

## Efecto de la cicloheximida sobre la cancerización hepática con dietilnitrosamina \*

A. Alonso \*\*

Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad de Navarra.  
Pamplona (España)

(Recibido el 1 de julio de 1970)

A. ALONSO. *Effect of Cycloheximide on the Liver Carcinogenesis Process Induced by Diethylnitrosamine*. R. esp. Fisiol., 26, 347-364, 1970.

This work is related to the protein synthesis inhibition realized by Cycloheximide on the experimental liver carcinogenesis by diethylnitrosamine.

The animals were divided in 3 groups; the first one received only cycloheximide; a second one was treated with diethylnitrosamine and the last one received simultaneously cycloheximide and diethylnitrosamine.

Studies with light microscope don't show important changes in the first of them. The second group as well as the third, present a sequence of alterations that in the first stage ruled over the toxic effect and afterwards coexist with the development of morphological carcinogenesis precursors: the hyperbasophilic foci and finally growing hepatomas.

The microscopic electronic observations reveal differences in the rough endoplasmic reticulum and in the nucleolar structure in the group treated simultaneously with both substances, comparing with the one which receive exclusively diethylnitrosamine, while in the first group the changes are few and resemble those of the third one but on the first phase.

It is discussed why the carcinogenesis process is not altered and the possible mechanisms involved.

Desde la formulación por VIRCHOW de su teoría irritativa como causa del desarrollo tumoral, hasta los esquemas presentados últimamente por HEIDELBERGER o LARIONOV, innumerables han sido las tentativas por las que ha atravesado la Oncología Experimental en un intento de

comprensión del origen y desarrollo del cáncer. Sin embargo, no se ha conseguido aún un modelo teórico capaz de responder a todas y cada una de las preguntas que surgen ante el crecimiento tumoral.

El desarrollo que en los últimos años ha sufrido la Oncología Experimental ha permitido dirigir la atención de la investigación actual hacia la cinética celular a nivel molecular, si bien los hallazgos aparentemente contradictorios encontrados en muchas experiencias, nos señalan lo lejos que estamos aún de la solución definitiva

\* Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Oviedo, en febrero de 1970.

\*\* Dirección actual: Pathologisches Institut der Universität. Bonn (Alemania).

del problema. No obstante, existen conclusiones aceptadas que consideran la carcinogénesis como un trastorno del crecimiento celular, trastorno probablemente debido a una perturbación en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas celulares, y/o de sus mecanismos reguladores.

Los tumores se caracterizan por un crecimiento anárquico de sus elementos celulares, estando en ocasiones disminuido su *Tc*. Aunque son variables las tasas de crecimiento y síntesis proteica, en los nódulos basófilos el número de mitosis marcadas es inferior al que se presenta en el hepatoma ya definido. Se ha comprobado en la cancerización del hígado por colorantes azoicos, que acaso exista una mayor cantidad de células hepáticas que entren en fase S, sin que ello quiera indicar variación en esta fase, aunque parece probable un acortamiento dentro de los escasos límites permisibles (5). La cinética celular sufre por tanto una alteración, paralela a los errores metabólicos que se presentan en todos los procesos de carcinogénesis química.

Hemos creído oportuno realizar el estudio del cuadro morfológico que aparece durante el tratamiento combinado de un cancerígeno, dietilnitrosamina (DNA), y un inhibidor de la síntesis proteica, cicloheximida (CHX), y comprobar las posibles variaciones en relación al control para el carcinógeno. Si el inhibidor afecta proteínas directamente implicadas en el proceso de carcinogénesis, asistiremos también a un alargamiento del tiempo de inducción tumoral. De igual manera, estábamos interesados en estudiar cuáles eran las relaciones entre sí de los orgánulos celulares cuando la síntesis proteica citoplásmica se hallaba disminuida.

Probablemente el DNA obre tras ligarse en posición 7 con la guanina del ADN, produciendo a partir de entonces copias erróneas de ADN. Es posible que además de esta manera de actuar, propia de todos los agentes alquilantes, pueda li-

garse con las proteínas citoplásmicas de manera irreversible.

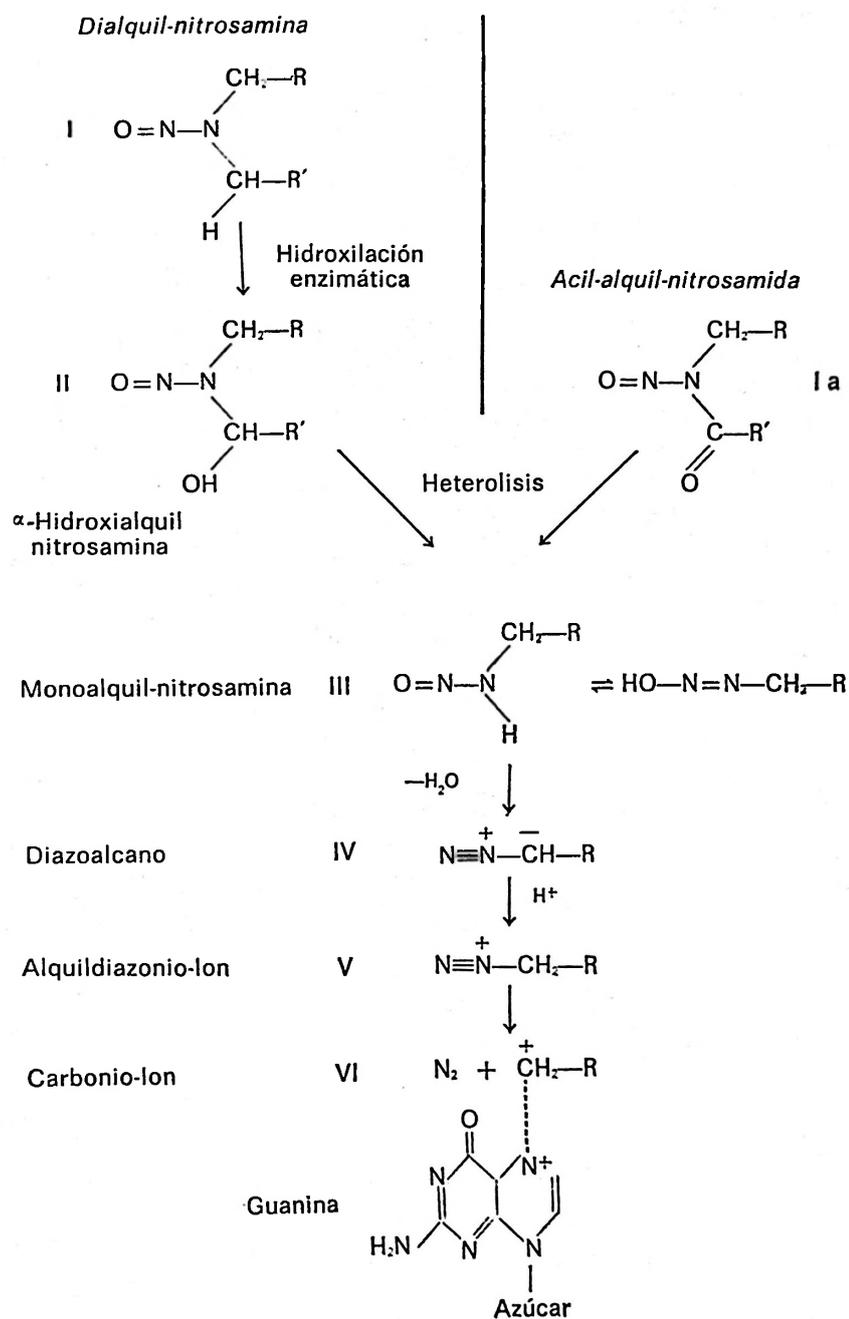
En el esquema I se presenta el metabolismo de las nitrosaminas. Escasos han sido los trabajos publicados referentes a microscopía electrónica de los hepatocitos tras adición *in vivo* de CHX durante fases prolongadas. No bien conocida aún su manera de actuar, parece probable que obre sobre la tercera fase de la síntesis proteica, impidiendo al enzima transferasa II la formación del enlace péptido (4, 12, 39). Su acción recae en la fase S del ciclo celular, a la vez que inhibe también una proteína específica en la fase G2 (50).

