

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS "FELIX HUARTE"

Efecto del 20-metilcolantreno sobre la carcinogénesis hepática inducida por la dietilnitrosamina

L. Ceballos y G. Herranz

RESUMEN

A una serie de ratas se les administró simultáneamente el 20-metilcolantreno a una dosis de 10 mg/Kg peso/día y la dietilnitrosamina (10 mg/Kg peso). El hígado fue estudiado con el microscopio de luz y electrónico a partir de la 4 semana, dándose por terminada la experiencia en la 17.^a semana. Cuando se comparan los hallazgos morfológicos de este grupo de experimentación con los que hemos observado en otro trabajo nuestro en el que los animales recibieron exclusivamente DENA, se comprueba un retraso muy marcado en la aparición de lesiones encuadradas bajo el patrón carcinogénico. Las diferencias no son de naturaleza cualitativa, sino preferentemente cuantitativa, pues las cosas se desarrollan como si se hubiese administrado dosis de dietilnitrosamina mucho más pequeñas de la que recibieron realmente.

Estos hallazgos se correlacionan bien con los de otros autores, al estudiar el efecto inhibitor del 20-metilcolantreno sobre la carcinogénesis hepática inducida por otros cancerígenos químicos.

Desde hace ya muchos años, casi a continuación del descubrimiento de la posibilidad de inducir tumores experimentalmente, se ha tratado de estudiar los mecanismos que modifican el curso ordinario de la carcinogénesis química, lo cual condujo a resultados tan brillantes como la creación de conceptos tales como el de cocarcinogénesis, los de acción iniciadora y promotora y la proposición de diversas teorías relativas al mecanis-

mo de la inducción de los tumores. Los aspectos históricos y teóricos de esta línea de investigación han sido resumidos por Berenblum⁵ y por Shimkin y Triolo³⁵. Los resultados experimentales mostraron pronto que entre las sustancias o procedimientos que modificaban el curso de la carcinogénesis, la mayor parte de ellos se manifestaban como reforzadores de la inducción tumoral, mientras que aquellos agentes que la modifi-

caban en sentido negativo —los llamados anticarcinógenos o quimioprolifáticos de la carcinogénesis— eran comparativamente más escasos y recibieron en conjunto una atención mucho menor.

La revisión de la bibliografía muestra que las sustancias dotadas de acción anticarcinogénica son muy variadas desde el punto de vista de su estructura química y, también, de su mecanismo de acción, el cual, de modo semejante a lo que ocurre con los agentes cancerígenos, solo es conocido parcialmente^{9, 38, 39}. Los conocimientos actuales no permiten una sistematización adecuada de los mecanismos implicados en la inhibición de la carcinogénesis. No obstante y de modo provisional, Wattenberg³⁹ y, siguiendo su pensamiento, Van Duuren y Melchionne³⁸, han clasificado los agentes capaces de inhibir el desarrollo tumoral en 4 grupos: los aceleradores de la detoxificación, los competidores por analogía química, los que interfieren sobre los mecanismos de transcripción y traducción de la información genética y finalmente, aquellos cuyo mecanismo de acción no está aclarado.

De modo general, la inhibición de la tumorigénesis no es un proceso que se cumpla según una ley del todo o nada, no es un efecto del tipo 0 % ó 100 %³⁸ sino que se manifiesta preferentemente como una disminución del número de neoplasias inducidas en comparación con los grupos control, en un retraso más o menos considerable de la aparición de los tumores y la consiguiente disminución del tamaño de las neoplasias. Por otra parte, los resultados obtenidos pueden depender en gran medida de la proporcionalidad de la dosis del cancerígeno y anticancerígeno que se aplican, de la edad y situación hormonal de los animales empleados y también de la forma de administración de uno y otro agente.

A pesar de todas estas limitaciones y dificultades, es necesario concluir que el

estudio de la anticarcinogénesis es un área importante de investigación, que puede contribuir a mejorar nuestro conocimiento de la carcinogénesis experimental misma y, sobre todo, a abrir perspectivas para un posible uso en la prevención del cáncer humano.

Entre los agentes anticarcinogénicos se muestran, de modo aparentemente paradójico, algunos hidrocarburos policíclicos y, en especial el MC, cuando son administrados por vía oral. En 1952, Richardson y col.²⁶ y Miller y col.²¹ observaron que la administración oral combinada de MC y del carcinógeno hepático 3-metil-4-dimetilaminoazobenceno desembocaba en una marcada reducción de los cambios morfológicos del hígado y del número de los hepatomas en comparación con los animales que solo recibían el azocompuesto. Estas observaciones fueron seguidas de numerosas investigaciones encaminadas a determinar la amplitud y el mecanismo de tan interesante fenómeno, desde las relaciones temporales implicadas en el antagonismo¹⁹ hasta la comprobación de que resultados similares podían obtenerse con hepatocarcinógenos de variada naturaleza química, en diferentes especies animales y usando hidrocarburos policíclicos distintos del MC^{1, 8, 15, 18, 22, 23, 24, 27, 28, 36, 37}.

Las investigaciones sobre la modificación del curso de la hepatocarcinogénesis por la DENA son escasas. Schmähl y col.²⁹⁻³² en un conjunto de trabajos sobre la sin-carcinogénesis han demostrado el efecto potenciador de la administración simultánea del 4-DMAB, el tetracloruro de carbono, el etanol, el 4-dimetilaminoes-tilbeno y la irradiación X. Observaron que ciertos agentes hepatoprotectores³³ y los factores del grupo vitamínico B³⁴ carecían de efecto inhibidor de la carcinogénesis por DENA. Lacassagne, Buu-Hoi y Giao¹⁶ demostraron que la reserpina disminuía el efecto tóxico y retrasaba la aparición de hepatomas en

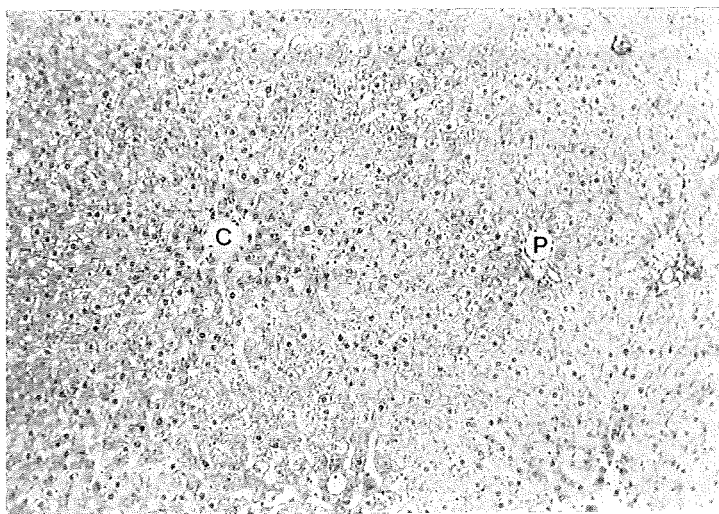


Fig. 1. Vista general del lobulillo, mostrando la perfecta preservación de la arquitectura lobulillar y la morfología celular. Existe vacuolización glucogénica en la vecindad del espacio portal (P). MC + DENA, 4 semanas (H-e).

las ratas sometidas a tratamiento con DENA. Finalmente, Hoch-Ligeti, Argus y Arcos¹² estudiaron, en la rata, el efecto de la administración simultánea del MC y dimetilnitrosamina, alcanzando resultados poco significativos.

