

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



REBANADAS DE TEJIDOS: UN MODELO
ALTERNATIVO EN INVESTIGACION BIOMEDICA

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO PROFESIONAL DE
BIOLOGO

PRESENTA

EFREN JARAMILLO REYNA

CIUDAD UNIVERSITARIA

ABRIL DEL 2006

2006

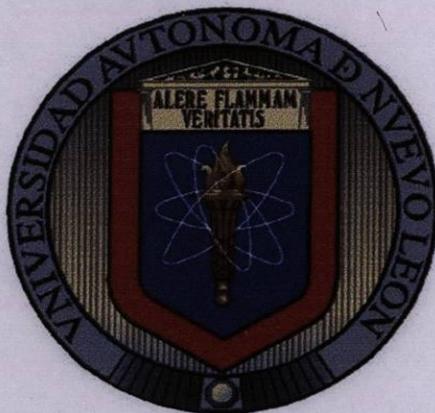
TL
QP88
.J36
2006
c.1

EFFREN JARAMILLO REYNIA



1080091476

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



**REBANADAS DE TEJIDOS: UN MODELO
ALTERNATIVO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

TESIS

QUE EN OPCION AL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

PRESENTA

EFRÉN JARAMILLO REYNA

CIUDAD UNIVERSITARIA

ABRIL DEL 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA

M.C. María Yafnide Morales Rubio
(Directora)

Dra. María del Pilar
(Directora)

Dra. Licet Villarreal Treviño
(Secretaría)

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
(Vocal)

M.C. Gerardo Lozano Garza
(Co-Director Externo)



**REBANADAS DE TEJIDOS: UN MODELO
ALTERNATIVO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

TESIS

QUE EN OPCION AL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

PRESENTA

EFRÉN JARAMILLO REYNA

CIUDAD UNIVERSITARIA

ABRIL DEL 2006

angel/F
23

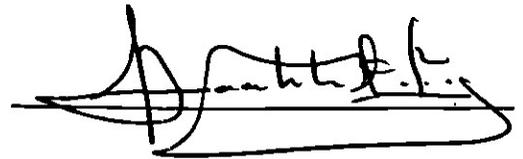
23

Comisión de Tesis

M.C. María Eufemia Morales Rubio
(Directora)

Handwritten signature of María Eufemia Morales Rubio in black ink, written over a horizontal line.

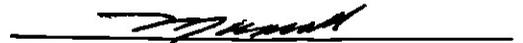
Dra. María del Pilar Carranza Rosales
(Directora Externa)

Handwritten signature of María del Pilar Carranza Rosales in black ink, written over a horizontal line.

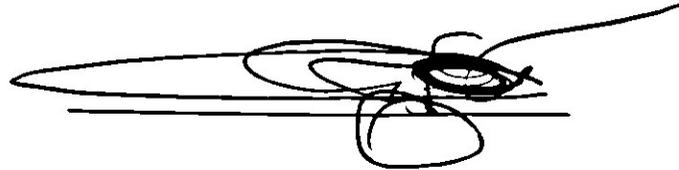
Dra. Licet Villareal Treviño
(Secretaria)

Handwritten signature of Licet Villareal Treviño in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
(Vocal)

Handwritten signature of Mario Rodolfo Morales Vallarta in black ink, written over a horizontal line.

M.C. Gerardo Lozano Garza
(Co-Director Externo)

Handwritten signature of Gerardo Lozano Garza in black ink, written over a horizontal line.

El presente trabajo se realizó en la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (Instituto Mexicano del Seguro Social) y en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

***El tiempo nos ha hecho comprender que podemos ser lo que nos
propongamos ser, gracias a nuestra gran plasticidad de aprender
y razonar.***

Efrén Jaramillo Reyna

AGRADECIMIENTOS

Dra. Pilar Carranza Rosales. Mi directora de tesis y claro, amiga, quien creyó en mí para realizar el presente proyecto, además de sus apreciables enseñanzas. Tú siempre supiste que la responsabilidad, esfuerzo y dedicación son parte de la formación profesional, quizás por esto eres muy buena investigadora.

M.C. María Eufemia Morales Rubio. Por su participación como directora interna de tesis, su amistad y apoyo.

Dra. Licet Villareal Treviño, Dr. Mario Morales Vallarta y M.C. Gerardo Lozano Garza. Por formar parte del comité de tesis, por sus valiosas sugerencias e interés para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Dr. Jorge Castro Garza y Dra. Delia Elva Cruz Vega. Por su participación especial en la revisión de la tesis y apoyo constante en la ejecución de este trabajo.

M.C. José Claudio Morenos Rocha, Dra. Diana Reséndez Pérez, Dra. Pilar Carranza Rosales y M.C. Jorge Verduzco Martínez. Por sus importantes aportaciones para conmigo. He aprendido a trabajar con alegría y seguridad, analizar para concluir, ser contundente pero también tolerante, respectivamente.

Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado. Por la Co-Dirección del presente trabajo y sus acertados comentarios durante la interpretación histopatológica del material que se revisó.

M.C. María Porfiria Barrón González. Por su colaboración en la impresión del presente trabajo y por su gran amistad.

A mis amigos y compañeros **Florita Ramos, Carmen Molina, Charly Salinas, Víctor H. Moreno, Guadalupe Santiago y Ezequiel Viveros** de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

Carolina Senés, Daniela Herrera, Mariana Moreno, Nelson R. Puente, Jesús Arriaga y todos los demás amigos (as) que aprecio y quiero.

Al **Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social**, por las facilidades brindadas durante la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

A mi madre María Reyna y padre Benito Jaramillo

A mis hermanas Elia, Zulema, Leticia y Mayra.

ÍNDICE**Página**

AGRADECIMIENTOS -----	ε
DEDICATORIA -----	φ
ÍNDICE -----	ρ
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS -----	e
LISTA DE FIGURAS -----	v
INTRODUCCIÓN -----	1
ANTECEDENTES -----	3
HIPÓTESIS -----	8
OBJETIVO -----	9
JUSTIFICACIÓN -----	10
MATERIALES Y MÉTODOS -----	11
RESULTADOS -----	19
DISCUSIÓN -----	28
CONCLUSIÓN -----	31
LITERATURA CITADA -----	32

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

	Página
Micras -----	μ
Amortiguador salino de Fosfatos -----	PBS
Bromuro de 3-[4,3-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio -----	MTT
Dulbecco's Modified Eagle's Medium -----	DMEM
Grados centígrados -----	°C
Gramos -----	g
Horas -----	h
Litros -----	L
Microgramos -----	μg
Micromolar -----	μM
Mililitro -----	mL
Milímetros -----	mm
Minutos -----	min
Porcentaje -----	%
Potencial Hidrógeno -----	pH
Revoluciones por minuto -----	rpm

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Obtención de órganos -----	12
Figura 2. Obtención de pulmones -----	13
Figura 3. Preparación de rebanadas de tejidos -----	14
Figura 4. Medición del grosor de las rebanadas -----	14
Figura 5. Cultivo de Rebanadas -----	15
Tabla 1. Promedio general del peso y grosor de las rebanadas de riñón, hígado y pulmón-----	19
Figura 6. Corte histológico de parénquima hepático normal a tiempo cero -----	20
Figura 7. Microfotografías de tejido hepático cultivado a las 12 h- -----	21
Figura 8. Microfotografías de tejido hepático cultivado a las 48 h -----	21
Figura 9. Microfotografías de tejido renal a tiempo cero -----	22
Figura 10. Microfotografías de las rebanadas de tejido renal cultivado a las 12 , 24, 36 y 48 h-----	23
Figura 11. Microfotografías de tejido pulmonar cultivadas a las 0, 24 y 48 h -----	24
Figura 12. Viabilidad de rebanadas de hígado y riñón en función de la reducción de MTT -----	25
Figura 13. Viabilidad de rebanadas de pulmón en función de la reducción de MTT -----	26
Figura 14. Viabilidad de las rebanadas de hígado en función de las enzimas hepáticas aspartato amino transferasa (AST) y deshidrogenasa láctica (LDH) -----	27
Figura 15. Viabilidad de las rebanadas de hígado en función de las enzimas hepáticas alanino amino transferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP) -----	27

INTRODUCCIÓN

Los modelos *in vitro* han sido de gran importancia en la investigación y desarrollo biotecnológico al formar parte de un conjunto de métodos para estudiar el efecto de diversos agentes xenobióticos, susceptibilidad antimicrobiana, procesos patológicos, relaciones entre vías metabólicas y las características farmacodinámicas de xenobióticos o fármacos, así como para el desarrollo de biomarcadores y de nuevos medicamentos. Entre estos modelos destacan los co-cultivos, cultivos primarios y el cultivo de líneas celulares establecidas (Chiu, 1993; Said-Fernández *et al.*, 1997). Sin embargo, estos modelos, no siempre reflejan una respuesta fisiológica completa debido a que generalmente corresponden a poblaciones o linajes celulares únicos. Un modelo adicional y potencialmente valioso lo constituye la técnica de rebanadas de tejidos, la cual fue desarrollada originalmente por Krumdieck *et al.*, en 1980. Las rebanadas de órganos son cortes de tejidos cuya característica distintiva es que dependiendo del órgano o tejido en estudio, se pueden preparar con diámetro de 5 a 10 mm y grosor de 200 a 600 μ , lo cual les permite mantenerse viables *in vitro* (Smith *et al.*, 1985). El modelo de las rebanadas de tejido posee las características únicas de conservar la organización espacial tridimensional propia del tejido y el mantenimiento de las interacciones célula-célula, así como entre las células y su matriz extracelular (Moronvalle-Halley, 2005). Además, en una rebanada de tejido se encuentran representadas todas las de células del órgano del cual proviene (Parrish *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1996). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada con diferentes órganos, incluyendo el hígado, riñón, pulmón, corazón y bazo (Parrish *et al.*, 1995).

