

Progressió de clons hepatocel.lulars enzim-deficients durant la carcinogè-
nesi per dietilnitrosamina i fenobarbital

M^aD. Estadella, M^aJ. Pujol, E. Rius, J. Serratosa, M^aR. Piñol, J. Domingo
Departament d'Histologia i Biologia Cel.lular, Facultat de Medicina,
Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona 36.

Abstract

Progression of enzyme-deficient hepatocellular clones during carcinogenesis
by diethylnitrosamine and phenobarbital

Enzyme biochemical and histochemical assays during chemical carcinogenesis in rat liver have revealed that several adult enzyme activities are lost and some fetal enzyme activities are re-expressed in the hyperplastic foci as well as in the developed hepatomas. The clonal origin of the hyperplastic foci and their probable involvement in the origin of hepatocellular carcinomas have been reported by different authors. From our three enzyme (glucose-6-phosphatase, adenosine-5'-triphosphatase and 5'-nucleotidase) studies on serial liver sections and a carcinogenesis protocol including diethylnitrosamine as the initiator and phenobarbital as the promoting agent, we have concluded that foci with more deviated enzyme pattern grow faster than less deviated ones. The present paper reports the progression of those foci or clones through more extended carcinogenesis protocols involving one or two initiation-promotion pairs. Relative proportions of the different foci classes and growth-enzyme pattern relationships have been found nearly invariant for all the cases. Complex foci with smaller foci or subclones inside have been observed in livers from the carcinogenesis protocols with two initiation-promotion pairs. Subclones are identified by additional enzyme deficiencies with respect to the focus phenotype. On the average, foci with subclones have been found larger than homogeneous foci. From comparisons between the number of foci per surface area of liver section and the number of subclones per surface area of foci section, a clear trend that enzyme alterations arise more frequently from cells already modified than from normal tissue can be shown.

Introducció

La carcinogènesi hepàtica per administració de carcinògens químics és un procés llarg i complex durant el qual es detecten notables canvis al fenotip dels hepatòcits mitjançant tècniques bioquímiques i histoquímiques. Les primeres, essencialment l'assaig de diverses activitats enzimàtiques a fraccions obtingudes d'homogenitzats de fetge total, donen una informació global del procés, revelant una progressiva "fetalització" del patró enzimàtic (Curtin, Snell, 1983). La realització d'estudis histoquímics per a enzims o altres marcadors de diferenciació hepàtica (Tatematsu et al. 1983) indica l'existència d'una gran heterogeneïtat de fenotips cel.lulars durant l'hepatocarcinogènesi, en forma de subpoblacions - identificables per la

pèrdua d'activitats enzimàtiques pròpies de l'adult o per la re-expressió de proteïnes fetals - que constitueixen focus, illots o nòduls hiperplàstics d'origen clonal (Scherer, Hoffmann, 1971), implicats, molt probablement, a la gènesi dels hepatomes (Emmelot, Scherer, 1980; Pitot, Sirica, 1980; i Williams, 1980).

Tant les dades epidemiològiques del càncer humà com les dels estudis de carcinogènesi experimental indiquen que el desenvolupament neoplàstic és un procés multifàsic (Berenblum, 1974; Foulds, 1975; i Burch, 1976). Actualment, el fonament genètic d'aquest procés comença a ser albirat en relació a la implicació dels oncogens en el mateix. Experiments recents de transformació cel.lular in vitro mitjançant la transfecció de fibroblastes normals per oncogens han demostrat la necessitat de, com a mínim, dos canvis genètics per a produir la transformació cel.lular completa. Un primer canvi, que pot ser provocat per carcinògens químics, determina la immortalització de les cèl.lules; a continuació, la transfecció dels fibroblastes immortalitzats per l'oncogen EJ c-Ha-ras determina la transformació propiament dita (Newbold, Overell, 1983). La transfecció conjunta per dos oncogens - myc i ras - produeix el mateix efecte (Land et al., 1983).

