

Estructuras subcelulares del Hepatoma 22. II. Distribución intracelular de la Glucosa-6-fosfatasa, la NADH-Citocromo C reductasa, la 5'Nucleotidasa y el Colesterol

J. W. DÍAZ, A. LAGE Y M. RAMOS

Lab. de Bioquímica, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, MINSAP, La Habana, Cuba

Recibido: 16 de junio de 1976

ABSTRACT. The intracellular distribution of cholesterol and three microsomal enzymes have been studied by tissue fractionation experiments carried out simultaneously on hepatoma 22 and non-neoplastic liver of the host mice. The total Glucose-6-phosphatase activity is considerably less in tumor than in liver. In liver, NADH-Cytochrome C reductase and Glucose-6-phosphatase, are concentrated in the microsomal fraction with very similar distributions. 5'Nucleotidase and cholesterol present a bimodal distribution, being concentrated in the nuclear and microsomal fractions. In the tumoral tissue the Glucose-6-phosphatase activity is mainly concentrated in the light mitochondrial fraction (L). NADH-Cytochrome C reductase activity behaves in both tissues as a typical microsomal constituent. The sedimental behaviour of cholesterol and 5'Nucleotidase in liver and tumor allows them to be considered as plasma membrane markers.

RESUMEN. Se presentan las distribuciones de 4 constituyentes de la fracción microsomal en experimentos de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial realizados simultáneamente en Hepatoma 22 y en el hígado no tumoral del ratón portador. La actividad total de Glucosa-6-fosfatasa en el tumor es considerablemente menor a la correspondiente del hígado. En hígado, la NADH-Citocromo C reductasa y la Glucosa-6-fosfatasa se asocian íntimamente concentrándose en la fracción microsomal, por otra parte la 5'Nucleotidasa y el colesterol presentan una distribución bimodal concentrándose en las fracciones nuclear y microsomal. En el tejido tumoral la actividad de Glucosa-6-fosfatasa se concentra principalmente en la fracción L. La NADH-Citocromo C reductasa se comporta en ambos tejidos como un constituyente típicamente microsomal. El comportamiento de sedimentación del Colesterol y la 5'Nucleotidasa en hígado y tumor permite considerarlos en primera aproximación como marcadores de membrana plasmática.

INTRODUCCION

El presente trabajo forma parte de un estudio bioquímico del Hepatoma 22 de ratón, tumor trasplantable empleado frecuentemente como modelo para la investigación terapéutica en Oncología. Tal estudio es un pre-requisito indispensable para la evaluación bioquímica de la respuesta del tumor a diferentes métodos de tratamiento.

En trabajos anteriores presentamos un estudio de la presencia y actividad de enzimas marcadoras (*Lage y cols., 1975*) y de la distribución intracelular de constituyentes de la fracción mitocondrial (*Lage y cols., 1977*) utilizando la técnica de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial, realizada simultáneamente en el tejido tumoral y en el hígado no tumoral del ratón portador.

En este trabajo presentamos un estudio de la distribución intracelular y propiedades de los principales constituyentes que se concentran en la fracción microsomal.

MATERIALES Y METODOS

La obtención del tejido, homogeneización, centrifugaciones y procesamiento de los datos resultantes se efectuó en igual forma que en el trabajo precedente (*Lage y cols., 1977*).

La glucosa-6-fosfatasa (3.1.3.9) se dosificó siguiendo el método de de Duve y cols., (1955), utilizando glucosa-6-fosfato de sodio 40 mM como sustrato, tamponado a pH 6.6, y midiendo el fósforo liberado según Fiske y Subbarow, (1925), a 660 nm.

La NADH-Citocromo C reductasa (1.6.2.1) se dosificó midiendo la reducción del Citocromo C a 550 nm, utilizando como sustrato Citocromo C 5.2×10^{-5} M y NADH 0.07 mM, tamponado a pH 7.0, siguiendo la técnica de de Duve y cols., (1955).

La 5'Nucleotidasa fue ensayada midiendo el fósforo liberado a 660 nm según la técnica de Fiske y Subbarow, (1925), utilizando como sustrato 5'AMP 2 mM tamponado a pH 7.4, siguiendo la técnica de Wattiaux-De Coninck y Wattiaux, (1969).