Su uso se ha incrementado gracias al desarrollo de sistemas de incubación, los cuales permiten extender la viabilidad de las rebanadas de tejidos de animales y humanos por 5, 7 y hasta 10 días (Brendel *et al.*, 1987; Behrsing *et al.*, 2003). De lo expuesto anteriormente se pueden comprender las ventajas del sistema de rebanadas de tejidos, de ahí surge el objetivo de estandarizar las condiciones para establecer este modelo en nuestra región.

ANTECEDENTES

Las rebanadas de órganos han sido muy utilizadas en estudios bioquímicos; muchas de las vías básicas de metabolismo intermediario fueron descubiertas empleando rebanadas de tejidos (Parrish *et al.*, 1995, cfr ref.). El uso de las rebanadas de tejidos *in vitro* fue reportado inicialmente en la década de 1920-1930 (Bach *et al.*, 1996). En los primeros trabajos se obtenían rebanadas de forma manual, utilizando bisturíes; debido a esto la producción de rebanadas idénticas era muy difícil y poco reproducible, dependiendo en gran medida de la experiencia del investigador (Campbell y Hales 1971). Posteriormente aparecieron rebanadores mecánicos como el Microtomo Stadie-Riggs en 1944 y el rebanador de McIlwan en 1953, los cuales, a pesar de que mejoraron la calidad de las rebanadas, no eran del todo reproducibles, además de que tenían el inconveniente de comprimir y dañar los tejidos (Bach *et al.*, 1996).

A pesar de estas limitaciones las rebanadas de tejidos continuaron siendo ampliamente utilizadas. En 1980, Krumdieck diseñó un rebanador de tejidos que permitió obtener rebanadas posicionales con diámetro y grosor precisos (Krumdieck *et al.*, 1980). El grosor y diámetro controlados en las rebanadas de órganos favorecen las condiciones idóneas para el intercambio de gases y de nutrientes permitiendo mantenerlas viables *in vitro*.

Han pasado dos décadas desde que apareció el primer trabajo publicado acerca de la preparación y mantenimiento de rebanadas de hígado de rata, conejo y humano utilizando “rebanadores” de precisión para realizar estudios toxicológicos *in vitro* (Smith *et al.*, 1985). No obstante, hoy en día, el uso de las rebanadas de tejidos se ha extendido gracias al desarrollo de sistemas de incubación adecuados que permiten prolongar su viabilidad (Brendel *et al.*, 1987; Behrsing *et al.*, 2003). Lo anterior es muy importante, ya que el cultivo *in vitro* de las rebanadas de tejido en buenas condiciones fisiológicas y morfológicas permite realizar estudios experimentales tanto agudos como crónicos.

Las rebanadas de hígado se han utilizado para evaluar el efecto citoprotector de ciertos compuestos contra la toxicidad debida a xenobióticos y para estudiar eventos tempranos en la carcinogénesis inducida por compuestos químicos (Godoy *et al.*, 1983; Goodall, 1984; Hall *et al.*, 1985), necrosis hepática inducida por paracetamol (Bailie *et al.*, 1984), toxicidad de aflatoxinas (Uwaifo, 1984), para estudiar la hepatotoxicidad de hidrocarburos halogenados, especialmente el papel de la peroxidación de lípidos (Fraga *et al.*, 1987; Fraga *et al.*, 1988), alteraciones en el transporte de electrones (Mourelle y McLean, 1989), toxicidad de cocaína (Boelsterli y Goldlin, 1991), para estudiar alteraciones histopatológicas y citotoxicidad inducidas por paraquat (Togashi *et al.*, 1991). Para evaluar la toxicidad de sustancias químicas (Miller *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1995), para establecer las vías metabólicas de xenobióticos (Ball *et al.*, 1996; Ekins., 1996), para evaluar el potencial genotóxico y antigenotóxico de diversos compuestos (Baumann *et al.*, 1996; Lake *et al.*, 1999), para investigar la respuesta hepática a drogas (Olinga *et al.*, 2001), para

estudiar la regulación de sistemas enzimáticos como el citocromo P450 (Meredith *et al.*, 2003), y también para comparar la viabilidad de las rebanadas entre especies animales (Sivapathasundaram *et al.*, 2004). Por otra parte, las rebanadas de riñón representan un modelo que permite exponer a todas las células de interés al efecto directo de agentes nefrotóxicos, así como para estudiar el metabolismo renal de sustratos endógenos y exógenos (Gandolfi *et al.*, 1995). Se han utilizado en estudios toxicológicos para determinar el mecanismo de nefrotoxicidad del cloroformo (Smith y Hook, 1983; Bailie *et al.*, 1984), para estudiar la síntesis de prostaglandinas (Fujimoto *et al.*, 1984; Fujita *et al.*, 1986) y la preservación de órganos (Southard *et al.*, 1985; Southard *et al.*, 1985b). También se ha estudiado la liberación de renina (Gossain *et al.*, 1986; Pedraza-Chaverri *et al.*, 1986), y el transporte de iones orgánicos (Braunlich, 1987). Parrish *et al.* (1998) presentaron evidencia de cambios en la expresión de los oncogenes c-fos, c-Ha-ras y c-jun en rebanadas de riñón e hígado de rata, así como del factor transcripcional AP-1 inducidos por arsénico inorgánico en rebanadas de riñón de conejo (Parrish *et al.*, 1999). Las rebanadas de riñón de conejo también han sido utilizadas para mostrar las alteraciones inducidas por mercurio en la cascada de transducción de señales mediadas por kinasas (Turney *et al.*, 1999). Kirkpatrick *et al.* describieron los efectos del arsenito en la vía ubiquitina-proteosoma utilizando el mismo modelo de rebanadas de la corteza renal en conejo (Kirkpatrick *et al.*, 2003).

Las rebanadas de pulmón mantienen su viabilidad en cultivo por períodos prolongados (7 días) y al mismo tiempo muestran un alto grado de especificidad funcional y estructural (Bach *et al.*, 1996). Su preparación incluye la infiltración del tejido con agarosa, lo que le proporciona al pulmón un soporte eficaz previniendo el colapso de la arquitectura celular y su posterior necrosis durante el tiempo de incubación de las rebanadas (Stefaniak *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1995). Las rebanadas de pulmón se han utilizado para estudiar los efectos tóxicos de acroleína y nitrofurantoina (Parrish *et al.*, 1994; Parrish *et al.*, 1994b), así como de doxorubicina, allilamina y alcohol alílico (Fisher *et al.*, 1994; Vereá *et al.*, 2001), para establecer la correlación entre las respuestas pulmonar *in vivo* e *in vitro* frente a aceite diesel o partículas contaminantes del ambiente (Hays *et al.*, 2003), para analizar mecanismos de infección con virus (Ebsen, *et al.*, 2002) y para estudiar el metabolismo de la nicotina y la inducción de citocromo CYP1A (Price *et al.*, 2004).

Finalmente, el uso de órganos para producir rebanadas se ha extendido a otros tejidos: las rebanadas de intestino, han sido utilizadas principalmente para realizar estudios de biotransformación (Vickers *et al.*, 1995; de Kanter *et al.*, 2005). También se ha logrado preparar rebanadas a partir de músculos cardíaco y liso, placenta, glándula mamaria, glándula adrenal y tejido tiroideo (Bach *et al.*, 1996). Finalmente, las rebanadas de próstata en humanos también han representado un importante modelo *in vitro* para investigar su patología (Parrish *et al.*, 2002).

En base a lo expuesto anteriormente, las rebanadas de tejidos han demostrado ser un valioso sistema *in vitro* en el cual se conservan propiedades fisiológicas muy

similares a las que ocurren *in vivo*, por lo cual el objetivo de este trabajo es la implementación de este modelo como una alternativa adicional en investigación biomédica.

HIPÓTESIS

La implementación del modelo de rebanadas de tejidos permitirá realizar diferentes estudios de investigación básica y aplicada.

OBJETIVO

Implementar, estandarizar y optimizar las condiciones para obtener rebanadas con diámetro y grosor precisos a partir de riñón, hígado y pulmón de rata.

JUSTIFICACIÓN

El modelo de rebanadas de tejidos representa un sistema adecuado para realizar ensayos experimentales *in vitro* en virtud de que se conservan la arquitectura e interacciones celulares propias del tejido del cual provienen, lo que a su vez permite obtener respuestas biológicas más completas que cuando se utilizan cultivos celulares. Es además un método alternativo que promueve el empleo óptimo de los tejidos animales para investigación, puesto que se pueden emplear simultáneamente de 1 a 3 órganos diferentes provenientes del mismo animal. Actualmente, no existen grupos de investigación en México que empleen esta metodología, por lo que se podrá lograr un importante avance en el campo de la investigación biomédica en nuestra región

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Para la preparación y cultivo de rebanadas se utilizó el rebanador de tejidos Brendel-Vitron, una incubadora para cultivo dinámico de órganos (ICDO) e insertos de titanio para la ICDO, todo ello de Vitron, Inc. (Tucson, AZ. (USA). También se utilizaron viales de vidrio con capacidad para 20 mL (Wheaton, Maryland., USA).

Animales

Se utilizaron ratas Wistar tanto hembras como machos. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS. Fueron alimentadas con “Lab Diet” de Purina y agua *ad libitum*.

Buffer Krebs-Henseleit o Buffer Krebs-Bicarbonato (KB)

Se pesaron 13.8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.72 g de cloruro de potasio (KCl), 0.26 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 4.22 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 9.0 g de D-Glucosa anhidra ($\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CHO}$), 0.85 g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 0.59 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), los cuales se disolvieron en 1.8 litros de agua bidestilada. El pH se ajustó a 7.4 y se aforó a 2 litros. Se esterilizó por filtración utilizando membranas con diámetro de poro de 0.22 μ y se almacenó a 4 °C por no más de 1 semana.