En el cas de l'hepatocarcinogènesi, malgrat la relativa abundància de dades sobre els canvis que precedeixen a l'aparició dels tumors, la relació entre les alteracions dels diversos marcadors de diferenciació observades als illots hiperplàstics i la progressió carcinogènica no és clara (Tatematsu et al., 1983). L'objectiu d'aquest treball és l'anàlisi de la progressió de clons cel.lulars deficientes en un o més dels enzims glucosa-6-fosfatasa, ATPasa canalicular i 5'nucleotidasa, durant la carcinogènesi hepàtica per dietilnitrosamina i fenobarbital. En treballs anteriors (Estadella et al. 1983 i 1984) hem pogut demostrar una correlació positiva entre el creixement dels illots hiperplàstics enzim-deficients i el grau de desviació de llur fenotip respecte del patró enzimàtic normal, després d'un tractament segons una pauta carcinogènica (A) que consta d'una etapa d'iniciació (dietilnitrosamina) seguida d'una etapa de promoció (fenobarbital). En el present treball aportem algunes dades relatives a la progressió dels clons enzim-deficients al cap d'una etapa de promoció més llarga (pauta B) o de tractaments més complexos, amb dues etapes d'iniciació i dues de promoció (pautes C i D).

Material i Mètodes

Es varen utilitzar rates mascle Sprague-Dawley d'aproximadament 200 g

de pes i es varen seguir quatre pautes d'inducció carcinogènica diferents.

A) Hepatectomia parcial i al cap de 24 h administració d'una dosi única de dietilnitrosamina (40 mg/kg intraperitoneal). Al cap de 8 setmanes: Administració continuada de fenobarbital durant 35 setmanes (0,05% a l'aigua de beguda). Sacrifici dels animals.

B) Hepatectomia parcial i al cap de 24 h administració d'una dosi única de dietilnitrosamina (40 mg/kg intraperitoneal). Al cap de 8 setmanes: Administració continuada de fenobarbital durant 57 setmanes (0,05% a l'aigua de beguda). Sacrifici dels animals.

C) Hepatectomia parcial i al cap de 24 h administració d'una dosi única de dietilnitrosamina (40 mg/kg intraperitoneal). Al cap de 8 setmanes: Administració continuada de fenobarbital durant 30 setmanes (0,05% a l'aigua de beguda). A continuació administració diària de dietilnitrosamina (10 mg/kg intraperitoneal) durant 4 setmanes. Després, administració de fenobarbital durant 12 setmanes (0,05% a l'aigua de beguda). Sacrifici dels animals.

D) Hepatectomia parcial i al cap de 24 h administració d'una dosi única de dietilnitrosamina (40 mg/kg intraperitoneal). Al cap de 8 setmanes administració continuada de fenobarbital durant 50 setmanes (0,05% a l'aigua de beguda). Després administració diària de dietilnitrosamina (10 mg/kg intraperitoneal) durant 4 setmanes. A continuació administració de fenobarbital (0,05% a l'aigua de beguda) durant 12 setmanes. Sacrifici dels animals.

El fetge dels animals va ser estudiat histològicament per a tres enzims: la Glucosa-6-fosfatasa (Wachstein, Meisel, 1956), l'adenosín trifosfatasa i la 5'nucleotidasa (Wachstein, Meisel, 1957). Les preparacions histològiques per a cadascun dels tres enzims varen ser fetes sobre grups de tres talls seriats de 5 μ realitzats a diferents nivells del fetge. De cada preparació histològica es va fer una ampliació fotogràfica i sobre aquestes ampliacions es varen dibuixar els illots amb deficiència enzimàtica. La superposició de les tres fotografies de cada nivell corresponents a les tres tincions histològiques ens va permetre classificar el fenotip de cada illot segons la combinació de deficiències enzimàtiques.

Per a cada fenotip mesurarem els següents paràmetres: Fracció volumètrica del fetge corresponent als illots enzim-deficients, nombre d'illots enzim-deficients per cm^2 de fetge, superfície de secció mitjana dels illots i distribució de freqüències dels diferents fenotips. Per a calcular aquests paràmetres la superfície de les seccions dels illots i del teixit estudiat varen ser mesurades amb un analitzador d'imatges KONTRON MOP 20 i es varen aplicar els mètodes morfomètrics usuals (Weibel et al, 1966).

