferación es similar, no es tan grande como en la del tratamiento completo, pero la sobrevivencia de estos hepatocitos casi se iguala (fig.1F).

Los resultados del tratamiento de hepatectomía no fueron relevantes ya que se comportaron de manera similar al tratamiento no tratado *in vivo*.

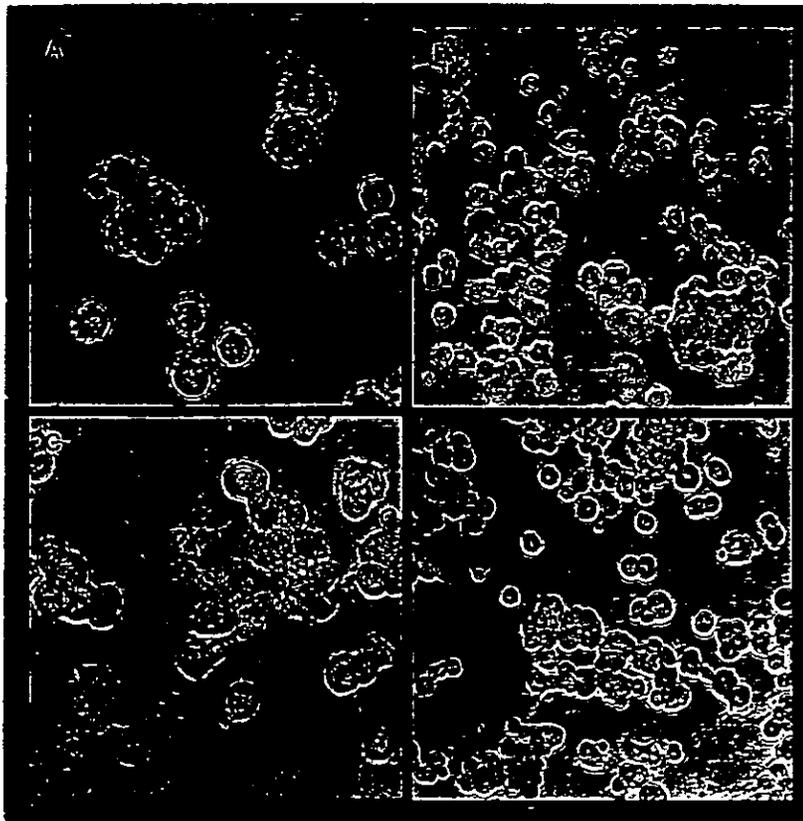


Figura 2: Células GGT positivas. A).- Hepatocitos provenientes de una rata que recibió tratamiento completo 4 horas después de iniciado el cultivo (objetivo 40x). B).- Igual que A (10x). C).- Hepatocitos después de 7 días de cultivo (40x). D).- Igual C (10x).

Estas diferencias en la capacidad de proliferación y de supervivencia observadas *in vitro* en relación con los tratamientos *in vivo* también se correlacionaron muy estrechamente con el número de células positivas a la GGT. (fig. 2 y fig 3).

