

GENOTOXICIDAD DE DIFERENTES CANCERIGENOS A CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS DE RATAS NO TRATADAS O PRETRATADAS CON AROCLOR 1254

TOMÁS MENDOZA FIGUEROA,^a RUBÉN LOPEZ REVILLA^b Y SAÚL VILLA TREVIÑO^b

Departamentos de ^aFarmacología y Toxicología, y ^bBiología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, México, D. F., 07000, México.

RESUMEN

Se utilizaron cultivos primarios de hepatocitos de ratas no tratadas o tratadas con Aroclor 1254 para cuantificar la genotoxicidad de diferentes clases de cancerígenos químicos mediante sedimentación del DNA en gradientes de sacarosa alcalina. Se definieron dos parámetros de daño al DNA: la concentración efectiva media, esto es, aquella que disminuye el peso molecular del DNA a la mitad del peso testigo y la potencia de producción de rupturas en el DNA, esto es, el número de rompimientos por molécula de DNA provocado por exposición de 2 h a una concentración 1 mM del compuesto químico.

Se demostró la genotoxicidad del agente alquilante de acción directa *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (6.8 a 340 μ M) y de los precancerígenos benzo [a] pireno (0.05 a 0.33 mM), dimetilnitrosamina (0.45 a 16 mM) y nitrosopiperidina (0.61 a 12 mM) en CPH* de ratas no tratadas, mientras que la genotoxicidad del 2-aminofluoreno (0.28 a 2.76 mM) fue determinada solamente en CPH de ratas pretratadas con Aroclor 1254.

El pretratamiento de las ratas con Aroclor 1254 disminuyó significativamente el peso molecular del DNA, la CE_{50} * del BP* y de la DMN*, mientras que incrementó la PPR* de la MNNG*, del BP y de la DMN. Estos resultados mostraron que el pretratamiento con Aroclor 1254 incrementó la genotoxicidad tanto de los cancerígenos directos como la de los precancerígenos y sugirieron que el Aroclor 1254 podría elevar la genotoxicidad de los cancerígenos químicos por aumentar su activación metabólica, por producir efectos genotóxicos directos, o por ambas razones.

ABSTRACT

Different primary cultures of rat Hepatocytes, treated and untreated with aroclor 1254 were used quantify the genotoxicity of different classes of chemical carcino-

* CPH, cultivos primarios de hepatocitos; CE_{50} , concentración efectiva media; BP, benzo [a] pireno; DMN, dimetilnitrosamina; PPR, potencia de producción de ruptura en el DNA; MNNG, *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina.

gens by way DNA sedimentation in alkaline sacarose gradients. Two parameters of DNA damage were defined: the effective median concentration, that is, that which diminishes the molecular weight of DNA to half the control weight; and, potency in the production of DNA ruptures, the breakage number per DNA molecule provoked by exposure to 2 hrs at a concentration of 1 mM of the compound chemical.

Genotoxicity was demonstrated for the direct action agent N-Methy-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (6.8 to 340 μ M); for the precarcinogenic benzo [a] pyrene (0.05 to 0.33 mM), dimethy nitrosamine (0.45 to 16 mM); and nitrosopiperidine (0.61 to 12 mM) in the PHC * of untreated rats, while the genotoxicity of 2-aminofluorine (0.28 to 2.76 mM) was determined only in the PHC of rats pretreated with aroclor 1254.

The pretreatment of rats with aroclor 1254 significantly diminished the molecular weight of DNA, EC₅₀*, of BP*, and DMN*, while the PRP of MNNG, of the BP, and of the DMN. These results showed that pretreatment with aroclor 1254 incremented the genotoxicity of precarcinogens, as well as that of direct carcinogens, suggesting that aroclor 1254 might elevate the genotoxicity of carcinogenic chemicals, by augmenting their metabolism, by producing direct genotoxic effects, or for both reasons.

INTRODUCCION

Los bifenilos policlorinados son contaminantes ambientales ampliamente distribuidos (Peakall 1972); en efecto, se han encontrado en los tejidos de diferentes especies animales, incluyendo al hombre (Peakall 1972, Kodana y Ota 1980, Landrigan 1980). Los BPCs* son tóxicos (Kimbrough *et al.* 1978, Kuratsune 1980) y carcinogénicos (Ito *et al.* 1978, Kimbrough 1979). El aroclor 1254, que es una mezcla de BPCs que contiene 54% de cloro, es un cancerígeno potencial para la especie humana (Althouse *et al.* 1980).