Para la dosificación del Colesterol se empleó la técnica de Abell y cols., (1958), aumentando a 4 ml el volumen extraído de la fase éter y disminu-

yendo a 1.5 ml la cantidad de reactivo para desarrollo del color con el fin de aumentar la sensibilidad. Las estimaciones de proteína se hicieron utilizando el método de Lowry y cols., (1951).

El empleo de las técnicas enzimáticas mencionadas fue precedido de un estudio cinético para verificar la linealidad de la reacción y la validez de las unidades empleadas.

Se realizaron experimentos complementarios de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa y de la metal dependencia de la actividad de la 5'Nucleotidasa. En el experimento de inhibición de la actividad de Glucosa-6-fosfatasa se utilizaron homogenados totales de hígado y de tumor. Los homogenados se pre-incubaron durante 30 minutos en tampón acetato pH 5.0 a 37°C. Al final de la pre-incubación el pH era llevado a 6.5 con tampón Tris-maleato-EDTA de concentración muy superior, añadiéndose entonces el sustrato e iniciándose la incubación para la medición de la actividad enzimática. La metal dependencia de la 5'Nucleotidasa fue ensayada también en homogenados totales en la forma usual utilizando tres condiciones diferentes las normales del test usando Cl_2Mg 16 mM, sin añadir Mg a la mezcla sustrato, y sin añadir Mg pero añadiendo EDTA 16 mM como quelante.

La comparación de distribuciones entre hígado y tumor se realizó mediante un test de diferencias de medias, empleando la distribución t de Student para pequeño muestreo. Se consideran y discuten como diferencias significativas aquellas con una probabilidad inferior al 5% en hipótesis nula. Los % de sobreposición de áreas en los histogramas de distribución se estimaron gráficamente.

RESULTADOS

Valores totales. La Tabla I muestra los valores totales de actividad enzimática y contenido de colesterol. Se toma como tal la suma del contenido de las fracciones N (nuclear) y E (sobrenadante postnuclear). Destaca la considerable disminución de actividad de glucosa-6-fosfatasa en el tumor.

Distribuciones y asociaciones de marcadores. La Fig. 1 muestra los histogramas de distribución de los marcadores enzimáticos y químicos empleados. En el hígado del animal portador se distinguen claramente dos grupos de asociación; por una parte las distribuciones de NADH-Citocro-

mo C reductasa y Glucosa-6-fosfatasa son prácticamente idénticas, exhibiendo ambas una típica distribución microsomal (P) con más de un 95% de sobreposición de áreas, por otra parte el Colesterol y la 5'Nucleotidasa en hígado muestran una distribución bimodal en N y P, sobreponiéndose en un 87%. Ambos tipos de distribuciones difieren claramente entre sí.

TABLA I

Valores totales

Constituyente	Tejido	Contenido Total xg. de Tejido	Contenido por mg. de Proteína	n
NADH-Citocromo	H	14.0 (8.8) U/g	100.9 miliU	3
C Reductasa	T	7.0 (7.0) U/g	66.7 miliU	5
Glucosa-6-fosfatasa*	H	10.8 (2.8) U/g	77.9 miliU	3
	T	0.4 (0.2) U/g	3.8 miliU	3
5'Nucleotidasa	H	3.0 (2.6) U/g	21.6 miliU	4
	T	1.9 (1.4) U/g	18.1 miliU	4
Colesterol	H	2.6 (1.7) mg/g	18.7 mg	4
	T	4.5 (2.2) mg/g	42.9 mg	4
Proteínas totales (a)	H	138.7 (25.7) U/g		6
	T	105.0 (21.2) U/g		6

Se toma como "valor total" la suma del contenido de la fracción nuclear (N) y el sobrenadante de la centrifugación para precipitar N (fracción E), ésta contiene las fracciones M, L, P y S. La suma de N y E se toma como equivalente al homogenado total. H y T son respectivamente hígado y tumor. n es el número de determinaciones independientes. Entre paréntesis se ofrecen las desviaciones standard. (a) son datos tomados de Lage y cols., 1977, Tabla III, con autorización del autor.