### Material y métodos

En la experiencia hemos empleado ratas macho albinos, de la raza Wistar, en un número total de 60. Divididos en dos grupos, uno de ellos, de 20 animales, sirvió de control para la CHX; el otro, de 40 animales, fue empleado como grupo base de la experiencia. Como control para el DNA hemos tomado los datos obtenidos en nuestro laboratorio, en un trabajo realizado simultáneamente con el nuestro referente a la cancerización hepática con DNA (48). Los pesos de las ratas fueron sumamente homogéneos, variando ligeramente en torno a 190 gramos al comienzo de la experiencia.

La administración de la CHX (Actidione, Man Research Laboratories, Division of Becton, Dickinson Co., N. Y.) se hizo por vía peritoneal tres días a la semana a razón de 0,05 mg/kg de peso, empleando una solución de 2 mg de CHX en 100 mililitros de suero fisiológico. El cancerígeno (N-Nitrosodiethylamine, Eastman Chemicals, Rochester, 3 N. Y.) se les administró seis veces por semana en el agua de bebida a dosis de 5 mg/kg de peso/día.

Cada quince días se mataron ratas tratadas y del grupo control, haciéndose semanalmente tras los primeros sesenta de



Metabolismo general de las nitrosaminas. Tomado de DRUCKREY *et al.* (11).

tratamiento. En todos los casos las ratas fueron decapitadas tras ser sometidas a ayuno durante 16 horas antes de la muerte. Realizamos necropsia de todas las ratas sacrificadas, tomando diversos órganos para microscopía óptica, que fueron fijados en formol al 10% neutralizado, Bouin y Carnoy. En todos los casos se tomaron fragmentos de los lóbulos derecho, izquierdo y triangular hepáticos. Se hicieron cortes tras inclusión en parafina a  $6 \mu$  de grosor y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina, Verde-metilopironina y PAS para demostración del glucógeno. La grasa se demostró con Sudán III en cortes por congelación.

Para microscopía electrónica se tomaron diversos fragmentos de hígado, bazo y páncreas inmediatamente después del sacrificio del animal. Los cortes fueron hechos en un Ultratomo LKB, utilizando cuchillos de cristal, entre 300 y 500 Å de espesor. Anteriormente realizamos secciones a  $1 \mu$  de grosor, fijadas con glutaraldehído-tetróxido de osmio e incluidas en Epon, y que nos sirvieron para seleccionar las zonas más representativas para el posterior tallado de la pirámide. Recogidos los cortes ultrafinos en redes de cobre, se diferencian en acetato de uranio e hidróxido de plomo. Las observaciones se hicieron siempre en un Elmiskop IA trabajando a 60 Kv.

*Elección de la dosis.* — Con objeto de ajustar la dosis de antibiótico a administrar durante la fase crónica de la experiencia, se realizó un ensayo previo de toxicidad aguda, con una duración de diez días, utilizando una dosis diaria de LD50/4, y que nos condujo a disminuir la dosis a LD50/12, que hemos empleado en nuestro trabajo.

### Resultados

Durante el período de tratamiento se produjo la muerte de tres ratas a los 180

días de administración del DENA y CHX, y 8 del grupo control para el DENA después de 140 días, siendo en todos los casos producida por una hemorragia hepática.

Tras los 90 primeros días de tratamiento, y en los grupos que recibían DENA, la superficie del hígado era granulosa y mate, siendo el tejido friable con suma frecuencia. Los tumores variaban en cuanto a tamaño desde un grano de mijo hasta un diámetro aproximado al de una moneda de diez céntimos. Su color era blanco nacarado y al corte presentaban resistencia. En las últimas semanas de tratamiento aparecieron grandes dilataciones quísticas conteniendo habitualmente coágulos de sangre y rodeados de una fuerte reacción conjuntiva en muchos casos. Los tumores del grupo tratado exclusivamente con DENA eran de un tamaño superior a los desarrollados en el tratamiento combinado del cancerígeno y el antibiótico; en este caso aparecían con una superior incidencia en el lóbulo izquierdo. Los lóbulos caudales aparecían uniformemente infiltrados de tumor, no advirtiéndose zonas de parénquima normal ni tumor definibles macroscópicamente. El tamaño del hígado era en todos los casos muy inferior al normal. La incidencia de tumores en el grupo base de la experiencia fue del 100% para los hepatomas, a la vez que obtuvimos siete papilomas de esófago, un carcinoma bronquial y dos colangiomas, existiendo en dos ocasiones metástasis de hepatomas en pulmón. En ningún caso pudimos comprobar metástasis en peritoneo ni en ganglios linfáticos regionales.

Simultáneamente con las lesiones descritas en hígado, se comprobó en seis ocasiones, necrosis con calcificación de testículo — lo que advertimos en tres ocasiones en el grupo control para la CHX —, fibrosis del epidídimo en tres ocasiones, otitis media supurada en una ocasión y nefritis ascendente en otra. Los ganglios

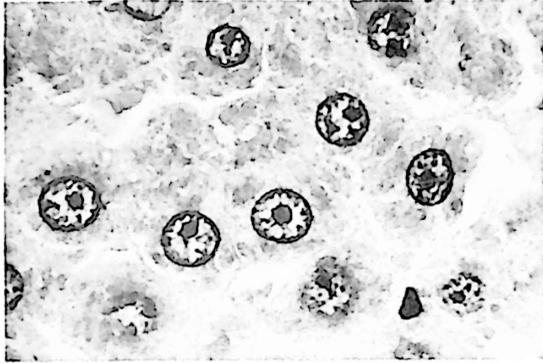


Fig. 1. Corte histológico de hígado tras 80 días de tratamiento con CHX. No existen alteraciones ( $\times 1.000$ ).

linfáticos aparecían repletos de células plasmáticas, que en ocasiones llegaban a la cortical y hacían desaparecer la estructura folicular normal del ganglio, hallazgo también habitual en el grupo tratado solamente con CHX. El bazo presentó abundantes macrófagos cargados con pigmento férrico. Extensiones de médula ósea no revelaron hallazgo cualitativo alguno, así como tampoco las realizadas con sangre periférica. Electroforesis del suero de ratas del grupo tratado con CHX evidenció disminución de las gamma-globulinas.

**CICLOHEXIMIDA. Microscopía óptica.** — Los hallazgos fueron escasos, si bien es posible dividirlos en dos etapas, que alcanzan: la primera, desde el principio del tratamiento hasta los setenta y siete días, y, la segunda, hasta el final de la experiencia.

En la primera, los hallazgos se limitan a una discreta vacuolización de los hepatocitos, que presentan el núcleo rodeado de una zona clara, estando los témpanos basófilos rechazados a la periferia. En tanto la porción centrolobulillar aparece respetada, es la periportal la que presenta los signos más evidentes de vacuolización.

En la segunda etapa las células han re-

cobrado su condensación citoplásmica normal, siendo siempre la ploidía la propia de la edad de la rata (fig. 1). Los senos aparecen dilatados, si bien las células de Kuffer no presentan signo alguno de interés. Se advierten pequeños focos puntiformes inflamatorios distribuidos por el parénquima hepático y constituidos por acúmulos de células redondas.

**CICLOHEXIMIDA. Microscopía electrónica.** — En la primera imagen celular que aparece tras siete días de tratamiento se advierte proliferación del retículo liso, estando el citoplasma uniformemente infiltrado de agua, lo que confiere a los hepatocitos un aspecto esponjoso. El depósito de glucógeno es grande en los espacios libres. El retículo rugoso se encuentra normal y es frecuente hallarlo en bloques al lado de las mitocondrias formando islotes en el citoplasma vacuolizado (fig. 2). En los núcleos sólo se advierte un ligero aumento de los granos de pericromatina. La imagen es semejante después de treinta días de tratamiento.

Tras sesenta y cuatro días la vacuolización es menos evidente; en el núcleo se advierte un mayor número de granos de intercromatina. En el citoplasma, el ergastoplasma está disminuido y con escasos

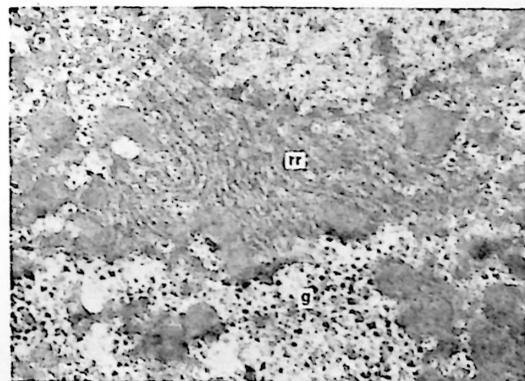


Fig. 2. Bloques de retículo rugoso (rr) vecinos a zonas ópticamente vacías y de escaso contenido en glucógeno (g) ( $\times 18.000$ ).

