

## La intoxicación subaguda por la cicloheximida. Estudio morfológico del hígado y del páncreas

*P. Herranz, L. Ceballos, G. Herranz y A. Alonso*

### RESUMEN

Con este trabajo se pretende contribuir a la línea de investigación que estudia la inhibición de la carcinogénesis química con diversos agentes, entre ellos la cicloheximida.

Hasta el momento, los resultados publicados en la literatura precedente se refieren únicamente a los efectos causados por la toxicidad aguda de este antibiótico. En nuestro estudio presentamos las alteraciones observadas en el hígado y en el páncreas tras la administración de cicloheximida en dosis que producen una intoxicación subaguda tratando de correlacionarlas con la perturbación bioquímica subyacente. Igualmente describimos la restauración de estas lesiones celulares tras la supresión del antibiótico.

En el curso de una serie de trabajos sobre la inhibición de la carcinogénesis hepática inducida por la dietilnitrosamina, hemos estudiado el efecto, entre otros agentes, de la cicloheximida<sup>1</sup>. Existen en la bibliografía algunos trabajos, publicados recientemente sobre la toxicidad aguda de este antibiótico<sup>33, 12, 34, 35</sup>, pero no hemos encontrado datos relativos a los efectos de la intoxicación subaguda o crónica.

La cicloheximida (CHX) es una glutarimida producida por el *Streptomyces griseus* que ha sido ampliamente investigada en relación con la inhibición de la síntesis de proteína en una gran variedad de experimentos *in vitro* e *in*

vivo<sup>2, 3, 6, 21</sup>. Su acción parece deberse a una inhibición de la transferasa II y a un bloqueo simultáneo de la desagregación polisomal, produciendo una suspensión casi total de la incorporación de timidina en el ADN durante la fase S y una parálisis, en la fase G<sub>2</sub>, de la síntesis de proteínas medida por la incorporación de leucina marcada<sup>35</sup> pero sin que se haya descubierto interferencia alguna con la síntesis del ARN<sup>34</sup>.

En el presente trabajo se describen las alteraciones observadas en el hígado y páncreas tras la administración de CHX en dosis que inducen una intoxicación subaguda y la restauración de las lesiones celulares así provocadas tras la su-

presión del antibiótico. De este estudio se desprenden datos interesantes relativos a la correlación entre la perturbación bioquímica y la morfología ultraestructural de un proceso de injuria celular y su reparación.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon dieciséis ratas macho de raza Wistar de 180 g de peso, mantenidas en jaulas individuales en las condiciones ordinarias del criadero. Recibieron alimentación en forma de pienso compuesto de roedores con un contenido proteínico bruto del 21 %.

La CHX fue administrada por vía intraperitoneal, durante 8 días, a razón de 0,1125 mg por Kg de peso del animal y día. La solución se preparaba, inmediatamente antes de su aplicación, en suero salino. Esta dosis fue elegida como dosis subaguda, por demostrar en experiencias preliminares, usando diferentes niveles de dosis (1/3, 1/6, 1/12 y 1/24 de  $\frac{1}{2}$  DL<sub>50</sub>) que inducía cambios celulares intensos que no se acompañaban de necrosis celular (0,1125 mg/Kg de peso del animal equivalen a 1/12 de la DL<sub>50</sub>, según la estimación de Gottlieb). Dos animales murieron el día 9 y no han sido incluídos en este estudio. Los restantes fueron sacrificados por decapitación, dos cada día, entre los días 6 y 13 del comienzo de la experiencia, después de un período de ayuno de 16 horas.

Inmediatamente después de la muerte se pesaron los hígados y se tomaron fragmentos de hígado y páncreas para el examen electromicroscópico (procedimiento de rutina, con fijación en glutaraldehído-cacodilato, postfijación en osmio, inclusión en Epon 812, contraste con acetato de uranilo e hidróxido de plomo) y para microscopia convencional (fijación en formol y Carnoy, cortes de parafina a 5  $\mu$  y tinción con hematoxilina-eosina, cresil violeta, verde de metilo-pironina y PAS-hematoxilina).

#### RESULTADOS

El peso de los animales no mostró variaciones a lo largo de todo el experimento. El peso del hígado de los animales sacrificados entre los días 6 y 9 de comenzado el experimento estaba reducido en un 30 % con respecto al peso calculado según la regla de Grisham<sup>11</sup>, recuperando valores normales al final de la experiencia.

Los hallazgos en los animales sacrificados entre los días 6 y 9 eran muy semejantes y serán descritos en conjunto bajo la denominación de fase de intoxicación. A partir del día 10 y hasta el término del período experimental, los cambios observados son indicativos de un restablecimiento de la morfología normal y se incluyen colectivamente bajo la designación de fase de recuperación.

#### Hígado

*Fase de Intoxicación.* La arquitectura lobulillar general no se ha alterado. Llama la atención la reducción del volumen citoplásmico de los hepatocitos, de tal manera que el número de núcleos por unidad de superficie aparece fuertemente elevado. En la porción central del lobulillo, los sinusoides son más anchos que lo normal. Los núcleos celulares presentan una cuestionable disminución del volumen, pero los nucléolos parecen más grandes y numerosos. En el citoplasma, la basofilia ha perdido la disposición característica en grumos y aparece difusamente distribuida. El glucógeno está presente sólo en mínimas cantidades y limitado a las células de la periferia lobulillar. En los cortes semifinos de 1  $\mu$  coloreados por el azul de metileno se observa frecuentemente una intensa vacuolización de las células hepáticas del centro lobulillar, formada por extensos espacios vacíos ópticamente en el borde vecino al espacio de Disse. El citoplasma aparece