* La diferencia entre el contenido de Glucosa-6-fosfatasa en hígado y tumor es significativa al 1%.

La Tabla II presenta una comparación de las actividades de NADH-Citocromo C reductasa y Glucosa-6-fosfatasa en las fracciones M (mitocondrial) y P del hígado. La relación de actividades entre ambas enzimas es la misma para las dos fracciones M y P, igualmente la relación entre la actividad en P y la actividad en M es la misma para ambas enzimas.

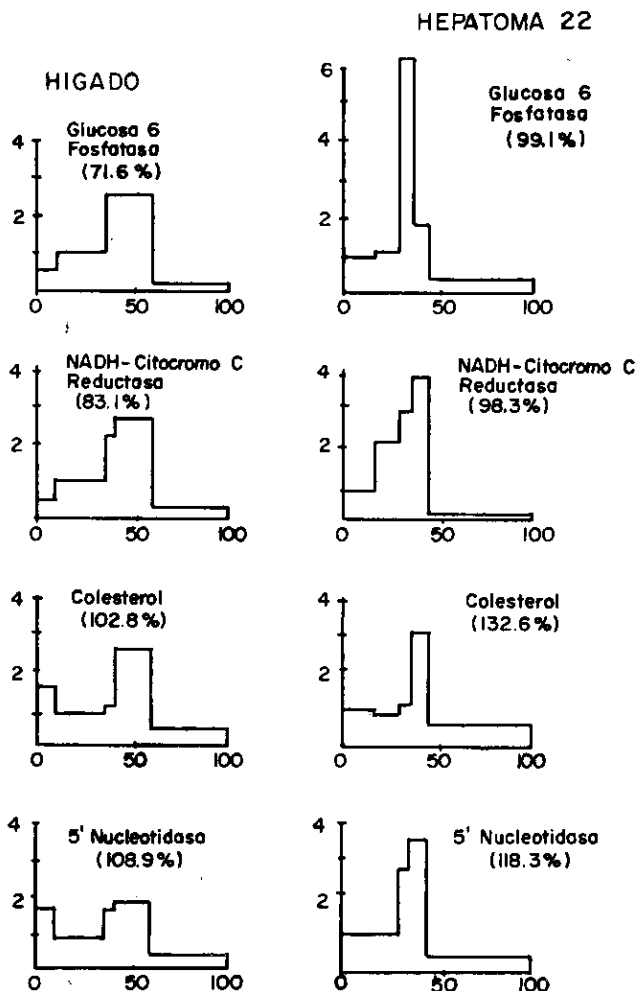


Fig. 1. HISTOGRAMAS DE DISTRIBUCION. Cada barra en el histograma representa una fracción, la altura es la actividad específica relativa del constituyente en la fracción definida como el cociente entre el % del constituyente en esa fracción y el % de proteínas de la fracción. El ancho de la barra representa el % de proteínas en la fracción. El histograma fue elaborado con los valores promedio de n fraccionamientos indicados en la Tabla III. Los valores entre paréntesis son de la recuperación promedio esto es, el cociente entre la suma de las actividades en todas las fracciones para un constituyente y la suma de las fracciones N y E que se toma como equivalente al homogenado inicial (100% de actividad). Las recuperaciones promedio de proteínas para hígado y tumor fueron respectivamente 94.3 y 99.4%.

TABLA II

Comparación de actividades y distribución de enzimas microsomales en las fracciones M y P.

Enzima	% en M	% en P	U/g en M	U/g en P	Relación-P/M (U/g)
NADH-Citocromo C Reductasa	27.3	42.6	3.32	5.96	1.80
Glucosa-6-fosfatasa	25.0	41.6	2.71	4.5	1.66
Relación NADH/G6F			1.23	1.24	1.66

Las columnas de % dan el contenido de la enzima para cada fracción expresado como % de la suma de las fracciones. U/g son unidades de actividad enzimática por gramo de tejido. La tercera fila indica la relación entre las actividades de NADH-Citocromo C reductasa y Glucosa-6-fosfatasa para cada fracción. Los valores son los promedios de n fraccionamientos (Tabla I).