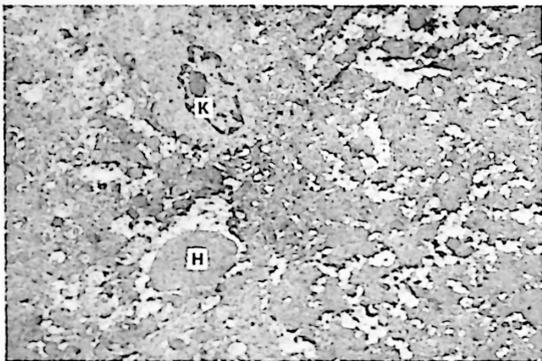


Fig. 3. *Hematie fagocitado por una célula parenquimatosa (H).*  
K = célula de Kupffer ( $\times 5.400$ ).

ribosomas adheridos. El glucógeno se hace particularmente abundante. La condensación del material sigue siendo superior en la periferia celular. Aparece por primera vez una formación semejante a una red o cuerpo multivesicular, en estrecha relación de la vecindad con la zona de Golgi y el canalículo biliar. Son frecuentes las inclusiones de lípidos, así como los lisosomas con material destruido. Hay pequeñas figuras de mielina rodeadas de una amplia zona ópticamente vacía, probablemente debida a un artefacto de fijación.

A partir de los setenta y siete días falta la imbibición acuosa. En las células claras se advierte proliferación del retículo liso, que ocupa prácticamente todo el citoplasma celular; falta casi por completo el glucógeno en tanto es abundante el número de inclusiones lipídicas. El ergastoplasma que rodea a las mitocondrias aparece casi desprovisto de ribosomas; se hacen visibles algunas mitocondrias en forma de copa. En el nucléolo hay evidentes signos de segregación. No es frecuente ahora el hallazgo de lisomas.

Tras noventa y cuatro días, el retículo liso se ha dilatado, formando lagunas de contenido poco denso al paso de los electrones. El ergastoplasma aparece disminuido y las porciones que rodean a las mi-

tocondrias se hallan dilatadas. Son muy frecuentes los ribosomas libres. La segregación nucleolar se hace más patente y hay frecuentes eritrofagocitosis y presencia de siderosomas (fig. 3). Los microbodis son particularmente abundantes y a veces aparecen repletos de una sustancia densa, comprobándose en otras ocasiones la presencia de membranas múltiples en su interior; es frecuente encontrarlos en el espacio de Disse. Se advierten ahora unas formaciones cerradas, dibujando contornos irregulares, en cuyo interior existe en ocasiones una sustancia amorfa densa, y en otras, organelas aparentemente normales. Hay de nuevo figuras de mielina de pequeño tamaño y en relación con microbodis. Las relaciones entre las células se han hecho más complejas, siendo normal el hallazgo de complicadas interdigitaciones de trayecto sinuoso. A partir de este momento y hasta el final, las células adquieren un aspecto normal, destacando solamente una ligera hiperplasia del retículo.

CICLOHEXIMIDA Y DIETILNITROSAMINA.  
*Microscopía óptica.*—A los veintiún días de tratamiento la arquitectura lobulillar se encuentra respetada, pero existe una fuerte vacuolización que afecta todo el lobulillo, siendo más evidente en torno al

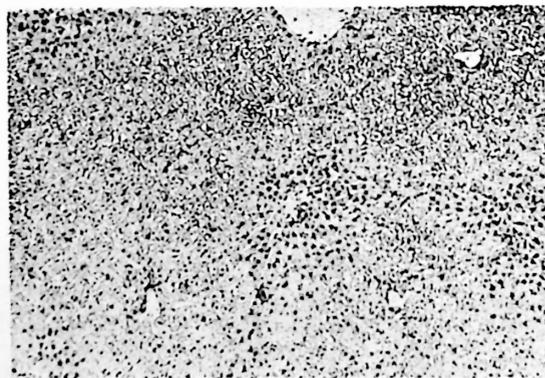


Fig. 4. *Vacuolización del lobulillo hepático tras 21 días de tratamiento ( $\times 100$ ).*

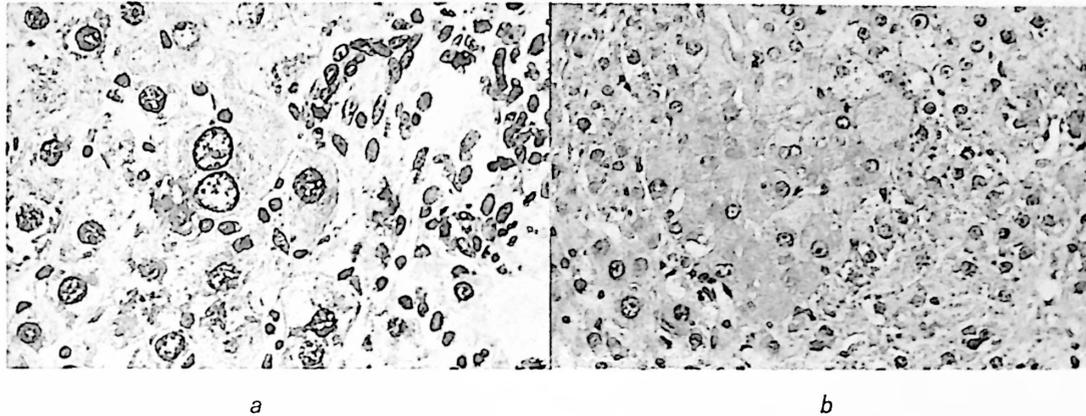


Fig. 5. Efectos tóxico y cancerígeno del DENA.

a) Célula homogénea binucleada, rodeada de hepatocitos normales. b) Nódulo inicial de células basófilas ( $\times 250$ ).

espacio portal (fig. 4). En las células, los témpanos basófilos han sido rechazados a la periferia. Es frecuente el hallazgo de células necróticas en torno a la vena centrolobulillar.

A los treinta y dos días de tratamiento la vacuolización se ha hecho menos evidente, para reaparecer de nuevo tras sesenta días; aparecen ahora unas células de citoplasma homogéneo, de tamaño superior al normal y núcleo voluminoso, comprobándose en ocasiones la presencia de gruesos nucléolos — células homogéneas — (fig. 5 a). En las células parenquimatosas existen corpúsculos de inclusión redondos, homogéneos y acidófilos. La ploidía ha aumentado, y en las células de Kupffer se observa abundante pigmento férrico. Hay frecuentes mitosis y evidentes signos de necrobiosis.

Tras setenta y cinco días, sigue existiendo vacuolización en el lobulillo. Las mitosis son muy frecuentes y aparecen núcleos gigantes en estrecha relación a los grupos de células homogéneas. Hay hiperplasia de los conductos biliares. Aparece ahora un tipo celular distinto, en estrecha relación de vecindad con las células que hemos llamado homogéneas; son unas célu-

las de poco tamaño, diploides probablemente, con el citoplasma fuertemente basófilo y un nucléolo. Suelen hacer su aparición en grupos de cinco a seis y no es raro observarlas en una zona de células homogéneas (células basófilas). A partir de este momento la arquitectura lobulillar se ve afectada; las células homogéneas forman ya verdaderos nódulos y sus caracteres se han acentuado, presentando núcleos grandes y vesiculosos y un citoplasma voluminoso y homogéneo, donde tinción con VMP revela escasa existencia de ARN citoplásmico.

