

«METODOS DE LABORATORIO PARA LA INVESTIGACION DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS Y PROTECTORAS DE LA FUN- CION HEPATICA», I-COLORANTES AZOICOS.*

Por *I. del Río Lozano***
*L. A. Tarrafeta Rubio****

INTRODUCCION:

Sabemos que el hígado es el principal órgano detoxificador y el que recibe el primer impacto de toda sustancia que entra en el organismo por vía oral y es capaz de atravesar la barrera intestinal, a excepción claro está, de una pequeña cantidad que es transportada por vía linfática.

En casi su totalidad, las investigaciones sobre la acción hepatotóxica de sustancias farmacológicamente activas, se han llevado a cabo realizando estudios a largo plazo o utilizando dosis elevadas, con el fin de producir lesiones fácilmente identificables macro o microscópicamente y funcionalmente.

Hasta la fecha, ha sido escaso el número de investigadores que han utilizado las pruebas de funcionalismo hepático para determinar la hepatotoxicidad de una sustancia. SPAIN y GRIFFIN, (1959) y WATERS y CANTERO (1965), realizaron pruebas de funcionalismo hepático en ratas a las que administraban por vía oral un colorante azoico carcinógeno. SPAIN y GRIFFIN observaron un aumento de la bilirrubina en el plasma a los dos días de la administración del colorante azoico 3-Me-DAB y WATERS y CANTERO, utilizando el rosa de bengala como indicador de la función hepática y administrando DAB, comprobaron que a las 48 horas la capacidad de retención de rosa de bengala por el hígado había disminuido apreciablemente.

Recientemente hay una tendencia muy marcada a investigar las acciones tóxicas de las sustancias por métodos histopatológicos.

ISBN 84-600-5909-X

Depósito legal: O.-357-1973

GRAFICAS SUMMA. Avda. del Mar, 7-OVIEDO

* Trabajo realizado en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza durante los años 1967-1968.

** Experto de FAO, Facultad Veterinaria y Zootecnia U. N. Bogotá, Colombia.

*** Ex-profesor adjunto de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza-España.

Hess (1965), aun siendo partidario de este método, afirma que «Un estímulo toxicológico es difícil de definir con los medios histopatológicos ordinarios, ya que con ello solamente nos enteramos del cuadro final de la lesión que ha sido producida por la progresiva acumulación de sustancias tóxicas o sus metabolitos, pero desconocemos el proceso de la «lesión bioquímica» en sí». Si el efecto morfológico de una sustancia con un alto grado de especificidad es aquel que se produce con la administración de una dosis que no interfiera ni con el desarrollo ni con la nutrición normal del animal y presente una relación de dosis-respuesta, tendríamos que descartar las pruebas histopatológicas para el estudio de la toxicidad de la mayor parte de las sustancias. Normalmente ocurre que, el cuadro histopatológico final, es el resultado de los procesos de degeneración y regeneración celular, superpuestos unos sobre otros.

PECK y LAMMERS (1965), son también de la opinión de que «los efectos tóxicos colaterales que se presentan debido a la inherente toxicidad de un medicamento, no pueden ser, por regla general, detectados por medio de estudios farmacológicos a corto plazo, requiriéndose la administración prolongada de dosis excesivas y a veces irreales», y afirman estos autores que los cambios anatómicos producidos en el hígado o riñón por algunas sustancias, no pueden ser predichos utilizando métodos farmacológicos.

Resumiendo, diremos que los estudios de toxicidad subagudos son de difícil interpretación utilizando las técnicas corrientes y que normalmente se requiere un período de 2-3 días para que las observaciones clínicas, exámenes hematológicos y estudios bioquímicos nos den una orientación sobre la capacidad tóxica de la sustancia objeto de estudio.

Refiriéndonos de nuevo al hígado, sabemos que la frecuencia con que en este órgano se presentan lesiones debido a la administración de cualquier compuesto, es mayor que para cualquier otro órgano.

Hess (1965) presenta una estadística de frecuencias de las alteraciones específicas en varios órganos producidos por la administración de drogas. Más del 50 % de las drogas probadas por él, producen lesiones en el hígado, siendo este órgano de dos a cinco veces más frecuentemente afectado que cualquier otro.

Vemos pues que el hígado, evidentemente, tiene una preponderancia muy significativa sobre los demás órganos en lo que se refiere a selectividad toxicológica, lo que refleja la primordial importancia de este órgano en los procesos de metabolismo y detoxicación. Por esta causa, gran número de sustancias podrían ser consideradas como verdaderas hepatotoxinas, no obstante el poseer acciones específicas sobre otros órganos y funciones.

S. SHERLOCK (1962) considera al tetracloruro de carbono, cloroformo, tetracloroetano, tetracloroetileno, cloruro de etilo, cloruro de metilo, D. D. T., muscarina, naftaleno, a los derivados del benceno y a los venenos metálicos, como venenos hepáticos directos, es decir, que cualquiera de ellos, tomados accidentalmente o con

intentos suicidas, producen lesiones hepatocelulares inmediatas y específicas cuya gravedad es directamente proporcional a la dosis. Otro tipo de sustancias pueden dar lugar a lesiones hepáticas similares a las producidas por la hepatitis vírica (iproniacida, Marsilid) y otros derivados de la hidrazina, utilizados como inhibidores de las monoamino-oxidasa. Pero más importantes aún son las colestasis intrahepáticas producidas por algunos derivados de la fenotiacina, tales como la clorpromacina, promacina, mepazina, etc. y otros compuestos (carbasona, cetilurea, ácido para-amino-salicílico, arsfenamina, etc.) los cuales poseen una acción sensibilizante.

Con excepción de los venenos hepáticos directos mencionados anteriormente, el modo de acción de las sustancias que son capaces de originar lesiones hepatocelulares, se desconoce por completo. E incluso, aunque se conocen con cierto detalle las lesiones celulares y cambios morfológicos que tienen lugar debido a la acción de los venenos hepáticos directos, sólo hay hipótesis en relación con el desencadenamiento de los procesos degenerativos.

Hess (1965) es de la opinión que los exámenes histopatológicos convencionales son el método más simple para determinar las manifestaciones de especificidad orgánica producida por las drogas, pero reconoce que es difícil el correlacionar los hallazgos histopatológicos con los resultados de las pruebas funcionales utilizadas actualmente.

Después de esta introducción en la que se ha dado especial énfasis a la importancia del hígado como blanco de la acción tóxica de la mayor parte de las sustancias y a lo incompletas que resultan las técnicas actuales para determinar «a priori» la capacidad potencialmente tóxica de todo tipo de sustancias, vamos a exponer ciertos métodos de laboratorio que difieren de los utilizados hasta ahora en la simplificación de las rutas por las que el tóxico llega al órgano y en la eliminación de factores que pudieran enmascarar la acción específica del tóxico sobre el hígado.

Así mismo, estas técnicas serían útiles para la búsqueda de sustancias con propiedades protectoras hepáticas o de métodos encaminados a aumentar la resistencia del parénquima hepático a la acción de los tóxicos.

Las pruebas iniciales las hemos realizado con un grupo de colorantes que han sido ampliamente estudiados por sus propiedades carcinógenas para el hígado.

Creemos de interés el hacer una somera revisión de los trabajos más destacados sobre la acción de dichos colorantes para que nuestros resultados puedan ser interpretados más claramente.

I.—COLORANTES AZOICOS

Según MILLER y MILLER (1952) han pasado más de 30 años desde que se descubrieron los primeros agentes químicos carcinógenos. Desde entonces se han intensificado los trabajos con el fin de descubrir las acciones nocivas de dichos agentes para mejor protegerse de ellos, siendo el fin práctico de estas investigaciones el

poder determinar las sustancias que, por ser potencialmente carcinogénicas, deben ser retiradas del alcance del fabricante o consumidor. Hoy en día aún desconocemos el proceso de la carcinogénesis a pesar del ingente número de trabajos realizados para conocer su metabolismo y modo de acción.

Un grupo de estos agentes químicos, el de los colorantes azoicos, ha atraído la atención de numerosos investigadores por haber resultado carcinogénicos algunos de sus compuestos y por continuar empleándose otros, afines químicamente, que en la actualidad no se consideran nocivos, siendo utilizados libremente en la preparación de productos alimenticios y en la industria farmacéutica.

Algunas naciones o comunidad de naciones, tienen en su legislación una lista de colorantes autorizados para su empleo en la industria. Estas listas no coinciden más que en algunos productos —5 entre 40— (Plá Delfina, 1965), siendo prohibidos el resto para una u otra comunidad. Esto nos hace pensar en la distinta apreciación de la toxicidad de estos compuestos por los equipos de técnicos dedicados a su estudio. Y también en la falta de pruebas toxicológicas específicas que puedan avalar la inocuidad o valorar la toxicidad de estos colorantes.