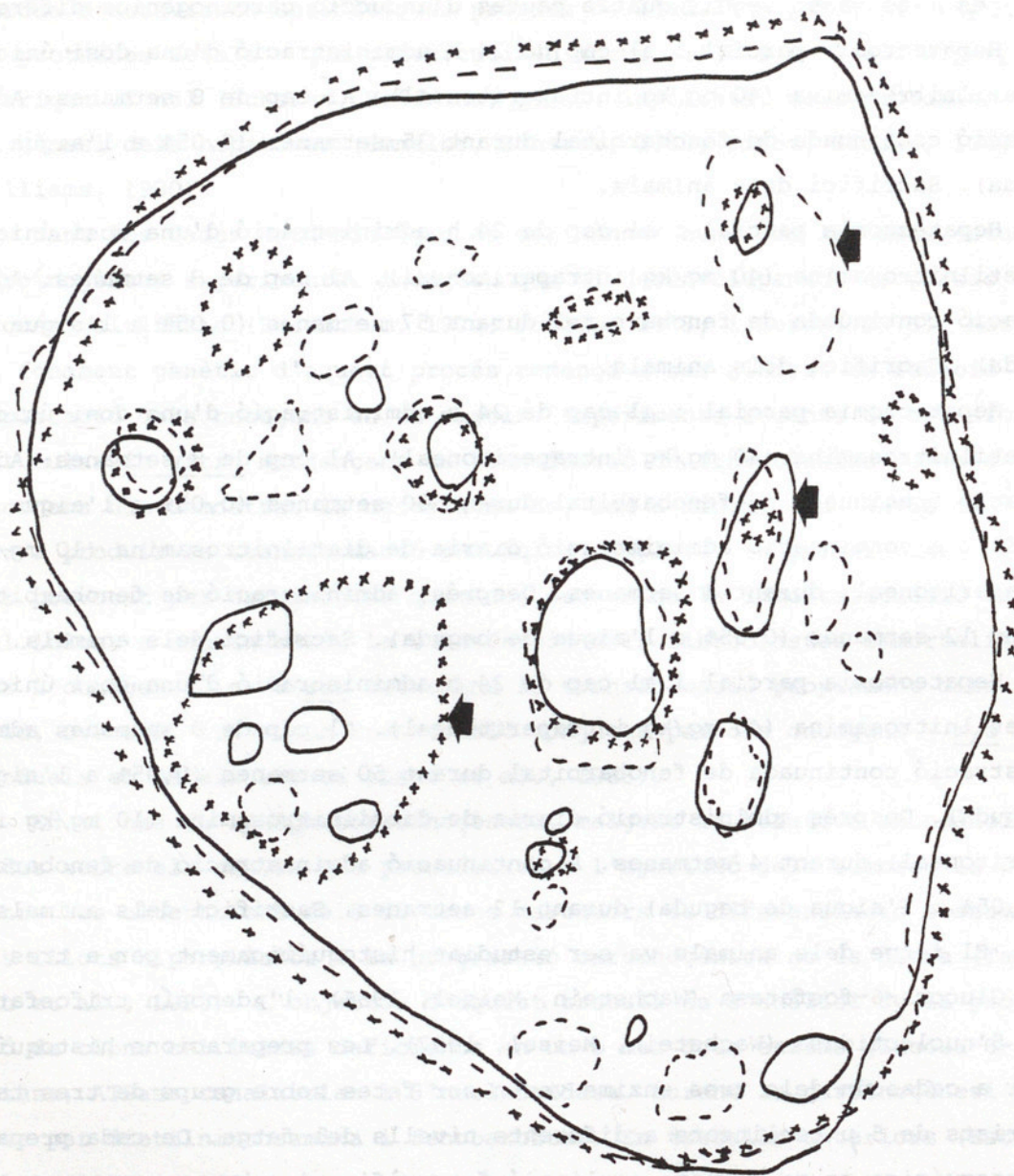


Figura 1. Superposició dels calcs obtinguts a partir de tres tincions histoquímiques per a un mateix nivell del fetge (talls seriat) d'una rata tractada segons la pauta carcinogènica C.