Preparación del Medio de Cultivo DMEM/F12 para las Rebanadas de Tejidos

Se pesaron 15.62 g de medio de cultivo en polvo (DMEM/F12 1:1. SIGMA) y 1.2 g de Bicarbonato de sodio grado cultivo celular (SIGMA). Se disolvieron en 800 mL de agua Milli Q y se ajustó el pH a 7.35, se añadió 1 mL de una solución a 50 mg/mL de gentamicina (GIBCO), posteriormente se aforó a 1 litro y se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0.22 μ . Se suplementó con 10% de suero fetal de bovino, descomplementado previamente a 56°C durante 30 min. y 25 mM de glucosa estéril. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

Obtención de órganos

Todos los órganos fueron obtenidos bajo estrictas condiciones de asepsia. Las ratas fueron sacrificadas humanamente de acuerdo a los principios éticos de los comités de protección a los animales. Se utilizó una sobredosis de pentobarbital sódico administrado intraperitonealmente (5 mg/100 g de peso). Posteriormente, en experimentos separados, se disectaron hígado y riñón, utilizando material de cirugía estéril. Los órganos se colocaron en buffer KB pH 7.4 estéril, a 4°C, como se muestra en la figura 1.



Figura 1. Obtención de órganos. Después de la disección el hígado y riñones se colocan en buffer KB a 4 °C.

En el caso de los pulmones, se disecó la piel del abdomen y tórax para abrir la cavidad pleural a lo largo de la línea media del cuerpo. Después se canalizó la tráquea con una sonda gástrica para instilar hacia el interior de los pulmones, agarosa al 0.5% disuelta en medio de cultivo a 40°C. Se dejó enfriar por 5 minutos para que solidifique la agarosa. Posteriormente, los pulmones fueron separados y colocados en buffer KB pH 7.4, a 4°C (figura 2).



Figura 2. Obtención de pulmones. Pulmones infiltrados con agarosa al 0.5% y colocados en buffer KB a 4 °C.

Preparación de las Rebanadas de Tejidos

Cada tejido se procesó por separado bajo condiciones de asepsia. Para la preparación de las rebanadas de hígado riñón y pulmón, se obtuvieron cortes cilíndricos de cada tejido utilizando un sacabocados de acero inoxidable de 5 mm de diámetro (figura 3A). Los cilindros de tejido (figura 3B) se colocaron en el portamuestras del rebanador Brendel-Vitron (figura 3C), a través del cual se hizo fluir buffer KB a 4 °C y una mezcla de gas (95% O₂/5% CO₂) a velocidad de flujo de 0.75 a 1 litros/min. Se prepararon las rebanadas de hígado, riñón y pulmón de 5 mm de diámetro y con un grosor de 250, 250 y 600 μ respectivamente deslizando suavemente el portamuestras a través de la navaja del rebanador y se colectaron en buffer KB a 4 °C.



Figura 3. Preparación de rebanadas de tejidos. A) sacabocados con el cual los órganos son perforados. B) bocados de tejido en buffer KB. C) portamuestras con bocados.

Estandarización del grosor de las rebanadas de hígado riñón y pulmón

El grosor de las rebanadas fue estandarizado mediante la adaptación y regulación de un tornillo calibrado (Fig. 4), la medición del grosor se realizó utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo Corp., México). El grosor de las rebanadas de hígado, riñón y pulmón fueron de 250μ , 250μ y 600μ respectivamente.

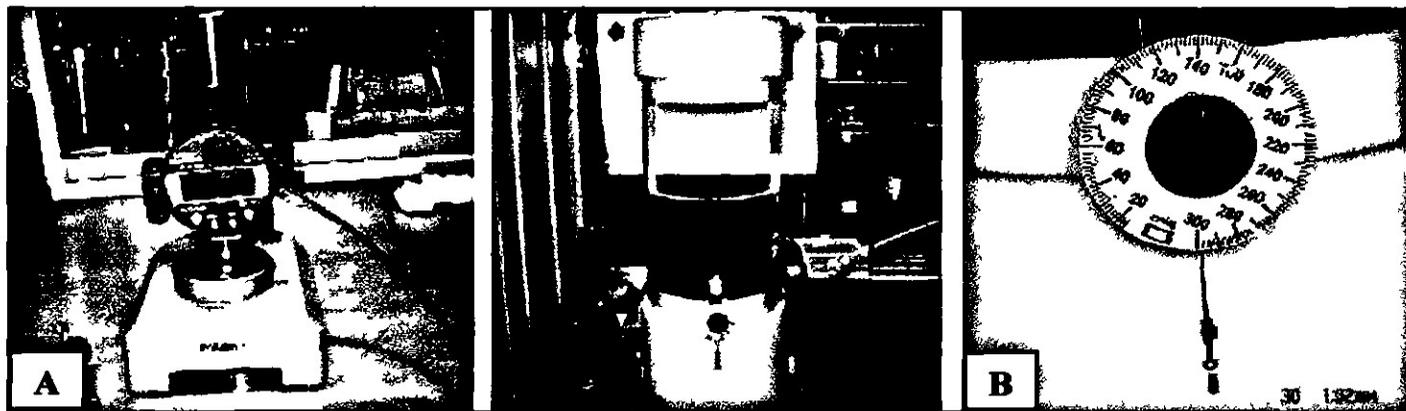


Figura 4. Medición del grosor de las rebanadas. A) micrómetro digital Mitutoyo. B) carátula graduada. La figura central corresponde a una fotografía panorámica del rebanador Brendel Vitron y los accesorios para medición del grosor de las rebanadas.

Cultivo de rebanadas de tejidos

De las rebanadas obtenidas de cada órgano por separado, se eligieron las de mejor apariencia visual y se colocaron 2 ó 3 rebanadas por cada inserto de titanio con malla de acero inoxidable, los cuales se encontraban sumergidos en buffer KB a 4° C (figura 5A). Los insertos con las rebanadas (figura 5B) se colocaron en viales de vidrio (figura 5C) de 20 mL que contenían 1.7 mL de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con gentamicina (50 mg/ml), 25 mM de glucosa y 10% de suero fetal bovino. Los viales se cerraron con tapas que tienen un orificio central de 1 mm de diámetro para permitir el acceso a la mezcla de gas en las rebanadas y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% O₂/5% CO₂ en la ICDO que mantiene los viales en rotación constante a 2 rpm.



Figura 5. Cultivo de Rebanadas. A) selección de las mejores rebanadas de tejidos. B) rebanadas en insertos de titanio. C) insertos en viales conteniendo medio de cultivo.

Preincubación de las rebanadas de tejidos

Las rebanadas fueron inicialmente preincubadas por 1 h para descartar las células muertas durante el proceso de rebanado, después fueron transferidas a medio fresco e incubadas a 37°C, para estudiar su viabilidad durante 48 h. Cada uno de los análisis

se realizó por triplicado, en experimentos independientes a los tiempos de incubación de 0, 12, 24, 36 y 48 h, para las rebanadas de hígado y riñón; mientras que para las rebanadas de pulmón los tiempos de incubación fueron a de 0, 24 y 48 h.

Análisis histológico

El criterio histológico fue considerado como el más importante para definir la integridad y viabilidad de las rebanadas de tejidos. Para esto, después de cada tiempo de incubación, se tomaron los viales correspondientes y las rebanadas se lavaron con PBS a 37 °C y se fijaron en solución acuosa de formol al 10% durante 24 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron incluidas en parafina utilizando un procesador automático de tejidos (histoquinette) durante 24 h. Posteriormente se prepararon los bloques de parafina conteniendo los tejidos y se realizaron cortes de 3-5 μ de espesor empleando un microtomo. Las muestras fueron colocadas y fijadas a un portaobjetos impregnado de albúmina-glicerina de Mayer, y se tiñeron utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E). A las laminillas teñidas se les colocó un cubreobjetos, se sellaron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente para su observaron al microscopio de luz.

Se utilizaron estándares histopatológicos para establecer las características morfológicas distintivas de tejidos normales mediante la valoración de la integridad celular de sus membranas y citoplasma, así como las interacciones de las células con su estroma, y características de tinción y de forma de sus núcleos.

Análisis de biomarcadores clínicos

Para este análisis se utilizó únicamente tejido hepático debido a que en la literatura no se encuentran referidos marcadores de función renal en rebanadas de tejido. A pesar de esto, nosotros realizamos ensayos preliminares incluyendo marcadores conocidos tales como urea y creatinina, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron consistentes, por lo que se descartó su inclusión en este primer estudio. Igualmente, para tejidos provenientes de pulmón, se desconocen marcadores clínicos de función pulmonar que pudieran ser utilizados.

Con respecto a las rebanadas de hígado, a los tiempos 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 40, 48, 52 y 56 h las rebanadas fueron removidas de los insertos de titanio, se lavaron en PBS a 37°C, se colocó una rebanada en un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 1 mL de agua Milli Q, posteriormente fueron homogenizadas y sonicadas a 4° C. El lisado tisular se centrifugó a 9000 g por 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a 4°C para realizar pruebas funcionales hepáticas: glucosa, aspartato aminotransferasa (AST), deshidrogenasa láctica (LDH), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP). Para este análisis se empleó un analizador clínico automatizado (Synchron Cx7 Beckman Coulter., USA).