A partir de los cien días, los nódulos de células homogéneas son muy evidentes, rechazando hacia la periferia al tejido hepático normal. En su interior aparecen corpúsculos de inclusión, PAS positivos; asimismo es frecuente la vacuolización, primero uniformemente y luego formando grandes vacuolas múltiples, imagen que se hace habitual tras 117 días de tratamiento. A partir de los 125 días, los cuerpos de inclusión se han hecho muy abundantes, a la vez que se ha generalizado la producción de pequeños nódulos de 10 a 20 células del tipo de las basófilas (figura 5 b). La tasa de mitosis es muy elevada

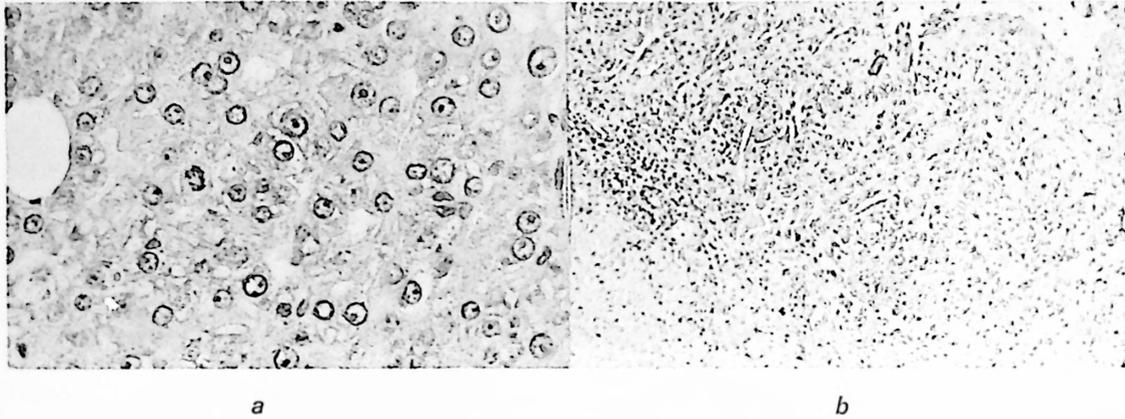


Fig. 6. Tipos de tumores.  
a) Hepatoma ( $\times 400$ ); b) Hepatocarcinoma ( $\times 100$ ).

ya, y los nódulos basófilos crecen rápidamente, rechazando los hepatocitos normales y transformándose en verdaderos hepatomas (figs. 6 a). Los senos están dilatados, dando lugar a la aparición de quistes sanguíneos. En los hepatomas, las células son muy semejantes entre sí, de citoplasma pálidamente basófilo y con un núcleo pobre en cromatina, pero que posee un grueso nucléolo en su centro. En ocasiones se observa un crecimiento elipsoide, siendo tumorales las células centrales en tanto las externas son del tipo de las homogéneas, y en general vacuolizadas.

El cuadro sigue desarrollándose y tras 160 días de tratamiento aparecen dos colangiomas. Al mismo tiempo, los hepatomas se han malignizado, con aparición de células gigantes multinucleadas y fuerte anisocariosis, perdiéndose las relaciones entre los citoplasmas celulares, lo que las hace adquirir aspecto sarcomatoso: se trata ya de verdaderos hepatocarcinomas (figura 6 b). Rodeando las dilataciones quísticas, hay grupos de células que recuerdan a las de los conductos biliares, y que están aisladas del parénquima hepático por una gruesa banda de tejido conjuntivo. En el interior de los quistes se forman frecuentemente trombos, que sufren una organi-

zación posterior, siendo posible encontrar macrófagos cargados de hemosiderina y neoformación de vasos. Suelen presentarse simultáneamente frecuentes cariorrexis, así como una degeneración grasa acentuada que afecta a los hepatocitos no tumorales y a las células homogéneas.

En los últimos estadios se encuentra fuerte fibrosis de algunas zonas del hígado, a la vez que se establecen sinequias con los órganos anatómicamente cercanos.

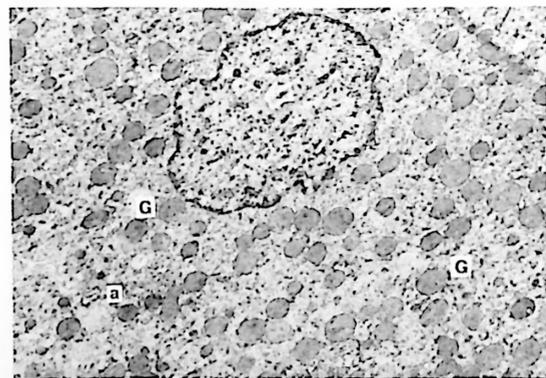


Fig. 7. Electronografía de un hepatocito en los primeros días de tratamiento. El RER se halla fraccionado y es posible encontrar anillos reagregados (a). G = gota de lípido ( $\times 4.500$ ).

También es fácil comprobar amplias dilataciones de los conductos biliares que presentan el epitelio notablemente bajo.

**CICLOHEXIMIDA Y DIETILNITROSAMINA.**  
*Microscopía electrónica.* — Las primeras imágenes que se presentan son de fuerte reacción del retículo rugoso, frecuente rotura de sus membranas y agregación posterior de los restos, dando una imagen invertida, y en la que es posible comprobar los ribosomas en el interior de los anillos de RER neoformados (fig. 7). Por otra parte, los ribosomas son escasos y la dotación por unidad de longitud de retículo rugoso

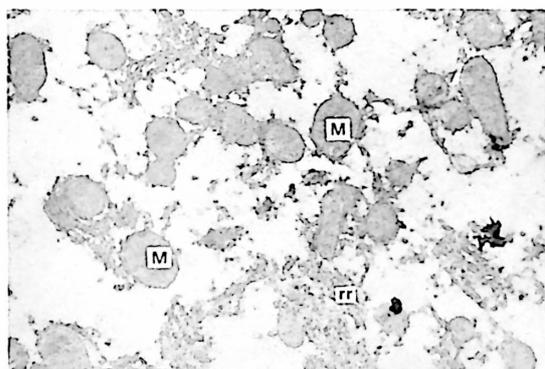


Fig. 8. Fuerte edema celular. Mitochondrias (M) y restos de ergastoplasma (rr) flotan en el citoplasma fundamental ( $\times 16.000$ ).

se halla disminuida. Las cisternas han perdido su orientación paralela y siguen trayectos irregulares, apareciendo dilatadas en ocasiones. Es frecuente el hallazgo de citosegresomas que engloban restos de mitocondrias y retículo en vías de destrucción. Las células de Kupffer se hallan algo activadas y presentan con frecuencia figuras de mielina.

A los treinta y tres días de tratamiento la imagen ha variado. Se comprueba acentuada hiperplasia del retículo liso, en tanto que el rugoso se ha recuperado parcialmente, aunque con una dotación ribosomal inferior a la que normalmente

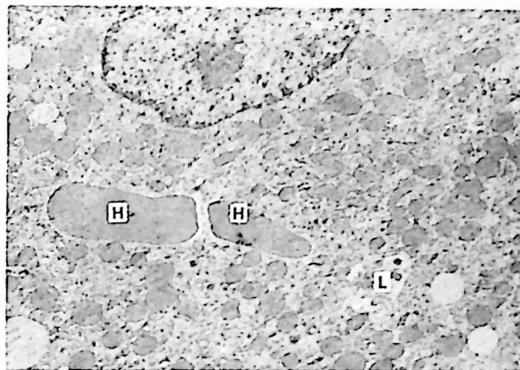


Fig. 9. Eritrofagocitosis por un hepatocito (H). L = lisosoma secundario ( $\times 4.500$ ).

se presenta en el hepatocito. Las mitocondrias forman pequeños grupos y están rodeadas de escaso retículo rugoso. Las porciones periféricas del núcleo se hallan desprovistas de organelas y todo el espacio libre se encuentra ocupado por glucógeno.

Tras cuarenta y seis días de tratamiento hay un intenso edema celular, apareciendo amplios espacios vacíos en cuyo seno flotan restos del retículo (fig. 8). En el retículo rugoso es evidente que aún continúa la fragmentación. Aparece por primera vez eritrofagocitosis (fig. 9), aunque los hematíes no se aprecian rodeados de membrana alguna y solamente colocados

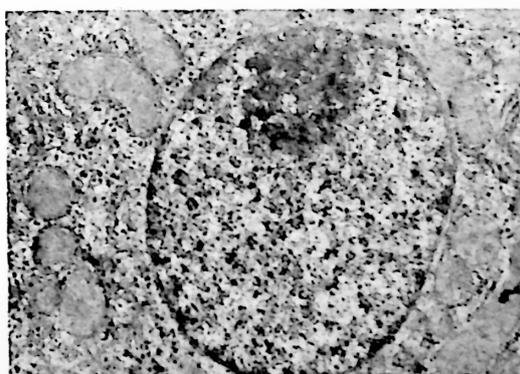


Fig. 10. Segregación nucleolar ( $\times 16.200$ ).

de una manera irregular en el seno del citoplasma. También por primera vez hacen su aparición estructuras semejantes a panales de miel, muy comprimidas, redondas, en estrecha relación topográfica con la zona de Golgi, y siempre en posición peribiliar.