Línia contínua: tinció histoquímica per a la glucosa-6-fosfatasa. Línia discontinua: tinció per a la ATPasa canalicular. Línia de creus: tinció per a la 5'nucleotidasa.

Els illots que presenten subclons estan assenyalats amb una fletxa.

Resultats

Els resultats obtinguts a partir dels animals tractats segons la pauta carcinogènica A han sigut objecte de publicacions anteriors (Estadella et al 1983, 1984). Els resultats obtinguts a partir de les rates tractades segons les pautes B, C i D es presenten a les taules I, II i III respectivament.

Els illots enzim-deficients de les rates tractades segons la pauta d'inducció carcinogènica A presenten un fenotip de deficiència enzimàtica homogeni totalment (totes les cel.lules tenen el mateix fenotip); en canvi a les

Taula I : Dades morfològiques dels illots enzim-deficients que apareixen en el fetge de 4 rates tractades segons la pauta carcinogènica B. Superfície total de fetge estudiada = 1.046,40 mm². Nombre total d'illots trobats = 795. Paràmetres estudiats: Fracció volumètrica ocupada pels illots. Nombre d'illots enzim-deficients per cm² de fetge. Àrea mitjana de la superfície de secció dels illots. Percentatge dels diferents fenotips.

Fenotip	Fracció vol (%)	n ^o illots/cm ²	Àrea mitjana (mm ²)	% de fenotip
G A 5				
- + +	1,52 ± 0,75	20,77 ± 12,45	0,08 ± 0,03	26,42
+ - +	2,04 ± 0,67	25,24 ± 9,78	0,09 ± 0,05	32,08
+ + -	1,02 ± 0,34	10,30 ± 2,14	0,10 ± 0,03	13,21
- - +	1,07 ± 0,47	8,26 ± 4,86	0,14 ± 0,04	10,44
- + -	0,25 ± 0,05	1,26 ± 0,37	0,21 ± 0,09	1,64
+ - -	1,48 ± 0,97	7,19 ± 3,09	0,20 ± 0,11	9,69
- - -	1,09 ± 0,91	3,17 ± 0,94	0,37 ± 0,32	4,15
- + + sc	0,17 ± 0,13	0,49 ± 0,39	0,30 ± 0,32	0,63
+ - + sc	1,59 ± 2,81	0,71 ± 1,11	0,97 ± 1,12	1,13
+ + - sc	0,06 ± 0,11	0,10 ± 0,19	0,14 ± 0,29	0,13
- - + sc	0,00	0,00	0,00	0,00
- + - sc	0,00	0,00	0,00	0,00
+ - - sc	1,36 ± 2,73	0,31 ± 0,61	1,12 ± 2,23	0,50

G= Glucosa-6-fosfatasa, A = adenosín trifosfatasa i 5 = 5'nucleotidasa
 (+) activitat enzimàtica normal, (-) activitat enzimàtica deficient.
 sc: illots que presenten subclons amb fenotip diferent del original

Taula II : Dades morfomètriques dels illots enzim-deficients que apareixen al fetge de 5 rates tractades segons la pauta carcinogènica C. Superfície total de fetge estudiada = 2.909,54 mm². Nombre total d'illots trobats = 3.085 Paràmetres estudiats: Fracció volumètrica ocupada pels illots. Nombre d'illots enzim-deficients per cm² de fetge. Area mitjana de la superfície de secció dels illots. Percentatge dels diferents fenotips.