Reducción de MTT

Otro criterio para evaluar la viabilidad de las rebanadas fue analizar la reducción de MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), una sal de tetrazolio. El MTT es reducido a formazán por las enzimas mitocondriales de las células vivas, virando su color de amarillo a púrpura, el cual es determinado a 570 nm (Mosmann., 1983). Existe una relación directa entre el número de células viables y la absorbancia obtenida. Este ensayo es de amplia aplicación en diversos sistemas biológicos (Ferrari *et al.*, 1990; Lobner, 2000), y recientemente se ha utilizado para estudiar la viabilidad de rebanadas de tejidos (Maas *et al.*, 2000; Martignoni *et al.*, 2004). Para este trabajo, se tomaron las rebanadas correspondientes al tiempo en estudio y se lavaron con PBS a 37 °C, se colocó una rebanada por pozo en microplacas de poliestireno de 24 pozos y se adicionaron 500 µl de una solución de MTT (2 mg/mL) en PBS y se incubaron 30 min a 37°C. Después de la incubación se retiró el MTT y se lavaron las rebanadas con PBS. Se adicionó a cada pozo 1 mL de alcohol isopropílico acidificado y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación lenta. Finalmente se tomaron 200 µl del sobrenadante, se colocaron en una microplaca de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas Sigma diagnostics EIA multi-well reader (St. Louis, USA).

RESULTADOS

Para la estandarización del grosor de las rebanadas de tejidos, tomamos como referencia el peso y grosor de alrededor de 300 rebanadas obtenidas en distintas posiciones en la carátula adaptada por nosotros al rebanador original (ver figura 4). Las rebanadas obtenidas en las posiciones 290 y 200 nos dieron el grosor adecuado para cada órgano, por lo que una vez establecido este parámetro de manera reproducible, decidimos realizar los experimentos siguientes en dichas posiciones. Los resultados se resumen en la tabla 1.

<i>Tejido</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Grosor (μ)</i>	<i>Posición del rebanador</i>
Riñón	88	250	290
Hígado	128	250	290
Pulmón	220	600	200

Tabla 1. Promedio general del peso y grosor de las rebanadas de riñón, hígado y pulmón.

Análisis histológico

Los cortes histológicos realizados a las rebanadas de tejido hepático cultivado durante 12, 24, 36 y 48 h fueron analizados comparativamente con tejido obtenido a tiempo cero (figura 6).

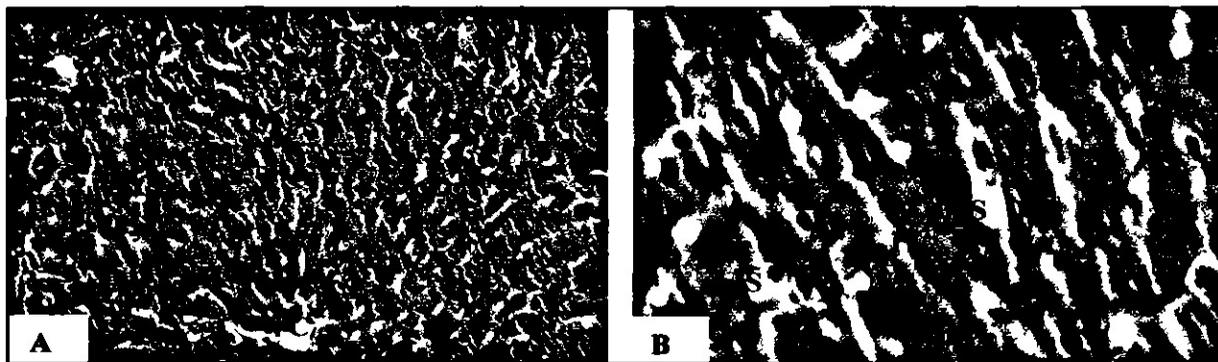


Figura 6. Corte histológico de parénquima hepático normal a tiempo cero. A y B. Tinción H y E (5X y 40X respectivamente). Se observan cordones de hepatocitos (H), vena central (VC), triada portal (TP) y sinusoides (S) sin presentar alteración.

La arquitectura hepática se observó similar en todos los tiempos de incubación analizados, aunque se apreciaron cambios de tipo adaptativo, con la presencia de células de aspecto balonoide y congestión sinusoidal (figura 7-F). A las 48 h se observó necrosis focal unicelular (figura 8-G y H).

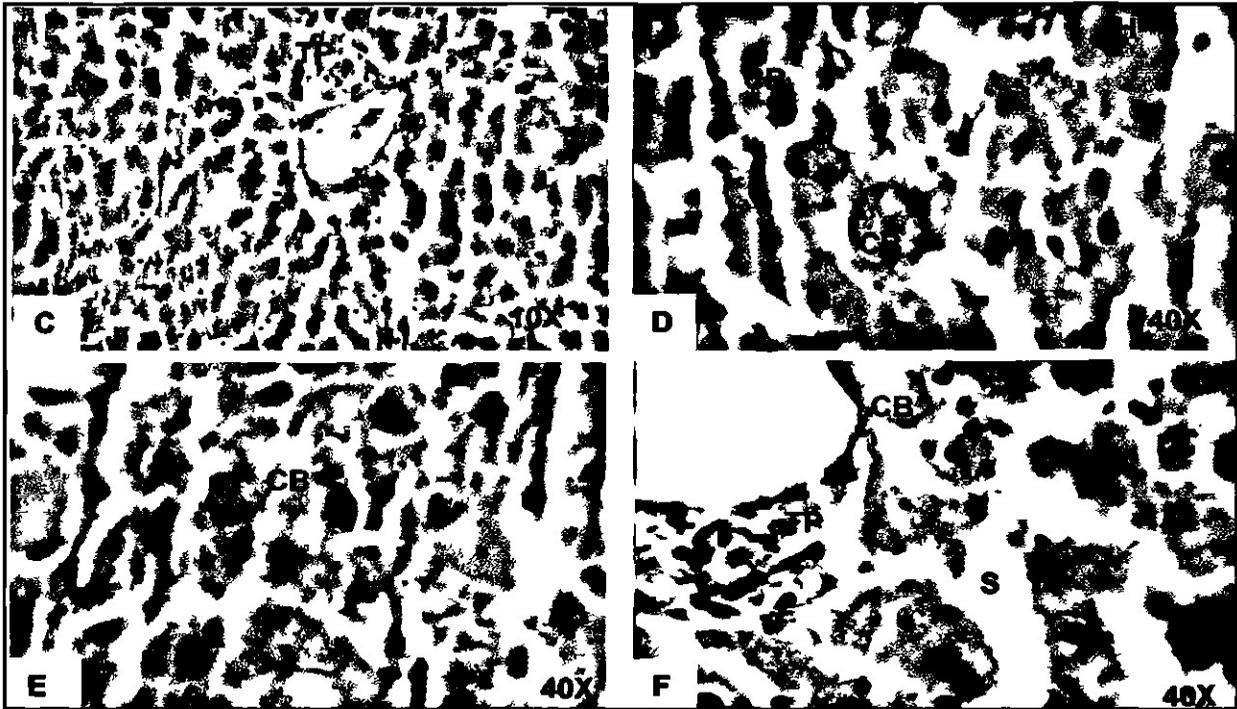


Figura 7. Microfotografías de tejido hepático cultivado a las 12 h. (C y D), 24 h (E) y a 36 h (F). Se observa arquitectura conservada con cambios de adaptación celular (células balonoides CB) y dilatación sinusoidal (S).

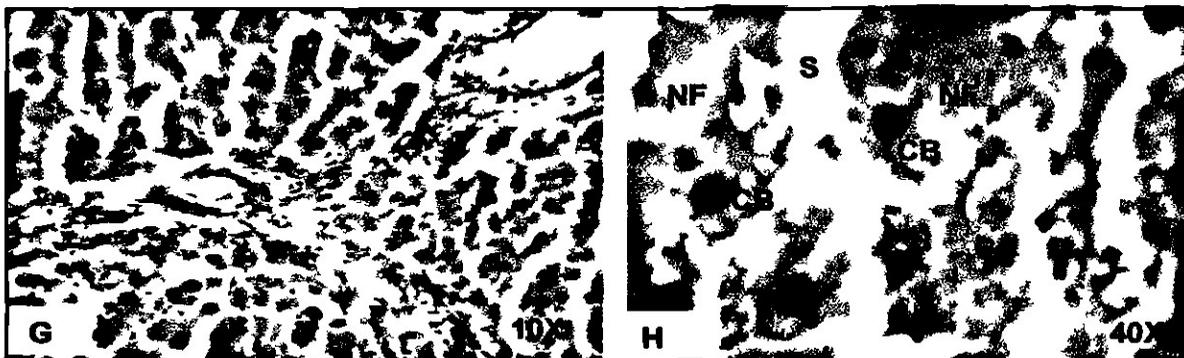


Figura 8. Microfotografías de tejido hepático cultivado a las 48 h. Se observa arquitectura conservada con cambios de adaptación celular (células balonoides CB), dilatación sinusoidal (S) y necrosis focal unicelular (NF).

En cuanto a los cortes histológicos realizados de las rebanadas de riñón cultivados a las 12, 24, 36 y 48 h, no se observaron cambios histológicos importantes comparados con el tejido obtenido a tiempo cero (figura 9).