Ante la falta de investigaciones sobre el posible efecto inhibitor del MC sobre la carcinogénesis hepática por DENA, hemos realizado este trabajo. En los re-

sultados del mismo se establecerán comparaciones con los obtenidos en experiencias paralelas, en los animales tratados con DENA¹⁰ y los que recibieron un tratamiento crónico de MC⁶.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dieciseis ratas Wistar, machos y de 8 semanas de edad al comienzo de la ex-

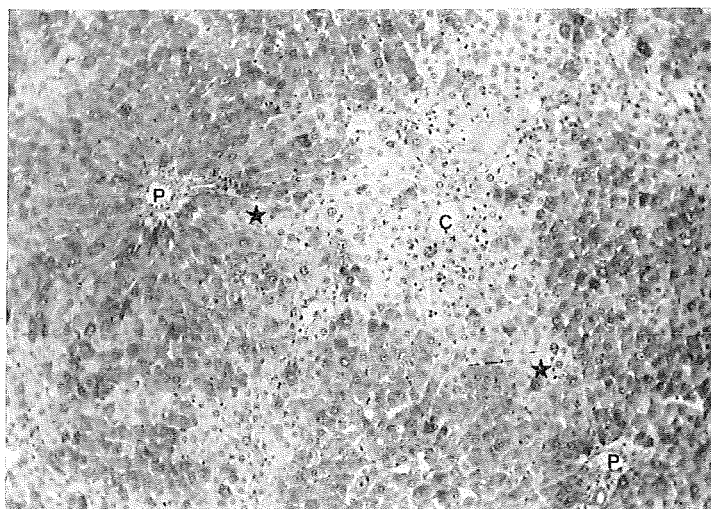


Fig. 2. La tinción por el PAS demuestra una depleción de glucógeno en las áreas centrales que siguiendo el trayecto ocupado por la zona 3 del acino de Rapaport alcanzan el espacio periportal (★). No existe fibrosis ni transformación cirrótica. MC + DENA, 10 semanas (PAS-H).

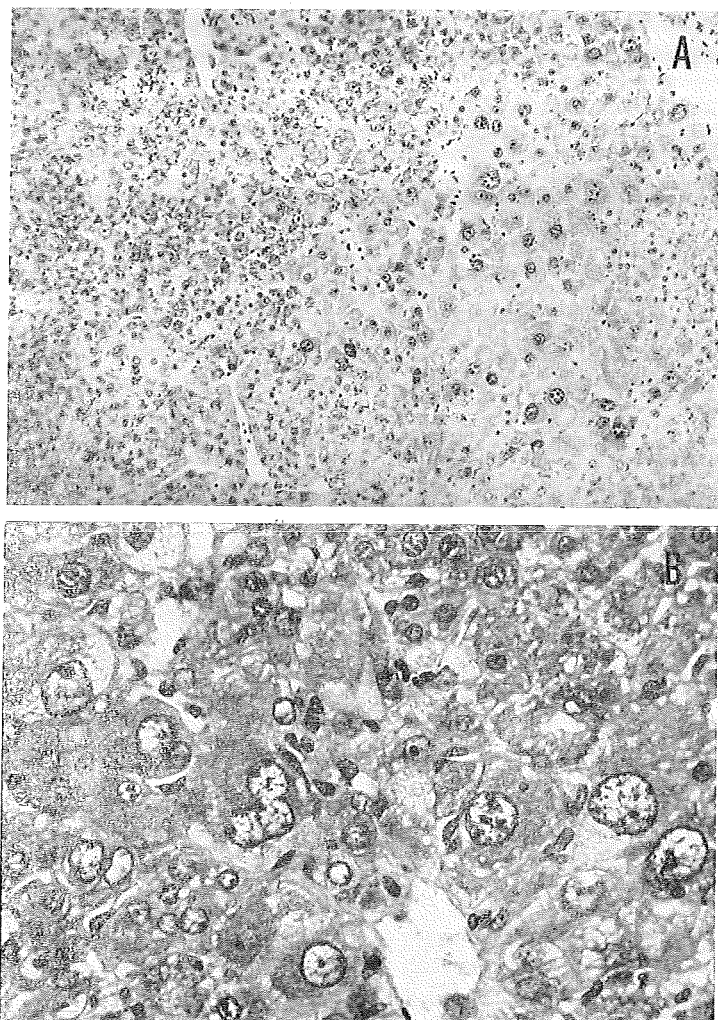


Fig. 3. A: Islote de hipertrofia y exageración de las diferencias centro-periferia tras 16 semanas de tratamiento con MC + DENA (cresil-violeta).

B: Polimorfismo celular extremo a que conduce el estímulo citotóxico. Son frecuentes los núcleos hiperploides. El citoplasma es muy variable con vacuolización de diferente tipo, áreas de eosinofilia y basofilia en mosaico.

MC + DENA, 14 semanas (H-e).

periencia, recibieron un tratamiento simultáneo de MC y DENA, seis días por semana. Los animales eran mantenidos en jaulas individuales en condiciones de estabulación adecuadas.

Una solución de MC en acetona pura a una concentración de 0,5 % (P/V), se absorbía en un comprimido de pienso en la cantidad calculada para que cada animal recibiese una dosis diaria de 10 mg/Kg de peso. El disolvente se dejaba

evaporar antes de administrar el pienso así preparado al animal, el cual no recibía otro alimento sólido hasta no haber consumido totalmente el adicionado de MC. De modo similar, la DENA se disolvía en el agua de bebida a una concentración de 0,02 % (P/V) adaptando el volumen administrado a cada animal para que la dosis diaria fuera de 10 mg/Kg de peso. Una vez ingerida esta solución, se proporcionaba a los animales agua de grifo ad libitum.

Los animales fueron sacrificados por de las semanas 4, 7, 10, 12, 14, 15, 16 y 17 de iniciado el tratamiento. Inmediatamente después de la muerte se recogieron fragmentos de hígado para el estudio histológico y electromicroscópico, tal como se señala en otro trabajo¹⁰.

RESULTADOS

Las alteraciones de la morfología hepática consecutivas a la administración combinada de DENA y MC son, en comparación a las provocadas por la DENA¹⁰, de menor intensidad, de tal modo que los hallazgos se corresponden más bien con los obtenidos con dosis considerablemente inferiores del compuesto nitroso.