Según MANCHON (1965), las pruebas para poder determinar el poder carcinogénico de los colorantes azoicos, consistirían en la administración de estas sustancias a cierto número de animales de laboratorio (ratas, ratones, cobayas, etc.), de una manera continuada, conservando el mismo número de animales como testigos. La relación numérica de los tumores producidos en aquellos animales, comparada con la de los testigos, nos informaría sobre la acción carcinogénica del colorante estudiado.

Pero dudamos que esto sea suficiente, por cuanto la toxicidad para las distintas especies es diferente, sobre todo la que se refiere a la del grupo de colorantes que nos ocupa. Bien pudiera ocurrir que éstos fueran inócuos para los animales utilizados más corrientemente en el laboratorio y selectivamente tóxicos para la especie humana. Según CANTERO (1959) existen alrededor de 450 sustancias químicas que pueden producir el cáncer en las distintas especies animales o en el hombre y sin duda, esta lista ha aumentado considerablemente durante los últimos años. El cáncer, según este investigador, no es el resultado de un cambio brusco o instantáneo de una célula normal a una célula neoplásica, sino que es el resultado de cambios progresivos intracelulares. CANTERO opina que estas etapas de evolución precancerosa podrían ser, en algunos casos, diagnósticas.

Con este fin se han intentado esclarecer los mecanismos íntimos de la acción de estas sustancias sobre los tejidos. Los ensayos bioquímicos realizados durante los últimos años, han abierto nuevas perspectivas para determinar los procesos metabólicos de las células normales y de las cancerosas.

De gran importancia son las relaciones entre la estructura química y la acción carcinogénica. ARCOS y ARCOS (1958-I), estudiaron los aspectos moleculares esenciales que deben tener los compuestos conjugados para que posean actividad

carcinogénica, refiriéndolos principalmente a la presencia o ausencia en la molécula, de sustituyentes que alterasen su carácter hidrofílico. La introducción de un grupo etilo en la posición 4' de la molécula de algunos colorantes azoicos inactivos, las convierte en carcinógenas (ARCOS y SIMÓN, 1962). En estudios detallados sobre la importancia de la disposición de los átomos de cloro en los anillos del 4-dimetilaminoazobenceno, MILLER, MILLER y FINGER (1953-1957) encontraron que no existía ninguna posición en el primer anillo que concerniese al proceso carcinogénico de este compuesto, aunque ciertas sustituciones por átomos de cloro aumentasen el poder cancerígeno del compuesto. Por otra parte estos mismos autores (1957), estudiando la actividad carcinogénica del segundo anillo, llegaron a la conclusión de que es necesario que la posición dos de la molécula del 4-dimetilaminoazobenceno quede libre para que éste posea actividad carcinogénica y para que sea posible la formación del complejo proteína-colorante en el hígado.

Las proporciones en que algunos colorantes azoicos se conjugan con las proteínas del plasma y del hígado han sido determinadas por DIJKSTRA y LOUW (1962). Según estos autores, el grado de conjugación está en relación con la actividad carcinogénica, con la excepción del 2-MeDAB, el cual, a pesar de estar fuertemente unido a las proteínas del hígado, es un agente carcinogénico débil. El mecanismo por el cual estos colorantes se unen a las proteínas, es aún oscuro y DIJKSTRA (1963), aportó pruebas de que los colorantes solubles en ácido, se conjugaban con las proteínas de una forma más rápida.

GELBOIN, MILLER y MILLER (1958), hicieron investigaciones sobre los procesos de conjugación de los colorantes con las proteínas del hígado. Después de cinco horas de la administración de 36 a 54 mg. de 3'-Me-DAB a ratas, por vía oral o intraperitoneal, encontraron gran cantidad de colorante conjugado con las proteínas del hígado. A las 18-24 horas, el colorante unido a las proteínas alcanzaba cifras iguales a las obtenidas después de la administración continuada de 3'-Me-DAB (4-5 mg. diarios durante una o dos semanas). Ratas alimentadas con una dieta rica en caseína, conjugaban más colorante que ratas a las que se les administraba una dieta con un bajo nivel protéico. Si esta deficiencia en proteína era subsanada, las ratas adquirirían rápidamente el poder normal para la conjugación del colorante.

GELBOIN, MILLER y MILLER creen por consiguiente que los colorantes azoicos se unen preferentemente a las nuevas proteínas y precisamente, durante su síntesis. Esto puede que sea de suma importancia en el proceso de la carcinogénesis, pues según ARCOS y ARCOS (1958, IIb), el primer paso en la carcinogénesis química, es la alteración de las infraestructuras de los mecanismos de síntesis de las proteínas.

En experimentos *in vitro*, GELBOIN, MILLER y MILLER (1959) observaron que en cortes de hígado incubados a 37°C. en una solución de Krebs-Ringer durante cinco horas, a la que se le añadía 3'-Me-DAB, la conjugación del colorante con la

proteína era inferior en $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ a la cantidad conjugada por el hígado *in vivo* y que aquélla era más débil que esta última a la acción de los álcalis o ácidos.

DAUST y CANTERO (1959), estudiaron las proporciones de tipos de células que existían en hígados normales y en hígados cirróticos después de la administración de DAB durante 90 días. En los hígados cirróticos había una disminución de más de un 50 % en el número de células parenquimales.

Según SUZUKI (1962-I), son característicos los cambios en el retículo endoplasmático de las células del hígado en la carcinogénesis hepática producida por la administración de DAB o 3' Me-DAB a ratas durante una o dos semanas. Estos cambios no son específicos de los colorantes azoicos, ya que otras sustancias hepatotóxicas, como el tetracloruro de carbono o el fósforo, producen un cuadro muy similar. La administración de 4' - Me-DAB durante dos semanas, no dio lugar a la aparición de estos cambios (SUZUKI, 1962-II). La determinación de la concentración de colorante en el hígado, reveló una relación paralela entre la intensidad de las lesiones y la cantidad de colorante presente. Hasta tres días después de la administración del carcinógeno, no encontró lesiones claras de degeneración celular.

ARCOS y ARCOS (1958) observaron la disminución progresiva de la turgencia de los microsomas de hígado de ratas, como consecuencia de la administración de colorantes azoicos a estos animales. La disminución máxima ocurría a las cuatro semanas, regresando al nivel primitivo a las 24 semanas, a pesar de no haber sido interrumpida la administración del colorante a las ratas. En presencia de hepatomas, la turgencia de los cromosomas regresaba a los niveles alcanzados a la 4.^a semana. ARCOS, GRIFFITH y CUNNINGHAM (1960-II), observaron que también las mitocondrias aparecían con una turgencia similar a la de los microsomas, coincidiendo el período de aparición de la lesión en ambas estructuras. Una vez rebasado el período crítico de las cuatro semanas, si se continuaba la administración del colorante, las lesiones tumorales se convertían en irreversibles. Según estos autores, no es el retículo endoplasmático el primer blanco de las sustancias carcinogénicas. ARCOS (1961) es de la opinión de que es más importante el estudio de los procesos de carcinogénesis a nivel subcelular que el conocimiento de la homeostasis celular, y sugiere que el estudio de las alteraciones producidas por los agentes químicos carcinógenos, debe de ser estudiado a dos niveles: a) en agregados macromoleculares o en macromoléculas individuales y, b) en las partículas celulares durante el proceso de la carcinogénesis.

Por otra parte, los colorantes azoicos liposolubles tienen un gran poder carcinógeno, mientras que el de los hidrosolubles es menor o carecen de él, siendo significativo que las sustancias extrañas oxidadas por los sistemas microsomales del hígado son en su mayor parte liposolubles y que los productos resultantes de esta oxidación, son ya menos solubles en las grasas o sus solventes que las sustancias de que proceden. Los enzimas de los microsomas no catalizan la hidroxilación de

los compuestos no liposolubles, siendo éstos hidroxilados por otros enzimas específicos presentes en la célula hepática (MRTOMA, POSNER, REITZ y UNDERFRIEND, 1956), lo que ha inducido a creer que los sistemas oxidativos de los microsomas están rodeados de una barrera lipoidea, la cuál sólo puede ser atravesada por sustancias liposolubles.

Sin la oxidación de los colorantes azoicos liposolubles su eliminación por el riñón se hace muy difícil. Los túbulos renales están recubiertos de una membrana de naturaleza lipoidea que reabsorbe estas sustancias y las devuelve a la circulación, permaneciendo en el organismo por tiempo indefinido.

Así tenemos que el hígado es el órgano más importante en la detoxicación de estos productos, los cuales quedan, total o parcialmente, sometidos a la acción de los enzimas hepáticos localizados en las estructuras intracelulares, donde se aumenta su hidrofilia, se reduce su toxicidad y por consiguiente aumentan también sus posibilidades de ser excretados por el riñón.