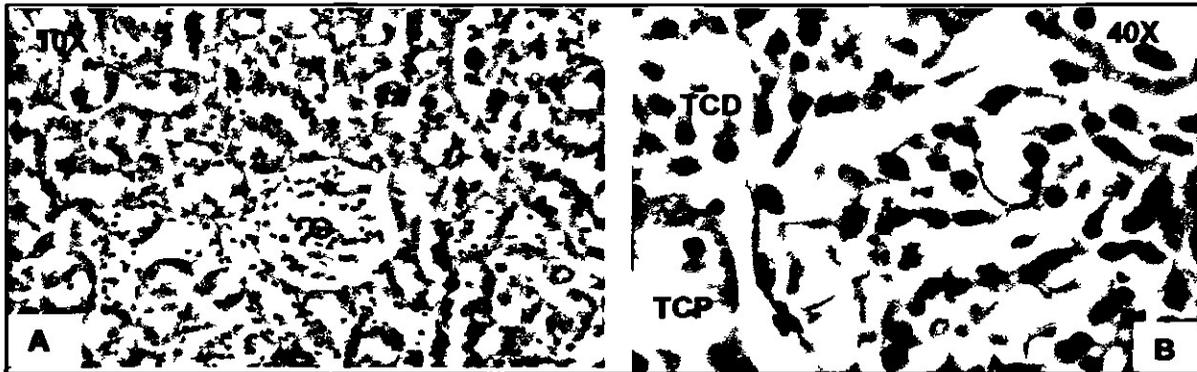


Figura 9. Microfotografías de tejido renal a tiempo cero. (A y B). Tinción H y E, a 10X y 40X respectivamente. En ambas se observa la arquitectura histológica normal, observándose los glomérulos (G) con discreta congestión vascular y rodeado en su mayoría por túbulos contorneados proximales (TCP) y en menor proporción por túbulos contorneados distales (TCD).

La morfología histológica de las rebanadas del tejido renal en los tiempos descritos permaneció conservada presentando en algunos túbulos renales material proteinaceo intraluminal y ciertos cambios de tipo adaptativo en el epitelio tubular. No se observaron necrosis tubular o infiltrados inflamatorios (figuras 10C - H).

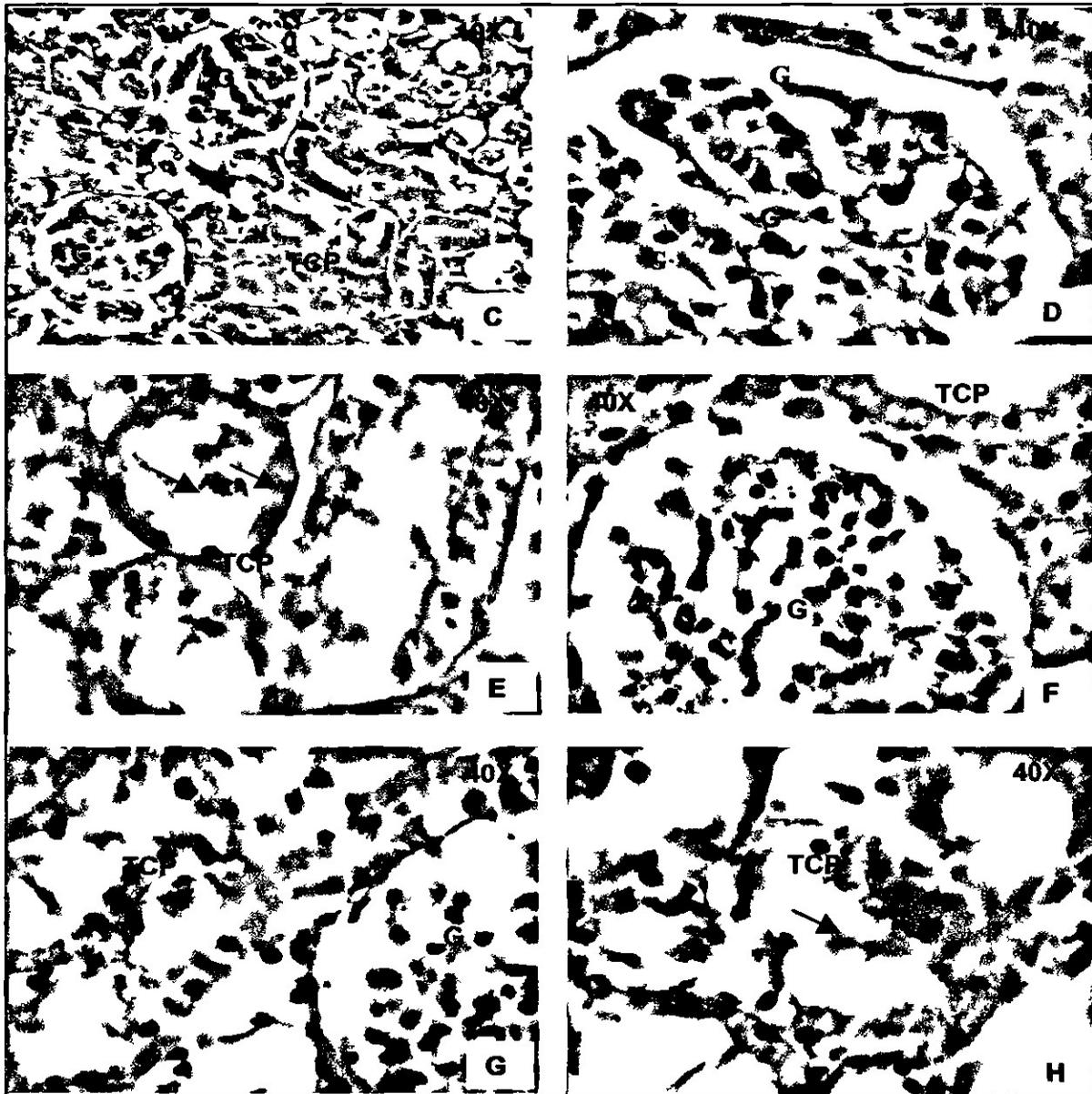


Figura 10. Microfotografías de las rebanadas de tejido renal cultivado a las 12 h. (C y D), 24 h (E), 36 h (F) y 48 h (G y H). Los cortes histológicos muestran corteza renal con su arquitectura conservada. Se observan glomérulos y estructuras tubulares sin alteración. De manera focal, se observa un acúmulo de material proteinaceo intraluminal (H, flecha).

Con respecto a los cortes histológicos realizados de las rebanadas de pulmón cultivadas a las 24 y 48 h, al igual que los anteriores tejidos, se analizaron comparativamente con el tejido obtenido a tiempo cero. En todos los cortes se observó su arquitectura conservada y de manera focal, discreto infiltrado inflamatorio agudo que pudiera corresponder a una respuesta frente al estrés quirúrgico. No se observaron cambios histológicos significativos con el tiempo cero (figura 11A – D).

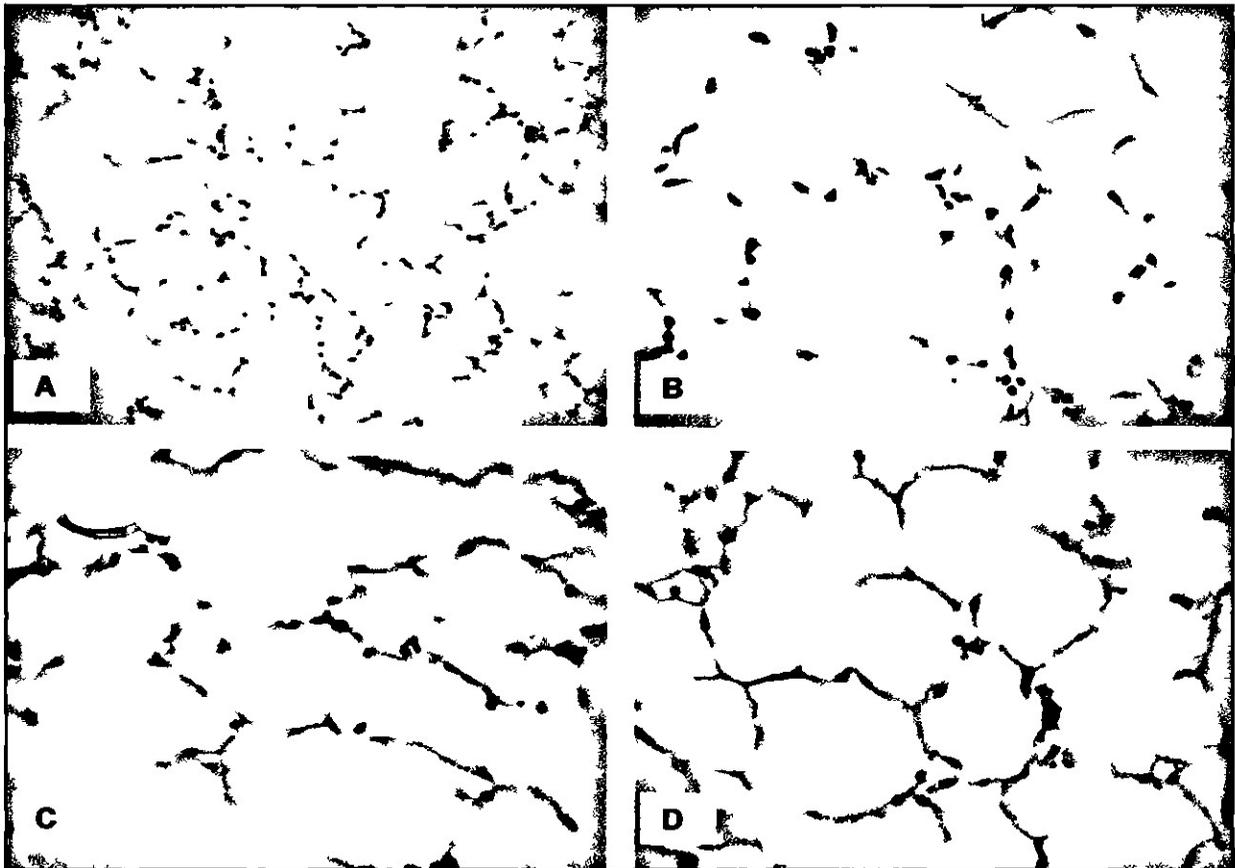


Figura 11. Microfotografías de tejido pulmonar. Rebanadas a las 0 h (A y B), 24 h (C) y 48 h (D). Se observan algunos espacios alveolares con septos rotos debido a la infiltración con agarosa, no obstante, el tejido fue capaz de mantener su viabilidad durante las 48 h de incubación.