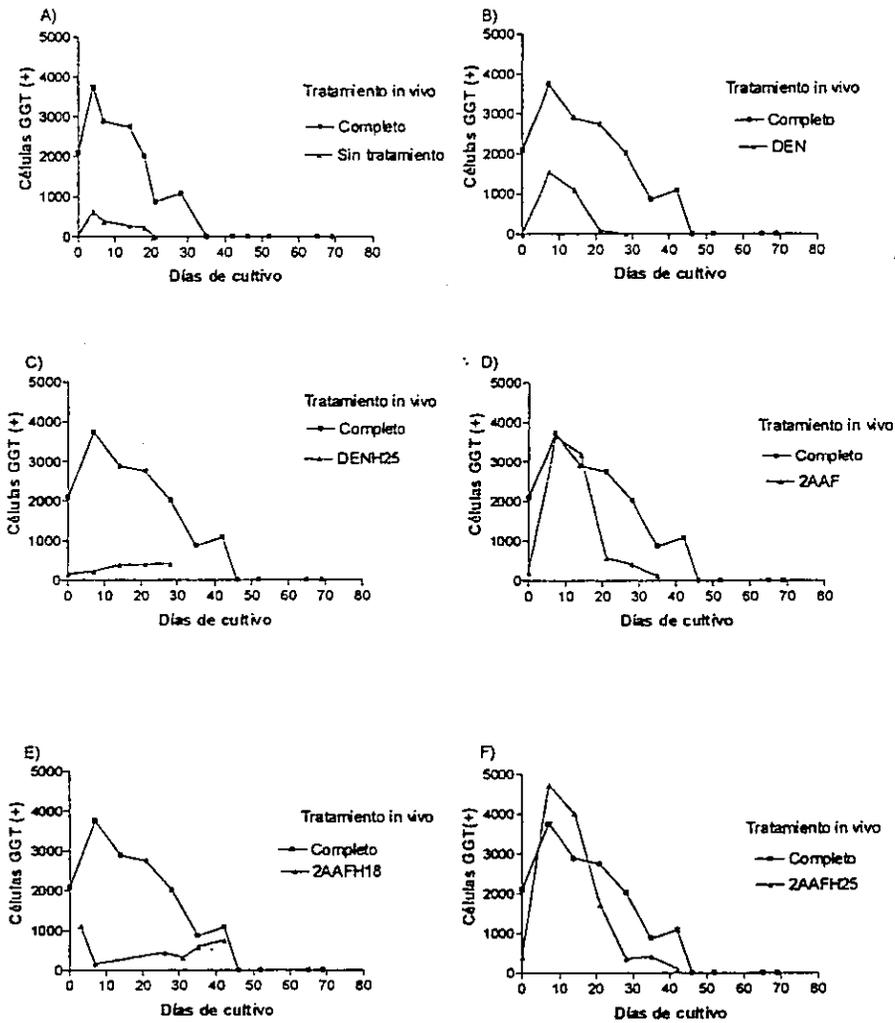


Figura 3: Aparición de células GGT+ en los cultivos de hepatocitos

En el caso de los hepatocitos que expresaron la GGT, el mayor número de ellos y con la mayor sobrevida se observó cuando los tres factores, iniciador, promotor, y estímulo proliferativo fueron aplicados en el tratamiento *in vivo* (fig. 3). En los cultivos de los hepatocitos de ratas que no recibieron tratamiento *in vivo* los hepatocitos que expresaron la GGT fue de solo 9% en relación a los que recibieron tratamiento completo y tuvieron una sobrevida máxima de menos de la mitad (fig. 3 A). El tratamiento *in vivo* con solo el iniciador o junto con el estímulo proliferativo no fue suficiente para incrementar el número de células GGT positivas, éstas solo aumentaron un 21% y 16.5% en relación al tratamiento completo (3B y 3C). Cuando se administra solo 2AAF se observa el 87.3 % de células GGT positivas, con relación al tratamiento completo, y también estos hepatocitos tienen una sobrevida menor (fig. 3D). El tratamiento con 2AAF, hepatectomía y sacrificado 25 días después de iniciado el experimento muestra un número de células GGT positivos que alcanza un 125% con respecto a los hepatocitos del tratamiento completo, pero casi tienen la misma sobrevida (fig 3 F). Es interesante notar que el mismo tratamiento pero con el sacrificio 8 días después de la hepatectomía 18 días después de iniciado el experimento presenta un número pequeño de células GGT positivas y estas sólo alcanzan el 34% del observado en el tratamiento completo. (fig. 3E)

En los cortes histológicos de los hígados de ratas con el tratamiento completo y aquellos que solo recibieron 2AAF y hepatectomía presentan una diferencia significativa con respecto a los nódulos que se observan (fig 4ABCD). Mientras que en los cortes de las ratas que no llevan tratamiento y aquellos que solo recibieron hepatectomía no se presentan nódulos.(fig 4 EFGH).