1. Microscopía óptica

La arquitectura lobulillar apenas experimenta cambios sustanciales en el transcurso de las 7 primeras semanas. Solo cabe señalar una marcada vacuolización glucogénica en las células del campo periportal y un marcado desarrollo de las áreas citoplásmicas eosinófilas y de carácter ligeramente reticulado de las células de la zona media del lobulillo hexagonal. La basofilia no experimenta cambios apreciables aún en la zona centrolobulillar, en la que los fenómenos regresivos son de intensidad muy ligera (fig. 1). Sólo después de 10 semanas de tratamiento se hace patente una moderada desestructuración de la zona central del lobulillo con ensanchamiento de los sinusoides y necrosis de las células hepáticas. En los lóbulos pequeños este fenómeno muestra una intensidad más fuerte, evidente de modo particular en las preparaciones teñidas por el PAS (fig. 2), en las que se observa una depleción de glucógeno en las zonas 3 de las unidades acinares de Rappaport²⁵.

La evolución del efecto citotóxico toma unos rasgos peculiares, en el sentido de

que en ningún momento de la experiencia se desarrolló una transformación cirrótica de la arquitectura hepática mientras que las deformaciones celulares que caracterizan al patrón citotóxico alcanzan una expresividad muy fuerte (fig. 3). Se observan áreas constituidas por hepatocitos muy pleomórficos, con núcleos gigantes, vesiculosos o densos, y citoplasma de rasgos muy variables en relación con el contenido de glucógeno, la intensidad de la basofilia o la reticulación del citoplasma. Estos grupos celulares aberrantes aparecen sembrados entre el parénquima afectado por el patrón centro-periférico antes descrito.

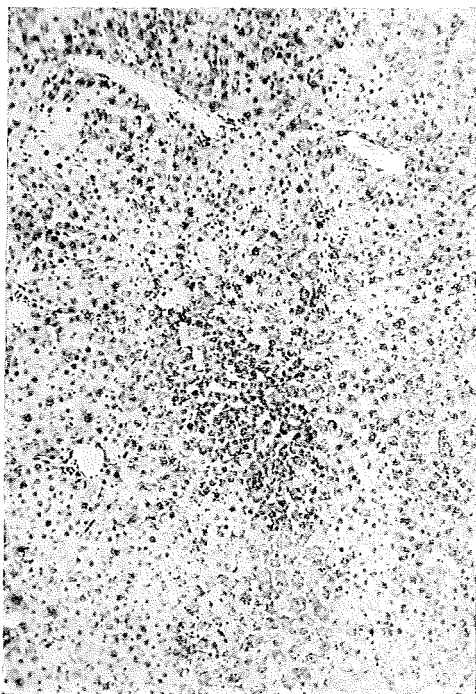
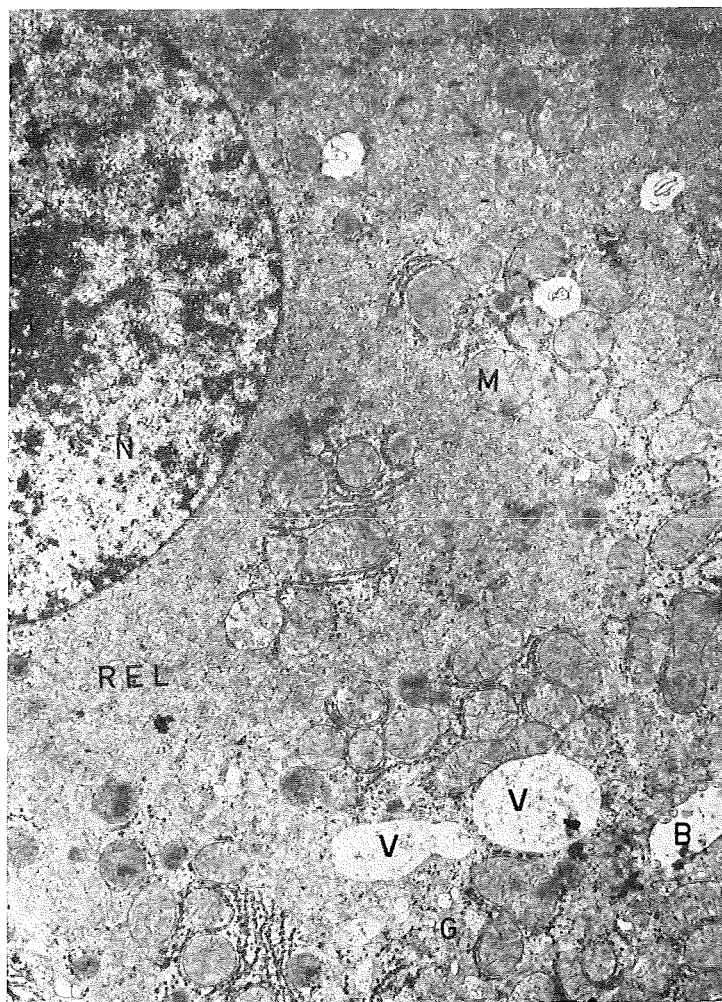


Fig. 4. Uno de los escasísimos focos de hiperbasofilia encontrados en toda la serie de animales tratados con MC + DENA. El tamaño celular y nuclear y la disposición trabecular son típicos del foco hiperbasófilo pre-neoplásico. Sin embargo, en comparación con los observados tras tratamiento con DENA, se trata de una lesión poco evolucionada. MC + DENA, 16 semanas (Cresil violeta).



Sig. 5. Desarrollo masivo del REL tras 4 semanas de MC+DENA. Ausencia de glucógeno en el citoplasma de la zona intermedia del lobulillo. Destaca el gran número de microbodies con nucleóide (M) y algunos otros que carecen de él o no lo presentan en el corte. Dos vacuolas (V) con contenido ligeramente fibrilar. En G, zona de Golgi. En B, mitocondrio. (10.800 x).

Solamente en los animales sacrificados después de 16 y 17 semanas de tratamiento se pudo detectar la presencia de pequeños focos hiperbasófilos formados por células pequeñas del tipo inicial de la transformación pretumoral (fig. 4), las cuales no mostraban todavía la disposición lamelar o filamentosa de la basofilia citoplasmática. En ningún caso se observó la aparición de hepatomas ya establecidos.

2. Microscopía electrónica

Los hallazgos electromicroscópicos de los animales tratados simultáneamente con DENA y MC son en buena parte superponibles a los descritos para la acción de la DENA¹⁰, bajo el epígrafe de patrón citotóxico. Por ello se hará hincapié aquí sobre los rasgos diferenciales. En primer lugar la acción conjunta de ambos agentes provoca una hipertrofia del retículo endoplásmico liso más inten-