Los BPCs son transformados por el sistema enzimático de monooxigenasas u oxidasas de función mixta, dependiente del citocromo P-450, a epóxidos reactivos capaces de unirse covalentemente con las proteínas de las membranas microsómicas (Shimada y Sato 1980, Shimada *et al.* 1981), con el RNA y el DNA (Morales y Matthews 1979). Los BPCs son inductores del sistema de OFM* que metaboliza los precancerígenos; el AR* aumenta los niveles de los citocromos P-448 y P-450 y las actividades de las enzimas etilmorfina N-desmetilasa e hidroxilasa de los hidrocarburos aromáticos (Alvarez y Kappas 1977). El Ar ha sido usado como inductor en algunas pruebas de mutagenicidad/carcinogenicidad *in vitro* de precancerígenos (Hollstein *et al.* 1979).

Previamente se ha descrito que el agente alquilante de acción directa MNNG y el precancerígeno DMN producen rupturas en el DNA de CPH (Mendoza-Figueroa *et al.* 1979). También se demostró que el pretratamiento de las ratas con fenobarbital, que es un inductor de las enzimas microsómicas hepáticas, incrementa la genotoxicidad de la DNA en los CPH (Mendoza-Figueroa *et al.* 1983). En este trabajo se mostró que diferentes clases de cancerígenos químicos causan rupturas en el DNA de CPH y que su genotoxicidad aumenta por pretratamiento *in vivo* con Aroclor 1254.

* BPCs, bifenilos policlorinados; OFM, oxidasas de función mixta; Ar, Aroclor 1254.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS

Los reactivos fueron obtenidos de los siguientes proveedores: BP y dimetil sulfóxido de Sigma Chemical Co.; MNNG de ICN K&K Laboratories, Inc.; DMN de Eastman Organic Chemicals; NP * fue sintetizada y donada por el Dr. Fernando Walls, Instituto de Química, UNAM, México; Ar de Analabs, Inc.; [^3H]timidina de Amersham/Searle Corp.; la insulina de los Laboratorios Lilly, México, D. F.; el suero de ternera de Biocel, México, D. F.; los demás reactivos de grado analítico se consiguieron de J. T. Baker, México, D. F.

ANIMALES

Ratas Wistar (machos de 200 g) fueron sometidos a hepatectomía parcial (Higgins y Anderson 1931) y mantenidas en ayunas durante 20-24 h antes del aislamiento de los hepatocitos. Las ratas tratadas con Ar recibieron una dosis intraperitoneal de 500 mg/kg (Costa *et al.* 1976), 4 días antes de la hepatectomía parcial.

CONDICIONES DE CULTIVO

El aislamiento de las células hepáticas se realizó conforme se ha descrito previamente (Mendoza-Figueroa *et al.* 1979). Un millón de células fueron inoculadas por caja de cultivo de 35 mm (Falcon Plastic Co.) en 1.5 ml de medio esencial mínimo de Eagle enriquecido con 7% de suero de ternera, insulina ($1\ \mu\text{M}$) y [^3H]timidina ($5\ \mu\text{Ci/ml}$). Las células fueron mantenidas a 37°C en incubadora con una atmósfera de 5% de CO_2 . Después de 2 h las células no adheridas se desecharon y las cajas de cultivo fueron lavadas con 1.5 ml de MEM * y posteriormente incubadas durante 2 h con MEM enriquecido, pero sin el compuesto radiactivo.

TRATAMIENTO CON LOS CANCERÍGENOS

La MNNG, DMN y NP fueron disueltas en MEM (pH 7.2) inmediatamente antes de ser añadidas a los cultivos. El BP y 2-AF * se disolvieron en DMSO * y después en MEM; la concentración final de DMSO en los cultivos testigos y tratados fue de 1%. Después de 2 h de exposición, los cultivos fueron lavados 2 veces con una solución salina balanceada, enseguida se añadieron 0.2 ml de la misma solución a cada caja y las células fueron despegadas con una espátula de hule.