También se han descrito fenómenos de sinergismo entre colorantes azoicos de estructura química similar, (ARCOS, y GRIFFITH, 1961) y de inhibición de la acción carcinogénica con la administración simultánea de ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos. (MILLER, MILLER, BROWN y Mc DONALD, 1958).

Un gran número de autores (NAKAJIMA, 1960: ONOS, SUZUKI, TAKAHASHI, NAKAJIMA y ARAI, 1959; JINOHARA, 1963; CHANG, SPAIN y GRIFFITH, 1953; SPAIN y GRIFFITH, 1957; CHANG, WARD y ICHINOS, 1963; DAOUST, 1962; HARUKO, AMANO y DAOUST, 1961; DAOUST y MOLNAR, 1964; etc.) han estudiado las lesiones de las células hepáticas utilizando métodos histológicos e histoquímicos. Con dichos métodos se han conseguido encontrar lesiones o alteraciones de los componentes celulares, a los tres días de la administración del colorante azoico carcinogénico.

SPAIN y GRIFFITH (1957) y WATERS y CANTERO (1965), realizaron pruebas de funcionalismo hepático en ratas a las que se les administraba por vía oral un colorante azoico carcinogénico. SPAIN y GRIFFITH observaron un aumento de la bilirrubina en el plasma de ratas alimentadas con una dieta normal a la que se le añadía un 0,06 % de 3' -Me-DAB. Este aumento era patente a los dos días y aumentaba progresivamente a las cuatro semanas. Estos autores creen que la administración del colorante producía una estasis biliar generalizada y que probablemente el aumento de la bilirrubina en el suero era debido a la regurgitación de la bilis de los capilares biliares. SPAIN y GRIFFITH opinan que la presencia de bilirrubina en el plasma es de poco valor en la predicción o conocimiento del grado de formación tumoral, ya que la concentración de este pigmento en el suero de ratas cuyos hígados presentaban una infiltración generalizada de tumores, era sólo ligeramente superior a la de ratas normales. También formulan la pregunta de si la proliferación del epitelio de los conductillos biliares sería debida al estasis biliar o que este estasis fuera precedido por la proliferación del epitelio, lo que daría lugar al cierre del lumen de los conductillos.

WATERS y CANTERO (1965), han estudiado la función de las células parenquimales del hígado de rata durante la carcinogénesis producida por colorantes azoicos, utilizando el rosa de bengala como indicador de la función hepática. Administrándoles el colorante por vía digestiva en cantidades normales en esta clase de experimentos (0,06 %), observaron que la función del hígado disminuía evidentemente al segundo día de la administración de un colorante azoico carcinogénico (DAB), teniendo éste un efecto máximo a los 21 días, pero no observaron ningún cambio funcional después de la administración de otro colorante azoico no carcinogénico (2-Me-DAB). El distinto comportamiento de estos dos colorantes azoicos fue atribuido por WATERS y CANTERO a la diferencia de poder hepatotóxico. La disfunción hepática producida por el DAB podría ser debida a la alteración del flujo sanguíneo hepático, aunque estos autores se inclinan a creer que sería debida a la pronta lesión de la célula hepática.

En resumen, podemos decir que se ha estudiado ampliamente la acción a largo plazo de los colorantes azoicos sobre el hígado, pero no la interferencia funcional que éstos o sus metabolitos pueden producir desde el primer momento de su administración.

Consideramos que el estudio de las alteraciones de la función hepática producida por la administración de distintas dosis de estos colorantes en la intoxicación aguda, pueden ser de mucha utilidad y considerando las pruebas utilizadas actualmente, lentas, engorrosas y de interpretación difícil, nos proponemos describir ciertas técnicas que permitan diferenciar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la disfunción que este tipo de sustancias producen desde el primer momento de su administración.

MATERIAL Y METODOS

Experimentos «in vitro»

Perfusiones de Hígados: Se perfundieron 36 hígados de rata (el peso de las ratas oscilaba entre los 290 y 350 grs.) con una solución de Ringer-Locke (R. L.), siguiendo el método de Andrews y del Río Lozano (1961), que en resumen es como sigue:

A ratas anestesiadas con éter, se les practicaba una incisión a lo largo de toda la línea blanca que se continuaba en dirección craneal hasta la parte anterior del tórax, quedando al descubierto las vísceras abdominales y torácicas. Inmediatamente se insertaba una cánula de acero inoxidable en la vena porta y comenzaba a perfundirse el hígado con la solución de Ringer-Locke. Al mismo tiempo se practicaba una incisión en el corazón, para permitir el drenaje del líquido perfusor. A continuación, se ligaba la vena cava inferior en su porción abdominal, entre la vena de la glándula adrenal y la desembocadura de las venas hepáticas. Por último, se insertaba una cánula de polietileno en la porción torácica de la vena cava en direc-

ción al hígado. El flujo de perfusión era mantenido constante entre los 9 y 12 cc./min., variándolo a voluntad según el tamaño del hígado a perfundir. Para ello se disponía de dos jeringuillas de 50 cc. que eran vaciadas automáticamente por medio de un aparato construido especialmente para ese fin. La temperatura de perfusión, estaba regulada termostáticamente entre los 37-38° C.

Cuando se investigaba la liberación de sulfobromoftaleína (BSP) por el hígado, se inyectaban en la corriente de perfusión de 10-15 mgrs. de esta sustancia de una manera continua durante 3-7 minutos, comenzándose a tomar muestras del perfusado, cinco minutos después de haber concluido la inyección del colorante. Si se investigaba la retención de BSP por el hígado, este colorante se añadía a la solución de R. L. en concentraciones de 0,5 a 3 mgrs./100 ml.

Los colorantes azoicos a estudiar eran también añadidos a la solución de R. L., la cual a veces contenía también BSP. Los colorantes de este tipo utilizados fueron: p-Dimetilaminoazobenceno (DAB), $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{—N=N—C}_6\text{H}_5$, Aminoazotolueno (AT), $(2\text{—CH}_3\text{—C}_6\text{H}_4\text{—N=N—C}_6\text{H}_3\text{—3—CH}_3\text{4—NH}_2)$ y Crisoidina $(\text{C}_6\text{H}_5\text{—N=N—C}_6\text{H}_3\text{—2—4(NH}_2)_2\text{. ClH})$, todos ellos obtenidos en forma pura de la casa DOESDER. La sulfobromoftaleína (BSP) se obtuvo de la casa MERCK (Bromotaleína), en ampollas de 10 cc. conteniendo 50 mgrs. de BSP por centímetro cúbico.

La composición de la solución de Ringer-Locke era: Cloruro Sódico, 0,85 grs., Cloruro Potásico, 0,042 grs., Cloruro Cálcico, 0,025 grs., Bicarbonato Sódico, 0,020 grs., agua destilada hasta 100 ml.

Experimentos «in vivo»

Se utilizaron un total de cuatro gatos y tres ratas anestesiados en un principio con éter y administrándoles seguidamente la suficiente cantidad de cloralosa intravenosamente para producirles una anestesia basal adecuada.

Se insertaron cánulas: en la vena femoral para la inyección de la anestesia y de BSP; en una pequeña vena tributaria de la vena mesentérica anterior (previa laparotomía), para la inyección del colorante azoico a estudiar; y en una vena yugular para la toma de muestras de sangre. En tres experimentos (2 ratas y un gato), se insertó también una cánula de polietileno en el colédoco, ligándose el conducto cístico.

Estimación de Colorantes:

Se hicieron comparaciones colorimétricas (D. O.) de todos los colorantes utilizados, en un colorímetro «Spectronic 20», previa comprobación del espectro de absorción de cada uno de ellos. Las soluciones de BSP fueron leídas en una longitud de onda de 580 m μ , después de haberlas alcalinizado con una solución concentrada de hidróxido sódico.

A pesar de considerarse el DAB insoluble en agua y soluble solamente en los aceites y sus solventes, para la realización de este trabajo se utilizaron soluciones en Ringer-Locke preparadas en caliente y filtradas momentos antes de su utilización. Estas soluciones se comparaban con una solución standar de DAB en alcohol de 99,5 %. A pesar de percibirse ciertas diferencias en las tonalidades de color, al acidificarse ambas soluciones con CIH se observó que, además de existir proporcionalidad en las lecturas siguiendo la Ley de BEER los espectros fotométricos de ambos coincidían. Los mismos controles fueron realizados para la determinación colorimétrica del AT y la crisoidina, los cuales fueron leídos a 495 m μ y 470 m μ respectivamente.

Estudios Histológicos:

Una vez perfundidos los hígados de rata durante un mínimo de tiempo de 10 minutos con la solución de R. L. y el colorante azoico a estudiar, cortes de los mismos se conservaban durante 3-4 días en una solución de formol al 12 %. Después de este tiempo los trozos de hígado se volvían a cortar y sumergir en la solución de formol para que la fijación y endurecimiento fuesen completos. Una vez las piezas lavadas con agua, se hicieron cortes histológicos con un microtomo de congelación y éstos se sometieron a los métodos de tinción de Gallego y una variante de Gallego.