Fenotip G A 5	Fracció vol (%)	nº illots/cm ²	Area mitjana (mm ²)	% de fenotip
- + +	2,19 ± 0,87	26,52 ± 10,66	0,09 ± 0,03	24,70
+ - +	3,18 ± 1,02	30,82 ± 4,39	0,11 ± 0,04	28,98
+ + -	0,82 ± 0,32	10,78 ± 5,14	0,08 ± 0,03	9,95
- - +	1,53 ± 0,97	10,58 ± 6,11	0,15 ± 0,04	9,53
- + -	0,19 ± 0,12	1,94 ± 1,18	0,11 ± 0,08	1,69
+ - -	1,98 ± 0,93	11,92 ± 6,37	0,18 ± 0,07	11,54
- - -	1,31 ± 0,83	5,39 ± 2,79	0,26 ± 0,11	5,22
- + + sc	1,02 ± 0,56	1,76 ± 0,84	0,59 ± 0,21	1,69
+ - + sc	2,36 ± 1,58	3,88 ± 1,99	0,80 ± 0,78	3,40
+ + - sc	0,80 ± 0,30	1,65 ± 0,47	0,58 ± 0,46	1,56
- - + sc	0,46 ± 0,52	0,78 ± 0,55	0,49 ± 0,27	0,68
- + - sc	0,07 ± 0,11	0,06 ± 0,08	0,43 ± 0,74	0,06
+ - - sc	0,41 ± 0,26	1,23 ± 0,66	0,45 ± 0,21	1,00

G=glucosa-6-fosfatasa, A= adenosín trifosfatasa i 5 = 5'nucleotidasa
(+) activitat enzimàtica normal, (-) activitat enzimàtica deficient.
sc: illots que presenten subclons amb deficiències addicionals.

rates tractades segons les pautes C i D i menys freqüentment a les tractades segons la pauta B s'observen alguns illots inhomogenis que presenten subgrups cel.lulars amb deficiències enzimàtiques addicionals que interpretem con a subclons del clon primari (fig. 1); a les taules I, II i III els illots amb aquest fenotip complex es designen segons el fenotip del clon primari i, a continuació, l'abreviatura sc (amb subclons).

El nombre d'illots per cm² de secció que presente cada fenotip és generalment més gran als animals tractats segons la pauta B que en els tractats segons la A i en el cas de les pautes C i D més gran que en les A i B. Les proporcions o abundàncies relatives dels diferents fenotips varien poc entre

Taula III : Dades morfomètriques dels illots enzim-deficients que apareixen al fetge de 3 rates tractades segons la pauta carcinogènica "D". Superfície total de fetge estudiada = 1.462,83 mm². Nombre total d'illots trobats = 1.914. Paràmetres estudiats: Fracció volumètrica ocupada pels illots. Nombre d'illots enzim-deficients per cm² de fetge. Area mitjana de la superfície de secció dels illots. Percentatge dels diferents fenotips.

Fenotip G A T	Fracció vol. (%)	nº illots/cm ²	Area mitjana (mm ²)	% de fenotip
- + +	1,56 ± 0,69	21,74 ± 5,30	0,08 ± 0,04	14,79
+ - +	3,26 ± 1,53	26,26 ± 5,41	0,12 ± 0,04	18,44
+ + -	1,32 ± 0,39	18,02 ± 6,70	0,08 ± 0,03	11,23
- - +	1,90 ± 0,13	12,56 ± 3,40	0,16 ± 0,04	8,15
- + -	0,41 ± 0,22	2,30 ± 0,81	0,17 ± 0,03	1,78
+ - -	1,62 ± 0,86	10,50 ± 4,56	0,16 ± 0,08	7,05
- - -	2,61 ± 0,35	9,33 ± 2,55	0,30 ± 0,14	6,06
- + + sc	2,93 ± 0,71	3,37 ± 0,88	0,89 ± 0,26	2,35
+ - + sc	10,02 ± 5,50	9,22 ± 3,33	1,04 ± 0,18	8,46
+ + - sc	1,79 ± 1,45	3,10 ± 2,90	0,66 ± 0,38	2,19
- - + sc	2,75 ± 2,73	2,30 ± 2,36	0,81 ± 0,71	1,78
- + - sc	0,06 ± 0,09	0,15 ± 0,19	0,21 ± 0,23	0,10
+ - - sc	1,99 ± 2,50	2,15 ± 1,55	0,69 ± 0,79	1,93