A los setenta y cinco días, el retículo liso sigue siendo hiperplásico, si bien es frecuente distinguir grupos de células en las que se aprecia fuerte edema citoplásmico. El retículo rugoso no se ha recuperado aún; siguen faltando los ribosomas, especialmente en aquellas porciones que

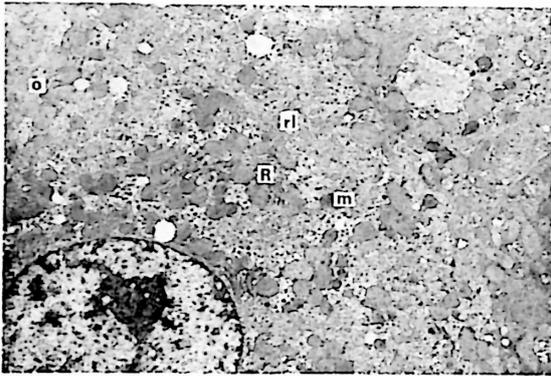


Fig. 11. Proliferación del retículo liso (rl). El RER está reducido a escasos perfiles (R). Existen abundantes microbodis (m) ( $\times 7.200$ ).

rodean las mitocondrias, que aparecen en ocasiones envueltas en membrana, dando lugar a principios de figuras de mielina. Se comprueba segregación nucleolar (figura 10).

Tras noventa días aparecen alteraciones en las mitocondrias, que han perdido casi por completo su densidad matricial y que presentan en su interior finas membranas, a veces múltiples; es fácil comprobar la existencia de imágenes que podrían ser interpretadas en el sentido de una división mitocondrial. Si la mitocondria aparece doblada, en su ángulo interno se aprecia una figura de mielina. Los ribo-

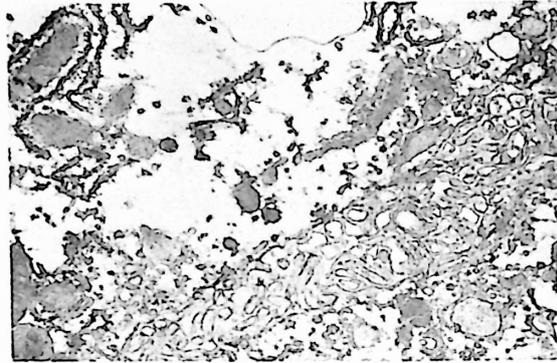


Fig. 12. Proliferación membranosa que ocupa la luz canalicular ( $\times 18.900$ ).

somas libres han aumentado a costa de su desprendimiento de las membranas. En el nucléolo se advierte una clara segregación y en el núcleo es mayor el número de granos de intercromatina visibles.

La imagen a partir de ahora se hace muy semejante en todas las muestras, hasta la última prueba, en que las lesiones son ya muy acentuadas. Las células son muy claras por predominio de retículo liso, que prácticamente ocupa toda la célula (fig. 11). El ergastoplasma ha quedado reducido a escasos restos, generalmente en relación a mitocondrias; en ocasiones aparece dilatado, dando la sensación de que las membranas de las cisternas se

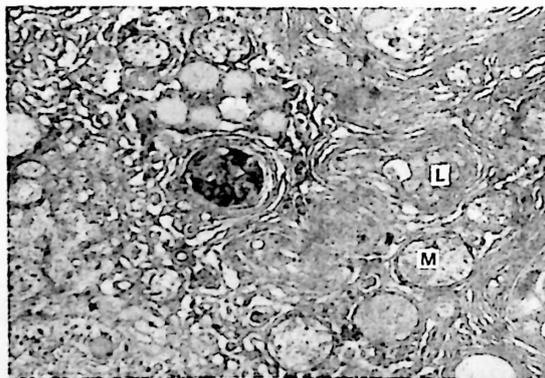


Fig. 13. Figuras de mielina en cuyo centro hay gotas de lípido (L) y mitocondrias (M). ( $\times 15.300$ ).

unen a la pared externa de las mitocondrias. Los microvillis de los capilares se han hipertrofiado y ocupan casi por completo la luz canalicular (fig. 12). Si las mitocondrias están vacuolizadas, el retículo rugoso se hace más abundante, en tanto que en las células que presentan una densidad normal, aquél suele faltar en gran medida. Son muy frecuentes las figuras de mielina en relación con mitocondrias, que en algunas ocasiones ocupan el centro de la figura, en tanto que en otras son gotas de lípidos probablemente (figs. 13 y 14). También se observan cuerpos de

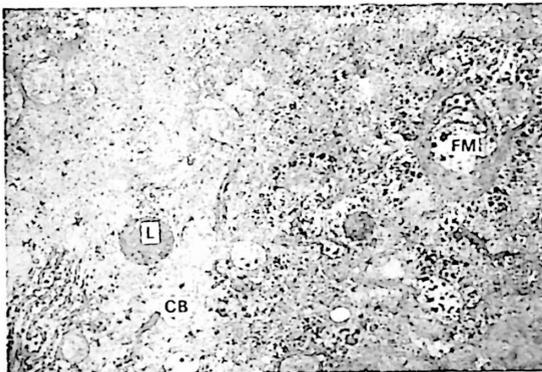


Fig. 14. Figuras de mielina en formación con desprendimiento de ribosomas del retículo rugoso (FM).

L = lisosomas; CB = canaliculo biliar ( $\times 18.000$ ).

glucógeno. Las zonas de Golgi se encuentran hiperplasiadas, si bien no se advierte anomalía estructural. El hallazgo de grandes citosegresomas es habitual, comprobándose restos de retículo y mitocondrias en su interior. Las células de Kuffer aparecen con gran cantidad de lisosomas, algunos de ellos activados. En las mitocondrias se conservan casi exclusivamente las paredes.

A medida que transcurre el tiempo, las células van haciéndose más claras, por una mayor hiperplasia del retículo liso y una falta casi absoluta de ergastoplasma.

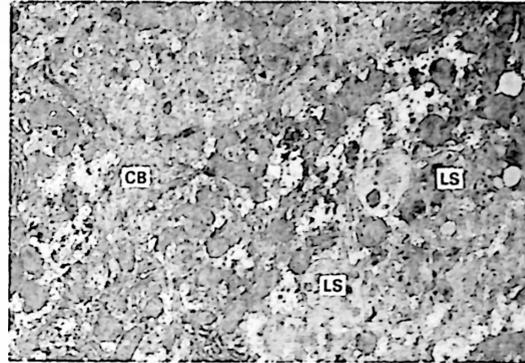


Fig. 15. Lisosomas secundarios (LS).  
CB = canaliculo biliar ( $\times 9.000$ ).

Las mitocondrias se hallan rodeadas de cuatro o cinco membranas, originando incipientes figuras de mielina, siendo frecuentes las inclusiones de lípidos incluso en el interior del núcleo, que con facilidad adquiere formas más o menos sinuosas. Luego, la imagen se acentúa; aumenta el número de ribosomas libres, siendo las mitocondrias muy escasas y presentando una matriz de poca densidad. En relación a la zona de Golgi, aparecen formaciones multivesiculares rodeadas de una sola membrana, probablemente derivadas de aquél. La abundancia de lisosomas es mayor (figs. 15 y 16), siendo muy frecuentes

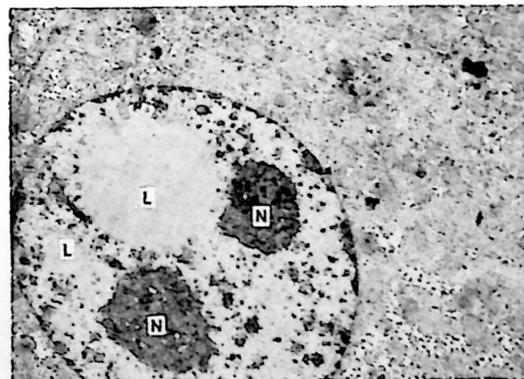


Fig. 16. Célula en vías de destrucción con dos gruesos nucléolos (N) y gotas de lípidos en el núcleo ( $\times 7.200$ ).

las formaciones citosegresomáticas. También se advierte intensa hiperplasia de los microvilllis de los canaliculos biliares.