En el tejido tumoral se mantiene la asociación de Colesterol y 5'Nucleotidasa (87% de sobreposición). Por el contrario, las distribuciones de NADH-Citocromo C reductasa y Glucosa-6-fosfatasa pierden en el tumor su asociación. La NADH-Citocromo C reductasa mantiene su distribución microsomal mientras que la actividad de Glucosa-6-fosfatasa se concentra primariamente en la fracción de mitocondrias ligeras (L), coincidiendo mejor con la distribución de fosfatasa ácida (84% de sobreposición) (Lage y cols., 1977a) que con la de NADH-Citocromo C reductasa (69% de sobreposición).

Comparación de distribuciones porcentuales en hígado y tumor. La Tabla III muestra los valores de las actividades enzimáticas y contenido de Colesterol en cada fracción, expresadas como % de la suma de las fracciones. La distribución de NADH-Citocromo C reductasa en el tejido tumoral no difiere de la correspondiente al hígado. La actividad de Glucosa-6-fosfatasa en la fracción P del tumor es significativamente menor que la correspondiente al hígado, esta actividad que falta en la fracción P del tumor aparece distribuida en N, S (soluble) y L mostrando un pico de purificación en esta última fracción, donde aparece más del 30% de la actividad.

TABLA III

Distribuciones porcentuales de los constituyentes

Constituyente	Tejido	n	% en N	% en M	% en L	% en P	% en S
NADH-Citocromo	H	3	6.9(2.7)	27.3(3.2)	16.6(7.1)	42.6(9.7)	6.4(1.5)
C Reductasa	T	5	14.4(7.3)	29.6(4.3)	15.2(3.4)	32.4(8.4)	8.4(2.9)
Glucosa-6-fosfatasa	H	3	5.9(2.4)	25.0(12.0)	18.8(16.8)	41.6(3.2) ^d	8.7(1.5)
	T	3	17.0(12.4)	15.8(11.7)	32.2(30.7)	15.3(14.6)	19.6(17.4)
5'Nucleotidasa	H	4	17.8(9.3)	20.2(3.9)	12.4(1.2)	29.3(8.3)	20.4(9.2)
	T	4	16.6(15.2)	14.7(9.5)	14.4(9.7)	30.1(20.0)	24.1(11.1)
Colesterol	H	4	16.5(6.1)	17.5(4.5)	7.3(5.6)	41.8(18.0)	16.8(16.0)
	T	4	17.0(3.5)	11.1(4.5)	5.8(4.9)	30.5(25.1)	35.8(27.5)
Proteínas totales (a)	H	6	10.5(4.1)	25.5(3.9)	7.4(2.5)	16.4(1.7)	40.4(2.9)
	T	6	16.6(11.2)	13.9(5.3)	5.2(2.2)	8.4(2.4)	56.0(6.4)

^d diferencia significativa al 5% entre hígado y tumor.

La Tabla de los valores del % de actividad enzimática o cantidad de un constituyente químico, en cada fracción, tomando la suma de las fracciones como 100%. Entre paréntesis las desviaciones standard. n es el número de fraccionamientos incluidos en el cálculo. H y T son respectivamente hígado y tumor. Las fracciones N, M, L, P y S son respectivamente nuclear, mitocondrial, mitocondrial ligera, microsomal y soluble de acuerdo al esquema de de Duve y cols., 1955 (a) son datos tomados de Lage y cols., 1977, Tabla IV, con autorización del autor.

La comparación de distribuciones hígado-tumor para el Colesterol y la 5'Nucleotidasa no muestran diferencias significativas.

Experimento de inhibición de la actividad de Glucosa-6-fosfatasa.

La Tabla IV muestra el efecto de la pre-incubación del homogenado a pH 5.0 y 37°C durante 30 minutos, sobre la actividad de Glucosa-6-fosfatasa en hígado y tumor. La actividad de Glucosa-6-fosfatasa del hígado es inhibida en un 84% en estas condiciones mientras que la actividad en el tejido tumoral apenas es inhibida.