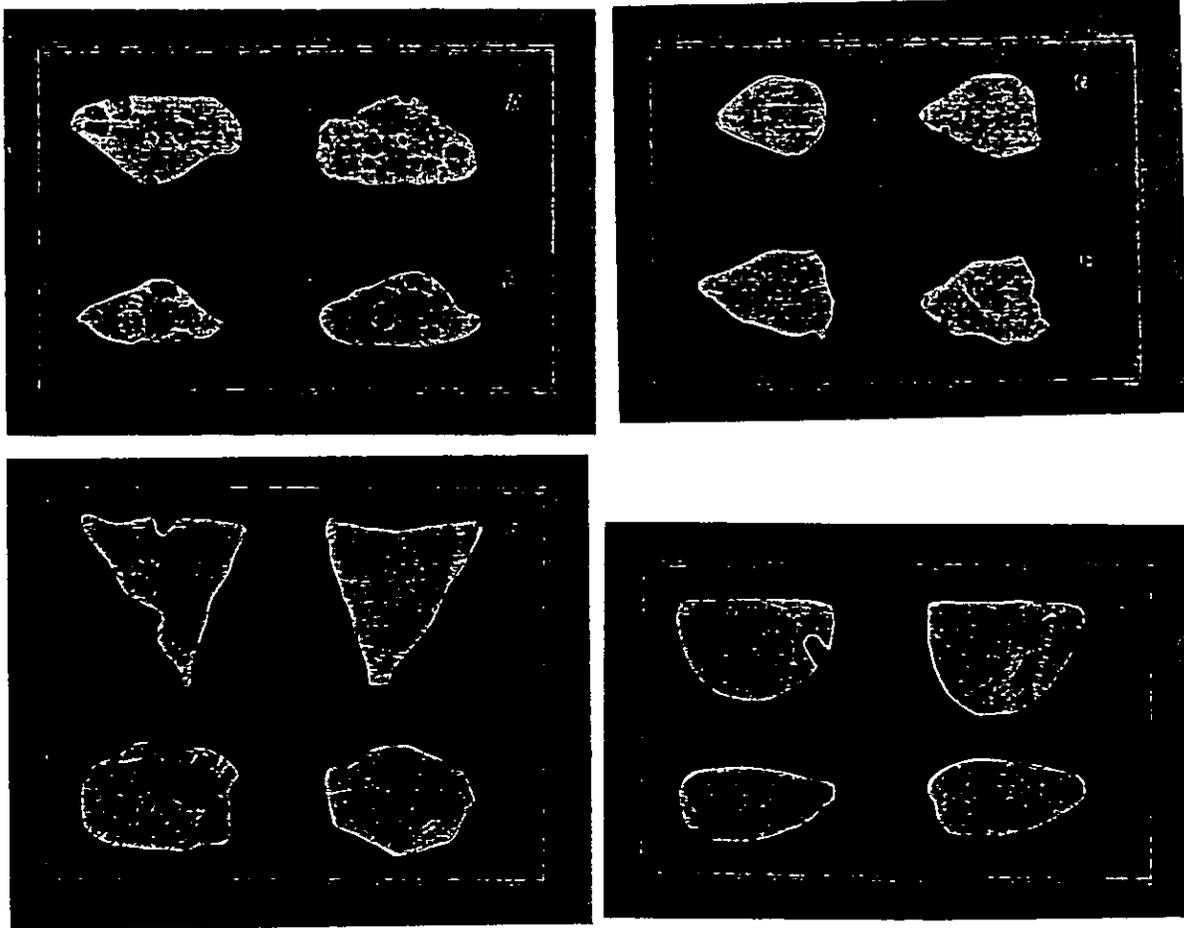


Figura 4: A).- cortes histológicos de hígados de una rata con el tratamiento completo. B).- El mismo tratamiento de A, otra rata C).- Cortes histológico de hígado de una rata con el tratamiento con 2AAF y hepatectomía. D).- mismo tratamiento C otra rata. G).- Cortes histológicos de ratas sin tratamiento. H).- El mismo tratamiento de G, otra rata. E).- Cortes de hígado con hepatectomía solamente. F).- El mismo tratamiento, otra rata.

Cuando se probó el efecto del tratamiento *in vitro* con dimetil sulfoxido DMSO; vehículo del carcinógeno, o con dos diferentes dosis de 2AAF, 5×10^{-7} o 15×10^{-7} en hepatocitos de ratas que recibieron el tratamiento completo *in vivo*, no se observaron diferencias en el número de células totales (fig 5A y 5B) o en el número de células GGT positivas (fig 5C y 5D) con respecto a los cultivos que no recibieron tratamientos *in vitro*.

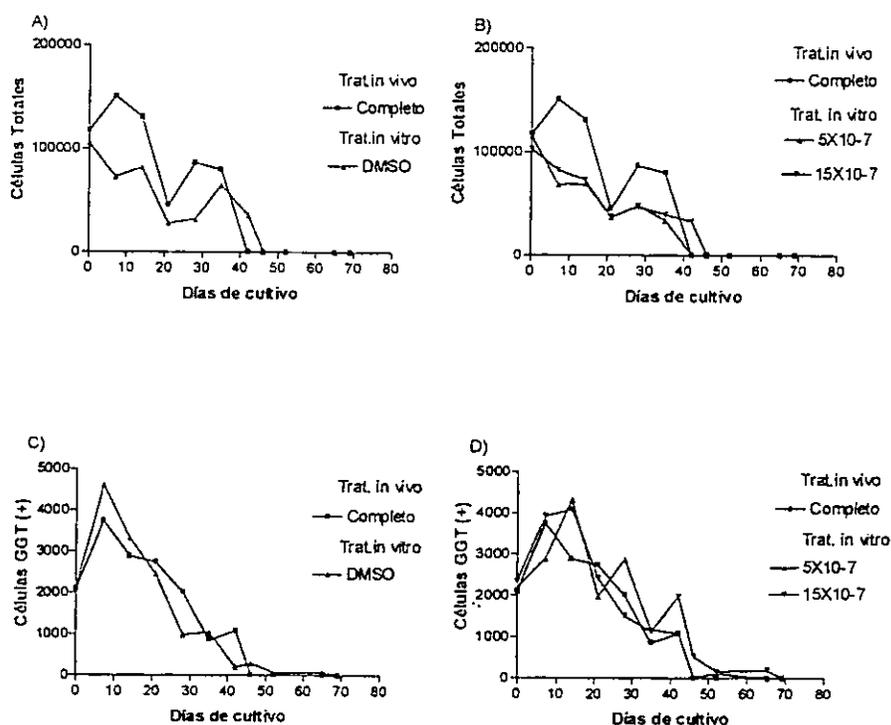


Figura 5: Efecto de diferentes tratamientos *in vitro* en cultivo de hepatocitos de ratas tratadas *in vivo* con el método de Farber

Cuando los cultivos, obtenidos de los hígados de las ratas tratadas *in vivo* con DEN, o con DEN y hepatectomía y sacrificadas a los 25 días, y posteriormente tratados *in vitro* con DMSO, o con del 2AAF, 5×10^{-7} o 15×10^{-7} solo se observó diferencia al séptimo día en el cultivo que se trató 5×10^{-7} 2AAF (fig 6 A). Los cultivos mencionados anteriormente tuvieron un número menor de hepatocitos, ya que la adhesión fue baja y en estos el tratamiento *in vitro* no modifica su comportamiento. Podemos observar que las cifras de sobrevivencia y del número de células GGT⁺ fueron las mismas que en los cultivos de hepatocitos que no fueron tratados *in vitro* (fig. 6).