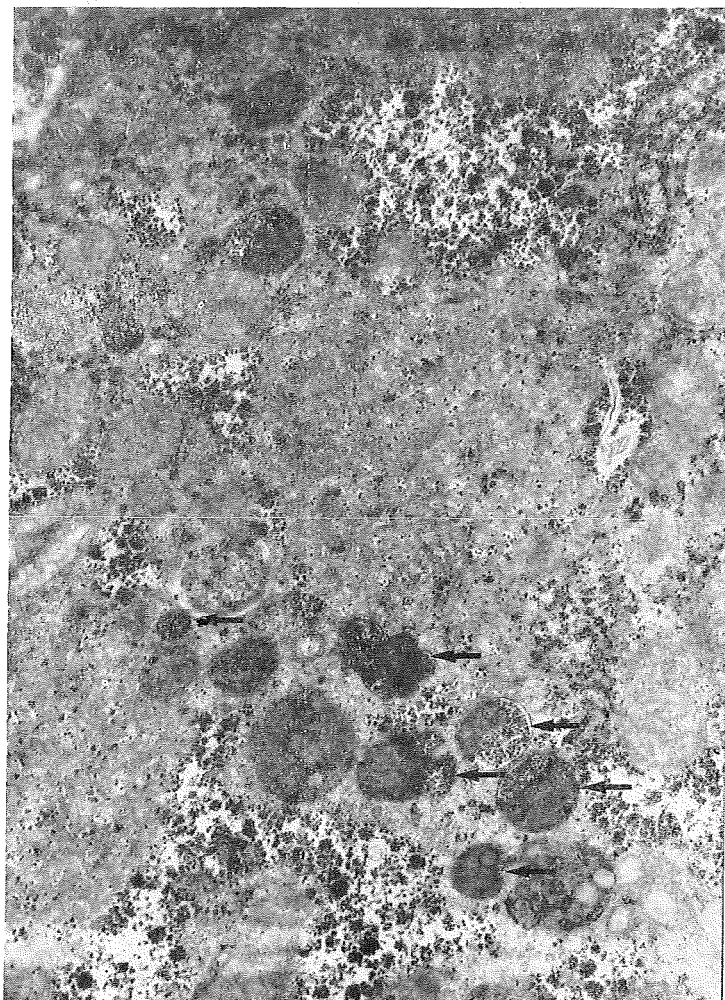


Fig. 6. Célula periférica con glucógeno y REL abundantes. Multitud de lisosomas con contenido glucogénico (→). MC + DENA, 4 semanas. M/E (24.000 x).

sa, alcanzando ya su máxima expresión tras 4 semanas de tratamiento (fig. 5). Este rasgo se mantiene, con pequeñas variaciones a todo lo largo de la experiencia y se acompaña de una fuerte disminución del retículo endoplásmico rugoso, que se reduce a la característica localización perimitocondrial.

En segundo lugar, se asiste a un incremento, notable y persistente, de los microboides y a la aparición transitoria,

entre las semanas 4 y 10, de lisosomas, en las células de la zona media del lobulillo, que contienen numerosas partículas de glucógeno. La morfología de estos lisosomas es variable: las más numerosas son de pequeño tamaño y encierran dentro de su membrana, además de glucógeno, una abundante cantidad de material finamente granular, pequeñas formaciones membranosas concéntricas, gruesos gránulos muy opacos a los electrones y algunas vesículas de contenido cla-

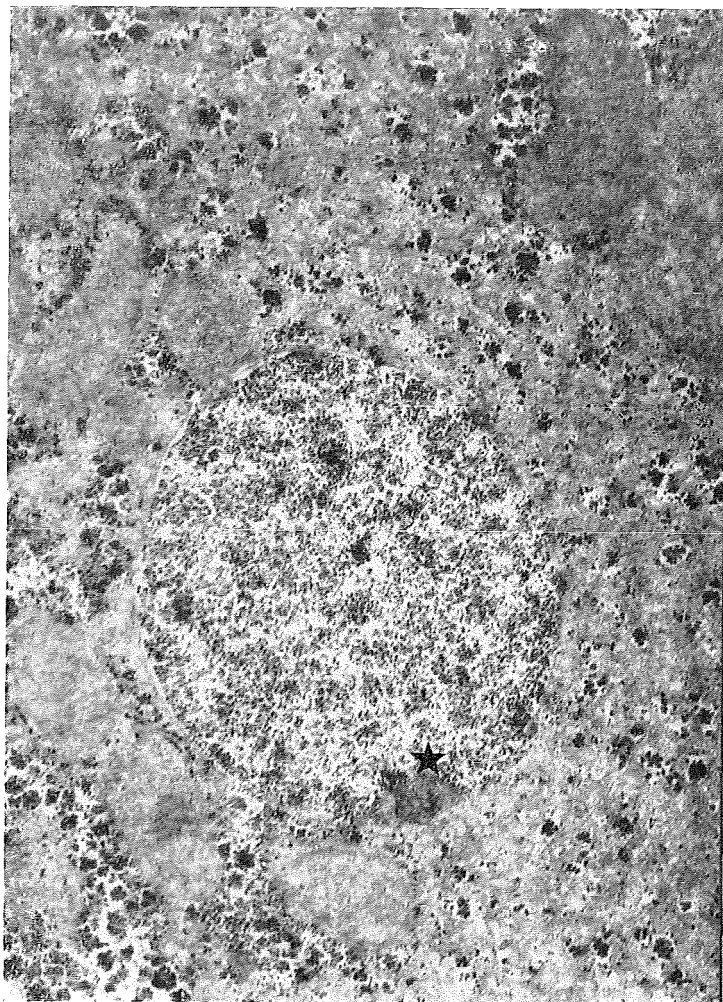


Fig. 7. Un voluminoso lisosoma con contenido glucogénico. Se observa que estos embolsamientos están rodeados de una membrana y contienen, aparte de glucógeno, pequeños reductos de carácter mieloide (★). Las partículas de glucógeno son de tipo α y no forman rosetas más que excepcionalmente. MC + DENA, 7 semanas. M/E (28.000 x).

ro. Los de mayor tamaño son de contenido predominantemente glucogénico con pequeños reductos de membranas concéntricas (figs. 6 y 7). Paralelamente, se observa la aparición de vacuolas citoplásmicas, de tamaño variable, de contenido floculento, localizadas de modo preferente en la porción más próxima al espacio de Disse y en cuyo interior pueden estar presentes pequeños laberintos membranosos (fig. 8). Las mitocondrias no ofrecen cambios llamativos. Fuera de las

variaciones de tamaño y estado osmótico de pequeña amplitud, se observa en raras ocasiones la aparición de inclusiones microcristalinas en la matriz (fig. 9). No es rara la presencia de complejas figuras de mielina, derivadas del retículo endoplásmico liso, que contienen en su porción central focos de citoplasma secuestrado (fig. 10). Las zonas de Golgi muestran una moderada hipertrofia a medida que avanza el tratamiento. Finalmente, ha de reseñarse la aparición