DIETILNITROSAMINA. *Microscopía óptica*. — El cuadro morfológico hallado en el control para el DENA no difiere del que presenta el grupo tratado con DENA y CHX simultáneamente. Aparecen los mismos tipos celulares y se advierten los mismos cambios en la estructura hepática en períodos de tiempo que coinciden con los estudiados en el grupo base de la experiencia.

DIETILNITROSAMINA. *Microscopía electrónica*. — Las alteraciones ultraestructurales que aparecen durante el tratamiento con DENA no dejan reconocer cambios específicos en la morfología celular, y corresponden a los que son posibles hallar tras tratamiento con diversos carcinógenos químicos.

Tras los primeros días de tratamiento ya se aprecian cambios en los hepatocitos. Hay una vacuolización celular por aclaramiento del citoplasma fundamental. En este tiempo, los cambios más llamativos aparecen en el ergastoplasma, que pierde su ordenación y sufre una reducción en el número de ribosomas asociados, no apareciendo, sin embargo, rotura de las cisternas como es posible hallar en los tratados simultáneamente con CHX. Las relaciones entre mitocondria y retículo se hacen más estrechas, apareciendo aquellas rodeadas totalmente por el ergastoplasma.

Tras esta primera fase, comienza una fuerte hiperplasia del retículo liso, que en ocasiones llena por completo la superficie celular, dejando libres escasas zonas ocupadas por mitocondrias. Aparecen gruesas vacuolas en el citoplasma que contienen sustancias electrón-opacas. Las mitocondrias suelen contener frecuentes inclusiones de naturaleza cristalina.

Las membranas del retículo comienzan

a ordenarse de una manera definida, originando cuerpos de glucógeno y figuras de mielina, particularmente abundantes en los últimos estadios de la cancerización. El glucógeno se halla siempre reducido. Las zonas de Golgi no presentan alteración definible hasta la décima semana, en que comienza hipertrofia e hiperplasia de sus cisternas, tanto más evidente cuanto más avanza el tiempo de cancerización. En el núcleo, y en el nucléolo, no es posible encontrar alteración alguna a lo largo de todo el tratamiento.

Al final del estadio, las inclusiones de grasa son abundantes y en las células de Kupffer los lisosomas son muy abundantes. Hay algunos fagosomas, tanto en las células reticulares como en los hepatocitos. En éstos, las mitocondrias han ido haciéndose más escasas cada vez, de manera que al final del tratamiento el volumen de condrioma por unidad de volumen celular se ha reducido considerablemente. El retículo rugoso ha disminuido de manera acentuada, y no se recupera tras el descenso inicial. Son muy abundantes los ribosomas libres y es fácil hallar estructuras que recuerdan rotura de las cisternas ergastoplásmicas.

## Discusión

*Cicloheximida*.—La CHX es una glutarimida producida por *St. griseus*. Activa frente a hongos y levaduras, lo es poco frente a bacterias, siendo diferente su acción frente a las células vivas. Inhibe la síntesis proteica citoplásmica, afectando escasamente la mitocondrial, tanto en experiencias *in vivo* como *in vitro*, sin afectar, por el contrario, la respiración o la glicolisis, siendo su acción sobre ambos procesos de naturaleza secundaria (18). Su efecto es reversible, comprobándose que tras lavado de reticulocitos tratados con el antibiótico, la proteína vuelve a sintetizarse de manera normal (9, 12). Aunque con

certeza no se conoce el lugar de acción de la CHX, todo parece indicar que es a nivel de la transferasa II, enzima que realiza el enlace péptido en las cadenas neoformadas de aminoácidos (3, 12, 39).

Probablemente una acción simultánea del antibiótico sea prevenir la desagregación polisomal (13, 17). La acción sobre algunos polisacáridos más parece debida a un efecto secundario que a una acción directa del antibiótico (24, 29, 36). Para WETTSTEIN *et al.* (52) la CHX inhibiría el paso de aminoácidos desde el t-ARN a la cadena naciente de polipéptidos. La inhibición llega incluso a hacerse lineal, pero se observan mayores efectos relativos con menores cantidades de antibiótico.

Es significativa la rapidez con la cual obra, pues treinta segundos después de su adición comienza la inhibición, que se completa veinte minutos más tarde (9). Simultáneamente con la acción sobre la síntesis proteica citoplásmica, la CHX podría actuar también sobre la mitocondrial (1). CLARK-WALKER y LINNANE (8) apuntan la idea de que en hongos probablemente exista un doble sistema sintetizante de proteínas, uno localizado en la mitocondria y fácil de inhibir con el cloranfenicol, y otro en el citoplasma y no sensible a este antibiótico; el primer sistema, a su vez, no se afectaba con la CHX. ASHWELL y WORK (1) señalan que la CHX entra en la mitocondria o se adhiere de manera irreversible a ella en experiencias *in vivo*. En su mismo trabajo se constata una considerable inhibición en la incorporación de Leucina-C14 en la fracción mitocondrial.

En el período de tratamiento con CHX aparece un amplio edema celular y también una intensa proliferación del retículo liso. Aquél, probablemente, se origine a causa de los cambios osmóticos que sufre la célula tras la entrada del antibiótico. La proliferación del retículo liso la creemos vinculada a una reacción de detoxicación. Un hecho por demás llamativo es que el

retículo rugoso prácticamente no ha variado durante el tratamiento, observándose exclusivamente un despegamiento no muy acentuado de sus ribosomas asociados, que cobra intensidad en la segunda mitad del primero de los dos períodos expuestos en los resultados. Desconocemos cuál puede ser la causa de este hecho que podría estar en relación con un metabolismo acentuado de los ácidos nucleicos, reacción que por lo demás es común en experiencias de carcinogénesis química (20). No podemos desechar tampoco la posibilidad de que la escasez de lesiones observadas sea debida a la corta dosis empleada en nuestro trabajo.

A partir de los setenta días de tratamiento es posible hallar eritrofagocitosis sin estar los hematíes rodeados de membrana alguna, así como tampoco los siderosomas derivados de aquéllos, lo que hace pensar en una alteración de la membrana celular, especialmente si las proteínas que entran en su composición son de turnover rápido, y la inhibición proteica ha sido efectiva. El hecho, por otra parte, es habitual en las células hepáticas de los animales sometidos a raciones alimenticias desprovistas de proteínas (10).

La aparición de mitocondrias en forma de copa carece de significación específica, puesto que han sido halladas igualmente tras intoxicación con alcohol y también en cobayas en períodos de ayuno. Su significación podría estar en un intento de aumentar la superficie de contacto entre las mitocondrias y el exterior (42), toda vez que nuestros hallazgos confirman una casi absoluta falta de ribosomas en los perfiles de ergastoplasma que se encuentra en relación con las mitocondrias.

Más difíciles de interpretación se hacen las alteraciones nucleares, por tres razones especialmente: a) A causa del escaso material con que normalmente se trabaja en microscopia electrónica. b) Por los deficientes conocimientos que se tienen de la ultraestructura normal del núcleo. c) Por

la falta de un estudio bioquímico categórico de la acción del antibiótico sobre la síntesis de los ácidos nucleicos. Sin embargo, es patente un aumento de granos de pericromatina al principio de la experiencia, para hacerse más evidentes los de intercromatina al final del período. Por otra parte, se especula con la posibilidad de una acción de la CHX sobre el ADN, al inhibir ampliamente la incorporación de sustancias marcadas (3). Aparece la segregación nucleolar, como posible alteración del mecanismo de síntesis del ARN-ribosomal. Sin embargo, no parece tener el antibiótico un efecto primario sobre la síntesis del ARN (3), aunque pudiera ocurrir que la alteración fuera secundaria a la inhibición de la síntesis proteica al afectarse la ARN-polimerasa (43).

A partir de los noventa días, las alteraciones han desaparecido, o al menos no hay sustrato morfológico demostrable. Probablemente la célula se habrá adaptado al empleo de la CHX y tendrá sus mecanismos de síntesis convenientemente acoplados.