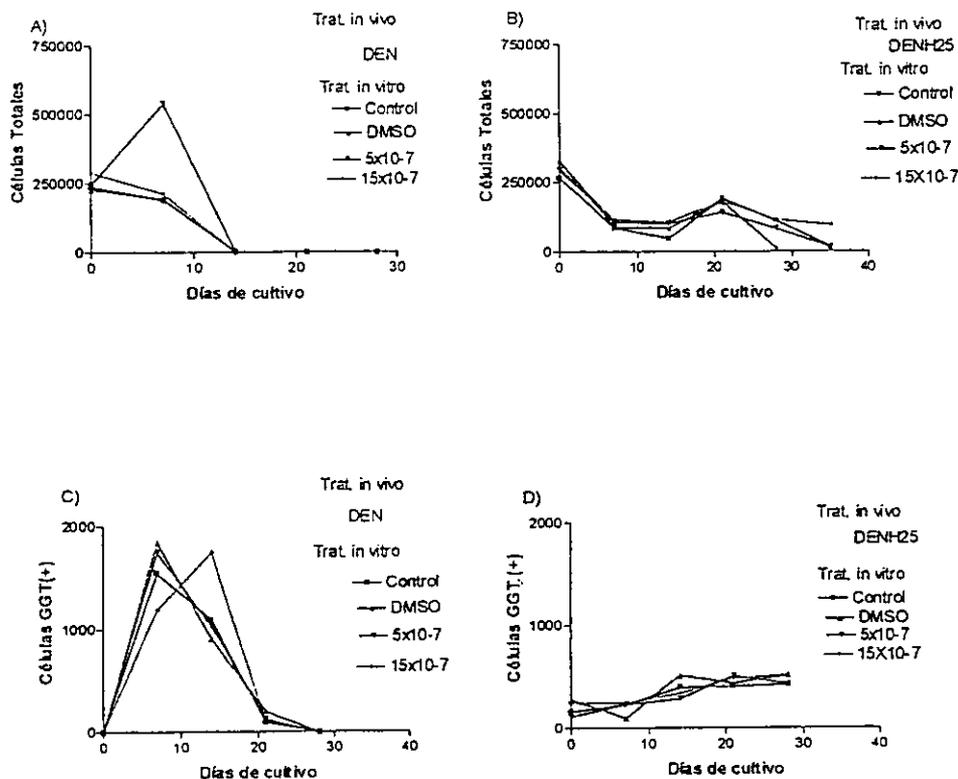


Figura 6: Tratamiento *in vitro* en cultivo de hepatocitos de rata tratada *in vivo* con DEN y DEN hepatectomía

Los hepatocitos de las ratas tratadas *in vivo* con 2AAF mostraron una adhesión del 50% al 70% mayor que las que recibieron el tratamiento completo y 3 veces menor que el grupo que no recibió. Los hepatocitos de las ratas tratadas *in vivo* con 2AAF y hepatectomía mostraron una adhesión igual al de los hepatocitos de las ratas que recibieron el tratamiento completo (fig.1 A y 7A), el comportamiento de estos cultivos no se modificó por el tratamiento *in vitro* (fig. 7).

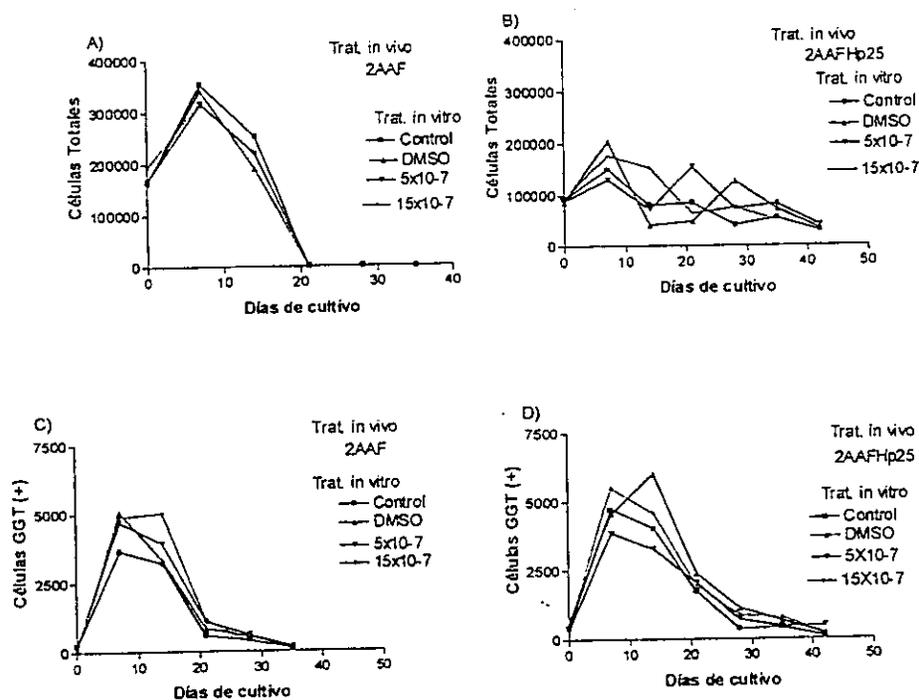


Figura 7: Tratamientos *in vitro* en el cultivo de hepatocitos de rata tratada *in vivo* con 2AAF y 2AAF hepatectomía

Los cultivos primarios de los hepatocitos de los tres grupos de ratas a las que se le administró el tratamiento completo y se sacrificaron a los 25, 270, y 300 días después de iniciado el tratamiento y posteriormente tratados *in vitro* con 2AAF 5X10⁻⁷, 15X10⁻⁷ y con el vehículo del carcinógeno el DMSO no modificaron el número de células totales ni su sobrevivencia (fig 8)