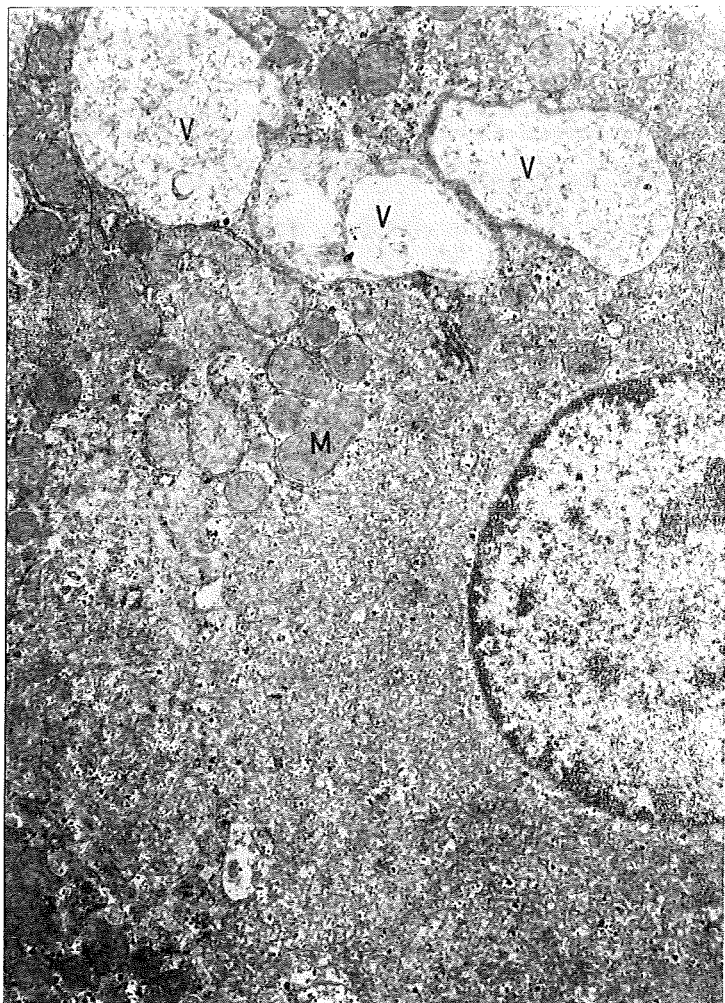


Fig. 8. Vacuolas (V) de contenido floculento con pequeñas membranas similares a las presentes en la figura 5. Es posible que correspondan a cuerpos residuales de la degradación del glucógeno en los lisosomas de las figuras anteriores. Numerosos microbodies (M).

MC + DENA, 7 semanas. M/E (11.000 x).

de eritrocitos en el citoplasma de las células parenquimatosas, con los mismos caracteres que los observados en el curso del tratamiento con DENA ¹⁰.

El desarrollo de los rasgos descritos como característicos del patrón carcinogénico ¹⁰, están pobremente desarrollados. Los focos de hiperbasofilia que aparecen en las fases finales del tratamiento contienen células de pequeño tamaño, con reorganización parcial del retículo endo-

plásmico rugoso, pequeñas áreas de ribosomas libres dispuestos en cortas espirales, reducción extrema del retículo endoplásmico liso, que presentan, en conjunto, un cuadro semejante al descrito como inicial en la transformación neoplásica. La diferencia básica radica en el escaso número de estos focos de hiperbasofilia y su reducido tamaño en comparación con los animales tratados con DENA (figs. 11 y 12).

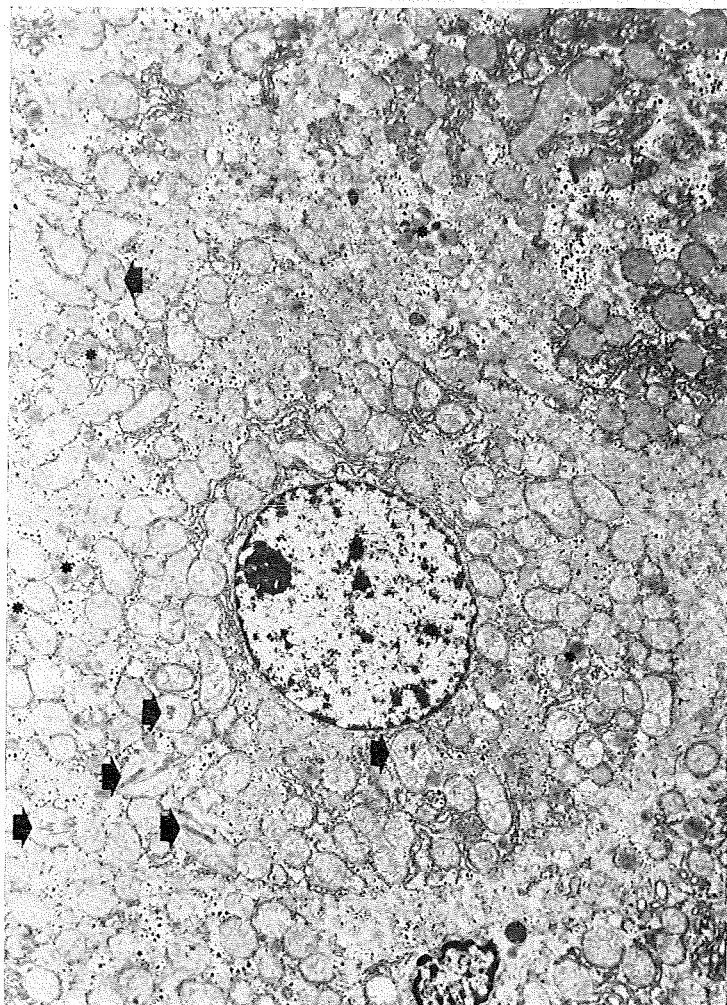


Fig. 9. Numerosas mitocondrias con formaciones cristaloides en la matriz ($\rightarrow$). Hay numerosos microbodies (*), ligera hiperpasia del REL.

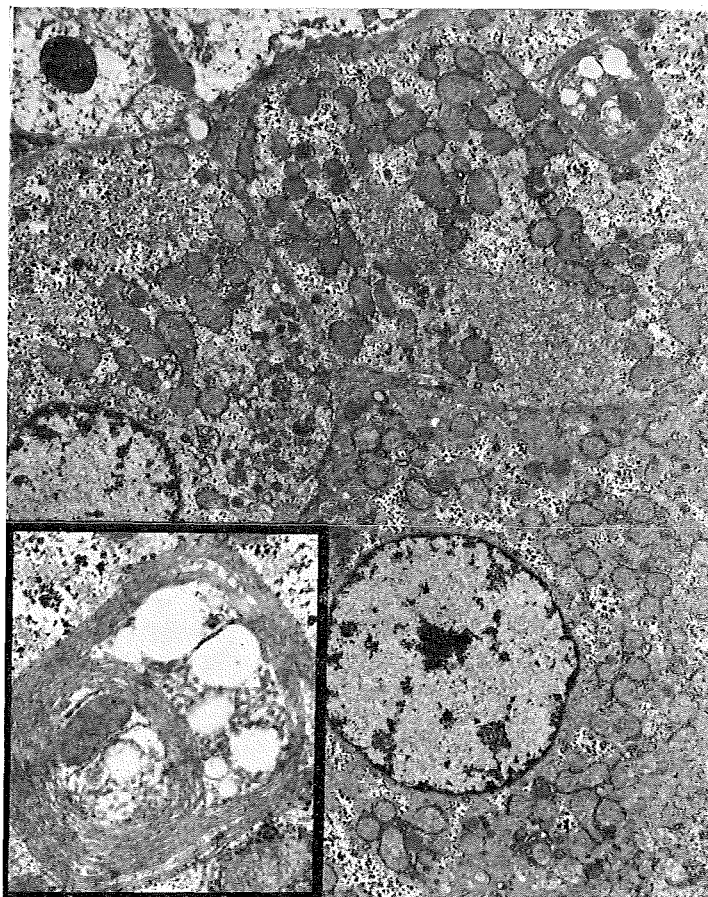
MC + DENA, 7 semanas, M/E (5.800 x).