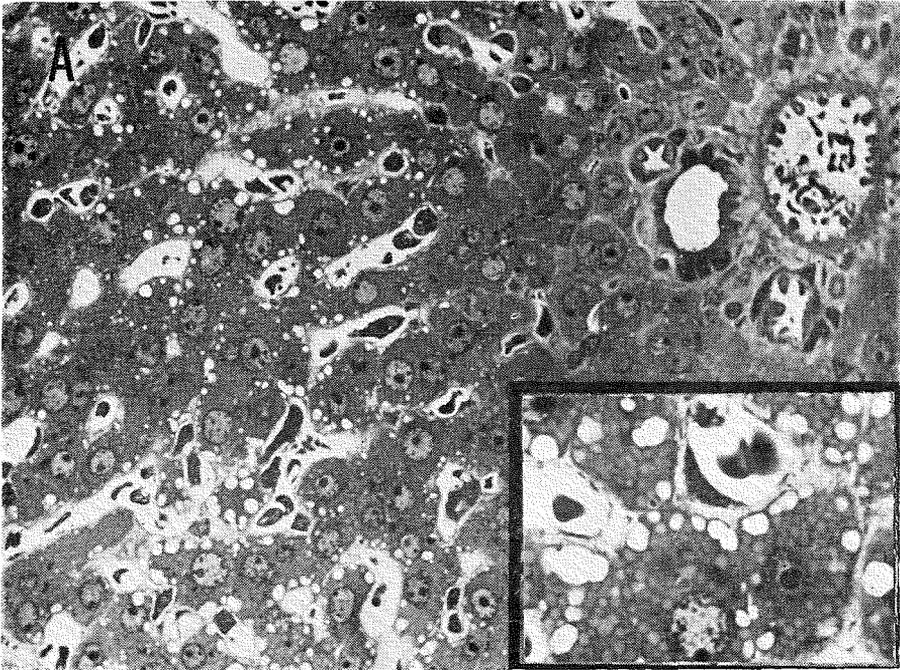
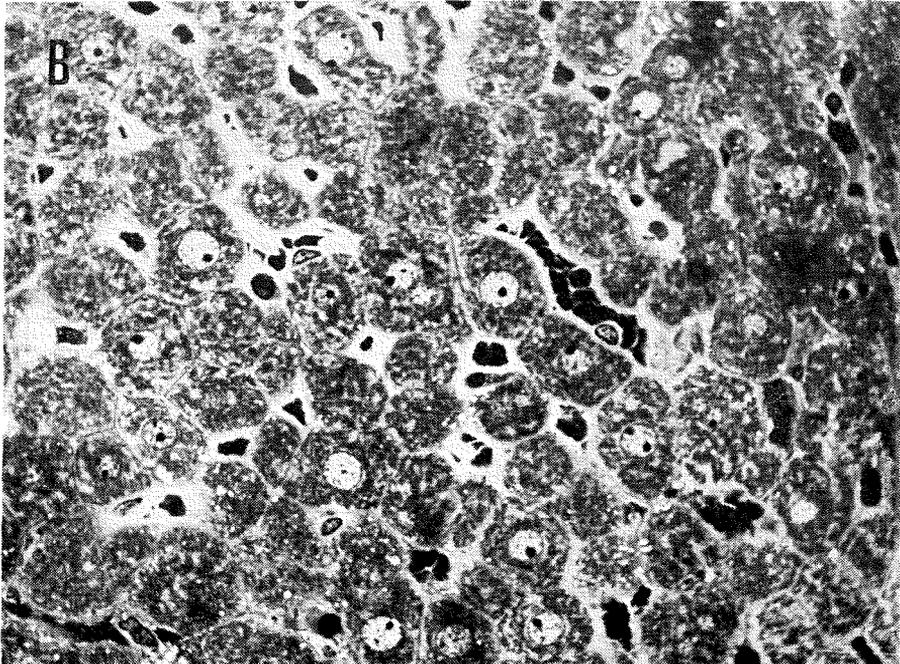


Fig. 1. A. Fase de intoxicación. B. Fase de recuperación. Cortes de  $1\mu$  (Epon, azul de metileno). Se aprecian las diferencias de tamaño celular y el contraste de la composición del citoplasma. En el recuadro, detalle mostrando el denso empaquetamiento de mitocondrias claras y redondeadas típicas de la fase de intoxicación



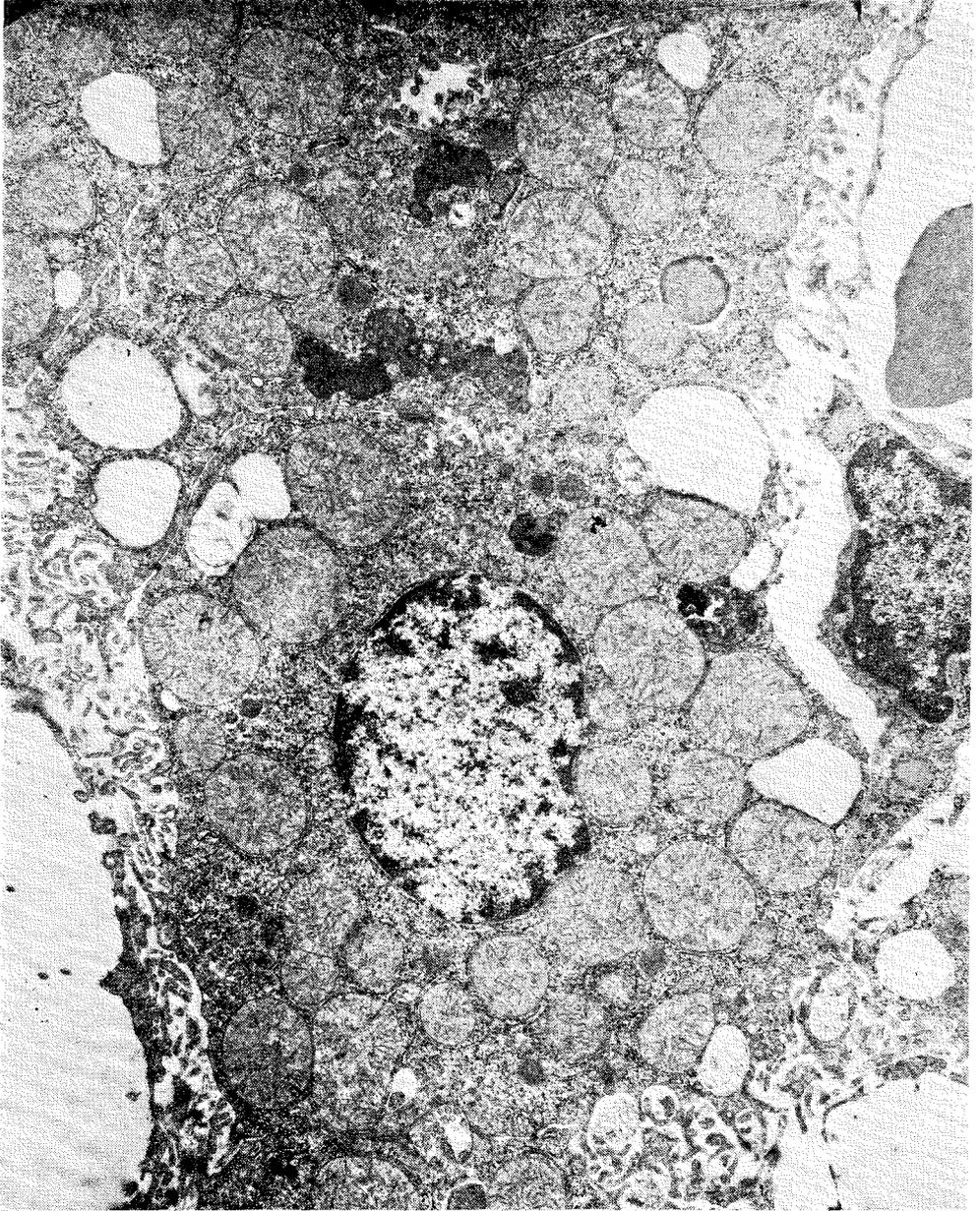


Fig. 2. Hígado, fase de intoxicación. Extrema reducción del volumen celular (hay áreas de 4 hepatocitos), con vacuolización del margen vecino al espacio de Disse, gran desarrollo de las microvellosidades, y característica transformación del citoplasma.

repleto de mitocondrias redondas y claras separadas por un fondo denso y basófilo (fig. 1A).