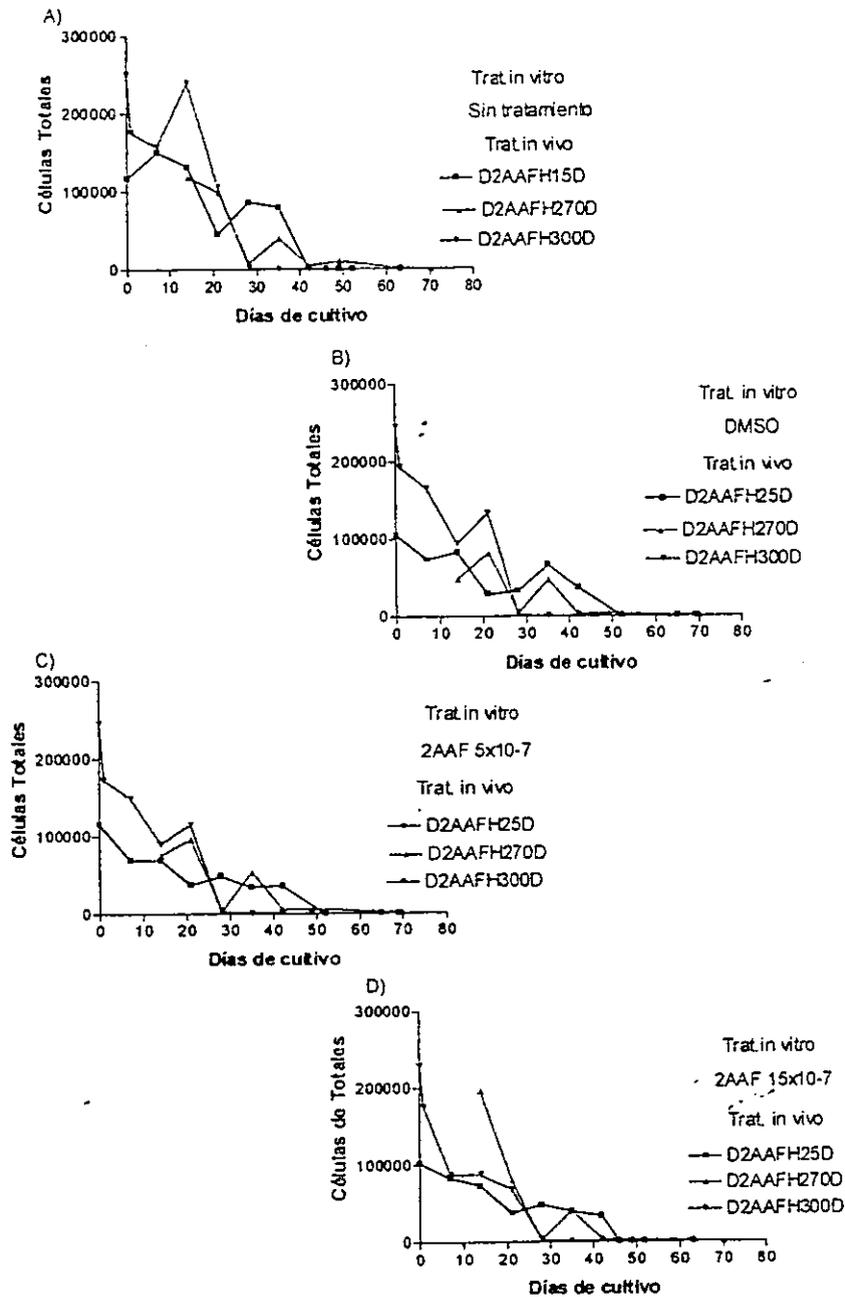


Figura 8 Tratamiento *in vitro* en cultivo de hepatocitos de rata tratadas *in vivo* con el método de Farber

270 y 300 días después expresaron 2.38 y 1.94 veces más células GGT positivas con relación al tratamiento completo *in vivo* de 25 días. El tratamiento *in vitro* con DMSO y con 2AAF a concentraciones de 5×10^{-7} y de 15×10^{-7} no modificaron y el número células GGT

positivas ni su sobrevida (fig 9).