RESULTADOS

En el Hígado perfundido de rata:

Cuando se investigó la liberación de BSP almacenado por el hígado, 5-10 minutos antes de comenzar la perfusión con la solución de R. L. se inyectaron intravenosamente 25 mg. de colorante en el animal vivo. Otras veces se inyectaban de 10 a 15 mg. de BSP en la corriente de perfusión durante un período de tiempo de cinco a ocho minutos. Con ambos métodos se confirmaron las curvas de liberación de este colorante por el hígado de rata descrita por ANDREWS y DEL RÍO LOZANO. (1961), (Fig. 1).

Se perfundieron 22 hígados de rata para estudiar la influencia del aminoazotolueno (AT) en la liberación de BSP en la corriente de perfusión a su paso por el hígado. Se comenzó perfundiendo el hígado con una solución de RINGER-LOCKE y cuando aquél estaba suficientemente lavado, se inyectó en la corriente de perfusión 10-12 mg. de BSP. Inmediatamente se comenzó a perfundir el hígado con una solución de R. L. que contenía 1,5 a 3,5 mg./100 ml. de AT. Se tomaron muestras de la cánula insertada en la vena cava cada 2 minutos. La curva de liberación de BSP no siguió el ritmo ascendente normal (Fig. 2), sino que tomó una dirección ligeramente ascendente. Parece ser que el AT desplazó al BSP de la célula hepática.

En otras ocasiones se perfundió el hígado alternativamente con una solución

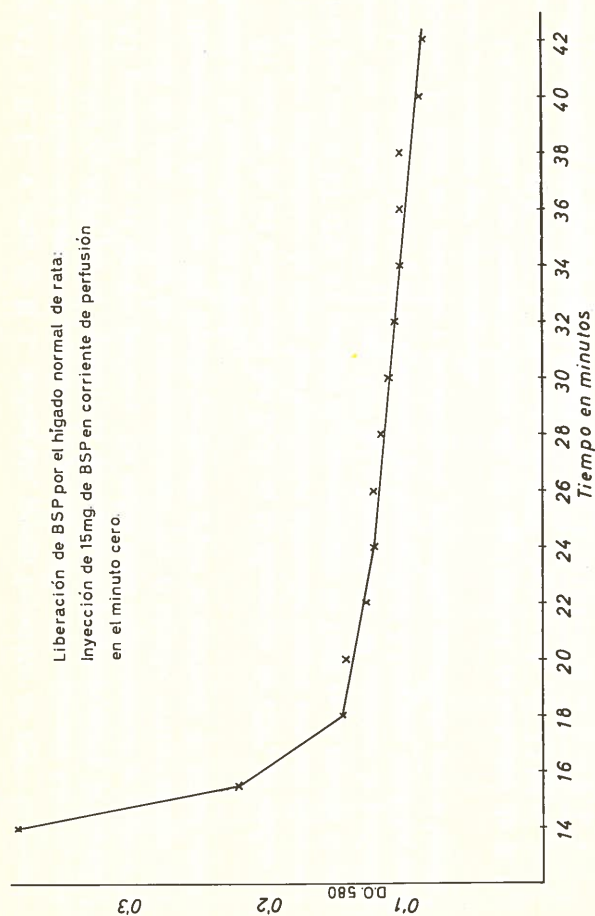


Fig. 1.—Lectura colorimétrica de las muestras tomadas cada dos minutos de la cánula de salida.

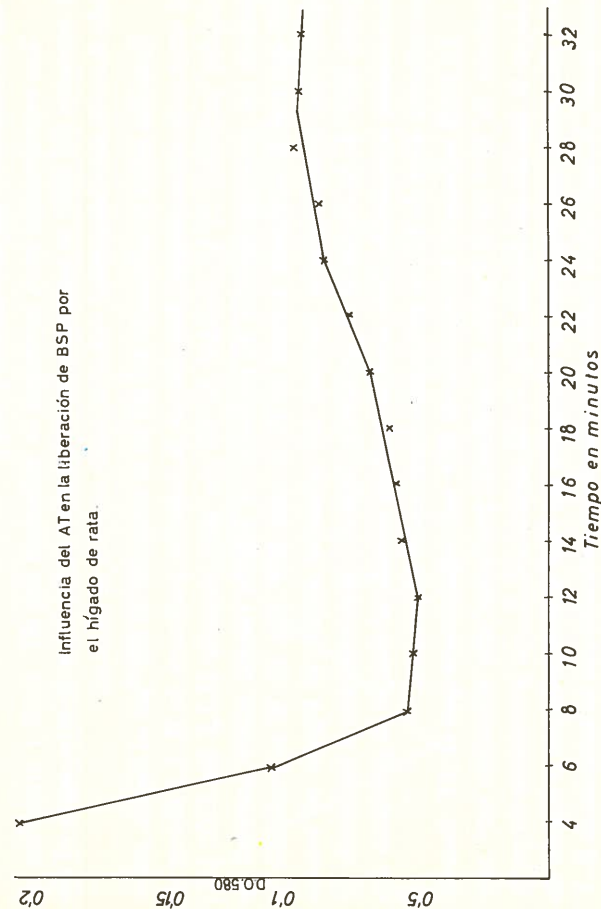


Fig. 2.—Después de un descenso rápido durante los 12 primeros minutos de perfusión con 1.8 mg. de AT en 100 ml. de R. L., el hígado comienza a liberar el BSP almacenado, en concentraciones cada vez mayores. Después de 30 minutos de perfusión, comienza a descender hasta acercarse a cero.

de AT y R. L., y, otra de R. L. solamente, previa inyección de BSP. Los resultados obtenidos confirman el experimento anterior (Fig. 3), viéndose además, que la liberación de BSP por el hígado, era directamente proporcional a la cantidad de AT presente en el líquido perfusor. En todos estos experimentos se apreció la retención de gran cantidad de aminoazotolueno por el hígado, evidenciándose por la disminución de color del líquido perfusado y por la aparición de zonas amarillentas en la superficie del hígado.

El estudio de las influencias del DAB en la liberación de BSP, se realizó en 18 hígados perfundidos de ratas. Los resultados obtenidos fueron aún más espectaculares que con el AT (Fig. 4), aunque la concentración de DAB en el líquido de perfusión era mucho menor (1 mg./100 ml.) Después de 20 minutos de perfusión con la solución de DAB y R. L. aparecían en la superficie del hígado módulos amarillentos. El DAB era retenido y metabolizado en grandes cantidades por el hígado, como se demostró por cromatografía.

La crisoidina, en concentraciones de 3.5 mg./100 ml. de solución de R. L., no alteró perceptiblemente la liberación de BSP almacenado en el hígado, resultando una curva similar a la de la figura 1.

Para estudiar el poder de retención de BSP por el hígado perfundido de rata, se añadió este colorante a la solución de RINGER-LOCKE en concentraciones de 0.5 a 3.0 mg./100 ml. Las curvas de retención obtenidas (Fig. 5), fueron idénticas a las de ANDREWS y del Rfo LOZANO (1961).

Los experimentos para investigar la influencia del AT, DAB y crisoidina en la retención del BSP, se realizaron en 42 hígados perfundidos de rata, según el método descrito anteriormente.

Estudios sobre la influencia del AT en la retención de BSP por el hígado, cuando estos colorantes estaban disueltos en la solución perfusora de R. L., dieron resultados variables. Si la cantidad de AT era muy pequeña (1-1.5 mg./100 ml.) durante los primeros minutos de perfusión, el hígado retenía mayor cantidad de BSP que con la perfusión normal de R. L. más BSP (fig. 6). Si se perfundía el hígado con concentraciones mayores del colorante azoico, el hígado no retenía apenas BSP de la corriente de perfusión, llegando aparentemente a un estado de intoxicación irreversible. Esto ocurría también cuando el tiempo de perfusión con una solución débil de AT, se prolongaba hasta los 60-90 minutos.

El DAB influenció la retención de BSP más rápidamente que el AT. Concentraciones de 10^{-5} en el líquido de perfusión, producían una alteración muy marcada en la función del hígado (Fig. 7). El cambio a R. L., en la corriente de perfusión, disminuía marcadamente la liberación del BSP almacenado por el hígado anteriormente, la cual volvía a aumentar cuando se perfundía con la solución de R. L. más DAB.

La adición de crisoidina a la solución de R. L. y BSP, no alteró más que muy ligeramente, la curva normal (Fig. 5) de retención de BSP.