El microscopio electrónico revela (fig. 2) en primer lugar, un denso empaquetamiento de mitocondrias redondeadas con crestas normalmente desarrolladas y matriz densa, que están separadas por algunos sáculos del retículo endoplásmico rugoso, que frecuentemente las envuelve, y por una escasa cantidad de citoplasma fundamental en el que son predominantes los ribosomas, agrupados en cadenas. Los lisosomas peribiliares no son especialmente llamativos; aparecen, a veces, como cuerpos complejos de contenido denso en cuyo interior existen algunas vesículas y gránulos. El retículo endoplásmico liso ha desaparecido casi por completo, lo mismo que el glucógeno. Las zonas de Golgi son muy escasas en número, se localizan en el área próxima al núcleo y están reducidas a pequeños grupos de vesículas y sáculos de pequeñas dimensiones. La porción periférica del citoplasma, limitante con el espacio de Disse, de las células del centro lobulillar, contiene numerosas vesículas de tamaño que varía entre 0,5 y 4  $\mu$ , de perfil ligeramente poligonal, limitadas por una membrana. No es raro observar imágenes de fusión de vacuolas vecinas. Excepcionalmente se ha visto una comunicación directa de estas vesículas con el espacio de Disse. El contenido de estas vacuolas es muy permeable a los electrones y dentro de algunas de ellas están presentes pequeñas formaciones membranosas. La superficie celular muestra un desarrollo intenso de las microvellosidades en el espacio de Disse y un elevado número de vesículas de pinocitosis. Las áreas de contacto entre los hepatocitos, los canalículos biliares y las células de Kupffer son de apariencia normal.

*Fase de Recuperación.* Los cambios descritos desaparecen progresivamente en los días que siguen a la supresión de la

CHX, de tal modo que, a los 3 días, el cuadro microscópico del hígado se ha restablecido ampliamente (fig. 1B).

El microscopio electrónico revela (fig. 3) que las mitocondrias ocupan una fracción sensiblemente normal del citoplasma, gracias al rápido desarrollo del retículo endoplásmico liso, que contiene ya algunos pequeños acúmulos de glucógeno. El retículo endoplásmico rugoso aparece constituido ya por grupos paralelos de cisternas densamente cubiertas de ribosomas, los cuales parecen desarrollarse en áreas citoplásmicas circunscritas por mitocondrias. Algunas imágenes sugieren la posibilidad de que su crecimiento se deba, en parte, a la penetración de perfiles del retículo endoplásmico en el interior de los acúmulos de ribosomas libres, ahora mucho menos frecuentes que en la fase de intoxicación. Las zonas de Golgi se hacen visibles de nuevo pero no alcanzan su desarrollo normal en todo el tiempo de observación. Las vacuolas citoplásmicas yuxtasinusoidales han desaparecido en casi su totalidad, persistiendo solamente algunas, de pequeño tamaño (0,1 a 0,3  $\mu$ ) que contienen minúsculos remolinos de membranas. Los lisosomas y microcuerpos no muestran anomalías.

## Páncreas

*Fase de intoxicación.* La arquitectura general del órgano está preservada. La intensidad de las alteraciones presentes muestra ligeras diferencias de unas áreas a otras, que no parecen sistematizadas de modo característico. Lo más llamativo y constante es, en el microscopio de luz, la casi total desaparición de los gránulos de zinógeno junto a una fragmentación de la basofilia basal, la cual aparece reducida a filamentos ondulados, separados por espacios claros, que recorren prácticamente toda la longitud de la célula. Este cuadro es muy patente en los

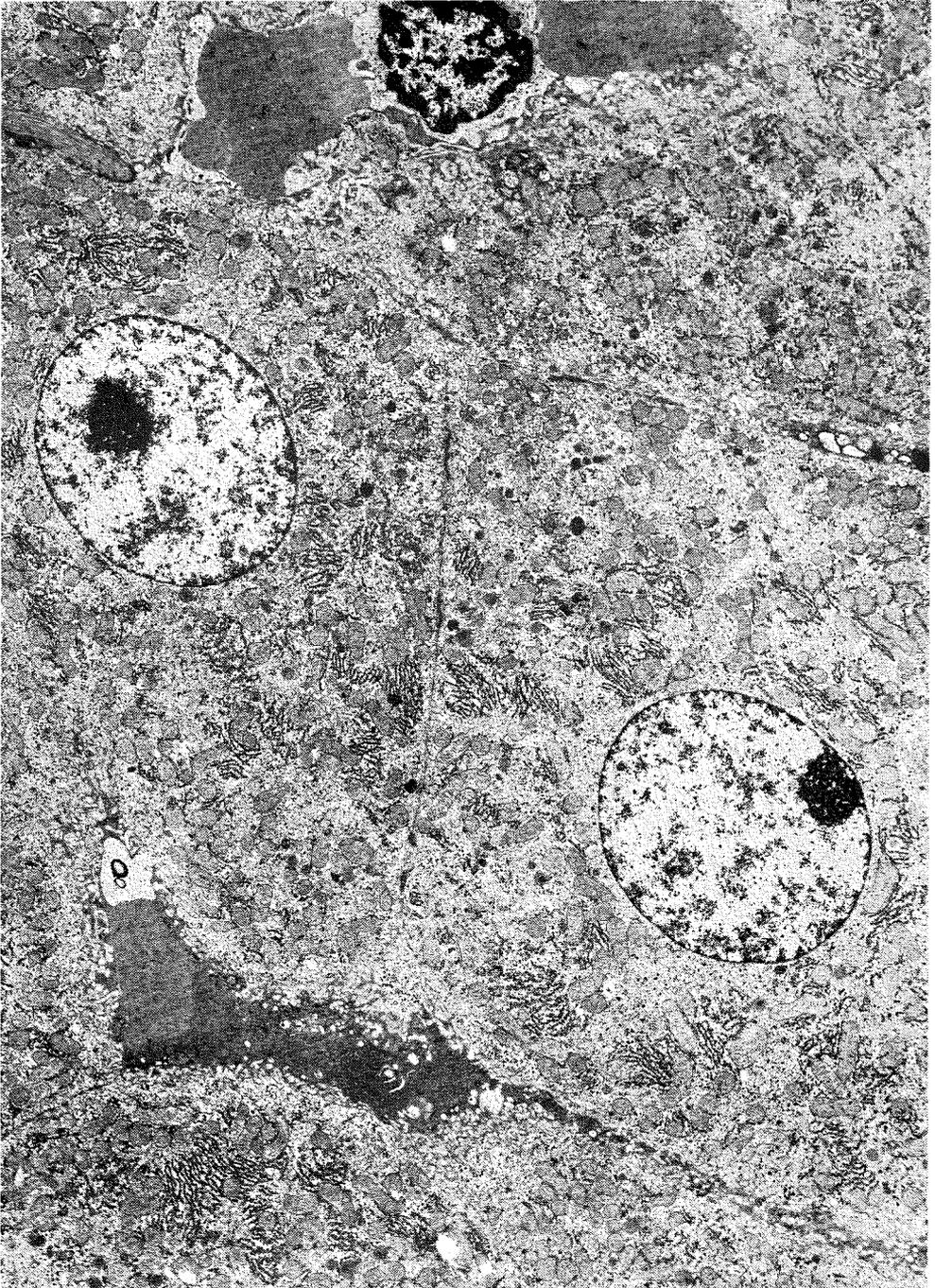


Fig. 3. Tres días después de la supresión de la CHX, restitución muy avanzada de la morfología normal.