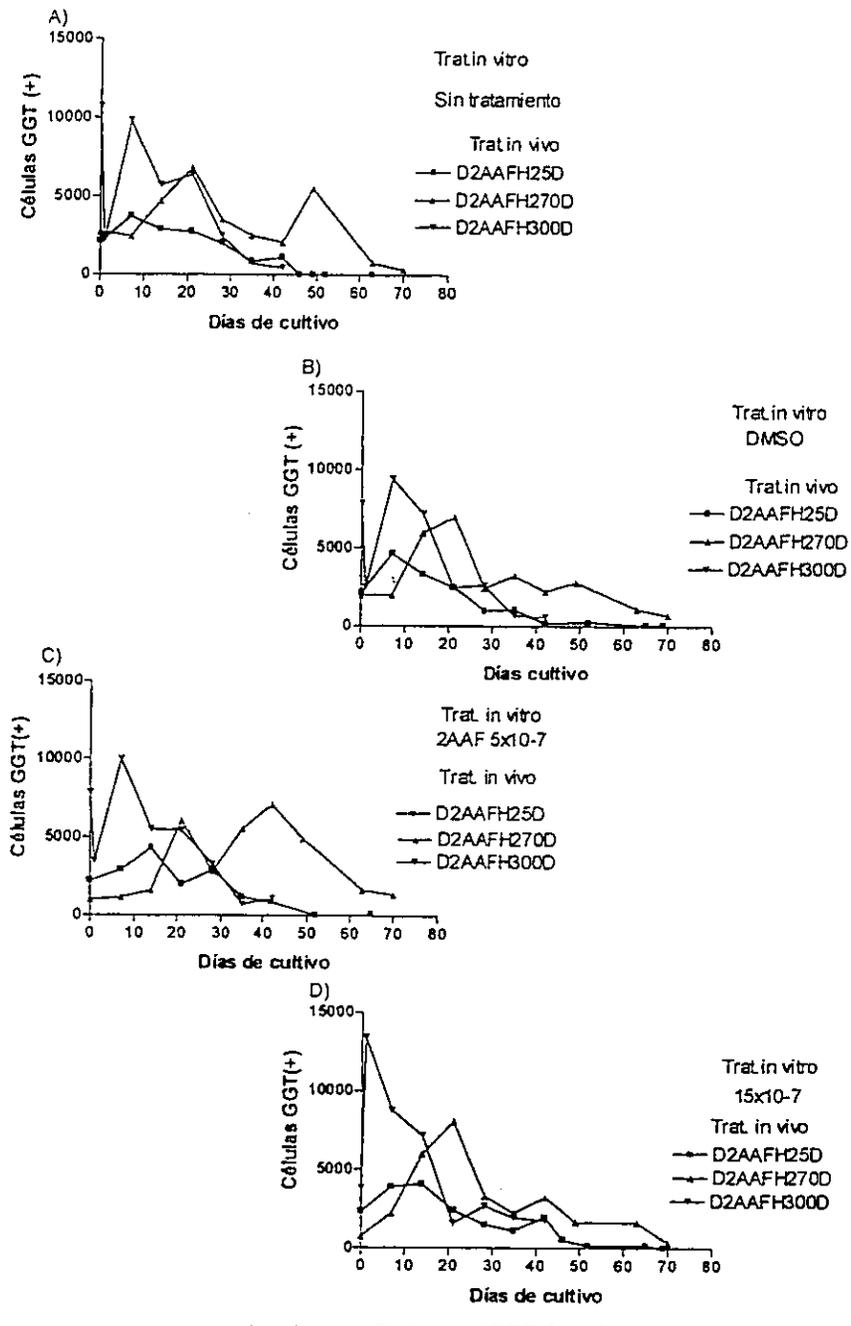


Figura 9: Tratamiento *in vitro* en cultivo de hepatocitos de ratas tratadas *in vivo* con el método de Farber.

DISCUSIÓN

La hepatocarcinogenesis ha sido un pilar para estudiar la carcinogénesis experimental (Farber 1980) estos estudios *in vivo* se complementaron con nuestros estudios *in vitro*. Estos tienen la ventaja de que cubren aspectos que sería difícil estudiar en el animal entero, además de ser costosos y tardados, por lo que se justifica desarrollar el modelo *in vitro* para el estudio complementario de la iniciación y de la promoción. En breve, el sistema *in vivo* cuantifica nódulos que expresan los marcadores de células preneoplásicas y en el sistema *in vitro*, en los cultivos primarios, se analiza el número de células, su sobrevivencia y la expresión de marcadores enzimáticos. (Edwards 1982).

Nuestra hipótesis implicaba que en el modelo *in vivo* de Solt y Farber modificado podemos seguir los procesos de iniciación y promoción *in vitro* por medio de cuantificar la capacidad de proliferación y la expresión de marcadores enzimáticos como la γ GGT.

Esta hipótesis está sustentada por la evidencia en la literatura que las diferentes etapas de la carcinogénesis experimental que se han descrito *in vivo* se pueden reproducir *in vitro* (Yeho et al., 1989, Kitagawa y Pitot 1975.). En cultivo primario de hepatocitos fetales Yeho y col (1989) reprodujeron el proceso de transformación neoplásica usando un iniciador y un promotor.

En este trabajo hemos observado que la cantidad y la duración de los hepatocitos en cultivo que expresan GGT⁺ están relacionadas a los tratamientos que recibieron las ratas *in vivo*. Los cultivos provenientes de ratas a los cuales se les dio el tratamiento completo, fueron los que mostraron el mayor número y la duración más larga del total de células y de las células GGT

positivas.

El tratamiento *in vitro* aún a concentraciones de 2AAF 5×10^{-7} y 15×10^{-7} no modificaron el comportamiento de las células inducido por el tratamiento *in vivo*.

El comportamiento de los cultivos primarios provenientes de ratas a las cuales se les administró el iniciador presentaron sobrevida similar a la de los cultivos primarios de las ratas control. Esto es congruente con lo que se observa *in vivo* ya que el seguimiento de ratas a los cuales se les da solo el iniciador no presentaron nódulos y requirió del estímulo proliferativo y del promotor. (Solt y Farber 1976, Dragan et al., 1994 y Pitot et al., 1989).

Los cultivos de las ratas del grupo al cual se le administró 2AAF como promotor más el estímulo proliferativo, al término de 25 días tuvo un comportamiento similar a los cultivos de las ratas que recibieron el tratamiento completo. De nuestros resultados se puede deducir que el 2AAF es un carcinógeno completo con una gran capacidad de promoción, sin embargo para que se exprese esta capacidad se requiere un periodo mínimo necesario; cuando se administró *in vivo* el promotor y se sacrificaron a las ratas a los 18 días de iniciado el tratamiento, este periodo no fue suficiente ya que el número de células totales y GGT⁺ son muy escasos y el comportamiento de estas células es diferente a los que tuvieron una semana más.

El análisis del comportamiento de las células GGT positivas con los diferentes tratamientos demuestran que el número total de células es bajo, esto concuerda con lo sugerido por Farber (1980) quien analizó que para que ocurra un evento mutacional y quede fijada la lesión a éste, en los modelos de hepatocarcinogénesis se da en proporción 1:10,000.

Los tratamientos de promoción que se hicieron *in vitro* de las células provenientes de esquemas completos, solamente tuvieron efecto en el esquema de 270 días, estos cambios importantes expresan la ganancia de fenotipos alterados teniendo en nuestras manos una herramienta muy interesante para limitar y entender el proceso de transformación

Todo esto nos lleva a sugerir que este ensayo complementario se puede usar para obtener información que permita entender el proceso temprano de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas en donde se eleva la actividad de la GGT (Hanigan and Pitot 1985). El incremento máximo de las células GGT se observan cuando las ratas se tratan con el iniciador, el promotor y el estímulo proliferativo, condiciones necesarias para inducir cáncer de hígado. Es en este proceso donde por medio de la estrategia experimental *in vivo* e *in vitro* podemos establecer un seguimiento durante la etapa de promoción; la presencia de focos, sitio de una célula iniciada, prolifera y la clona se expande, estas células se pueden identificar en los cultivos primarios de hepatocitos y llevar a cabo el seguimiento durante la hepatocarcinogénesis (Black and Wolf 1991).