TABLA IV

Efecto de la pre-incubación a pH 5 sobre la actividad de glucosa-6-fosfatasa^a

		Absorbancia 660 nm	% del test normal
Hígado	test normal	0.628	100
	homogenado pre-incubado	0.100	16
Hepatoma	test normal	0.065	100
	homogenado pre-incubado	0.048	74

^a promedio de 2 experimentos.

Metal dependencia de la actividad de 5'Nucleotidasa. La Tabla V muestra los resultados de mediciones de la actividad de 5'Nucleotidasa en homogenados totales en presencia y en ausencia de iones Mg^{++} evidenciando que la actividad de esta enzima es metal dependiente y que esta propiedad permite distinguir la actividad de la misma de las de otras fosfatasas inespecíficas.

TABLA V

Metal dependencia de la actividad de 5'Nucleotidasa

Condiciones del test	U/g total	,% test normal	tejido
Normales Mg^{++} 16 mM	0.736	100.0	H
	0.467	100.0	T
Sin magnesio	0.494	68.0	H
	0.319	68.3	T
Sin magnesio EDTA 16 mM	0.100	13.8	H
	0.128	27.7	T

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Valores totales. El cuadro de actividades totales concuerda con lo presentado y discutido anteriormente (*Lage y cols., 1975*).

Localización intracelular de la actividad de NADH-Citocromo C reductasa. En hígado de rata se ha reportado desde los primeros fraccionamientos una distribución bimodal de esta enzima entre las fracciones M y P. Dada la escasa contaminación de otros marcadores microsomales en la fracción M era imposible atribuir la presencia de esta enzima en M a contaminación de la fracción con membranas del retículo endoplásmico (*de Duve y cols., 1955; Sottocasa y cols., 1967*). Este hecho, más la comprobación ulterior de que en una fracción mitocondrial esta reducción del citocromo "externo" era insensible a diferentes inhibidores del transporte de electrones por la cadena respiratoria y que carecía de fosforilación acoplada, hicieron plantear la existencia de un sistema transportador de electrones diferente a la cadena respiratoria y similar al sistema microsomal en las mitocondrias (*Ernster y cols., 1963*). Tal hipótesis resulta confirmada en 1967 con experimentos de subfraccionamientos de mitocondrias que permitieron establecer la existencia de tal sistema en la membrana externa mitocondrial, con componentes similares o idénticos a la NADH-Citocromo b_5 reductasa y el Citocromo b_5 microsomales (*Sottocasa y cols., 1967*). En nuestros fraccionamientos la actividad de NADH-Citocromo C reductasa se comporta como un constituyente típicamente microsomal.

La Tabla II muestra que los % de NADH-Citocromo C reductasa y Glucosa-6-fosfatasa en M y P son respectivamente similares, al igual que la relación P/M para ambas enzimas. Tales datos permiten atribuir la actividad de NADH-Citocromo C reductasa en la fracción M a contaminación microsomal y la existencia o no de un sistema transportador de electrones en la membrana mitocondrial externa en el hígado de ratón C3HA debe ser establecida por experimentos más específicos.

Por otra parte, la actividad de NADH-Citocromo C reductasa ha sido separada de la actividad de Glucosa-6-fosfatasa de esa fracción en hígado de rata con distribuciones diferentes en un gradiente isopícnico de la fracción P (*Amar-Costesec y cols., 1969*), interpretándose este resultado como indicador de la heterogeneidad del retículo endoplasmático. Los resultados de nuestros fraccionamientos por el momento establecen una

estrecha asociación y la posibilidad de separación debe ser evaluada posteriormente.

Naturaleza de la actividad de Glucosa-6-fosfatasa en el Hepatoma 22.

La Glucosa-6-fosfatasa ha sido reportada en otros experimentos de fraccionamiento en tejido hepático como un marcador de retículo endoplásmico, que sedimenta principalmente en la fracción P, sobreponiéndose su distribución a la de la NADH-Citocromo C reductasa y otros marcadores microsomales (*de Duve, 1971*). Eso ocurre también en el hígado del ratón portador C3HA, sin embargo en el Hepatoma 22 la distribución se modifica completamente y sólo el 15% de la actividad se recupera en la fracción P mientras que más del 30% sedimenta en L donde se alcanza la máxima purificación.