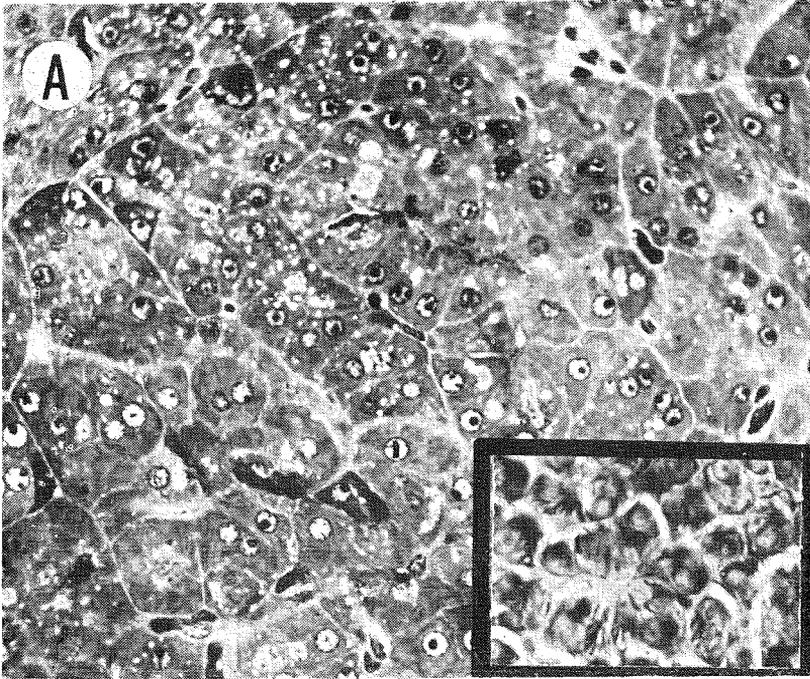
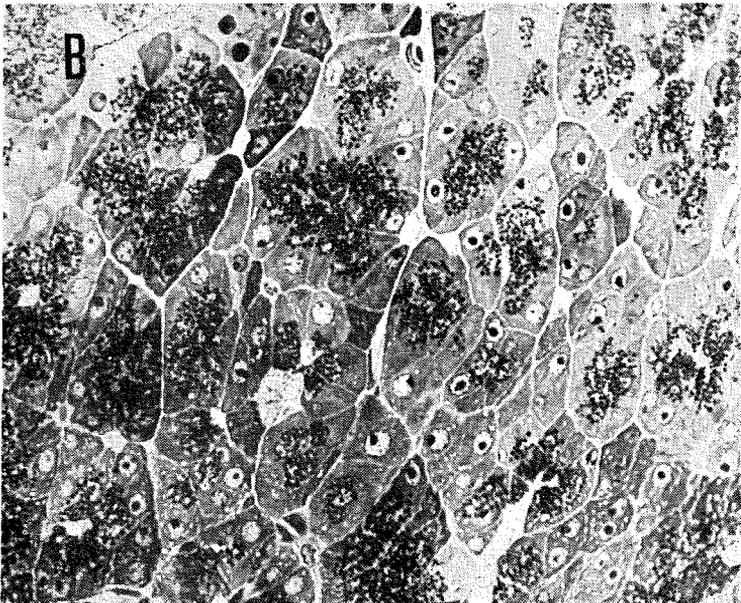


Fig. 4. Páncreas. A, Fase de intoxicación. B, Fase de recuperación. Es bien manifiesta la diferencia con respecto al contenido de gránulos secretorios. (Cortes de Epon, azul de metileno). En el recuadro tinción del páncreas con verde de metilo - pironina, mostrando la transformación laminar del ergastoplasma (fijación en Carnoy).



cortes teñidos por el verde metilo-pirónina. La reducción del volumen de las células acinares es patente y se debe preferentemente al acortamiento de la porción apical (fig. 4A).

Electromicroscópicamente, las alteraciones observadas consisten en la disminución muy marcada de gránulos de zimógeno, una hinchazón bastante difundida de las mitocondrias y de los sacos del RER y fragmentación vacuolar de la zona de Golgi. Los gránulos zimogénicos presentes son de reducidas dimensiones, de densidad variable y, generalmente acumulados en la porción apical de la célula (fig. 5). La hinchazón tanto mitocondrial como de los sacos del ergastoplasma eran fenómenos que se encuentran en una elevada proporción de células y se presentan siempre mutuamente asociadas. El edema mitocondrial se lo-

caliza en la matriz con rechazamiento periférico de las crestas y de la sustancia densa de la matriz (fig. 6).

El grado de dilatación de las cisternas del RER varía ampliamente entre células vecinas y dentro de una misma célula. El contenido de estos sacos dilatados es transparente a los electrones. El número de los ribosomas adheridos a los sacos es prácticamente normal. Las zonas de Golgi están constituidas por vesículas agrupadas, que pueden contener gránulos secretorios pequeños e inmaduros, estando los elementos lamelares pobremente desarrollados o ausentes.

*Fase de recuperación.* Durante esta fase se asiste a un restablecimiento progresivo y rápido de la morfología celular normal. En los dos primeros días se observa todavía una marcada dilatación de las mi-

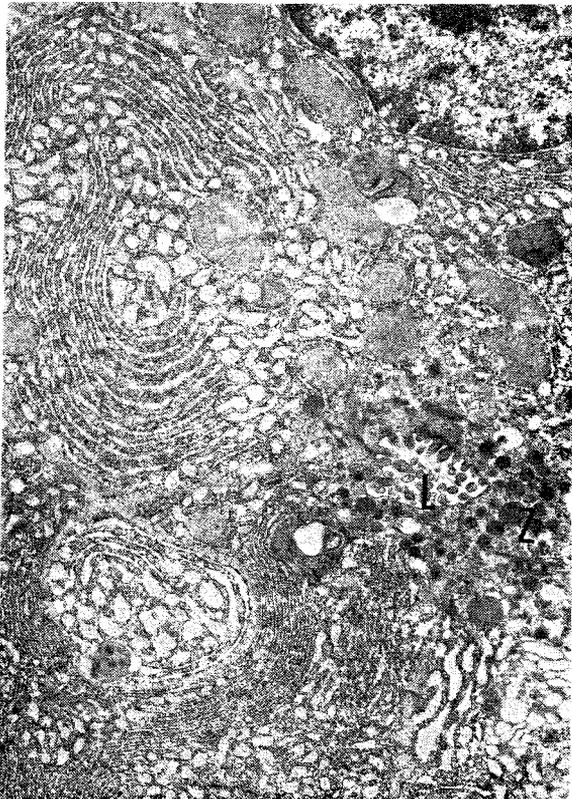


Fig. 5. Páncreas. Fase de intoxicación. Escaso número de gránulos secretorios (Z) en la proximidad de la luz (L) de un acino, junto a hinchazón irregular de los sacos del RER y de algunas mitocondrias.