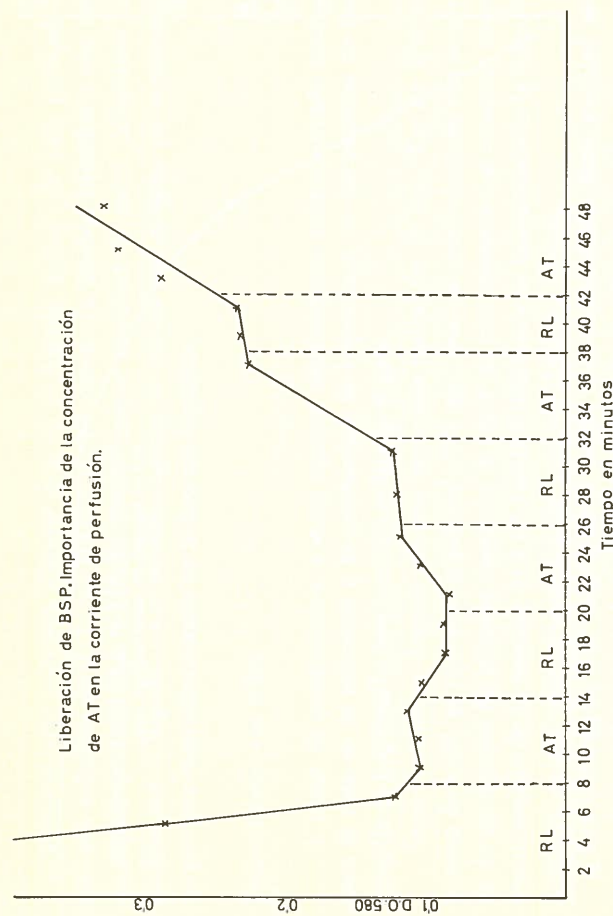


Fig. 3.—Perfusión de hígado de rata alternativamente con una solución de 3,6 mg. de AT por 100 ml. de R. L. y con otra de R. L. solamente. Inyección previa (7 minutos) de BSP en la corriente de perfusión.

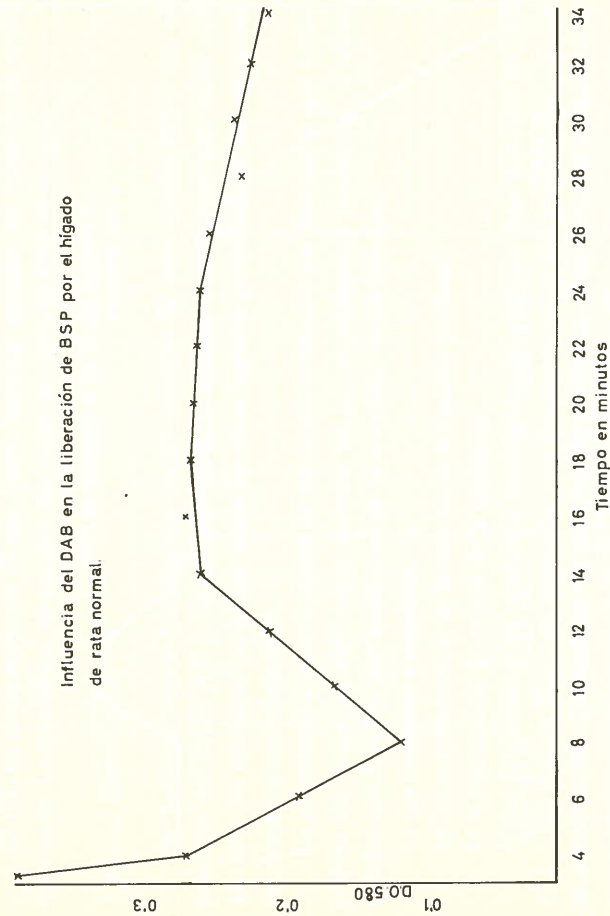


Fig. 4.—Perfusión de hígado de rata con 1 mg./100 ml. de DAB en R. L. El hígado libera grandes cantidades de colorante.

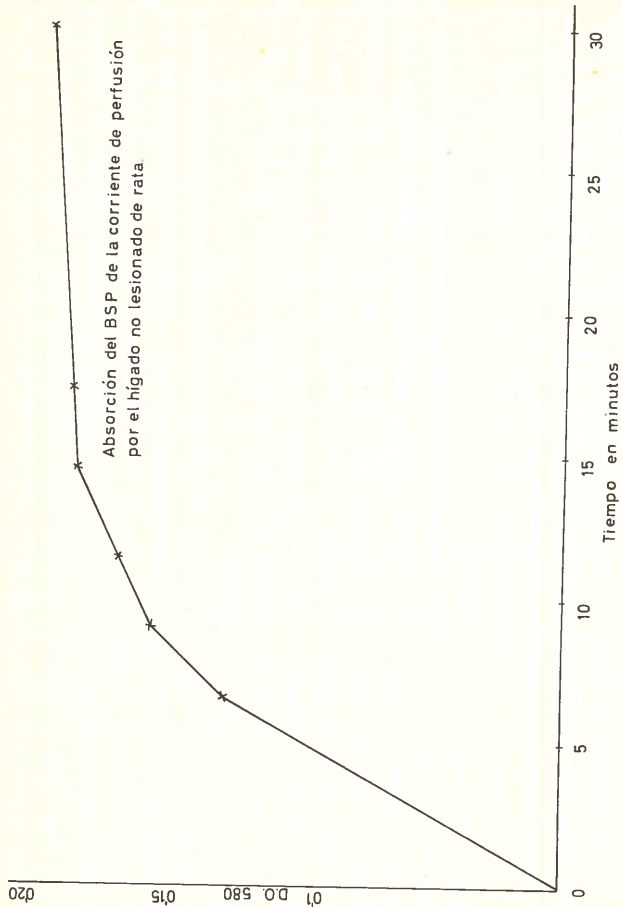


Fig. 5.—Curva normal de BSP no retenido por el hígado.

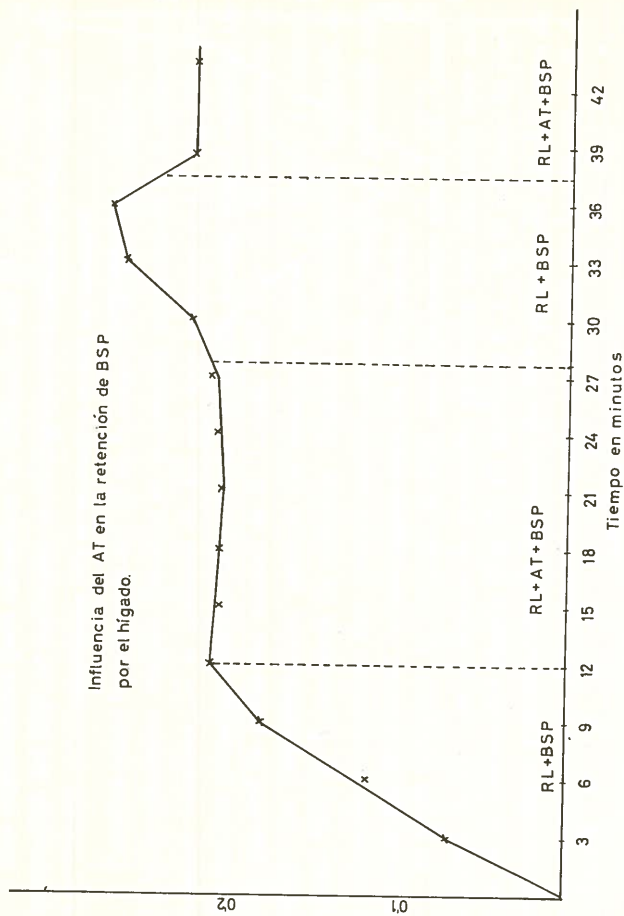


Fig. 6 El AT en pequeñas concentraciones, aumenta la capacidad del hígado para la retención de BSP.

Resumiendo, podemos afirmar que en el hígado aislado de rata perfundido con una solución de R. L., el DAB y el AT alteran la función hepática y que esta alteración se hace más marcada cuanto mayor cantidad de estos colorantes ha pasado por el hígado. La crisoidina, agente de acción carcinógena poco marcada, no produce estas alteraciones en la función hepática.

Experimentos «in vivo»

A pesar de considerarse a estos agentes carcinógenos selectivamente nocivos para la rata en lo referente a la producción de hepatomas, en las pruebas de funcionalismo hepático hemos también utilizado el gato.

Inmediatamente después de una inyección inicial de 10 mg./Kg. de BSP en la vena femoral, se continuó inyectando 0,5 mg./min. de este colorante con la ayuda de un aparato de infusión continua. A partir de este momento, se tomaban muestras de sangre de la yugular (0,3 ml.) cada 5 minutos y se inició también la infusión continua, en una vena mesentérica, de 1 mg. de DAB por minuto.

Las lecturas de BSP en el plasma de las muestras tomadas de la yugular, nos informaban de la cantidad de BSP circulante. La gráfica de la figura 8 muestra cómo, a partir del comienzo de la inyección de DAB, aumenta la cantidad de BSP circulante, el cual disminuye de nuevo al ser interrumpida la administración del colorante azoico.