ULTRACENTRIFUGACIÓN Y CÁLCULO DEL PESO MOLECULAR DEL DNA

Los procedimientos para la sedimentación en gradientes de sacarosa y para el cálculo del peso molecular del DNA fueron ya previamente descritos (Mendoza-Figueroa *et al.* 1979). El peso molecular relativo del DNA (N) fue determinado como la relación del PM_p * del DNA de los cultivos tratados con respecto a los no

* NP, nitrosopiperidina.

* MEM, medio esencial mínimo de Eagle; 2-AF, 2-aminofluoreno; DMSO, dimetilsulfóxido.

* PM_p , peso molecular promedio; PM_r , peso molecular relativo.

tratados. El número de rupturas por molécula de DNA (N) fue calculado con la fórmula $N = (1 - PM_r)/PM_r$ (Mendoza-Figueroa *et al.* 1983).

CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE DAÑO AL DNA

La dosis efectiva media de cada cancerígeno, esto es, la que disminuye el PM_p a la mitad y por tanto que provoca una ruptura promedio por molécula de DNA, fue establecida de las ecuaciones correspondientes obtenidas por regresión lineal de los datos presentados en las tablas I y II ($\log PM_r$ vs $\log$ concentración).

El número de rompimientos por molécula de DNA fue determinado para cada concentración (Tablas I y II) y las ecuaciones correspondientes fueron entonces estimadas por regresión lineal (número de rupturas por molécula de DNA vs concentración). La PPR de los cancerígenos fue definida como el número de rupturas por molécula de DNA causadas después de 2 h de exposición a una concentración 1 mM. Este parámetro fue obtenido directamente de la pendiente de las ecuaciones correspondientes.

RESULTADOS

PM_p DEL DNA DE LOS HEPATOCITOS

El PM_p del DNA de los CPH de las ratas no tratadas fue de $2.83 \times 10^8 \pm 0.55 \times 10^8$ (media $\pm$ DE*; $n = 8$), mientras que el PM_p de los CPH de las ratas pretratadas con Ar fue de $1.97 \times 10^8 \pm 0.39 \times 10^8$ (media $\pm$ DE; $n = 6$). El MP_p del DNA de las ratas tratadas y no tratadas fue significativamente diferente ($p < 0.005$). El PM_r del DNA de los cultivos testigo obtenidos de las ratas no tratadas y pretratadas con Ar fue 1.00 ± 0.10 y 1.00 ± 0.04 (media $\pm$ DE), respectivamente.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS CANCERÍGENOS SOBRE EL DNA

La exposición por 2 h de los CPH de ratas no tratadas a concentraciones crecientes de MNNG, BP, DMN y NP disminuyó el PM_r del DNA proporcionalmente a la dosis (Tabla I). A las concentraciones probadas solamente el 2-AF no tuvo efecto significativo sobre el PM del DNA. En los CPH de ratas pretratadas con Ar la exposición por 2 h a MNNG, BP y DMN produjo mayor fragmentación del DNA que en los cultivos de ratas no tratadas (Tabla II). También la exposición a 2-AF (0.28 mM a 2.76 mM) provocó disminución significativa en el tamaño del DNA (Tabla II).

PARÁMETROS DE LA GENOTOXICIDAD DE DIFERENTES CANCERÍGENOS

En los cultivos de ratas no tratadas, la genotoxicidad de la MNNG expresada como CE_{50} y PPR fue cerca de 10 y 1000 veces mayor que la del BP y de la DMN, respectivamente (Tabla III), mientras en los cultivos de ratas pretratadas con Ar estas proporciones disminuyeron para la CE_{50} y aumentaron para la PPR (Tabla

* DE, desviación estándar.