tocondrias, con formación de remolinos membranosos en su interior, originadas aparentemente de la membrana interna (fig. 7), que han desaparecido por completo dos días después. El retículo endoplásmico rugoso se restituye muy pre-

cozmente y no presenta dilataciones anormales ya al comienzo de esta fase. La zona de Golgi muestra un desarrollo muy fuerte, con dilatación irregular de los sistemas saculares y gran número de microvesículas asociadas (fig. 8). Los

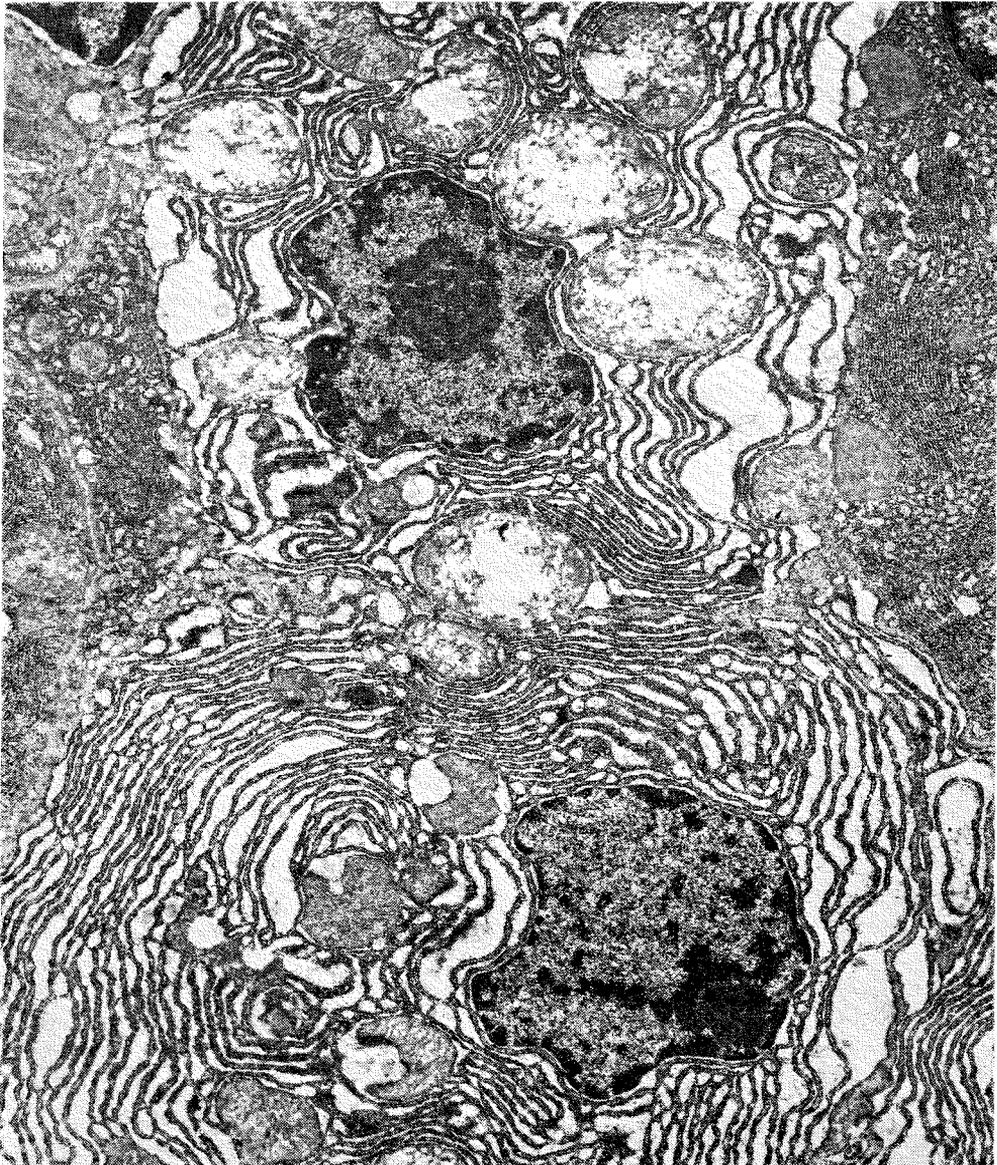


Fig. 6. Páncreas. Fase de intoxicación. Dilatación de los sacos del RER e hinchazón mitocondrial en dos células acinares. El citoplasma de las células vecinas no presenta tal alteración.

gránulos de prozimógeno, y de zimógeno son cada día más numerosos, de tal modo que en el quinto día igualan los observados en el páncreas normal tras 16 horas de ayuno (fig. 9).

#### DISCUSIÓN

Los hallazgos descritos muestran que la CHX, administrada a dosis subagudas, induce un patrón peculiar de alteracio-

nes en el hígado y en el páncreas, que difiere notablemente de los descritos tanto en la intoxicación aguda por esta droga como por otros agentes a los que se atribuye un efecto inhibitor de la síntesis de las proteínas. El cuadro morfológico se caracteriza en el hígado por una reducción marcada del volumen celular, debida principalmente a la desaparición del retículo endoplásmico liso y del glucógeno, quedando el citoplasma constituido por una densa agregación de