Si bien se han obtenido distribuciones ligeramente diferentes para la Glucosa-6-fosfatasa y la NADH-Citocromo C reductasa en gradiente isopícnico de la fracción P (*Amar-Costesec y cols., 1969*), resulta difícil explicar la diferencia tan notable que encontramos entre hígado y tumor en términos de esta heterogeneidad del retículo endoplásmico.

Dado que la distribución de Glucosa-6-fosfatasa en el tumor se obtiene a partir de valores totales muy bajos (Tabla I), resulta más lógico suponer que la Glucosa-6-fosfatasa, enzima propia de la función especializada del hepatocito en la regulación de la glicemia, se modifique o se pierda totalmente durante la desdiferenciación que implica el proceso de cancerización y que la escasa actividad detectada se deba a la presencia de otras fosfatasas poco específicas, en parte lisosomales, y con posibilidad de catalizar la hidrólisis del éster glucosa-6-fosfato. La propia fosfatasa ácida tiene esta actividad, si bien es sólo un 10% de su actividad sobre el B-glicerofosfato.

El resultado del experimento de inhibición por pre-incubación a pH 5.0 apoya esta hipótesis (Tabla IV), la glucosa-6-fosfatasa debe inhibirse casi totalmente como resultado de ese tratamiento, tal como sucede en el hígado del ratón portador. La ausencia de tal inhibición en el tejido tumoral indica que la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato en el Hepatoma 22 de distribución L no es el producto de la actividad de Glucosa-6-fosfatasa del retículo endoplásmico. Resultados similares han sido obtenidos para células de hepatoma de rata en cultivo (*López Saura, 1973*).

Membrana plasmática. La 5'Nucleotidasa es en hígado de rata el marcador más empleado de membrana plasmática y su distribución N-P refleja la distribución de los fragmentos de membrana que se producen durante la homogeneización (*de Duve, 1971*). Nuestros resultados sugieren un comportamiento similar en hígado de ratón C3HA y en Hepatoma 22, aunque no lo confirman por completo. El Colesterol sigue muy de cerca la distribución de 5'Nucleotidasa, en concordancia también con lo reportado para hígado de rata, donde se ha sugerido que podría considerarse como un marcador secundario de membrana plasmática (*Thines-Sempoux y cols., 1969*), este comportamiento se repite también en Hepatoma 22.

Como puede verse en la Fig. 1, si bien para ambos marcadores la distribución en hígado y tumor no presenta diferencias significativas en ninguna de las fracciones, la apariencia del histograma se modifica, borrándose el pico en N y elevándose aún más el pico en P para el tumor. Este resultado es interpretable en función de la localización de membranas plasmáticas que hemos asumido de la siguiente manera: si la actividad de 5'Nucleotidasa se asocia a componentes menores de las fracciones N y P, y no al componente principal que son los núcleos y el retículo endoplásmico respectivamente, entonces las variaciones en el contenido de proteínas de esas fracciones pueden ocurrir de modo independiente a las variaciones de la actividad de 5'Nucleotidasa modificando de esta forma el valor de la actividad específica relativa (AER, altura del pico en el histograma). Así, como en el tumor aumenta el % de proteínas en N y disminuye en P, la AER de marcadores de membrana resulta disminuida en un caso y aumentada en el otro.

Por tanto, la disminución del contenido proteico de la fracción P, atribuible a un menor desarrollo del retículo endoplásmico en los tumores y a una disminución de la cantidad de ribosomas unidos a membrana, no se acompaña de una disminución similar en el contenido de 5'Nucleotidasa de la fracción. En efecto, la actividad de 5'Nucleotidasa de la fracción P expresada por miligramo de proteína se duplica en el tumor (31.7 miliUnidades/mg de proteína en hígado y 65.1 en tumor) valores promedio de n mediciones. (Tabla III). El cuadro es completamente distinto cuando se trata de una actividad asociada al componente principal de la fracción, como es probablemente el caso de la NADH-Citocromo C reductasa cuya actividad en P disminuye en el tumor: paralelamente a la disminución del contenido proteico de la fracción, manteniendo en hígado

y tumor actividades por mg de proteínas similares (262.2 miliUnidades en hígado y 258.4 en tumor), lo cual sugiere que la disminución en la actividad de esta enzima se debe a la misma variación estructural causante de la disminución del contenido proteico.