El AT, en dosis mayores (2 mg./min), produjo también un aumento en el BSP circulante. La crisoidina, en cambio, no alteró la curva de BSP en sangre.

Estudios Histológicos:

Se hicieron cortes histológicos en 27 hígados de rata, perfundidos con una solución de DAB, AT y crisoidina en R. L. durante un tiempo que varió entre los 10 y 60 minutos. La mayor parte de estos hígados procedían de los experimentos descritos anteriormente.

La observación microscópica de los cortes evidenció las lesiones a que hubiera podido dar lugar la disfunción descrita en los experimentos anteriores. Podemos señalar tres factores que influyeron en la severidad de las lesiones.

- 1) La sustancia a emplear.
- 2) La concentración de la misma en el líquido perfusor.
- 3) El tiempo de duración de la perfusión.

A los 10 minutos de perfundir un hígado de rata con una solución de DAB al 1 : 100.000 en R. L., se apreciaba una desorganización del parénquima próximo al canal portal. Después de 40 minutos de perfusión, estas lesiones se acentuaban y se extendían hacia zonas centrales del lobulillo (Fig. 9).

Utilizando dosis iguales de DAB y AT, las lesiones histológicas en estos hígados son similares para ambos colorantes, siempre que el tiempo de perfusión con

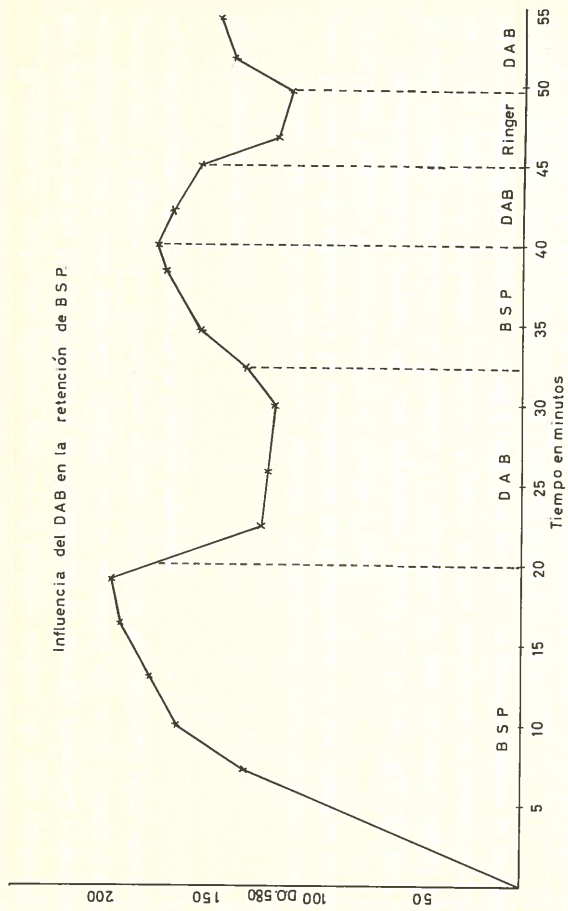


Fig. 7.—El DAB en concentraciones de 1 mg./100 ml. produce una marcada alteración de la función del hígado. La parte final de la curva, es similar a la de la figura 4.

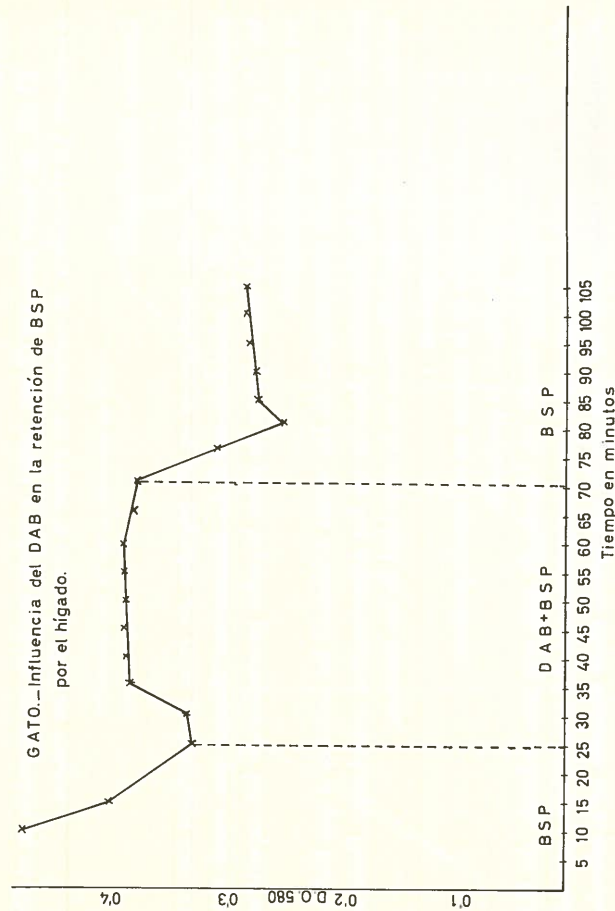


Fig. 8.—Aumento del BSP circulante en el plasma durante la inyección de 1 mg./min. de DAB en una vena mesentérica y rápida disminución de aquél al interrumpir la administración de DAB.

la solución de AT, sea de tres a cinco veces mayor. Las lesiones producidas por el AT están también localizadas en la periferia del lobulillo (Fig. 10).

La crisoidina produce lesiones menos marcadas. Es necesario aumentar grandemente la concentración de la misma en el líquido perfusor y alargar el tiempo de perfusión, para poder apreciar ligeros cambios en la estructura hepática (Fig. 11).

CONCLUSION:

La sulfobromoftaleína fue utilizada por vez primera por ROSENTHAL en 1928 como indicador de la función hepática. Este colorante, desde el punto de vista de su metabolismo se comporta de forma similar a la bilirrubina, pigmento biliar cuyo aumento en la circulación sanguínea indica la presencia de una disfunción en los mecanismos de secreción de la bilis, bien a nivel de la célula parenquimal, o en sus vías de conducción. Otro colorante utilizado frecuentemente como indicador de la función hepática es el rosa de bengala.

SPAIN y GRIFFIN (1957) estudiaron en la rata los cambios que sufren algunos de los constituyentes de la bilis en el curso de la carcinógenesis provocada por la administración de colorantes azoicos.

Al segundo día de la administración de 3' -Me-DAB por vía oral la bilirrubina en el plasma había aumentado el 87 % en comparación con la de los animales testigo, siendo este aumento 35 veces mayor, después de cuatro semanas de administración ininterrumpida. Estos autores consideraron sus resultados similares a los obtenidos por otros autores en casos de obstrucción biliar, y suponen que en sus experimentos se produce una estasis biliar, pasando a la sangre, por regurgitación, los componentes de la bilis. KREBS, BRAUER, BOLLMAN y LEONG (1964), presentaron pruebas de que después de la obstrucción aguda del conducto biliar en la rata, la sulfobromoftaleína presente en la linfa hepática, era cromatográficamente similar a la contenida en los conductos biliares. Otros autores, sin embargo, han señalado la posibilidad de que en casos de obstrucción biliar la dirección de secreción de la bilis por la célula parenquimal, puede ser dirigida hacia el sistema linfático (STARLING, 1911; GREEN, 1929; WITTH, 1947, 1949; FRIEDMAN BYERS y OMOTO, 1956). También recientemente DEL RÍO LOZANO y ANDREWS (1966), han puesto en duda la hipótesis de que los componentes de la bilis que pasan a la linfa hepática en casos de obstrucción del colédoco, sean iguales a los encontrados en los conductos biliares.

Para nosotros, es poco probable que el primer paso en la carcinógenesis sea la estasis intrahepática como suponen SPAIN y GRIFFIN y que el primer blanco de estas sustancias carcinógenas sea el epitelio de los conductillos biliares. Nos parece más plausible el hecho de que sea la célula hepática la dañada en primer lugar y que estas lesiones sean más parecidas a las producidas por la administración de otras sustancias hepatotóxicas (SUZUKI, 1962, I y II), produciendo un cambio

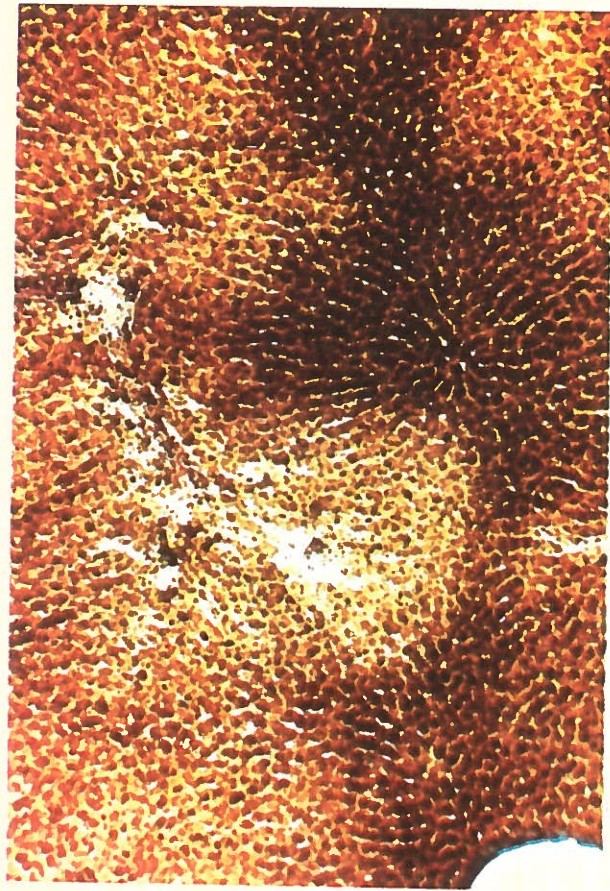


Fig. 9.—Corte de hígado de rata perfundido con DAB (1 mg./100 ml. de R. L.) durante 40 minutos. Las lesiones del parénquima, localizadas alrededor de los tractos portaes, van extendiéndose hacia el centro del lobulillo. (Método de Gallego.).