Reducción de MTT

En las rebanadas de hígado y riñón cultivadas durante 12, 24, 36 y 48 h se observan valores de absorbancia válidos, aunque con una ligera disminución a las 12 h, posiblemente debido al estrés producido durante el proceso de rebanado. Las rebanadas se recuperan posteriormente, alcanzando su máxima absorbancia a las 24 h, sin embargo se mantienen sin cambios significativos hasta las 48 h para ambos órganos (figura 12). En el caso de la reducción MTT por tejido pulmonar, la figura 13 muestra que la absorbancia se mantuvo constante durante las 48 h de incubación.

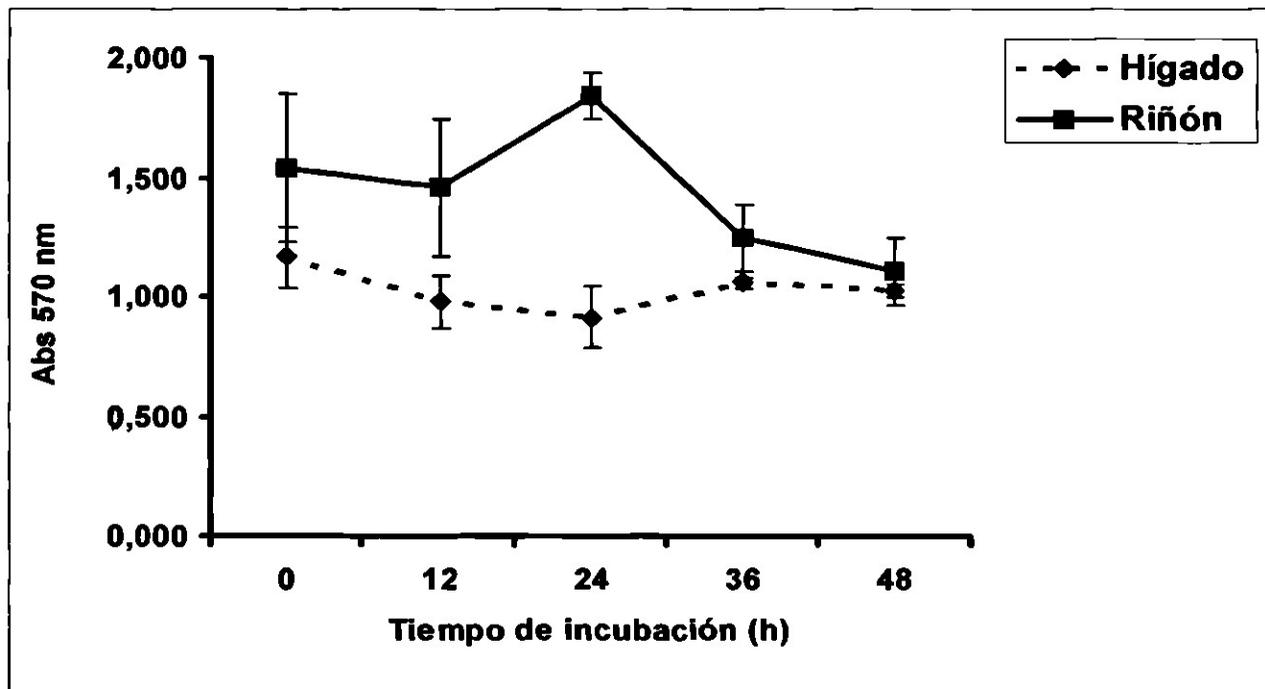


Figura 12. Viabilidad de rebanadas de hígado y riñón en función de la reducción de MTT.

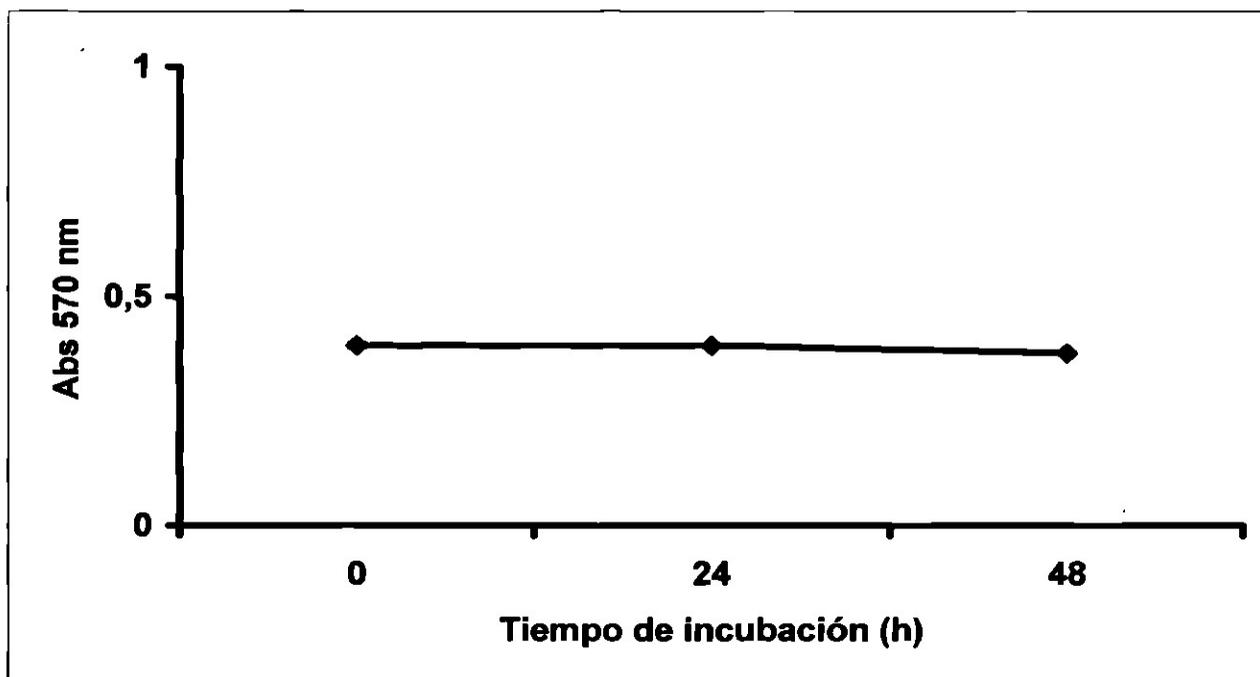


Figura 13. Viabilidad de rebanadas de pulmón en función de la reducción de MTT.

Análisis de biomarcadores clínicos

El estudio de las enzimas marcadoras de función hepática permite inferir que el tejido se mantuvo viable durante 48 h de incubación. Después de este tiempo, se observa que dichas enzimas disminuyen. La figura 14 refleja actividad de las enzimas aspartato amino transferasa (AST) y deshidrogenasa láctica (LDH), la actividad de estas enzimas se mantiene relativamente constante durante las primeras 50 h de incubación. En la figura 15 se observa la actividad de las enzimas alanino amino transferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP), donde esta última se mantiene constante con respecto al tiempo de incubación, mientras que la ALT muestra una disminución gradual a medida que se incrementa el tiempo de incubación.

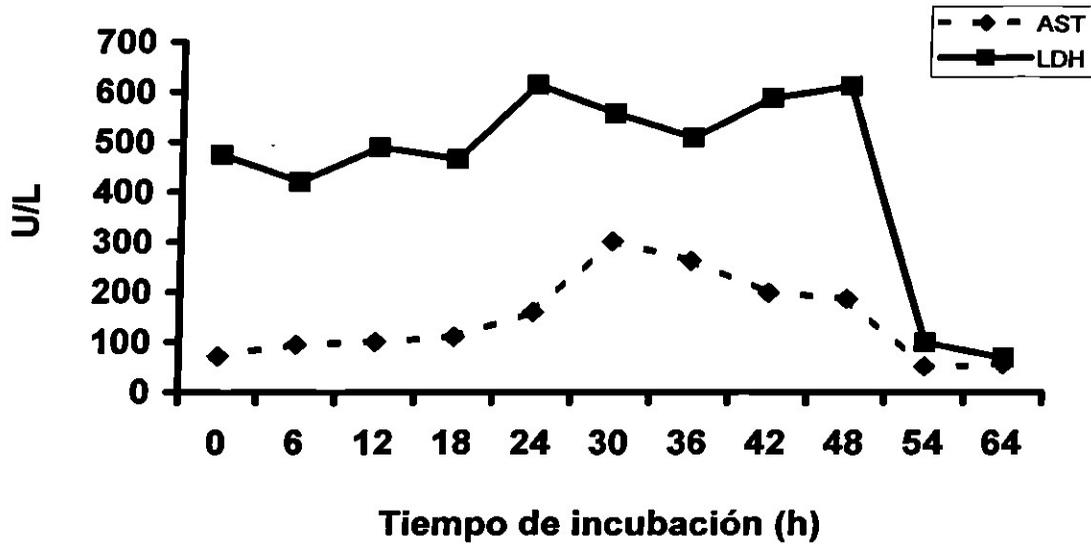


Figura 14. Viabilidad de las rebanadas de hígado en función de la actividad de las enzimas hepáticas aspartato amino transferasa (AST) y deshidrogenasa láctica (LDH).