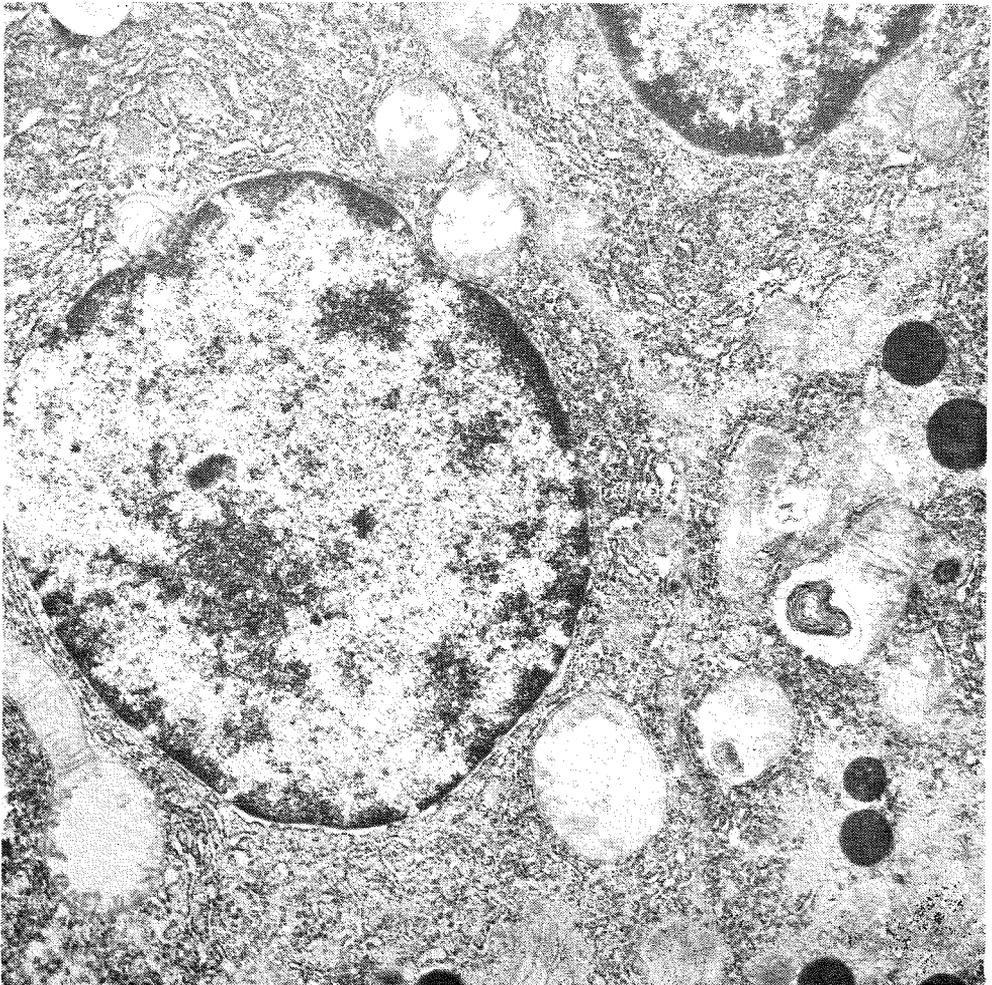


Fig. 7. Páncreas, 2.º día de la fase de recuperación. Persistencia de la hinchazón mitocondrial y formación de remolinos de membranas en algunas mitocondrias. La reanudación de la síntesis de zimógeno es patente.

mitocondrias separadas por una pequeña cantidad de sacos del retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres. En las células acinares del páncreas se observó

una desaparición prácticamente total de los granos de zimógeno junto a una moderada hinchazón de las mitocondrias y de los sacos del retículo endoplásmico

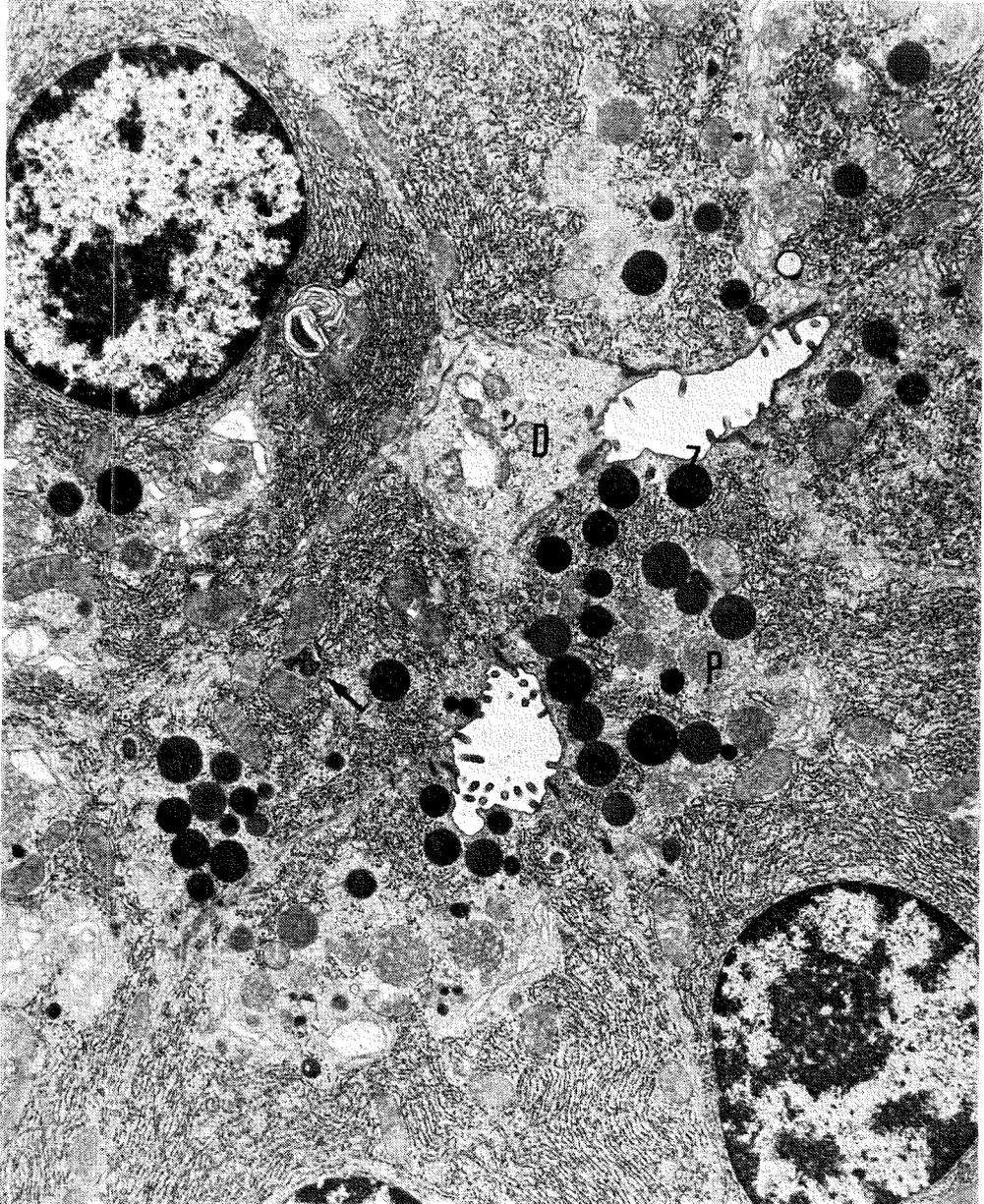


Fig. 8. Páncreas, 3.º día de la fase de recuperación. Gran desarrollo de las zonas de Golgi, abundantes gránulos de prozimógeno (P) y zimógeno (Z) y leves residuos de la alteración mitocondrial de días precedentes (flechas). D, célula centroacinar.

rugoso. Es llamativa la ausencia en ambos órganos de fenómenos de degradación focal del citoplasma, no habiéndose visto citofagosomas en ningún momento de la experiencia.