DISCUSIÓN

Los hallazgos descritos atestiguan que el MC ejerce una acción anticarcinogénica ante la DENA con respecto a la capacidad de la nitrosamina de inducir hepatomas. En líneas generales, puede afirmarse que, las diferencias encontradas con respecto a los animales que recibieron solamente DENA¹⁰, son de carácter más bien cuantitativo que cualitativo, y que la interpretación más razona-

ble parece consistir en aceptar que el MC opera una inutilización parcial de la DENA, tanto en su efecto citotóxico como en su poder carcinogénico. Los cambios morfológicos del hígado de los animales sometidos a la acción combinada de MC y DENA, a las dosis empleadas en el presente trabajo, son en sus líneas básicas superponibles a las de los animales que reciben únicamente DENA en dosis mucho menores (3-5 mg/Kg de peso), tanto con respecto a la

Fig. 10. Tipo celular característico de la periferia lobulillar, con buena preservación del núcleo y de los orgánitos citoplasmáticos, RER dispuesto alrededor de las mitocondrias, focos de hiperplasia del REL, moderado depósito de glucógeno. El asterisco señala un remolino de membranas en cuyo interior existen vacuolas, una mitocondria y elementos desordenados del REL (ver detalle en el ángulo inferior izquierdo). MC + DENA, 10 semanas. M/E. (5.000 x).



intensidad de los cambios como a su cronología⁷. Pero a pesar de ello, las alteraciones observadas son de la misma naturaleza y, probablemente, si el experimento se hubiera prolongado por más largo tiempo, se hubieran manifestado también focos de hepatocarcinoma. Es, pues, indudable que el MC ejerce un efecto protector frente a los cambios citotóxico y cancerígeno de la DENA, pero no puede hablarse de un efecto profiláctico absoluto. En este sentido, la DENA puede alinearse junto a una larga lista de hepatocarcinógenos cuyo efecto puede ser parcialmente neutralizado por los hidrocarburos policíclicos³⁸.

Las interpretaciones acerca del mecanismo de acción del MC sobre la cancerización por la DENA ha de moverse necesariamente en el terreno de lo hipotético mientras no se realicen los estudios bioquímicos pertinentes. Los enzimas inducidos por el MC podrían modificar la vía metabólica de la DENA de tal manera que la eficacia carcinogénica de ésta quedare ampliamente reducida. Como ya se ha señalado anteriormente¹⁰ no hay acuerdo acerca de si la propia DENA es un cancerígeno remoto o inmediato. Los mecanismos de detoxificación exaltados por la hiperplasia del retículo endoplásmico liso y los enzimas

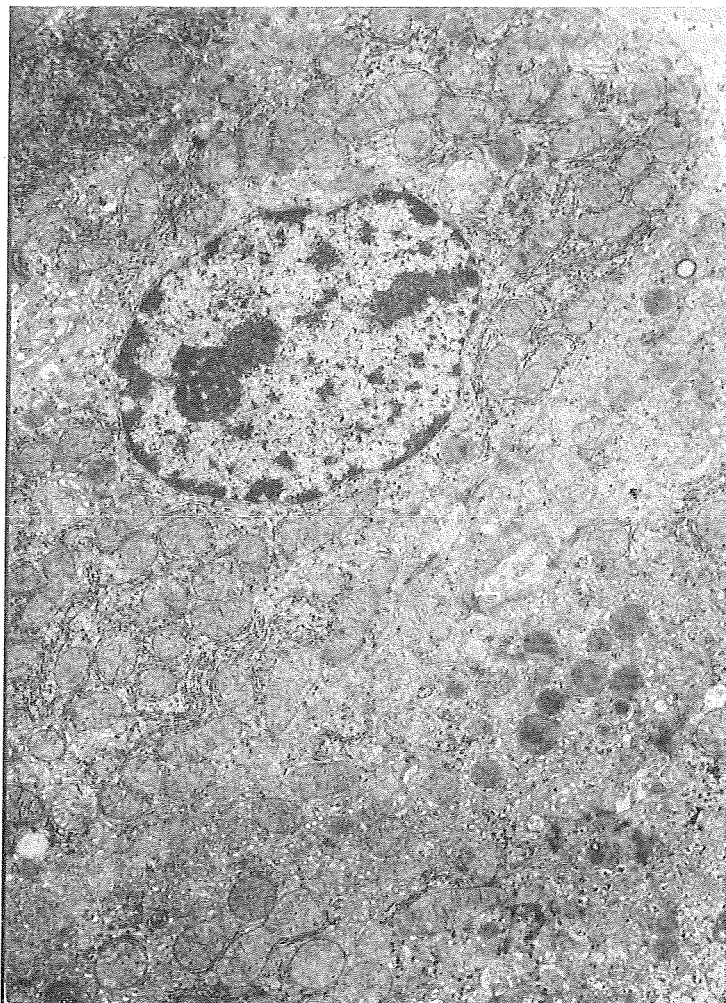


Fig. 11. Periferia de un área de hiperbasofilia. En la célula de arriba, abundante RER y ribosomas libres, hipertrofia de las zonas de Golgi. Este citoplasma contrasta con el de las 3 células que se ven en la parte inferior de la figura. MC + DENA, 16 semanas. M/E (10.200 x).

inducidos podrían operar una rápida eliminación del cancerígeno. Es también posible que tenga lugar una desetilación más allá del nivel de monoetilnitrosamina (que parece ser el cancerígeno intermediario) lo cual traería como consecuencia un rendimiento disminuído de diazoetano cíclico, el carcinógeno último. Esta capacidad de detoxificación del retículo endoplásmico liso modificado por el tratamiento con MC desviaría de la ruta metabólica ordinaria a una parte de

la nitrosamina administrada y ello redundaría en un alargamiento de la fase de inducción de los tumores y también en la toxicidad global del compuesto.