G = glucosa-6-fosfatasa, A = adenosín trifosfatasa i 5 = 5'nucleotidasa
(+) activitat enzimàtica normal, (-) activitat enzimàtica deficient.
(sc) illots que presenten subclons amb deficiències addicionals.

les quatre pautes de tractament. L'ordre d'aquestes proporcions es manté bastant constant, així, per exemple, els illots deficients només en glucosa-6-fosfatasa o només en ATPasa canalicular són sempre els més abundants, i a la vegada els illots doble deficients en glucosa-6-fosfatasa i en 5'nucleotidasa són sempre els menys abundants en totes les situacions estudiades. En el cas de les pautes amb dues etapes d'iniciació i dues de promoció C i D les proporcions dels illots amb fenotips homogenis es troben disminuïdes degut a l'existència d'illots amb subclons.

Pel que fa a l'àrea de secció mitjana dels illots, és molt remarcable

que a totes les pautes carcinogèniques emprades es manté la relació ja observada en el cas de la pauta A, entre el tamany dels illots i el nombre d'alteracions enzimàtiques.

Els illots amb subclons presenten una àrea mitjana de secció més gran que la corresponent als illots del mateix fenotip sense subclons. Comparant les àrees mitjanes dels diferents fenotips corresponents a les pautes A (35 setmanes de promoció amb fenobarbital) i B (57 setmanes de promoció amb fenobarbital) es troba un increment positiu en tots els casos amb un valor mig del 70%. Si es comparen les pautes carcinogèniques C i D (doble iniciació i promoció) que difereixen només en el temps de la primera etapa de promoció amb fenobarbital (30 setmanes a la pauta C i 50 a la D) la situació és diferent en el cas dels illots homogenis respecte a la dels que presenten subclons. Mentre que en el primer cas l'increment és del 9%, en el segon cas és del 28%. Aquesta diferència és encara més acusada al comparar les pautes B (iniciació i promoció úniques) i D (iniciació i promoció dobles) a on no es troba un increment al comparar el tamany dels illots homogenis i, en canvi, en el cas dels illots amb subclons es troba un increment de D respecte a B del 130%.

A la taula IV es donen les abundàncies globals d'illots respecte a la superfície de secció hepàtica per a les quatre pautes carcinogèniques i també els valors corresponents d'illots secundaris o subclons respecte a la superfície total de secció d'illot de cada fenotip (illots homogenis més illots amb subclons). El nombre de subclons per superfície de secció d'illot es dona per defecte, doncs no s'ha tingut en compte per aquests càlcul, l'existència d'illots amb més d'un subclon que s'observa amb bastant freqüència.

A efectes de comparar la freqüència amb que apareixen alteracions addicionals al fenotip enzimàtic dels illots (subclons) amb la freqüència de producció d'alteracions enzimàtiques sobre el teixit normal (illots o clons) es donen també (taula IV) les diferències entre els valors corresponents a les pautes C i A (C-A) i a les pautes D i B (D-B). L'objecte d'aquestes restes es descomptar de les abundàncies totals els illots atribuïbles a la primera iniciació-promoció ja que se suposa que la major part dels subclons són imputables a la segona iniciació-promoció. Això està justificat per l'absència gairebé total de subclons a les pautes sense segona iniciació i promoció (A i B). La freqüència mitjana de subclons és en el cas de la pauta C 51,96 subclons/cm² d'illot, de l'ordre de la freqüència mitjana d'illots sobre el teixit normal (54,11 illots/cm² fetge) però la corresponent als subclons dels illots deficients en 5'nucleotidasa és clarament superior (91,20 subclons/cm² d'illot).

En el cas de la pauta D, la freqüència mitjana de subclons (59,15/cm²d'illot) és superior a la freqüència mitjana d'illots sobre el teixit normal (42,15illots/cm²) i algunes vegades molt superior. En relació a aquestes comparacions s'ha de tenir present que el càlcul és per defecte al no haver considerat l'existència d'illots amb més d'un subclon.