Estas alteraciones son reversibles en un corto espacio de tiempo, observándose una restitución de la morfología normal a los 3 días de la supresión de la CHX. Estos hallazgos apenas coinciden con los

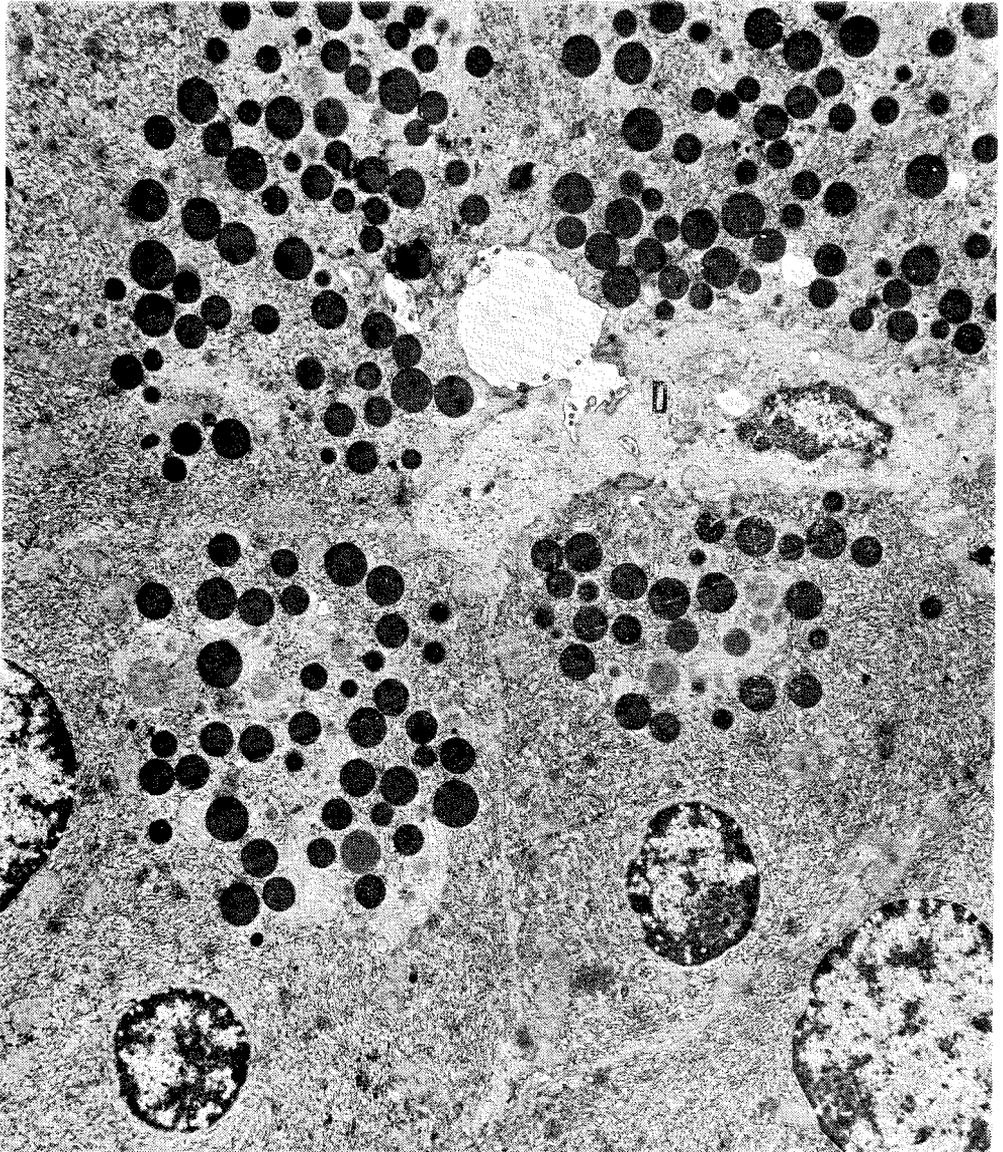


Fig. 9. Páncreas, 5.º día de la fase de recuperación, con abundante cantidad de gránulos de secreción maduros e inmaduros, gran desarrollo de las zonas de Golgi y ausencia de alteraciones en mitocondrias o RER.

descritos para la intoxicación aguda con CHX. En la intoxicación aguda, Harris y col.<sup>12</sup>, describieron alteraciones nucleares y nucleolares, fenómenos de degradación focal del citoplasma, hiperplasia del retículo endoplásmico liso, acumulación de grasa y alteraciones en la distribución de los ribosomas. Verbin y col.<sup>34</sup> sólo pudieron observar cambios estructurales mínimos tras la administración de una dosis única de 1,5 mg de CHX por Kg consistentes en desorganización del retículo endoplásmico rugoso y en vaciamiento del contenido de las zonas de Golgi. Con toda probabilidad han de atribuirse estas marcadas diferencias con nuestros resultados al diferente patrón de administración de la CHX y a la diferente duración de los experimentos, pues ambos grupos de autores aplicaron dosis entre 10 y 200 veces mayores que las usadas por nosotros e hicieron el estudio morfológico dentro de las 24 horas después del tratamiento.

La ausencia de proliferación del retículo endoplásmico liso y la falta de áreas de degradación citoplásmica constituyen dos interesantes hallazgos, ya que se considera que ambos fenómenos son un acompañamiento habitual de la reacción de la célula hepática a los estímulos tóxicos<sup>32, 28</sup>. El escaso desarrollo, prácticamente la desaparición casi completa del retículo endoplásmico liso del hepatocito, observado tras la administración de CHX significa probablemente que la droga interfiere de modo selectivo sobre los enzimas implicados en la síntesis de estos sistemas membranosos. No es fácil encontrar en la bibliografía referencias sobre la atrofia del retículo endoplásmico liso. En una revisión reciente (Goldblatt<sup>9</sup>), no se enumera la disminución o desaparición del retículo endoplásmico liso entre las alteraciones fisiológicas o patológicas de esta estructura, por lo que, en principio, podría considerarse este fenómeno como un efecto característico de la CHX sobre la célula hepática.

En el páncreas, la alteración básica del retículo endoplásmico ha sido la dilatación de los sacos del ergastoplasma sin degranulación aparente. La significación de este cambio no parece unívoca, pues tanto puede corresponder a diferentes fases fisiológicas, como a una respuesta inespecífica ante gran variedad de agentes (etionina<sup>20, 13</sup>; penuria proteica<sup>36</sup>; actinomicina<sup>27</sup>; yodoformo<sup>20</sup>; azaserina<sup>15</sup>; 2-acetilaminofluoreno<sup>8</sup>; kwashiorkor<sup>4</sup>; etc.). Su mecanismo se ha tratado de aclarar en el sentido de considerarlo como un fenómeno osmótico, como una alteración de la estructura molecular de las citomembranas o un reflejo de la deficiencia de la síntesis de proteínas cuya continua renovación es necesaria para mantener la organización del retículo endoplásmico. Es probable que este último mecanismo, postulado por Hruban y col.<sup>15</sup> haya operado en el páncreas durante la intoxicación por la CHX, aunque de un modo mucho menos marcado que en el hígado.