CONCLUSIONES.

Los resultados indicaron que los cultivos de hepatocitos de las ratas sometidas a iniciación, promoción y hepatectomía *in vivo* y sacrificadas a los 25 días después de iniciado el experimento, tuvieron el periodo de vida más largo, el mayor número de células que expresaron la GGT y las cuales aumentaron progresivamente.

El tratamiento *in vivo* determina el comportamiento de los hepatocitos en los cultivos. Aquéllos provenientes de ratas que tuvieron un tratamiento completo, mostraron la sobrevida de células más prolongada. Los hepatocitos que provienen de los animales que recibieron el iniciador y adicionalmente se les practicó la hepatectomía, tuvieron la sobrevida intermedia, mientras que los que solo recibieron DEN *in vivo* tuvieron la menor sobrevida.

Se observaron diferencias en la sobrevida *in-vitro* de los hepatocitos al modificar el tiempo de sacrificio de la rata. En el tratamiento se les administró el promotor *in-vivo* y se les practicó hepatectomía y después se sacrificó a los animales, los hepatocitos de las ratas que fueron sacrificadas a los 18 días de iniciado el tratamiento sobrevivieron menos tiempo los de aquellas que se sacrificaron a los 25 días, los cuales mostraron un tiempo de sobrevida intermedio. Las células GGT positivas se comportan de manera similar a las células totales siendo notablemente mayor el número de ellas en los hepatocitos de las ratas que fueron tratados con el promotor, hepatectomía y que fueron sacrificados después de 25 días de iniciado el experimento. Lo que nos indicó que es indispensable el estímulo proliferativo pero además, se requiere de tiempo para que el efecto se exprese cabalmente. También se puede concluir que la promoción por medio de un carcinógeno

completo en ausencia del iniciador produce efectos similares aunque menores a los del tratamiento completo.

El análisis comparativo de los tratamientos completos *in vivo* y sacrificio después de 25, 270, 300 días nos indicó que a los 270 días se presenta la mayor sobrevida y en el aumento progresivo de células GGT positivas lo que es congruente ya que estamos en la etapa de la progresión.

La conclusión general es que tenemos una estrategia por medio de los estudios experimentos *in vivo* e *in vitro* durante el proceso de carcinogénesis para dar seguimiento a la etapa de promoción mediante el análisis de las células GGT positivas..

BIBLIOGRAFIA.

1. Asomoto M., Tsuda H., Kagawa M., Camargo J. L., Ito N., and Nagase S. (1989). Strain differences in susceptibility to 2 acetylamino fluorene and phenobarbital promotion of rat hepatocarcinogenesis in a medium-term assay system: Quantitation of glutathione s-transferase p-positive foci development. *Jpn.J. Cancer Res.* 80 939-944.
2. Barrett Carl J. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health perspect.* 100 1-9.
3. Black S. M. and Wolf R.C (1991) The role of Glutathione. Dependent enzymes in drug resistace. *Pharmac ther.* 51 139-154
4. Dragan Y.P., Hully J., Crow R., Mass M., and Pitot H.C.(1994). Incorporation of bromodeoxyuridire in glutathione S-transferase positive hepatocytes during rat multistage hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 15(9) 1939-1947.
5. Dragan Y.P., Hully J., Nakamura J., Mass M., Swenberg J.A., and Pitot H.C. (1994). Biochemical events during initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 15 (7) 1451-1458.
6. Edwards, A.M., (1982) Regulacion of g' glutamyltranspeptidase in rat hepatocyte monolayer culture. *Cancer Research*, 42 1107-1115.
7. Enghusen P.H., Loft S.,(1995)Early biochemical markers of effects enzyme induction, oncogene activation and markers of oxidateve damage. *Toxicology.* 101.55-64.
8. Estadella M.D., Pujol M.J., and Domingo D.(1980). Cell phenotype inestability in preneoplastic foci of rat liver. *Carcinogenesis* 9 (4) 563-566.

9. Farber E. and Soltt D. (1979). New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. 263
701-703
10. Farber E. (1980) The sequential analysis of live cancer induction. *Biochim Biophys acta* 605
149-153
11. Goldsworthy L.T., Hanigan H.M, Pitot C.H., (1983). Models of hepatocarcinogenesis in the rat
contrasts and comparisons. *CRC Crit. Rev. toxicolo.*17 61-89.
12. Habib S.L., Srikanth N.S., Scappaticci F.A., Faletto M.B., Maccubbin A., Farber E., Ghoshal
A.K., and Gurtoo H. L. (1994) Altered expression of cytochrome P450 mRNA during
chemical-induced hepatocarcinogenesis and following partial hepatectomy. *Toxicology and
applied pharmacology.* 124 139-148.
13. Hanigan M., and Pitot H. (1985) Gamma-glutamyl transpeptidase it is role in
hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 6 165-169
14. Hendrich S., and Pitot H.C. (1987). Enzymes of glutathione metabolism as biochemical
markers during hepatocarcinogenesis. *Cancer Metastasis* 6 155-178.
15. Joseph W., Parton J.W., Yount J.D.,and Garriott M.L. (1995). Improved Sensitivity of the
unscheduled DNA synthesis assay in primary rat hepatocytes following culture in serum-free
defined media. *Environ. Mol. Mutag.* 26 147-154.
16. Ghia M., and Mereto E. (1989) Induction and promotion of g-glutamyltranspeptidase- positive
foci in the liver of female rats treated with ethinyl estradiol, clomiphene, tamoxifen and their
associations. *Cancer Letters* 46 195-202.