TABLA I. GENOTOXICIDAD DE DIFERENTES CANCERÍGENOS QUÍMICOS A CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS DE RATAS * NO TRATADAS

Cancerígeno	Concentración (mM)	Peso Molecular relativo del DNA (PMr)	No. de rupturas/molécula de DNA ‡
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	0.007	0.63	0.59
	0.068	0.21	3.76
	0.136	0.11	8.09
	0.340	0.05	19.00
Benzo [a] pireno	0.050	0.74	0.35
	0.099	0.47	1.13
	0.248	0.40	1.50
	0.330	0.31	2.23
Dimetilnitrosamina	0.45	0.70	0.43
	4.46	0.67	0.49
	8.91	0.53	0.89
	16.20	0.44	1.27
N-Nitrosopiperidina	0.61	0.78	0.28
	4.05	0.73	0.37
	12.20	0.47	1.11
2-Aminofluoreno	0.069	0.84	N.D.§
	0.138	1.12	
	0.276	1.10	
	0.550	1.05	

* Los hepatocitos fueron aislados, incubados por 2 horas con [³H]timidina y después por 2 h en medio fresco antes de su tratamiento con cancerígenos. Después del tratamiento, los hepatocitos fueron lisados por 1 h sobre gradientes de sacarosa alcalina (5-20%) y centrifugados durante 30 minutos a 300,000 g. El peso molecular del DNA fue calculado y expresado como una fracción del peso molecular del cultivo testigo no tratado con cancerígenos.

‡ Número de rupturas/molécula de DNA = (1-PMr)/PMr.

§ No detectable a las concentraciones probadas.

III). La CE₅₀ de la MNNG no cambió por el tratamiento *in vivo* con Ar, mientras que la PPR aumentó más de 5 veces; las CE₅₀ del BP y de la DMN disminuyeron más de 5 veces y sus PPR aumentaron de 2 a 3 veces (Tabla III).

DISCUSION

En este trabajo se ha utilizado un sistema de prueba diseñado previamente con el objeto de averiguar la genotoxicidad de la DMN (Mendoza-Figueroa *et al.* 1979) para descubrir los efectos genotóxicos de otras clases de precancerígenos químicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (BP), aminas aromáticas (2-AF) y nitrosaminas cíclicas (NP).

Puesto que los BPCs son contaminantes ambientales universales, capaces de interaccionar con los ácidos nucleicos (Morales y Matthews, 1977) y de inducir poderosamente la actividad de las enzimas microsómicas del hígado (Alvarez y Kappas 1977), se investigó si el Aroclor 1254, una mezcla comercial de BPCs, modificaba la genotoxicidad de otros cancerígenos.

Se midió la genotoxicidad de los cancerígenos por medio de la disminución en el tamaño del DNA. Si bien es posible detectar rupturas en el DNA después de la muerte celular (Williams y Little 1974), con 2 h de exposición a un agente hepatotóxico no carcinogénico como la cicloheximida (0.1 a 10 mM) no se causó, en las condiciones empleadas, disminución en el peso molecular del DNA (Mendoza-Figueroa *et al.* 1979). Aunque la viabilidad de las células no fue determinada después de la exposición a los cancerígenos, los CPH no mostraban alteraciones morfológicas que sugirieran la muerte celular.

Por lo tanto, se considera que las rupturas producidas al DNA por estos compuestos no se deben a la muerte celular, sino que son el resultado directo de su genotoxicidad.

TABLA II. GENOTOXICIDAD DE DIFERENTES CANCERIGENOS QUIMICOS A CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS DE RATAS * PRETRATADAS CON AROCLOR 1254

<i>Cancerígeno</i>	<i>Concentración (mM)</i>	<i>Peso Molecular relativo del DNA (PMr)</i>	<i>No. de rup- turas/molécu- la de DNA ‡</i>
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	0.007	0.61	0.63
	0.068	0.11	8.17
	0.136	0.03	33.50
	0.340	0.01	99.00
Benzo [a] pireno	0.025	0.41	1.44
	0.050	0.39	1.58
	0.099	0.35	1.90
	0.198	0.18	4.62
Dimetilnitrosamina	0.45	0.78	0.28
	4.46	0.43	1.33
	8.91	0.40	1.48
	16.20	0.31	2.26
2-Aminofluoreno	0.03	0.98	N.D.§
	0.28	1.02	N.D.
	1.38	0.70	0.43
	2.76	0.67	0.50

* Los hepatocitos fueron aislados 5 días después de que las ratas fueron tratadas con Aroclor 1254 (500 mg/kg). Los cultivos fueron incubados 2 h con [³H]timidina y después por 2 h en medio fresco antes de su tratamiento con cancerígenos. Después del tratamiento, los hepatocitos fueron lisados por 1 h sobre gradientes de sacarosa (5-20%) y centrifugados durante 30 minutos a 300,000 g. El peso molecular de DNA fue calculado y expresado como una fracción del peso molecular del cultivo testigo no tratado con cancerígenos.