A conclusiones similares llegaron Hoch-Ligeti, Argus y Arcos¹², quienes, en un experimento similar, administraron simultáneamente MC (dosis aproximada 1,3 mg por Kg de peso, 5 días a la semana) y dimetilnitrosamina (DMNA) (18 mg/Kg de peso, 5 días a la semana)

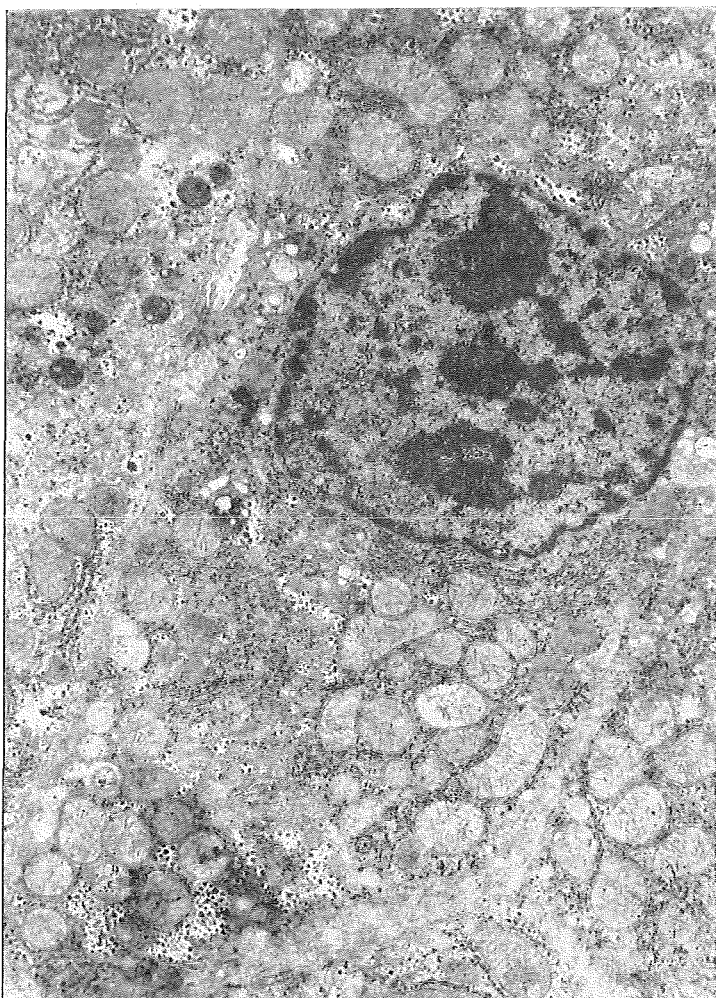


Fig. 12. Area de hiperbasofilia. Grandes nucleolos y abundantes ribosomas libres. MC + DENA, 16 semanas. M/E. (10.400 x).

durante 25 semanas y observaron a los animales durante 340-350 días después de terminado el tratamiento. Sus resultados muestran que la administración combinada de ambos agentes no aumentó el número de tumores hepáticos, sino que, por el contrario, disminuyó ligeramente su incidencia, en comparación con el grupo que solo recibió DMNA. Comprobaron, además, que la acción conjunta de DMNA y MC inducía tumores pulmonares, que no se observaron en los

animales que sólo habían recibido DMNA. Esta escasa influencia del MC sobre la cancerización por DMNA contrasta con los resultados obtenidos por nosotros, lo cual puede atribuirse a que la dosis usada por Hoch-Ligeti y cols.¹² ha sido comparativamente pequeña o a que el plan experimental (tratamiento de parada y largo período de observación post-tratamiento) ha sido diferente. No parece probable que el uso como cancerígeno de la DMNA, en lugar de la

DENA, sea la razón de tan marcadas diferencias.

Desde el punto de vista ultraestructural, los rasgos más salientes son la precoz y extensa proliferación del retículo endoplásmico liso, la presencia de lisosomas de contenido glucogénico y el aumento constante y mantenido de los microbodies. Otras alteraciones (agregados cristaloideos en la matriz mitocondrial, frecuente aparición de atrapamiento de eritrocitos en el citoplasma de las células epiteliales del hígado, las alteraciones nucleolares y la frecuente vacuolización) nos parecen de menor relieve.

La proliferación del retículo endoplásmico liso ha de atribuirse a la acción combinada del MC y la DENA, pues ambos son capaces de inducirla. No son apreciables diferencias en la constitución y organización de esta estructura entre los animales de uno y otro grupo, fuera de la ausencia casi constante en los que recibieron el tratamiento combinado de la transformación vesicular de esta estructura. La formación de remolinos concéntricos de membranas del retículo endoplásmico liso mostró una incidencia similar.

Los lisosomas de contenido glucogénico son, en nuestra experiencia, un rasgo exclusivo de los animales que recibieron simultáneamente MC y DENA. Banasch² los encontró en ocasiones en sus ratas tratadas con N-nitrosomorfolina. Estos lisosomas glucogénicos son típicos, en la patología humana, de la glucogenosis tipo II, la cual es debida a una carencia de α -glucosidasa, que degrada el glucógeno y los oligosacáridos a glucosa¹¹ y que está ligada a los lisosomas¹⁴. De modo característico, los lisosomas de las células hepáticas en la glucogenosis de tipo II contiene un predominio de agrupaciones rosetoides de partículas

glucogénicas elementales⁴, mientras que las que nosotros hemos observado están constituidos por partículas elementales que no tienden a agregarse. El origen de estos lisosomas responde seguramente a un proceso de autofagia y es posible que el glucógeno acumulado en ellos sea degradado a oligosacáridos y glucosa pues no suelen persistir indefinidamente. Posiblemente, las vacuolas de contenido floculento o ligeramente fibrilar sean el resultado final de la evolución de estos lisosomas cuando su contenido básico estuvo constituido por glucógeno. En los lisosomas de composición compleja, la evolución morfológica se caracteriza por la formación de remolinos mieloides de membranas y de cuerpos densos.

Las variaciones cuantitativas de los microbodies constituyen un capítulo todavía no elaborado de la patología de los organitos celulares. Baudhouin³, en su reciente revisión, no trata de las alteraciones de los microbodies. Hruban, Swift y Slesers¹³ han estudiado la respuesta de los microbodies a la inyección de ácido acetilsalicílico, que provoca un aumento del tamaño y número de estos organitos en el hígado y riñón, y que se ponen en relación con la hidroxilación del ácido acetilsalicílico a ácido gentísico. Hübner y Rohr¹⁴ han estudiado detalladamente el cuadro morfológico y morfométrico del aumento de los microbodies consecutivo a la aplicación del ácido acetilsalicílico. Este fenómeno coexiste con una marcada proliferación del retículo endoplásmico liso. La significación del aumento de los microbodies en los animales tratados con MC y DENA no es fácil de explicar sobre la base de los simples hallazgos morfológicos concurrentes ni de poner en relación con algún proceso de metabolización de cualquiera de los dos compuestos, aunque ello pudiera ser posible.

SUMMARY

Effect of 20-Methylcholanthrene on Diethylnitrosamine-induced Carcinogenesis of Liver

20-Methylcholanthrene (10 mg/Kg animal weight) and diethylnitrosamine (10 mg/Kg animal weight) were simultaneously administered to rats six days a week. The liver was studied by light and electron microscopy after 4 to 17 weeks of treatment.

When the morphological findings in this experimental group are compared with those observed by us in animals receiving diethylnitrosamine alone, a marked delay in the

appearance of the features of the carcinogenic pattern is found. The differences are not of a qualitative nature, but simply quantitative in character, things happening as if a smaller daily dose of diethylnitrosamine were administered.

These findings correlate well with those of other authors studying the inhibitory effect of 20-methylcholanthrene on liver carcinogenesis induced by other chemical carcinogens.