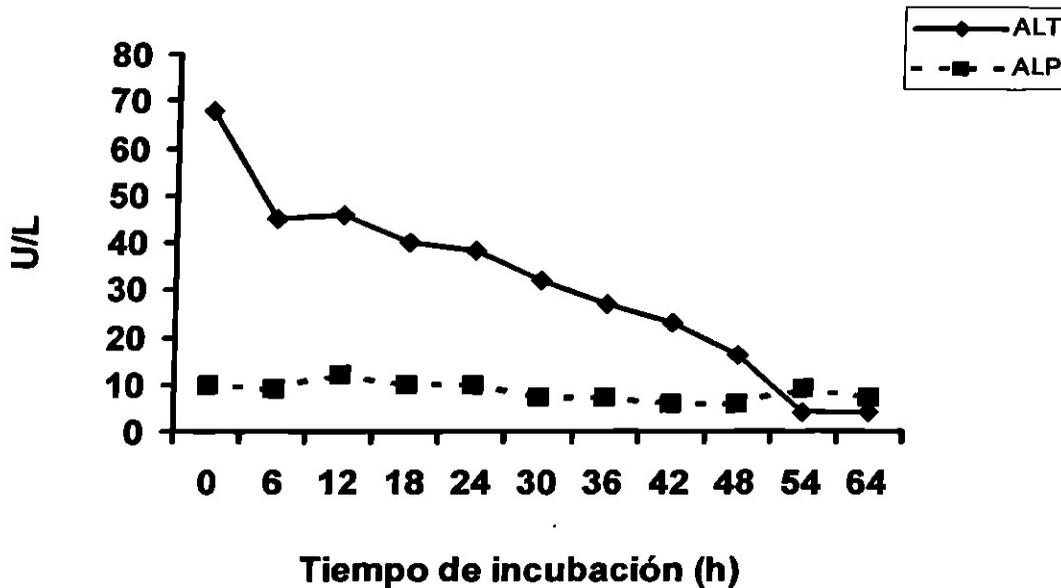


Figura 15. Viabilidad de las rebanadas de hígado en función de la actividad de las enzimas hepáticas alanino amino transferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP).

DISCUSIÓN

En estudios previos se ha demostrado que las rebanadas de hígado de rata mantienen su integridad bioquímica y funcional durante 3, 7 o 10 días (Smith *et al.*, 1986; Brendel *et al.*, 1987; Behrsing *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, nosotros logramos mantener la viabilidad de las rebanadas por 48 h utilizando uno de los medios de cultivo más empleados para las rebanadas de órganos suplementado con 10% de suero y 25 mM de glucosa (Verrill *et al.*, 2002; Catania *et al.*, 2003). Es probable que si se hubieran adicionado factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento epidermal, así como de las hormonas insulina y/o hidrocortisona (Sawyer *et al.*, 1995; Umachandran *et al.*, 2004), se hubiera logrado una mejor adaptación de las rebanadas al cultivo prolongado hasta por 5 días, como lo demostró Behrsing *et al.*, en el 2003. Aún con esta posible limitante, logramos mantener viables las rebanadas de hígado riñón y pulmón durante 48 horas y comprobamos dicha viabilidad estudiando parámetros que reflejan su integridad, como son: análisis histológico, reducción de MTT y análisis de biomarcadores clínicos (en hígado), siendo el análisis histológico el criterio más importante para definir la integridad tisular de los tres órganos.

Debido a que el grosor de las rebanadas es muy importante para permitir el intercambio de gases y nutrientes por parte del tejido, la estandarización de este parámetro resultó ser un factor crítico para su sobrevivencia. Durante nuestros experimentos realizamos adecuaciones tales como la adaptación de una carátula

graduada y flecha de referencia, para lograr obtener el grosor correcto para los tres órganos que utilizamos. Es posible que empleando un rebanador automatizado, como el de Krumdieck®, se favorezca la obtención de rebanadas idénticas, con menor estrés mecánico durante el proceso de rebanado y así, poder extender el tiempo de viabilidad (Behrsing *et al*, en el 2003.).

Con respecto a los resultados del análisis histológico, se observan cambios adaptativos de las células en el medio durante las primeras horas de incubación, después de este tiempo, tienden a mantener su integridad histológica, la cual permite el intercambio de gases entre célula-célula y células-matriz extracelular durante 48 h en nuestras condiciones. Estos resultados son muy similares a los estudios realizados por Behrsing *et al* (2003), quienes también analizaron biomarcadores clínicos en rebanadas de hígado como indicadores de viabilidad, aunque la viabilidad que reportan es de 10 días. Las diferencias del trabajo mencionado implican 3 cambios importantes: preparar las rebanadas en un amortiguador más complejo (solución de la Universidad de Wisconsin), depositar las rebanadas en filtros de celulosa, incubar en medio de cultivo de Weymouth MB/752/1, y emplear una atmósfera de 70% O₂ y 30% de CO₂.

En el ensayo de reducción MTT, donde la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables (Mosmann., 1993), se demostró que las rebanadas de los tres tejidos empleados mantuvieron la capacidad para reducir el MTT, lo cual es similar a reportes previos utilizando el mismo sistema (Price *et al.*, 1996; Olinga *et al.*, 1997; Martignoni *et al.*, 2004).

En conjunto, los resultados que obtuvimos en el presente trabajo demuestran que las rebanadas de riñón, hígado y pulmón de rata se mantuvieron viables durante 48 h. Se pretende que en estudios posteriores, se puedan adicionar reactivos o factores de crecimiento que permitan extender su cultivo *in vitro*.

Finalmente, el establecimiento de condiciones de cultivo que permitieron mantener viables las rebanadas de riñón, hígado y pulmón hasta por 48 h, constituye el primer paso exitoso en la implementación de este valioso modelo experimental en nuestra región.

CONCLUSIONES

- 1) Se estandarizaron las condiciones para la preparación y cultivo de rebanadas de órganos a partir de hígado, riñón y pulmón de rata.

- 2) Las rebanadas se mantuvieron viables hasta por 48 horas, esto, de acuerdo con criterios histológicos, bioquímicos (producción de enzimas marcadoras de tejido) y metabólicos (reducción de MTT).

LITERATURA CITADA

Bach PH, Vickers AEM, Fisher R, Baumann A, Brittebo E, Carlile DJ, Koster HJ, Lake BG, Salmon F, Sawyer TW, y Skibinski G. (1996). The Use of Tissue Slices for Pharmacotoxicological Studies. *ATLA* 24: 893-923.

Bailie MB, Smith JH, Newton JF, y Hook JB. (1984). Mechanism of chloroform nephrotoxicity. IV. Phenobarbital potentiation of *in vitro* chloroform metabolism and toxicity in rabbit kidneys. *Toxicol Appl Pharmacol* 74: 285-292.

Ball SE, Thiel VE, Tio CO, Lim HK, Kao J, Sisenwine SF, Scatina J. (1996). [14C]7-ethoxycoumarin metabolism by precision-cut rat hepatic slices. *Drug Metab Dispos.* 24: 383-389.

Baumann A, Kerdar RS, Cramer P, Feser W, Blode H, Salomon A, Kuhn W. (1996). Use of rat and human liver slices for the detection of steroid hormone-induced DNA-adducts *in vitro* by means of the (32)P-postlabeling technique. *Pharmacol Toxicol.* 78: 214-223.

Behrsing PH, Vickers AEM y Tyson CHA. (2003). Extended rat liver slices survival and stability monitored using clinical biomarkers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312: 209-213.

Boelsterli UA, Goldlin C. (1991). Biomechanisms of cocaine-induced hepatocyte injury mediated by the formation of reactive metabolites. *Arch Toxicol* 65: 351-360.

Braunlich H. (1987). Transport of p-aminohippurate in renal cortical slices of rats of different ages following treatment with thyroid hormones. *Biomed Biochim* 46: 251-257.

Brendel K, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Smith PF. (1987). Organ slices revisited. *Trends Pharmacol Sci* 8: 11-25.

Campbell AK, Hales CN. (1971). Maintenance of viable cells in an organ culture of mature rat liver. *Exp. Cell. Res.* 68: 33-42.

Catania JM, Parrish AR, Kirkpatrick DS, Chitkara M, Bowden GT, Henderson CJ, Wolf CR, Clark AJ, Brendel K, Fisher RL, Gandolfi AJ. (2003). Precision-cut tissue slices from transgenic mice as an *in vitro* toxicology system. *Toxicol In Vitro.* 17 :201-205.

Chiu SH. (1993). The use of *in vitro* metabolism studies in the understanding of new drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 29: 77-83.

de Kanter R, Tuin A van de Kerkhof E, Martignoni M, Draaisma AL, de Jager MH, de Graaf IA, Meijer DK, Groothuis GM. (2005). A new technique for preparing

precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*.51: 65-72.

Ebsen M, Mogilevski G, Anhenn O, Maiworm V, Theegarten D, Schwarze J, Morgenroth K. (2002). Infection of murine precision cut lung slices (PCLS) with respiratory syncytial virus (RSV) and *Chlamydomydia pneumoniae* using the Krumdieck technique. *Pathol Res Pract*.198: 747-753.

Ekins S. (1996). Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*. 28: 591-623.

Ferrari M, Chiara FM y Isetta AM. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 131: 165-172.

Fisher RL, Smith MS, Hasal SJ, Hasal KS, Gandolfi AJ, y Brendel K. (1994). The use of human lung slices in toxicology. *Human Exp Toxicol* 13: 466-471.

Fraga CG, Leibovitz BE, y Tappel AL. (1987). Halogenated compounds as inducers of lipid peroxidation in tissue slices. *Free Radic Biol Med* 3:119-123.

Fraga CG, Leibovitz BE, y Tappel AL. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 4: 155-161.