‡ Número de rupturas/molécula de DNA = (1-PMr)/PMr.

§ No detectado.

TABLA III. PARAMETROS DE DAÑO PRODUCIDO AL DNA DE HEPATOCITOS POR DIFERENTES CANCERIGENOS

Cancerígeno	Ratas no tratadas		Ratas pretratadas con Aroclor 1254	
	CE ₅₀ *	PPR‡	CE ₅₀	PPR
MNNG	0.01 (0.99)	55.47 (1.00)	0.01 (0.99)	307.06 (0.99)
BP	0.11 (0.97)	5.47 (0.95)	0.02 (0.88)	18.81 (0.96)
DMN	13.87 (0.84)	0.06 (0.98)	2.70 (0.99)	0.12 (0.95)
2-AF	N.D.§	N.D.	11.00 (0.98)	0.20 (0.90)
NP	16.50 (0.86)	0.07 (0.98)	—	—

* Concentración efectiva media (m moles/litro). En paréntesis, el coeficiente de correlación de la ecuación obtenida por regresión lineal.

‡ Potencia de producción de rupturas al DNA (Número de rupturas/molécula de DNA/mol/litro).

§ No detectable a las concentraciones probadas.

Los efectos genotóxicos del BP y DMN aumentaron en los CPH de ratas pretratadas con Ar (Tabla II); también el 2-AF causó disminución significativa en el tamaño del DNA. Puesto que los BPCs inducen la desmetilación oxidativa de la DMN (Jannetti y Anderson 1981) y la hidroxilación del BP (Alvares y Kappas 1977), la mayor genotoxicidad pudo deberse a una mayor activación metabólica en los CPH de las ratas pretratadas con Ar, como ya se mostró anteriormente para la DMN en CPH obtenidos de ratas pretratadas con fenobarbital (Mendoza-Figueroa *et al.* 1983).

Para determinar si la mayor genotoxicidad de los precancerígenos pudo atribuirse a efectos del Aroclor 1254 diferentes de la activación enzimática, se probó la genotoxicidad del agente alquilante de acción directa MNNG en cultivos de ratas no tratadas o tratadas con Ar. La CE₅₀ de la MNNG fue la misma en los CPH tanto de ratas no tratadas como pretratadas con Ar, mientras que la PPR aumentó más de 5 veces (Tabla III). Estos resultados sugieren que efectos del Ar diferentes a la inducción de enzimas microsómicas están posiblemente involucrados en el incremento de genotoxicidad de los precancerígenos. El hecho de que el PM_p de los CPH de ratas pretratadas con Ar sea significativamente menor, sugiere que el pretratamiento *in vivo* con el Ar produce daño al DNA. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con publicaciones anteriores que muestran que los BPCs y en particular el Ar causan rupturas al DNA (Stadnicki *et al.* 1979, Sina *et al.* 1983). Por lo tanto, no se puede descartar que la aparente elevación en la genotoxicidad de los cancerígenos se debe, al menos parcialmente, a los efectos genotóxicos directos del Ar.

Además del parámetro CE₅₀ previamente descrito (Mendoza-Figueroa *et al.* 1979), en esta investigación se introdujo un nuevo parámetro de daño al DNA, el PPR (Tabla III). El efecto diferencial del Ar sobre ambos parámetros (Tabla III) sugiere que ellos probablemente tienen diferente significado biológico. La CE₅₀ parece depender principalmente de la activación metabólica, mientras que la PPR aparentemente está más afectada por daño adicional al DNA (Tabla III).