Un hecho por demás significativo es que las alteraciones se presentan sólo en las células claras del hígado, en tanto las oscuras siguen mostrando su estructura normal. Es probable que la actividad en este tipo celular sea distinta a la de las claras, aunque no hemos de olvidar que procediendo a una fijación por perfusión con glutaraldehído, el número de células claras aumenta notablemente (16).

*Cicloheximida y Dietilnitrosamina.* — En las ratas tratadas con el antibiótico y el cancerígeno, la primera imagen que se presenta en el tejido hepático normal (6) es la de una reacción probablemente sin hiperplasia del ergastoplasma, con desorganización y rotura en finos trozos y donde falta gran número de ribosomas. Esta primera fase corresponde sin duda a los efectos combinados de antibiótico y cancerígeno, con reducción fuerte de la sín-

tesis de proteína (24, 49). La rotura de las cisternas parece producirse tras adición del antibiótico, que pone a la célula en disposición de no sintetizar fosfolípidos, cuyo turnover rápido asegura la integridad de las membranas. De igual manera, los ribosomas libres parecen ser inducidos tanto por una como por otra sustancia. La presencia de citosegresomas es habitual en todos aquellos procesos de injuria celular (47).

El hecho de que la CHX no produzca alteraciones evidentes al microscopio electrónico, en experiencias de corta duración (50) y tampoco en las de duración prolongada, hace difícil la interpretación de los resultados de este grupo. Por otra parte, creemos que la célula responde de una manera similar ante estímulos diversos, siendo mínimas las variaciones y solamente comprobables en cuanto afectan escalones definidos del metabolismo celular. De la misma manera que en el control para la CHX, también se presenta eritrofagocitosis, no existiendo tampoco membranas envolventes; en ocasiones los hematíes se hallan en células necrobióticas. Este hecho, unido a las profundas alteraciones que se presentan en las relaciones celulares, nos hace pensar en la existencia de alguna alteración en la membrana celular, y que haya modificado las condiciones de permeabilidad o transporte activo, permitido por el aporte de energía del ATP a su vez alterado — aparición de membranas en capilares biliares —. Es patente, de igual manera, la presencia de fuerte edema celular, que en ocasiones hace adquirir al tejido las características del tratado con tetracloruro de carbono (10).

En el nucléolo aparece segregación de sus tres componentes, lo que no es característico de la dietilnitrosamina; el hecho se relaciona sin duda con la aplicación de la CHX y, como en aquel caso, se debería a una alteración en la síntesis de ARN. En las mitocondrias, las alteracio-

nes son las propias del proceso de cancerización.

No conocemos que se hayan realizado experiencias de tipo semejante a la nuestra, aunque sí son numerosas aquellas que emplean una dieta sintética carente de proteínas; en todos los trabajos se concluyó que la dieta prácticamente no interfiere con la aparición del tumor obtenido con carcinógenos químicos (25, 32). El problema, sin embargo, creemos que es distinto al que nosotros hemos planteado, pese a lo cual los resultados obtenidos en ambos tipos de experiencias son similares. El desarrollo del tumor parece ser debido a una alteración del metabolismo celular en algún escalón irreversible e indispensable. Las teorías del mecanismo regulador (33), basadas en los hallazgos de Jacob y Monod, parecen responder a este tipo de requisitos. El esquema conduce a una alteración en un mecanismo regulador celular, sin existencia paralelamente de alteración en el material genético, y que se perpetúa. No podemos olvidar, sin embargo, que el DENA, como todos los agentes alquilantes, se liga a la guanina, produciendo copias erróneas de ADN. La inhibición de la síntesis proteica citoplásmica no ha producido alteración alguna en el desarrollo normal de los tumores, sin ocasionar tampoco una desviación del cuadro de cancerización patente. Es probable que la inhibición de las proteínas conseguida con la Cicloheximida no afecte a las proteínas comprometidas en el circuito regulador, y que serían las únicas capaces de alterar el camino de la célula hacia la cancerización. Por otra parte, debemos considerar la reacción celular produciendo enzimas inespecíficas que actuarían sobre el antibiótico. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que el tamaño y número de los tumores observados fue inferior al control para el cancerígeno, aunque ello responda probablemente al efecto inespecífico propio de todos los inhibidores de la síntesis proteica.

*Dietilnitrosamina.* — Los agentes alquilantes son cancerígenos de reciente uso, empleados últimamente con frecuencia a causa de que su forma de actuar es más o menos conocida, y que inducen tumores en órganos determinados, dependiendo del agente elegido. Sin embargo, las alteraciones ultraestructurales que aparecen en el proceso de cancerización son muy similares en todos los casos, siendo detalles mínimos los que pueden revelar, si ello es posible, la identidad del agente empleado. De todos los agentes alquilantes, los más empleados en la actualidad son la dimetil- y la dietilnitrosamina, ambos con marcado tropismo por el hígado y que raramente originan tumores en otros órganos si la dosis se regula convenientemente. Es el segundo de ellos el mejor conocido de los dos, aunque no existan trabajos prácticamente sobre el estudio al microscopio electrónico del proceso de cancerización (28, 48).

El cuadro electrónico de la cancerización por DENA sufre al comienzo una desorganización de las cisternas del retículo rugoso, que pierden parte de sus ribosomas asociados. Corresponde a la fase de toxicidad, en la que además se pueden hacer evidentes necrosis centrolobulillares en histología convencional y discreta hiperplasia del retículo liso, sin aparecer alteraciones en mitocondrias ni aparato de Golgi. Cesa pronto esta activación del ergastoplasma para dar paso a una fuerte hiperplasia del retículo liso, entendida en un intento de metabolizar el cancerígeno; corresponde esta etapa a la de vacuolización celular del microscopio óptico, en la que se han reducido los témpanos basófilos (20, 46). Por lo demás, es un hecho común en todos los procesos de carcinogénesis química, así como en aquellos otros de injuria celular. De presentación habitual en el fenómeno de la cancerización son las figuras de mielina y los cuerpos de glucógeno. En las primeras su centro suele estar ocupado por gotas iden-

tificadas en algunos casos como lípidos y en otras como prótidos (37). Al microscopio de luz aparecen como gruesos corpúsculos de inclusión que no presentan homogeneidad, siendo posible distinguir en su centro pequeñas vacuolas. En todos los casos, las membranas que forman la figura no aparecen acopladas, aunque la adaptación entre unas y otras pueda llegar a ser tan perfecta que semejan con toda exactitud mielina (7, 21, 22, 31, 41, 44). Los cuerpos de glucógeno poseen membranas acopladas y dejan espacios libres ocupados por glucógeno. Suelen ser membranas muy ordenadas y es frecuente su hallazgo en células ya cancerizadas. Creemos que ambos tipos tienen un mismo origen, probablemente el retículo rugoso, tras pérdida de sus ribosomas, y que son diversos estadios en el desarrollo de una misma formación, sin querer indicar que las figuras de mielina son el final obligado de los cuerpos de glucógeno. Su significación es probablemente de naturaleza degenerativa y es posible descubrir su presencia en todos los procesos de injuria celular.

En algunos estadios del proceso ha sido posible descubrir concentraciones de membranas en los canalículos biliares, probablemente originadas a partir de la membrana celular. Es oscura su interpretación, si bien parece hallarse simultáneamente con una fuerte alteración de la ATP-asa (51). Las mitocondrias no suelen estar excesivamente afectadas (26, 27).. El volumen normal del condrioma se ha reducido al final de la cancerización; sin embargo, no parece que el metabolismo mitocondrial se halle gravemente alterado, manteniéndose dentro de los límites normales la fosforilización oxidativa (30). Es posible comprobar al final del proceso la presencia de gran número de mitocondrias conteniendo inclusiones de naturaleza cristalina, que interpretamos en el sentido de una reacción regresiva (40).

El núcleo no deja advertir detalle algu-

no de interés. Durante el proceso de cancerización la síntesis de ARN (19, 23) sufre un descenso mínimo para aumentar ligeramente luego y hacerse ya más patente este aumento en los nódulos basófilos. De modo semejante se comporta el ADN (18, 22, 34, 35).

La síntesis proteica se encuentra aumentada tanto en nódulos basófilos como en hepatomas.

El cuadro enzimático sigue un modelo general, similar al que aparece en otros tipos de carcinogénesis (14, 15, 38). El glucógeno sigue una marcha regular decreciente y se relaciona estrechamente con el retículo liso, asiento de las enzimas hexoquinasa y glucosa-6-fosfatasa (2, 45).