Fujimoto Y, Akamatsu N, Hattori A, y Fujita T. (1984). Stimulation of prostaglandin E2 synthesis by exogenous phospholipase A2 and C in rabbit kidney medulla slices. *Biochem J* 218: 69-74.

Fujita T, Yamamoto T, Tabata M, Ueno T, y Fujimoto Y. (1986). The effects of reduced glutathione and cysteine on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices. *Comp Biochem Physiol* 83: 29-31.

Gandolfi AJ, Keith RL, y Brendel K. (1995). Uptake and toxicity of metals in rabbit renal cortical slices. *In Vitro Toxicol* 5: 213-221

Godoy HM, Diaz Gomez MI, y Castro JA. (1983). Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats. *J Natl Cancer Inst* 71: 1047-1051.

Goodall CM. (1984). Dimethylnitramine metabolism in vitro by NZR rat liver slices. *Cancer Biochem Biophys* 7: 77-82.

Gossain VV, Sherma NK, Srivastava L, Michelakis AM, y Rovner DR. (1986). Hormonal effects of smoking--I: Effects on plasma renin activity. *Am J Med Sci* 291: 321-324.

- Hall J, Bresil H, y Montesano R. (1985). O6-Alkylguanine DNA alkyltransferase activity in monkey, human and rat liver. *Carcinogenesis* 6: 209-211.
- Hays AM, Lantz RC, Witten ML. (2003). Correlation between in vivo and in vitro pulmonary responses to jet propulsion fuel-8 using precision-cut lung slices and a dynamic organ culture system. *Toxicol Pathol.* 31: 200-207.
- Kirkpatrick DS, Dale KV, Catania JM, Gandolfi AJ. (2003). Low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins in rabbit renal cortical slices and HEK293 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*186:101-109.
- Krumdieck CL, dos Santos JE, y Ho KJ. (1980). A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem* 104: 118-123.
- Lake BG, Beamand JA, Tredgar JM, Barton PT, Renwick AB, Price RJ. (1999). Inhibition of xenobiotic-induced genotoxicity in cultured precision-cut human and rat liver slices. *Mutat Res.* 440: 91-100.
- Lobner D. (2000) Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods* 96: 147-152.
- Maas WJM, Leeman WR, Groten JP y Van De Sandt JJM. (2000). Cryopreservation of Precision-cut rat liver slices using a computer-controlled freezer. *Toxicology in vitro* 14; 523-530
- Martignoni M, Monshouwer M, De Kanter R, Pezzeta D, Moscone A, y Grosi P. (2004) Phase I and Phase II metabolic activities are retained in liver slices from mouse, rat, dog, monkey and human after cryopreservation. *Toxicology in vitro* 18: 121-128
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ, Lake BG. (2003). Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica.* 33: 511-527.
- Miller MG, Beyer J, Hall GL, deGraffenried LA, Adams PE. (1993). Predictive value of liver slices for metabolism and toxicity in vivo: use of acetaminophen as a model hepatotoxicant. *Toxicol Appl Pharmacol.* 122: 108-116.
- Moronvalle-Halley V, Sacré-Salem B, Sallez V, Labbe G, y Gautier JC. (2005). Evaluation of cultured, precision-cut rat liver slices as a model to study drug-induced liver apoptosis. *Toxicology* 207: 203–214.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63.

Mourelle M y McLean AE. (1989). Electron transport and protection of liver slices in the late stage of paracetamol injury of the liver. *Br J Pharmacol*; Suppl: 825P

Olinga P, Groen K, Hof IH, De Kanter R, Koster HJ, Leeman WR, Rutten AA, Van Twillert K, Groothuis GM. (1997). Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 38: 59-69.

Olinga P, Hof IH, Merema MT, Smit M, de Jagar MH, Swart PJ, Slooff MJ, Meijer DK, Groothuis GM. (2001). The applicability of rat and human liver slices to the study of mechanisms of hepatic drug uptake. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 45: 55-63.

Parrish AR, Dorr RT, Gandolfi AJ, y Brendel K. (1994). Adult rat myocardial slices: a tool for the study of comparative cardiotoxicity. *In Vitro Toxicol* 8: 1233-1237.

Parrish AR, Wishnies SM, Dorr RT, Gandolfi AJ, y Brendel K. (1994b). Coculture of rabbit liver and myocardial slices: potentiation of the cardiotoxicity of allyl alcohol but not allylamine. *In Vitro Toxicol* 7: 53-57.

Parrish AR, Gandolfi AJ y Brendel K (1995). Precision cut liver slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life sci* 57: 1887-1901.

Parrish AR, Fisher R, Bral CM, Burghardt RC, Gandolfi AJ, Ramos KS. (1998). Benzo(a)pyrene-induced alterations in growth-related gene expression and signaling in precision-cut adult rat liver and kidney slices. *Toxicol Appl Pharmacol*. 152: 302-308.

Parrish AR, Zheng XH, Turney KD, Younis HS, Gandolfi AJ. (1999). Enhanced transcription factor DNA binding and gene expression induced by arsenite or arsenate in renal slices. *Toxicol Sci*. 50: 98-105.

Parrish AR, Sallam K Nyman DW, Orozco J, Cress AE, Dalkin BL, Nagle RB y Gandolfi AJ. (2002). Culturing Precision-Cut Human prostate slices as an *in vitro* Model of prostate Pathobiology *Cell Biol toxicol* 18: 205-219.

Pedraza-Chaverri J, Alatorre-Gonzalez MC, Pena JC, y Garcia-Sainz JA. (1986). Pertussis toxin enhances the beta-adrenergic and blocks the alpha 2-adrenergic regulation of renin secretion in renal cortical slices. *Life Sci* 38:1005-1011.

Price RJ, Renwick AB, Wield PT, Beamand JA, Lake BG. (1995). Toxicity of 3-methylindole, 1-nitronaphthalene and paraquat in precision-cut rat lung slices. *Arch Toxicol*. 69: 405-9.

Price RJ, Mistry H, Wield PT, Renwick AB, Beamand JA, Lake BG. (1996). Comparison of the toxicity of allyl alcohol, coumarin and menadione in precision-cut

rat, guinea-pig, cynomolgus monkey and human liver slices. *Arch Toxicol.*71: 107-111.

Price RJ, Renwick AB, Walters DG, Young PJ, Lake BG. (2004). Metabolism of nicotine and induction of CYP1A forms in precision-cut rat liver and lung slices. *Toxicol In Vitro.* 18: 179-185.

Said-Fernández S, Carranza-Rosales, MP, Elizondo-Herrera A, Vargas-Villarreal J, González-Ramírez D, y Martínez-Rodríguez H. (1997). Modelos celulares para el estudio de efectos tóxicos de fármacos y metales pesados. *Gaceta Médica de México* 33: 586-593.

Sawyer TW, Wilde PE, Rice P, Weiss MT. (1995). Toxicity of sulphur mustard in adult rat lung organ culture. *Toxicology.*100: 39-49.

Sivapathasundaram S, Howells LC, Sauer MJ, Lonanides C. (2004). Functional integrity of precision-cut liver slices from deer and cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 27: 79-84.

Smith JH, y Hook JB. Mechanism of chloroform nephrotoxicity. II. (1983). In vitro evidence for renal metabolism of chloroform in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 70: 480-485.

Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Putnam CW, Zukoski CF 3rd, Davis WM, y Brendel K. (1985). Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. *Life Sci* 8: 1367-1375.

Smith PF, Krack G, McKee RL, Johnson DG, Gandolfi AJ, Hrubby VJ, Krumdieck CL, Brendel K. (1986). Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 22 :706-712.

Southard JH, Rice MJ, Ametani MS, y Belzer FO. (1985). Effects of short-term hypothermic perfusion and cold storage on function of the isolated-perfused dog kidney. *Cryobiology* 22: 147-155.

Southard JH, Rice MJ, y Belzer FO. (1985b). Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP synthesis in hypothermically perfused dog kidneys. *Cryobiology* 22: 237-242.

Stefaniak MS, Krumdieck CL, Gandolfi AJ y Brendel BG. (1992). Biochemical and histological characterisation of agar-filled precision cut lung slices in dynamic organ culture as an in vitro tool. *In vitro toxicology.* 5: 7-19.

Togashi H, Shinzawa H, Wakabayashi H, Nakamura T, Yong H, Yamada N, Ukai K, Okuyama Y, Takahashi T, y Ishikawa M. (1991). Superoxide is involved in the

pathogenesis of paraquat-induced injury in cultured rat liver slices. *Hepatology* 14: 707-714.

Turney KD, Parrish AR, Orozco J, Gandolfi AJ. (1999). Selective activation in the MAPK pathway by Hg(II) in precision-cut rabbit renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol.* 160: 262-270.

Umachandran M, Howarth J, Ioannides C. Metabolic and structural viability of precision-cut rat lung slices in culture. (2004). *Xenobiotica.* 34: 771-780.

Uwaifo AO. (1984). Inhibition of oxygen uptake in liver slices of three mammalian species (rat, rabbit, guinea-pig) by aflatoxin B1 (AFB1). *Toxicology* 1: 33-39.

Verea E, Ponsoda X, Molowny A, Dansher G y Lopez Garcia C. (2001). Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue. *J Neurosci Methods* 110: 57-63.

Verrill C, Davies J, Millward-Sadler H, Sundstrom L, Sheron N. (2002). Organotypic liver culture in a fluid-air interface using slices of neonatal rat and adult human tissue--a model of fibrosis in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 48: 103-110.

Vickers AE, Fisher RL, Brendel K, Guertler J, Dannecker R, Keller B, Fischer V. (1995). Sites of biotransformation for the cyclosporin derivative SDZ IMM 125 using human liver and kidney slices and intestine. Comparison with rat liver slices and cyclosporin A metabolism. *Drug Metab Dispos.* 23: 327-33.