En resumen, los resultados muestran que la genotoxicidad de diferentes tipos de cancerígenos químicos puede ser detectada en CPH de ratas hepatectomizadas

mediante sedimentación del DNA en gradientes de sacarosa alcalina. También se muestra que el pretratamiento de las ratas con Ar aumenta la genotoxicidad tanto de cancerígenos directos como de precancerígenos. Los probables mecanismos involucrados en este sinergismo pueden ser el incremento en la activación metabólica, la genotoxicidad directa del Ar o ambos.

REFERENCIAS

- Althouse R., Huff J., Tomatis L. y Wlibourn J. (1980). An evaluation of chemical and industrial processes associated with cancer in humans based on human and animal data. *Cancer Res.* 40, 1-12.
- Alvares A. P. y Kappas A. (1977). The inducing properties of polychlorinated biphenyls on hepatic monooxygenases. *Clin. Pharm. Ther.* 22, 809-816.
- Costa M., Costa E. R., Manen C. A., Sipes I. G. y Russell D. H. (1976). Adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase and ornithine decarboxylase involvement in the induction of cytochrome P-450 and hepatic hypertrophy. *Mol. Pharmacol.* 12, 871-878.
- Higgins G. M. y Anderson R. M. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12, 186-202.
- Hollstein M., McCann J., Angelosanto F. A. y Nichols W. W. (1979). Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* 65, 133-226.
- Ito N., Nagasaki H., Arai M., Makiura S., Sugihara S. y Hirao K. (1973). Histopathologic studies on liver tumorigenesis induced in mice by technical polychlorinated biphenyls and its promoting effect on liver tumors induced by benzene hexachloride. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1637-1646.
- Jannetti R. A. y Anderson L. M. (1981). Dimethylnitrosamine dimethylase activity in fetal, suckling and maternal mouse liver and its transplacental and transmammary induction by polychlorinated biphenyls. *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 461-466.
- Kimbrough R. D. (1979). The carcinogenic and other chronic effects of persistent halogenated compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 415-418.
- Kimbrough R., Buckley J., Fishbein L., Flamm G., Kasza L., Marcus W., Shibko S. y Teske R. (1978). Animal Toxicology. *Environm. Health Perspect.* 24, 173-184.
- Kodama H. y Ota H. (1980). Transfer of polychlorinated biphenyls to infants from their mothers. *Arch. Environm. Health* 35, 95-100.
- Kuratsune M. (1980). Yusho. *En Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products.* (R. D. Kimbrough, Ed.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp. 287-302.
- Landrigan P. J. (1980). General population exposure to environmental concentrations of halogenated biphenyls. *En Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products.* (R. D. Kimbrough, Ed.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp. 267-286.
- Mendoza-Figueroa T., López-Revilla R. y Villa-Treviño S. (1979). Dose-dependent DNA ruptures induced by the procarcinogen dimethylnitrosamine on primary rat liver cultures. *Cancer Res.* 39, 3254-3257.
- Mendoza-Figueroa T., López-Revilla R. y Villa-Treviño S. (1983). DNA breaks induced by micromolar concentrations of dimethylnitrosamine in liver primary cell cultures from untreated and phenobarbital treated rats. *Toxicology* 27, 55-69.
- Morales N. M. y Matthews H. B. (1979). In vivo binding of 2,3,6,2',3',6'-hexachlorobiphenyl to mouse liver macromolecules. *Chem. Biol. Interact.* 27, 99-110.
- Peakall D. B. (1972). Polychlorinated biphenyls: occurrence and biological effects. *Residue Rev.* 44, 1-21.
- Shimada T. y Sato R. (1980). Covalent binding of polychlorinated biphenyls to rat liver microsomes in vitro: nature of reactive metabolites and target macromolecules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 490-500.
- Shimada T., Imai Y. y Sato (1981). Covalent binding of polychlorinated biphenyls to

proteins by reconstituted monooxygenase system containing cytochrome P-450. *Chem. Biol. Interact.* 38, 29-44.

Sina J. F., Bean C. L., Dysart G. R., Taylor V. I. y Bradley M. O. (1983). Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as predictor of carcinogenic/mutagenic potential. *Mutat. Res.* 113, 357-391.

Stadnicki S. S., Lin R. S. D. y Allen J. R. (1979). DNA single strand breaks caused by 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 24, 313-327.

Williams J. R. y Little J. B. (1974). Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* 252, 754-755.