Taula IV: Freqüències d'illots enzim-deficients respecte al total del fetge i freqüències de subclons respecte al total de superfície corresponent a cada classe d'illot.

pauta	Nº total illots cm ² fetge	Nº subclons / cm ² illot					
		GA5 -++sc	GA5 +--sc	GA5 ++-sc	GA5 ---sc	GA5 --+-sc	GA5 +---sc
A	53,20	0	0	0	0	0	0
B	78,85	27,68	28,45	9,41	0	0	0
C	107,31	52,67	58,48	91,20	39,00	30,28	40,11
D	121,00	73,16	76,44	94,27	64,90	32,43	79,25
C - A	54,11	52,67	58,48	91,20	39,00	30,28	40,11
D - B	42,15	45,48	47,99	84,86	64,90	32,43	79,25

G:glucosa-6-fosfatasa, A:adenosin trifosfatasa i 5:5'nucleotidasa

Discussió

L'objectiu d'aquest treball és contribuir a l'aclariment de les relacions entre els canvis del fenotip enzimàtic cel.lular que s'observen durant la carcinogènesi hepàtica a certes subpoblacions clonals constituint focus o illots hiperplàtics i la progressió d'aquestes lesions pre-neoplàsiques cap al desenvolupament de tumors.

En estudis previs (Estadella et al. 1983,1984), basats en la pauta carcinogènica de Pitot et al. (1978) que consta d'una etapa d'iniciació amb dietilnitrosamina seguida d'una etapa de promoció amb fenobarbital (A), hem pogut demostrar una correlació positiva entre el creixement dels clons o illots hiperplàtics i el grau de desviació -respecte del fetge normal- de llur patró enzimàtic. En el present treball s'ha utilitzat una pauta carcinogènica semblant a l'esmentada però amb una etapa de promoció més llarga

(B) i dues altres pautes (C i D) molt semblants en la seva primera part a les pautes A i B respectivament, però amb una segona part consistent també en una etapa d'iniciació i una etapa de promoció. De la comparació dels resultats obtinguts amb aquests quatre tractaments es poden treure algunes conclusions relatives a la progressió dels clons cel.lulars enzim-deficients.

En les quatre situacions es manté el mateix ordre entre les proporcions de les diferents classes d'illots i també resulta invariant la relació entre creixement i desviació del patró enzimàtic abans esmentada.

La comparació de les àrees mitjanes de secció dels illots hiperplàsics corresponents a les pautes A i B -70% d'increment- és una mesura aproximada del creixement dels illots entre les setmanes 35 (A) i 57 (B) de l'etapa de promoció amb fenobarbital. L'increment observat no és igual per a totes les classes d'illots. La classe més desviada en el patró enzimàtic (triple deficiència) és la de creixement més ràpid durant les primeres 35 setmanes de promoció, però el seu increment relatiu entre les setmanes 35 i 57 és el més baix, mantenint sempre, no obstant, el tamany més gran. Això sembla indicar l'existència de mecanismes de limitació del creixement dels clons enzim-deficients en relació al tamany (limitació de l'aportació sanguínia, Conway et al. 1983), el nombre de cicles de divisió cel.lular acumulats (Hayflick, Moorhead, 1961; Macieira-Coelho, Azzarone, 1982) o a altres factors.

Un aspecte característic dels illots hiperplàsics que s'observen en el cas de les pautes C i D (doble iniciació i promoció) és la presència a l'interior de molts d'ells de grups cel.lulars compactes amb deficiències enzimàtiques addicionals que interpretem com a subclons del clon inicial. En el cas de la pauta A no s'en observen i en el de la B molt pocs: Això fa pensar que els subclons són principalment conseqüència de la segona iniciació amb dietilnitrosamina, que provoca canvis als hepatocits normals i a les cèl.lules, ja modificades, dels clons originats a partir de la primera iniciació.