17. Gonzalez Horta M.C. (1987). Uso de la GGT y la GST para identificar hepatocitos preneoplásicos *in vitro*; tesis para obtener el grado de doctorado Departamento de Biología Clínica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. 1-147.
18. Goodspeed D.C., Dunn T.J., Miller C.D., and Pitot H.C. (1989) Human γ -glutamyl transpeptidase cDNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. *Gene* 76 1-9.
19. Kitagawa T, Pitot H C,(1975). The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and n-2-fluoreylacetamide feeding. *Cancer Res.* 35.1075-1084.
20. Kitagawa, T., Watanabe, R., And Sugano, H. (1980). Introduction of γ -Glutamyl transpeptidase activity by dietary phenobarbital in "spontaneous" hepatic tumors of C3H mice *Gann*, 71, 536-542
21. Leyva A. and Kelley W.N. (1974) Measurement of DNA in cultured human cells. *Analytical Biochemistry* 62, 173-179
22. Marché C. A, Fattel Fazenda S., Rojas Ochoa A., Arce Popoca E., Villa Treviño S. (1995). Follow-up of GTS-P during hepatocarcinogenesis with DEN-2AAF in F344 rats. *Arch. Med. Res.* 26 s169-s173.
23. Marché C.A., Fernández O.A., Morales G.M., Sobrevilla C.P., Rojas O.A.; Fattel F.S.; Arce P.E., Villa T.S. (1996). Glutathione sulfhidrilo transferasa clase pi marcador temprano de células iniciadas durante la carcinogénesis química en roedores: Perspectivas para su aplicación clínica en cánceres humanos.(parte 3: perspectivas). *Bioquímica* 21 (1-82) 424-434.
24. Pitot H.C., Goodspeed D., Dunn T., Hendrich S., Maronpot R.R., and Moran S. (1989) Regulation of Expression of some genes for enzymes of glutathione metabolism in

- hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 97 23-34.
25. Pitot H.C., Dragan Y., Sargent, and Xu Y.H. (1991). Biochemical Markers associated with the stages of promotion and progression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 93 181-189.
26. Richmond R.E., Carter J.H., Carter H.W., Daniel F.B., DeAngelo A.B. (1995) Immunohistochemical analysis of dichloroacetic acid (DCA)-induced hepatocarcinogenesis in male Fischer (F344) rats. *Cancer Letters* 92 67-76.
27. Richmond R.E., Carter J.H., Carter H.W., Daniel F.B., DeAngelo. (1996). Hepatocyte expression of tumor associated aldehyde dehydrogenase (ALDH-3) and p21 Ras following diethylnitrosamine (DEN) initiation and chronic exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DHEP). *Carcinogenesis* 17 (8) 1647-1655.
28. Rojas O.A. (1994) Establecimiento del cultivo primario de hepatocitos de hamster fetal para estudios de carcinogénesis. Tesis para obtener el título de biólogo Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala.
29. Rosales Encina Jose Luis. (1982). Estudio de la iniciación de la transformación celular por 2AAF en cultivo primario de hepatocitos de rata. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en la especialidad de Biología Celular. Centro de Investigaciones y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 11-106
30. Sambasiva R.M., Mohan R.N., Nobuteru U. Dante G.S., Takao M., Henry C., Pitot, and Janardan K.R., (1988) Lack of expression of glutathione-S- transferase P. γ -Glutamyl transpeptidase, and γ - fetoprotein messenger RNAs in liver tumors induced by peroxisome proliferators. *Cancer Research* 48 4919-4925.
31. Sarkar A., Mukherjee B., Chatterjee M., (1995) Inhibition of 3'- methyl-4-

- dimethylaminoazobenzene-induced hepatocarcinogenesis in rat by dietary β -carotene: changes in hepatic anti-oxidant defense enzyme levels. *int. j. Cancer* 61 799-805.
32. Shuichi A, Kaawamura k. and Takemoto (1994) Increased susceptibility to oxidative DNA damage in regenerating liver. *Carcinogenesis* 15(3) 539-543
33. Talamás P. Rohana.(1983) Estudio comparativo de los fenómenos involucrados en la iniciación de la carcinogenesis química por la C-DMN en cultivo primario de hepatocitos de rata intacta y de rata parcialmente hepatectomizada. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias con la especialidad en biología Celular 1-93.
34. Ulla Stenius, Warholm M., Ult Martens and Högderg J.(1994). Isolation of glutathione S-transferase P-positive hepatocytes from carcinogen treated rats by use of ethacrynic acid as selecting agent. *Carcinogenesis* 15 (8) 1561-1566.
35. Villa Treviño s.(1990). Los eventos del proceso de cáncer por sustancias químicas. XVII Taller latinoamericano de educación y actualización. Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México. 231-271
36. Yeoh, G., Porter, I., Arcus, M. and Douglas, A. (1989). Transformation of cultured rat liver cells by MDAB and phenobarbital, morphological, biochemical and immunocytochemical characterization of cell lines. *Carcinogenesis* 10 (6) 1051-1027.
37. Yuan Soon H., and Jen-Kun Lin (1994). N-Nitroso-2 acetilaminofluoreno: A direct-acting carcinogen inducing hepatocellular carcinoma in Sprague-Dawley Rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 85 794-800.
38. Zalatinia A., Lapis K. (1994) Decreased hepatocarcinogenic effect of diethylnitrosamine in experimentally induced liver cirrhosis in rat: delay or inhibition. *Cancer Letters* 79 1-7