Vistos de conjunto, por tanto, estos resultados apoyan el criterio de que la 5'Nucleotidasa en hígado y tumor no se asocia al componente principal de las fracciones N y P, si no a un componente menor, muy probablemente las membranas plasmáticas. El Colesterol parece tener un comportamiento similar, al menos en primera aproximación. Estas conclusiones deben ser sustentadas con experimentos de gradiente analítico de la fracción P, actualmente en ejecución.

Finalmente, dado que se ha reportado en células de hepatoma de rata en cultivo la ausencia de 5'Nucleotidasa, atribuyéndose la escasa hidrólisis del 5'AMP a fosfatasas inespecíficas (*López Saura, 1973*), evaluamos esta posibilidad, considerando la eventualidad de que la fosfatasa alcalina, parcialmente activa sobre nucleósidos-5'-fosfato, pudiese contribuir a deformar el histograma de distribución de 5'Nucleotidasa. Un criterio para distinguir entre estas dos posibilidades resulta del estudio de la metal-dependencia de la actividad de 5'Nucleotidasa. Los resultados de tal estudio que aparecen en la Tabla V no apoyan la idea de atribuir a la fosfatasa alcalina parte importante de la actividad microsomal de esta enzima, la actividad se comporta en ambos tejidos como metal-dependiente y esto es criterio a favor de la existencia real de 5'Nucleotidasa en el Hepatoma 22.

REFERENCIAS

- ABELL L. L., LEVY B. B., BRODIE B. B. AND KENDALL F. E. Cholesterol in serum. En: Seligson D. (Ed.) Standard Methods of Clinical Chemistry. Vol. 2, 26-33, Academic Press Inc., New York, 1958.
- AMAR-COSTESSEC A., BEAUFAY H., FEYTMANS E., THINES-SEMPoux D. AND BERTHET J. Subfractionation of rat liver microsomes. En: Gillette-Conney-Cosmidas-Estbrook-Fouts y Mannering (Eds.) Microsomes and drug Oxidations, 41.49, Academic Press Inc., New York, 1969.
- DE DUVE C., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., WATTIAUX R. AND APPELMANS F. Tissue fractionation studies. 6 Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604, 1955.
- DE DUVE C. Tissue fractionation. Past and present. *J. Cell. Biol.* 50, 20d, 1971.

- ERNSTER L., DALLNER G. AND AZZONE G. F. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. *J. Biol. Chem.* 238, 1124, 1963.
- FISKE C. H. AND SUBBAROW Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925.
- LAGE A., DÍAZ J. W., PÉREZ A. J. Y RAMOS M. Enzimas marcadoras en el Hepatoma 22. *Archivos Cubanos de Oncología y Radiobiología*, 2, 142, 1975.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. I. Distribución intracelular de la citocromo-C-oxidasa, la succinato deshidrogenasa, la catalasa, proteínas y ácidos nucleicos. *Revista Cenic*, 8, 23, 1977.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22 III. Distribución intracelular de la fosfatasa ácida y la catepsina D. Discusión general del esquema de fraccionamiento. *Revista Cenic*, 8, 297, 1977 a.
- LÓPEZ SAURA P. Estudio bioquímico de los organelos subcelulares de hepatoma de rata en cultivo de tejidos. Tesis de Maestría, Cenic, La Habana, 1973.
- LOWRY D. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- SOTTOCASA G. L., KUYLENSTIERNA B., ERNSTER L. AND BERGSTRAND A. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* 32, 415, 1967.
- THINES-SEMPOUX D., AMAR-COSTESSEC A., BEAUFAY H. AND BERTHET J. The association of cholesterol, 5'-nucleotidase, and alkaline phosphodiesterase I with a distinct group of microsomal particles. *J. Cell. Biol.* 43, 189, 1969.
- WATTIAUX-DECONINCK S. AND WATTIAUX R. Nucleoside diphosphatase activity in plasma membrane of rat liver. *BBA* 183, 119, 1969.