Surgen dificultades al considerar cuál puede ser la histogénesis de los tumores. Parece probable que las células homogéneas no sean las que originan las basófilas, y que representen exclusivamente el modelo tóxico del proceso. Se ha discutido la existencia de las llamadas células ovales, que procederían del epitelio del paso de Hering y que serían células con potencialidad para desarrollarse hacia el tipo parenquimatoso o hacia el epitelio tubular biliar. En nuestro material parece observarse en ocasiones que se formen conductos a partir de hepatocitos muy desdiferenciados, pero no hemos podido comprobar el paso del epitelio biliar a hepatocito. El microscopio electrónico revela la existencia de células diferentes a las epiteliales biliares, de las que probablemente procedan, pero cuyo modelo ultraestructural no se ha diferenciado aún lo suficiente como para pensar en hepatocitos. El frecuente hallazgo de células diploides que acompañan a las células homogéneas desde el principio de la experiencia, nos hace pensar que sean éstas las que originen los hepatomas por cancerización. El hecho de hallarlas junto a células homogéneas no lo creemos suficiente como para establecer un parentesco entre ambas.

### Resumen

Se estudia la acción de la Cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, sobre la cancerización hepática experimental de la rata por Dietilnitrosamina. Se toman grupos controles para ambas sustancias.

El microscopio de luz no permite apreciar cambio alguno en el cuadro de cancerización en los animales tratados con el inhibidor, en relación a los no tratados. Estos muestran una secuencia de cambios correspondientes al efecto tóxico de la Dietilnitrosamina en una primera fase, y al efecto cancerígeno en fases posteriores, coincidentes con los descritos por otros autores. Los animales tratados con la Cicloheximida solamente dejan reconocer muy escasas alteraciones.

El microscopio electrónico permite comprobar en el grupo tratado con el inhibidor y el cancerígeno diferencias en cuanto al retículo rugoso en la primera fase de la cancerización, y alteraciones en la estructura nucleolar. El grupo de animales tratados con Cicloheximida presenta escasas desviaciones estructurales del tejido normal, que coinciden relativamente con las diferencias observadas en los animales tratados con ambas sustancias.

Se discuten las posibles causas por las cuales no se ha afectado la cancerización.

### Bibliografía

1. ASHWELL, N. A., y WORK, T. S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 1006, 1968.
2. BANNASCH, P.: *Verh. dtsh. Ges. Path., Göttingen*, 1967.
3. BENNETT, L. L., SMITHERS, D., y WARD, C. T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 60, 1964.
4. BENNETT, L. L., WARD, V. L., y BROCKMAN, R. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 478, 1965.
5. BRESCIANI, F.: *Europ. J. Cancer*, **4**, 343, 1968.
6. BRUNI, P. C., y PORTER, K. R.: *Amer. J. Path.*, **46**, 691, 1965.
7. BURGER, P. C., y HERDSON, P. B.: *Amer. J. Path.*, **48**, 793, 1966.
8. CLARK-WALKER, C. D., y LINNANNE, A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **25**, 8, 1966.
9. COLOMBO, B., FELLICETTI, L., y BAGLIONE, C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 389, 1965.
10. DAVID, H.: «Submikroskopisches Ortho- und Pathomorphologie der Leber», Pergamon Press, Oxford, 1964.
11. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANCOVIC, S., y SCHMÄHL, D.: *Z. Krebsforsch.*, **96**, 103, 1967.
12. ENNIS, H. L., y LUBIN, M.: *Science*, **146**, 1474, 1964.
13. FELLICETTI, L., COLOMBO, B., y BAGLIONI, C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **119**, 120, 1966.
14. FRIEDRICH-FREKSA, H.: *Z. Krebsforsch.*, **72**, 240, 1969.
15. FRIEDRICH-FREKSA, H.: *Z. Krebsforsch.*, **72**, 226, 1969.
16. GANOTE, C. E., y MOSES, H. L.: *Lab. Invest.*, **18**, 740, 1968.
17. GODCHEAUX, W., ADAMSON, S. D., y HERBERT, E.: *J. Mol. Biol.*, **27**, 57, 1967.
18. GOTTLIEB, D., y SCHAW, P.: «Antibiotics», Springer-Verlag, Berlín, 1967.
19. GRUNDMANN, E., y FETCHLER, W.: *Z. Krebsforsch.*, **67**, 80, 1965.
20. GRUNDMANN, E., y SIEBURG, H.: *Beitr. path. Anat.*, **126**, 57, 1962.
21. HERDSON, P. B., y KALTENBACH, J. P.: *J. Cell. Biol.*, **25**, 485, 1965.
22. HERDSON, P. B., GARVIN, P. J., y JENNINS, R. B.: *Amer. J. Path.*, **45**, 157, 1964.
23. HOBİK, H. P., y GRUDMANN, E.: *Beitr. path. Anat.*, **127**, 25, 1962.
24. HOOBER, J. K., y SIEKEVITZ, P. J.: *J. Cell. Biol.*, **39**, 62, 1968.
25. LACASSAGNE, A., y HURST, L.: *Bull. Cancer*, **54**, 171, 1967.
26. LOUD, A. V.: *J. Cell. Biol.*, **31**, 69a, 1966.
27. LOUD, A. V.: *J. Cell. Biol.*, **37**, 27, 1968.
28. MOLBERT, E., HILL, K., y BUCHNER, F.: *Beitr. path. Anat.*, **126**, 218, 1962.
29. NECAS, O., SVOBODA, A., y KODECKA, M.: *Exptal. Cell. Res.*, **53**, 291, 1968.
30. NICKEL, E., y DIENER, E.: *Beitr. path. Anat.*, **132**, 429, 1965.
31. NICKERSON, P. A., y CURTIS, J. C.: *J. Cell. Biol.*, **40**, 859, 1959.
32. OSSWALD, H., y SCHMAHL, D.: *Naturwiss.*, **53**, 255, 1966.
33. PITOT, H. C., y HEIDELBERGER, CH.: *Cancer Res.*, **23**, 1694, 1963.
34. RAJEWSKY, M. F.: *Z. Krebsforsch.*, **70**, TODD, P.: *Exptal. Cell. Res.*, **52**, 53, 1968.

35. RAJEWSKY, M. F.: *Europ. J. Cancer*, **3**, 335, 1967.
36. RICHMOND, J. E., GLAESER, R. M., y TODD, P.: *Exptal. Cell. Res.*, **52**, 53, 1968.
37. ROSCHLAU, G., y KEMMER, CH.: *Zblatt. allg. Path.*, **110**, 26L, 1967.
38. SCHAUER, A., y KUNZE, E.: *Z. Krebsforsch.*, **70**, 252, 1968.
39. SIEGEL, M. R., y SISLER, H. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 83, 1964.
40. SMUCKLER, E., ISERI, O. A., y BENDITT, E. P.: *Lab. Invest.* **13**, 531, 1964.
41. STENGER, R. J.: *J. Ultrastruct. Res.*, **14**, 240, 1966.
42. STEPHENS, R. J., y BILS, R. F.: *J. Cell. Biol.*, **24**, 500, 1965.
43. SUMMERS, W. A., NOTEBOMM, W. D., y MUELLER, G. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **22**, 399, 1966.
44. SVOBODA, D., GRADY, H. J., y HIGGINSON, H.: *Amer. J. Path.*, **49**, 1023, 1966.
45. SYDOW, G.: *Europ. J. Cancer*, **3**, 503, 1967.
46. THOMAS, C.: *Z. Krebsforsch.*, **64**, 224, 1961.
47. TRUMP, B. F., y ERICSSON, J. L. E.: In «The Inflammatory Process». B. W. Zweifoch, L. Grant and McCluskey, Eds., Academic Press, New York, 1965.
48. VÁZQUEZ, J. J., y HERRANZ, P. (Comunicación personal.)
49. VERBIN, R. S., y FARBER, E.: *J. Cell. Biol.*, **35**, 649, 1967.
50. VERBIN, R. S., GOLDBLATT, P. J., y FARBER, E.: *Lab. Invest.*, **20**, 529, 1969.
51. WACHSTEIN, M., MEISEL, A., y FALCON, C.: *Amer. J. Path.*, **40**, 219, 1962.
52. WETTSTEIN, F. O., NOLL, H., y PENMAN, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 525, 1964.