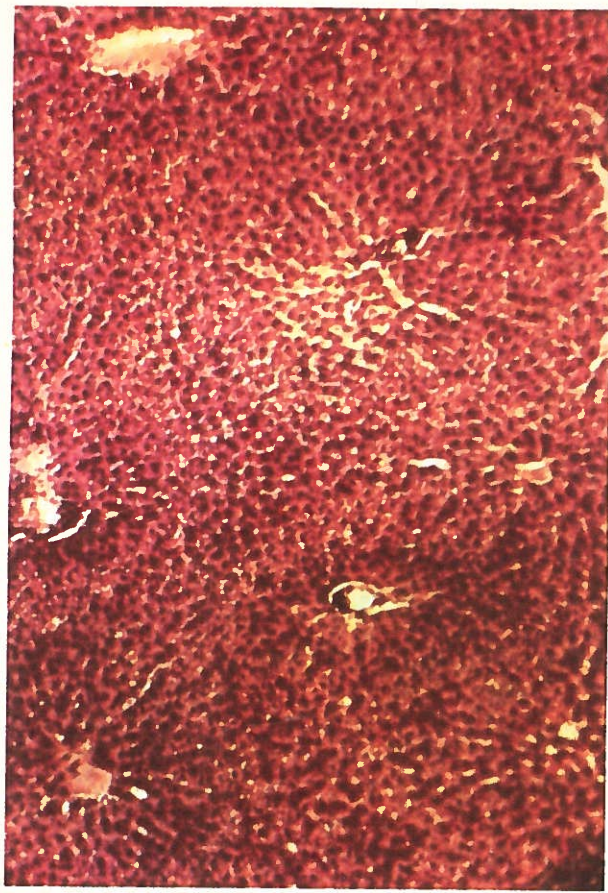


Fig. 10.—Corte de hígado de rata perfundido con AT (2 mg./100 ml. de R. L.) durante 60 minutos. Las lesiones son menos marcadas que con el DAB. Tinción variante de Gallego.



Fig. 11.—Corte de hígado de rata perfundido con crisoidina (4 mg./100 ml. de R. L.) durante 60 minutos. Sólo se aprecian pequeñas infiltraciones alrededor de los tractos portaes de pequeño tamaño. Tinción: Gallego.

en la dirección de secreción de las sustancias que normalmente son vertidas en los conductos biliares. Podrían influenciar este proceso, los cambios físico-químicos que sufre la célula por la acción de estos colorantes, alterando la tonicidad intracelular u «osmotic homeostasis» descrita por OPIE y ROTHBARD (1953), e influenciando por tanto el intercambio de sustancias entre las células y el fluido intersticial. El hecho de que en los animales con hígados fuertemente carcinomatosos exista una concentración de bilirrubina en plasma sólo ligeramente superior a la de las ratas normales, podemos explicarlo por la disminución del número de células parenquimales normales (DAOUST y CANTERO, 1959), que han sido o van siendo sustituidas por células cancerosas, las cuales, al igual que en la obstrucción biliar crónica, sólo pueden producir bilis sin pigmento (DEL RÍO LOZANO y ANDREWS, 1965). Por otra parte, no se ha demostrado aún que la bilis sea tóxica para las células parenquimales del hígado, aunque se ha descrito su acción irritante sobre las capilares y tejidos intersticiales (LOEFFLER 1927).

Durante las perfusiones de hígado de ratas, cobayos y conejos con RINGER LOCKE, no se produce bilis, y por consiguiente, la función de la célula hepática en este aspecto está paralizada. No obstante, conserva la función de almacenamiento y de detoxicación de gran cantidad de sustancias. El BSP es retenido por la célula hepática y liberado paulatinamente de una forma muy similar, y como lo haría a través del sistema biliar, en el animal vivo. Según ANDREWS y DEL RÍO

LOZANO (1961), el ritmo de liberación de BSP por el hígado puede ser alterado por cambios físicos en la corriente de perfusión (flujo, temperatura, etc.) o por la adición del proteína en el líquido perfusor. Estos cambios, sin duda, alteran al igual que los colorantes azoicos empleados, el fisiologismo celular, no el de los conductillos biliares, que sería consecuencia de aquél.

También pudiera ocurrir que la célula parenquimal, tuviese más apetencia por el colorante azoico que por el BSP y lo desplázase, pero a pesar de haber observado el almacenamiento de DAB y AT por el hígado perfundido, estamos inclinados a creer que no es un caso de competición, sino que el colorante, a pesar de ser almacenado por la célula en cantidades más pequeñas, daña sus estructuras (membrana, microsomas, mitocondrias, etc.) lo cual provoca la liberación del BSP. Los estudios histológicos de estos hígados muestran, a los pocos minutos de perfusión con un colorante azoico carcinogénico, zonas de desorganización celular muy marcadas. Por consiguiente podemos decir que los conductillos biliares no intervendrían en la liberación del BSP almacenado por la célula, ni en presencia ni en ausencia de DAB o AT.

También apoya esta hipótesis, el hecho de que a medida que se aumenta el tiempo de perfusión o la dosis de estas sustancias carcinógenas, disminuye la capacidad del hígado para almacenar BSP a la vez que aumentan las lesiones en el parénquima.

Las proteínas juegan también un papel importante en el proceso de la carcinogénesis producida por estos colorantes. Tanto el BSP como los colorantes azoicos carcinógenos se unen a las proteínas del plasma y del hígado. En estudios no completados hemos apreciado una diferencia en la forma de unión del BSP y del DAB a las proteínas del plasma, pareciendo ser esta unión de naturaleza distinta. Esto podría confirmar los trabajos de GELBOIN, MILLER y MILLER (1958) y ARCOS y ARCOS (1958 II b), referente a la unión de los colorantes azoicos a las proteínas en formación y el proceso de la carcinogénesis.

A pesar del escaso número de experimentos realizados *in vivo* sobre ratas y gatos, podemos afirmar que los datos obtenidos confirman los resultados criticados anteriormente. El DAB y el AT alteran la capacidad funcional del hígado para la retención del BSP, pudiendo detectarse esta disfunción a los pocos minutos de la administración por vía intravenosa de estos colorantes. WATERS y CANTERO (1965) son también de la opinión de que la disfunción detectada por ellos a los dos días de la administración de DAB utilizando el rosa de bengala como indicador era debida a la lesión de la célula hepática.

Con respecto a la crisoidina, se confirmó su escaso poder hepatotóxico, al igual que WATERS y CANTERO (1965), demostraron la función normal del hígado de rata en presencia del colorante azoico no carcinógeno 2-Me-DAB y SUZUKI (1962) la ausencia de lesiones tempranas en la célula hepática después de la administración continuada del débil carcinógeno 4'-Me-DAB.

Concluyendo, podemos afirmar que el estudio funcional y las pruebas funcionales del hígado, al orientarnos sobre el poder hepatotóxico de los colorantes azoicos, puede ayudarnos a entender mejor el proceso de la carcinogénesis por ellos producida, siendo los métodos descritos en este trabajo, más rápidos que los utilizados actualmente para el diagnóstico precoz de la lesión hepática. Opinamos que, a diferencia de ARCOS (1961), los procesos homeostáticos que tienen lugar en la célula hepática son de suma importancia, ya que éstos son los encargados de regular los intercambios entre las células y los tejidos que las rodean.

En otra serie de experimentos (en curso), se están intentando establecer las relaciones entre las células parenquimales, los espacios de Disse, los sinusoides y los conductos biliares durante el proceso de la carcinogénesis por estos colorantes.