La comparació entre el nombre d'illots per superfície de secció hepàtica i el nombre de subclons per superfície de secció d'illot ens permet descobrir que les alteracions del fenotip enzimàtic es produeixen amb més freqüència a les cèl.lules previament alterades que a les normals.

Els illots amb subclons són generalment més gran que els homogenis i el seu creixement, calculat per comparació de tamany entre les pautes C i D i les pautes B i D és també superior. De fet, això és el que es pot esperar de la relació entre creixement i patró enzimàtic abans esmentada, ja que els subclons detectats tenen una o dues deficiències enzimàtiques addicionals

respecte del clon original i, per tant, el seu creixement hauria de ser més ràpid.

L'estudi histològic detallat dels fetges per tal d'identificar possibles tumors en relació als illots enzim-deficients i la detecció de productes oncogènics mitjançant immunotècniques es preveuen com els passos necessaris per a continuar aquests estudis.

Bibliografia

- BERENBLUM J. (1974). Carcinogenesis as a biological problem. North-Holland, Amsterdam.
- BURCH P.R.J. (1976). The Biology of Cancer, a new approach. MTP Press, Lancaster.
- CONWAY J.G., POPP J.A., THURMAN R.G. (1983). Effect of size on portal circulation of hepatic nodules from carcinogen-treated rats. Cancer Res. 43, 3374-3379.
- CURTIN N.J., SNELL K. (1983). Enzymatic retrodifferentiation during hepatocarcinogenesis and liver regeneration in rats in vivo. Brit. J. Cancer 48, 495-505.
- EMMELOT P., SCHERER E. (1980). The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta 605, 247-304.
- ESTADELLA M^aD., PUJOL M^aJ., SERRATOSA J., RIUS E., DOMINGO J. (1983). Creixement i fenotip enzimàtic dels illots hiperplàtics induïts al fetge de rata per administració de dietilnitrosamina. Biologia del Desenvolupament 1 (Domingo et als. edd.) pp 176-180, Societat Catalana de Biologia, Barcelona.
- ESTADELLA M^aD., PUJOL M^aJ., DOMINGO J. (1984). Enzyme pattern and growth rate of liver preneoplastic clones during carcinogenesis by diethylnitrosamine. Oncology (in press).
- FOULDS L. (1975). Neoplastic Development. Academic Press, London.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 25, 585-621.
- LAND H., PARADA L.F., WEINBERG R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature 304, 596-602.
- MACIEIRA-COELHO A., AZZARONE B. (1982). Aging of human fibroblasts is a succession of subtle changes in the cell cycle and has a final short stage with abrupt events. Exp. Cell. Res. 141, 325-332.
- NEWBOLD R.F., OVERELL R.W. (1983). Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. Nature 304, 648-651.
- PITOT H.C., BARSNESS L., GOLDSWORTHY T., KITAGAWA T. (1978). Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. Nature 271, 456-458.
- PITOT H.C., SIRICA A.E. (1980). The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta 605, 191-215.
- SCHERER E., HOFFMANN M. (1971). Probable clonal genesis of cellular islands induced in rat liver by diethylnitrosamine. Eur. J. Cancer 7, 369-371.

TATEMATSU M., KAKU T., MEDLINE A., ERIKSSON L., ROOMI W., SHARMA R.N., MURRAY R.K., FARBER E. (1983). Markers of liver neoplasia - real or fictional ?. Application of Biological Markers to Carcinogen Testing (Millman, Snell eds.) pp 25-42. Plenum Press, New York.

WACHSTEIN M., MEISEL E. (1956). On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. J. Histochem. Cytochem. 4, 592.

WACHSTEIN M., MEISEL E. (1957). Histochemistry of hepatic phosphatases at the physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Am. J. Clin. Path. 27, 13-23.

WEIBEL E.R., KISTLER G.S., SCHERLE W.F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. J. Cell Biol. 30, 23-48.

WILLIAMS G.M. (1980). The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. Biochim. Biophys. Acta 605, 167-189.