BIBLIOGRAFIA

1. BABA, T. *Gann*, 48: 145, 1957.
2. BANNASCH, P. *Recent Results in Cancer Research* (19). Springer, Berlin, 1968.
3. BAUDHOVIN, P. *Handbook of Molecular Cytology*. Editado por A. Lima de Faria. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, London, 1969.
4. BAUDHOVIN, P., H. G. HERS y H. LOEB. *Lab. Invest.*, 13: 1139, 1964.
5. BERENBLUM, I. *Progress Exp. Tumor Res.*, 11: 21, 1969.
6. CEBALLOS, L. y G. HERRANZ. En prensa.
7. DRUCREY, H., A. SCHILDBACH, D. SCHMÄL, R. PREUSSMAN y S. IVANKOVIC. *Arzneimittelforschung*, 13: 841, 1963.
8. ENOMOTO, M., M. MIYAKE y K. SATO. *Gann* (Tokyo), 59: 177, 1968.
9. GELBOIN, H. V. *Advanc. Cancer Res.*, 10: 1, 1967.
10. HERRANZ, G. y L. CEBALLOS. En prensa.
11. HERS, H. G. *Biochem J.*, 86: 11, 1963.
12. HOCH-LIGETI, C., M. F. ARGUS y J. C. ARCOS. *J. Nat. Cancer Inst.*, 40: 535, 1969.
13. HRUBAN, Z., H. SWIFT, A. SLESERS. *Lab. Invest.*, 15: 1884, 1966.
14. HÜBNER, H. H., y H. P. ROHR. *Beitr. path. Anat.*, 139: 362, 1969.
15. ITO, N., Y. HIASA, Y. KONISHI y M. MARUGAMI. *Cancer Res.*, 29: 1137, 1969.
16. LACASSAGNE, A., N. P. BUU-HOI y N. B. GIAO. *Bull. Cancer* (Paris), 55: 87, 1968.
17. LEJEUNE, N., D. THINES-SEMPUX y H. G. HERS. *Biochem. J.*, 86: 16, 1963.
18. MARUGAMI, M., N. ITO, Y. KONISHI, Y. HIASA y E. FARBER. *Cancer Res.*, 27-II: 2011, 1967.
19. MEECHAN, R. J., D. E. MCCAFFERTY, R. S. JONES. *Cancer Res.*, 13: 802, 1953.
20. MILLER, J. A. y E. C. MILLER. *Carcinogenesis: A broad critique*. Williams & Wilkins Baltimore, 1967.
21. MILLER, E. C., J. A. MILLER, R. R. BROWN y McDONALD. *Cancer Res.*, 12: 282, 1952.
22. MILLER, E. C., J. A. MILLER, R. R. BROWN y McDONALD. *Cancer Res.*, 18: 469, 1958.
23. MIYAJI, T., MOSKOWSKI, L. I., T. SENOO, M. OGATA, T. ODO, K. KAWAI, Y. SAYAMA y H. MATSUO. *Gann*, 44: 281, 1953.
24. O'HEGARTY, M. T. y J. W. HARMAN. *Cancer Res.*, 29: 521, 1969.
25. RAPPAPORT, A. M. *The Liver*, Vol. I. Editado por C. H. Rouiller. Academic Press. New York, 1963.
26. RICHARDSON, H. L., A. R. STIER, E. BORSOS-NACHTNEBEL. *Cancer Res.*, 12: 356, 1952.
27. ROBERTSON, C. H., A. C. GRIFFIN, H. L. RICHARDSON. *J. Nat. Cancer Inst.*, 15: 519, 1954.
28. SASAKI, S. *J. Nat. Med. Assoc.*, 14: 101, 1963.
29. SCHMÄHL, D., E. STUTZ y C. THOMAS. *Z. Krebsforsch.*, 68: 68, 1966.
30. SCHMÄHL, D. y C. THOMAS. *Z. Krebsforsch.*, 67: 135, 1965.
31. SCHMÄHL, D. C. THOMAS y KONIG. *Z. Krebsforsch.*, 65: 343, 1963.
32. SCHMÄHL, D., C. THOMAS, W. SATTLER y G. F. SCHELD. *Z. Krebsforsch.*, 66: 526, 1965.
33. SCHMÄHL, D., C. THOMAS y G. SCHELD. *Arzneimittel Forsch.*, 14: 1167, 1964.

34. SCHMÄL, D., S. VON STACKELBERG. *Arzneimittel Forsch.*, 18: 318, 1968.
35. SHIMKIN, M. B. y W. A. TRIOLO. *Progr. Exp. Tumor Res.*, 11: 1, 1969.
36. SIDRANSKY, H., S. CLARK y T. BABA. *J. Nat. Cancer Inst.*, 30: 999, 1963.
37. SIDRANSKY, H., N. ITO, E. VERNEY. *J. Nat. Cancer Inst.*, 37: 677, 1966.
38. VAN DUUREN, B. L. y S. MELCHIONNE. *Progr. Exp. Tumor Res.*, 12: 55, 1969.
39. WATTENBERG, L. W. *Cancer Res.*, 26: 1520, 1966.

REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA

Fundada en 1945, publica trabajos de investigación sobre temas de Fisiología humana normal y patológica, Fisiología animal y comparada y Bioquímica.

Los cuatro números publicados cada año forman un volumen.

Cada artículo lleva un extenso resumen en inglés.

Precio de suscripción anual:

España, 400 pesetas. Extranjero, 8 \$ U. S. A.

REDACCION Y ADMINISTRACION:

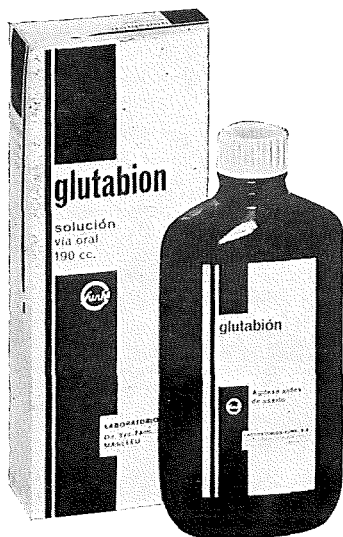
REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA

APARTADO 273 — PAMPLONA (ESPAÑA)

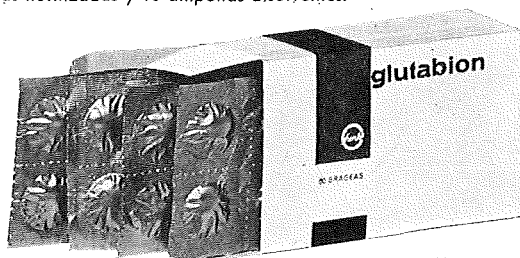
GLUTABION



Caja con 10 ampollas liofilizadas y 10 ampollas disolventes.
P.V.P. 181,30



Solución Oral, Frasco de 190 c.c.
P.V.P. 109,50



Caja de 60 grageas,
P.V.P. 178,50

- * Tratamiento de todas las HEPATOPATIAS,
- * Aporta al hígado sustancias base para su correcto funcionamiento.
- * Potente regenerador Células Hepáticas.



LABORATORIOS FUNK S.A.
Mallorca, 288
Barcelona-9