RESUMEN

Se han investigado los cambios que se producen en la liberación y retención de BSP en el hígado aislado de rata la adición, al líquido perfusor, de tres colorantes azoicos: AT, DAB y crisoidina. Los dos primeros, activos carcinógenos, producen una alteración muy marcada, tanto en la liberación como en la retención de BSP, dependiendo de la dosis o del tiempo de perfusión. La crisoidina, en dosis más elevadas, no produce alteraciones de importancia. El DAB resultó ser más hepatotóxico que el AT. Estudios histológicos de los hígados perfundidos, evidenciaron la presencia de lesiones periportales después de la perfusión con DAB o AT durante 10 ó más minutos. La severidad de las lesiones dependió también de la dosis.

Los hígados perfundidos con crisoidina, no presentaron lesiones apreciables. En otros experimentos realizados *in vivo* sobre ratas y gatos, se confirmaron los resultados anteriores.

La técnica descrita se cree sea de gran valor para la pronta detección de la hepatotoxicidad de éstas u otras sustancias.

RESUME

On a fait des investigations sur les changements produits dans la libération et retention de BSP dans le foie de rat isolé, par l'addition de trois colorants azoïques: AT, DAB et crisoldine, au liquide perfuseur. Les deux premiers colorants, carcinogènes actifs, produisent une altération très marquée dans la libération aussi bien que dans la retention de BSP; cel depend du dosage ou du Temps de perfusion. La crisoldine utilisée à un dosage plus élevé ne produit pas d'altérations importantes. Le DAB fut plus hépatotoxique que le AT. Des études histologiques de foies perfondus ont démontré la présence de lésions périportales après la perfusion avec de DAB ou

du AT pendant 10 minutes ou plus. La gravité des lésions dépendait du dosage. Les foyes perfondus avec de la crisoidine n'eurent pas de lésions appréciabiles.

Les résultats précédents ont été confirmés dans l'autres expériences effectuées *in vivo* avec des rats et des chats.

On croit que la technique que nous avons décrite aura une grande valeur pour une prompte détection de l'hépatotoxicité de ces substances ou d'autres.

SUMMARY

Changes in the uptake and release of BSP by the perfused rat liver induced by the administration to the perfusion fluid of 3 azo dyes, AT, DAB and chrysoidine, has been investigated. AT and DAB, having a strong carcinogen action, produced a rapid and marked alteration in the uptake un release of BSP, which was influenced by the dosis and the perfusion time. In higher dosis chrysoidine, did not alter appreciably neither of the two functions. The DAB, under the same conditions, was more toxic than the AT. Histological preparations of the perfused livers showed periportal lesions following the addition of AT or DAB to the perfusing fluid for 10 minutes or longer. The severity of the lesions was also dependent of the dosis. The addition of chrysoidine did not alter the parenchyma appreciably. Experiments carried out on the rat and cat *in vivo* confirmed previous results.

It is believed that the technique used is of great value for the screening and detection of the hepatotoxicity of these or other substances.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS, W. H. H. y DEL RÍO LOZANO, I.; *Quart J. Exp. Physiol.*, XLVI: 238-256, 1961.
 ARCOS, D. C.; *Bull. Tulane Med. Fac.*; **20** : 133, 1961.
 ARCOS, M. y ARCOS, J. C.; *Arzneim.—Forsch.* (Drug Res.), **8** : 486-88, 1958, part I.
 ARCOS, M. y ARCOS, J. C.; *Arzneim.—Forsch.* (Drug Res.), **8** : 643-47, 1958, part II b.
 ARCOS, J. C. y ARCOS, M.; *Bioch. et Biophys. Acta* : **28** : 9-20, 1958.
 ARCOS, J. C. y GRIFFITH, G. W.; *Brit. J. Canc.*, XV: 291-298, 1961.
 ARCOS, J. C. y GRIFFITH, G. W.; y CUNNINGHAM, R. W.; *J. Biophys. & Biochem. Cyt.*; **7** : 49-60, 1960.
 ARCOS, J. C. y SIMÓN, J.; *Drug Res.*, **12** : 270-75, 1962.
 CANTERO, A.; Mouvement Médical. Montreal, Septembre, 1959.
 CHANG, J. P., SPAIN, J. D. y GRIFFIN, A. D.; *Cancer Res.*, **18(6)** : 670-75, 1953.
 CHANG, J. P., WARD, D. N. y ICHINDE, K.; Extrait de Acta Unión Internationales Contre le Cancer; XIX (3-4) : 560-67, 1963.
 DAOUST, R.; *Cancer Res.*; **22(6)** : 743-47, 1962.
 DAOUST, R. y CANTERO, A.; *Cancer Res.*; **19(7)** : 757-62, 1959.
 DAOUST, R. y MOLNAR, F.; *Cancer Res.*; **24(11)** : 1898-1909, 1964.
 DIJKSTRA, J.; *Brit. J. of Cancer*; XVII : 355, 1963.
 DIJKSTRA, J. y LOUW, T. B.; *Brit. J. of Cancer*; XVI : 757, 1962.
 FRIEDMAN, M., Byers, S. D. y ONOTO, C.; *Am. J. Physiol.*; **184** : 11, 1956.
 GELBOIN, H. V., MILLER, J. A. y MILLER, E. C.; *Cancer Res.*; **18(5)** : 608-17, 1958.
 GELBOIN, H. V., MILLER, J. A. y MILLER, E. C.; *Cancer Res.*; **18(9)** : 975-85, 1959.
 GREENE, C. H.; *J. Missouri M. a.*; **26** : 214, 1929.
 GROOSKY, G. M. CARBONE, J. V. y FANSKE, R.; *Nature*, **103** : 469, 1959.

- HAOJIOLOV, D. C.; *Zeitech. Krebsforsch.*; **66** : 473-477, 1965.
 HARUKO ANANO y DAOUST, R.; *J. Histochem & Cytochem.*; **9(2)** : 161-64, 1961.
 HINCHARA, T.; *Sapporo Med. J.*; **23(4/5)** : 278-281, 1963.
 KREBS, J. S., BRAUER, R. W., COLLMAN, J. L. y LEONG, G. F.; *Am. J. Physiol.*; **207** : 877, 1964.
 LOEFFLER, L.; *Ztschr. F. Anat. u. Entwiklungsgesch.*; **84** : 511, 1927.
 MANCHON, P.; *Biol. Med.*; **53(5)** : 453-75, 1965.
 MILLER, E. C. y MILLER, J. A.; *Cancer Res.*; **12(8)** : 547-56, 1952.
 MILLER, J. A., MILLER, E. C. y FINGER, G. C.; *Cancer Res.*; **17** : (5) : 387-98, 1957.
 MILLER, J. A., MILLER, E. C. y FINGER, G. C.; *Cancer Res.*; **13(1)** : 93-97, 1953.
 MILLER, E. C., MILLER, J. A., BROWUN, R. R. y MACDONALD, J. C.; *Cancer Res.*; **18(4)** : 469-77, 1958.
 MITOMA, C., POSNER, H. S., RETTZ, H. C. y UNDERFRIEND, S.; *Arch. Biochem. A. Biophys.*; **61(2)** : 431-441, 1956.
 NAKAJIMA, Y.; *Sapporo Med. J.*; **18(1)** : 43-54, 1960.
 ONOE, T., SUZUKI, I., TAKAHASHI, O., NAKAJIMA, Y. y ARAI, S.; *Sapporo Med. J.*; **8(2-3)** : 151-53, 1959.
 OPIE, E. L. y ROTHBARD, M. B.; *J. Exp. Med.*; **97** : 483, 1953 a.
 PLA DELFINA, J. M.; *Acta Galénica*; **18** : 37-76, 1965.
 RÍO LOZANO, I. y ANDREWS, W. H. H.; *Quart. J. Exp. Physiol.*; **11** : 324-335, 1966.
 RÍO LOZANO, I. y ANDREWS, W. H. H.; *J. Path. & Bact.*; **90(2)** : 471-77, 1965.
 ROSENTHAL, S. M. y WHITE, E. C.; *J. Am. Med.*; **84** : 112, 1925.
 SPAIN, J. D. y GRIFFIN, A. C.; *Cancer Res.*; **17(3)** : 200-204, 1957.
 SPAIN, J. D. y GRIFFIN, A. C.; *J. Nat. Cancer Inst.*; **18(5)** : 693-700, 1957.
 STARLING, E. H.; *Arch. Esp. Path. u. Pharmacol.*; **64** : 468, 1911.
 SUZUKI, I.; *Sapporo. Med. J.*; **21(6)** : 327-34, 1962.
 SUZUKI, I.; *Sapporo. Med. J.*; **21(6)** : 352-63, 1962.
 WATERS, C. y CANTERO, A.; *Cancer Res.*; **21(1)** : 67-71, 1965.
 WITH, T. K.; *Acta Med. Scand.*; **128** : 25, 1947.
 WITH, T. K.; *Acta Med. Scand.*; **234** : 331, 1949.