Puede también especularse sobre la posibilidad de que la síntesis de fosfolípidos haya sido perturbada. Son bien conocidas la participación del retículo endoplásmico en el metabolismo fosfolipídico<sup>9</sup> y la rapidez del turnover de los fosfolípidos en el páncreas exocrino en relación con la síntesis, transporte y secreción de los gránulos de zimógeno<sup>14</sup>. No obstante, tampoco puede excluirse la posible naturaleza osmótica de la dilatación del retículo endoplásmico de las células exocrinas del páncreas; ello parece lo más probable, pues ocurre en un grado proporcional a la hinchazón de las mitocondrias. Es posible que la CHX haya lesionado la función respiratoria celular con la correspondiente deficiencia en la síntesis de ATP y en la activación de los enzimas que Lehninger<sup>24</sup> incluyó bajo la denominación de mecano-enzimas, implicados básicamente en la regulación del equilibrio osmótico de la célula. Jamieson y Palade<sup>18, 19</sup> han demos-

trado, en efecto, que la CHX provoca una inhibición de aproximadamente el 25 % de la respiración celular en rodajas de páncreas de cobaya incubadas *in vitro*. La hinchazón mitocondrial observada en el páncreas bajo la acción de la CHX podría ser el reflejo morfológico de esta perturbación de su rendimiento metabólico. Se trataría de una dilatación de baja amplitud, probablemente energía-dependiente<sup>26</sup> que se mostró como totalmente reversible en la fase de recuperación. Esta deficiencia de energía puede haber contribuido a la hinchazón del retículo endoplásmico rugoso bien directamente o a través del proceso de transporte dependiente de energía, descrito recientemente por Jamieson y Palade<sup>18, 19</sup>. Estos mismos autores<sup>16, 17</sup> han demostrado que los enzimas, sintetizados por el retículo endoplásmico rugoso de las células exocrinas del páncreas son transportados vectorialmente hacia los extremos terminales de los sacos y pasan, por un proceso de fusión a formar pequeñas vesículas que se fusionan con los elementos periféricos del aparato de Golgi. No es fácil encontrar una explicación para el diferente comportamiento de las mitocondrias en el hígado, con preservación de la morfología normal, y en el páncreas, donde presentaron un grado moderado de hinchazón. Gana cada vez más terreno la idea de que las mitocondrias de los distintos órganos y especies pueden diferir en sus propiedades<sup>5</sup>. En todo caso, la insensibilidad de las mitocondrias a la CHX en la célula hepática podría indicar que la droga no afecta seriamente a los procesos de síntesis de la proteína mitocondrial hepática o que la renovación de las proteínas mitocondriales es lenta y no se desequilibra después de la inhibición de su síntesis de 8 días de duración. La primera posibilidad está apoyada por la demostración de que la CHX no posee efecto sobre la incorporación de aminoácidos de las mitocondrias del hígado de rata<sup>22</sup> pero no hay

datos acerca de las mitocondrias de otros órganos. Por alguna razón desconocida, las mitocondrias pancreáticas son sensibles a la CHX, manifestando hinchazón de la nariz y formación de algunas pequeñas figuras de mielina a partir de la membrana interna. Este último rasgo aumenta durante los primeros días de la fase de recuperación pero ha desaparecido casi totalmente al final del experimento, tratándose probablemente de un fenómeno reversible.

Lebeux y col.<sup>23</sup> han estudiado imágenes morfológicamente similares en las mitocondrias hepáticas de la rata y llegaron a la conclusión de que probablemente se trata de un fenómeno que ocurre ya en condiciones normales y que puede incrementarse en una variedad de situaciones experimentales, tales como el ayuno, infusión de glucosa y administración de insulina. No obstante, no puede excluirse la posibilidad de un artefacto de fijación atribuible al glutaraldehído<sup>7</sup>.

La aparición de degradación citoplásmica focal es un acontecimiento tan frecuente en la respuesta celular a las intoxicaciones<sup>31</sup>, que es llamativa su ausencia en nuestro material. La razón de ello podría buscarse en una parálisis de la síntesis de hidrolasas ácidas asociadas a los lisosomas provocada por la CHX, pues existen datos que sugieren bastante firmemente que estas hidrolasas son sintetizadas por el retículo endoplásmico rugoso<sup>25</sup> e incorporadas a los lisosomas a través de una vehiculación intermediaria del aparato de Golgi. Las alteraciones ya señaladas de estos organitos citoplásmicos y del sistema de transporte intracelular podría ser responsable de la ausencia de lisosomas secundarios y de degradación focal. Svoboda y Higginson<sup>30</sup> señalan que en ratas sometidas crónicamente a una deficiencia proteica tampoco se observa la aparición de focos de degradación citoplásmica.

## SUMMARY

### Subacute intoxication with cycloheximide Morphological findings in liver and pancreas

This paper is in the line research of agents acting as inhibitors of liver chemical carcinogenesis induced by diethylnitrosamine.

Up to now, review of literature only records acute toxicity results of cycloheximide. In this study, we present the morphological alterations in liver and pancreas under su-

bacute dose of cycloheximide trying to correlate them with published biochemical findings.

At the same time, we describe the repairing process of those subcellular injuries after suppression of this antibiotic.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALONSO, A. *In Vorbereitung*, 1969.
2. BENNET, L. L., D. SMITHERS y C. T. WARD. *Biochem. Biophys. Acta*, 87: 60, 1964.
3. BENNET, L. L., V. L. WARD y R. W. BROCKMAN. *Biochem. Biophys. Acta*, 103: 478, 1965.
4. BLACKBURN, W. R. y K. VINIJCHAIKUL. *Lab. Invest.*, 20: 305, 1969.
5. BORST, P. *Handbook of Molecular Cytologia*, págs. 914-942, North Holland Publ. Amsterdam, 1969.
6. COLOMBO, B., L. FELICETTI y C. BAGLIONE. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 18: 389, 1965.
7. CURGY, J. J. *J. Microscopie*, 7: 63, 1968.
8. FLAKS, B. y J. A. MOODY. *Europ. J. Cáncer*, 5: 231, 1969.
9. GOLDBLATT, P. J. *Handbook of Molecular Cytology*. Págs. 1.101-1.129. North Holland Publ. Amsterdam, 1969.
10. GOTTLIEB, D. y P. D. SHAW. *Antibiotics*. Vol. I. Springer Verlag. Berlín, 1967.
11. GRISHAM, J. W. *Cancer Res.*, 22: 842, 1962.
12. HARRIS, C., H. GRADY y D. SVOBODA. *J. Ultrastruct. Res.*, 22: 240, 1968.
13. HERMAN, L. y P. J. FITZGERALD. *J. Cell Biol.*, 12: 277, 1962.
14. HOKIN, L. E. *Intern. Rev. Cytol.*, 23: 187, 1969.
15. HRUBAN, Z., H. SWIFT, F. W. DUNN y D. E. LEWIS. *Lab. Invest.*, 14: 70, 1965.
16. JAMIESON, D. J. y G. E. PALADE. *J. Cell Biol.*, 34: 577, 1967a.
17. JAMIESON, D. J. y G. E. PALADE. *J. Cell Biol.*, 34: 597, 1967b.
18. JAMIESON, D. J. y G. E. PALADE. *J. Cell Biol.*, 39: 580, 1968a.
19. JAMIESON, D. J. y G. E. PALADE. *J. Cell Biol.*, 39: 589, 1968b.
20. JELL, D. A. y E. S. REYNOLDE. *J. Cell Biol.*, 41: 736, 1969.
21. KORNER, A. *Biochem. J.*, 101: 627, 1966.
22. KROON, A. M. *Handbook of Molecular Cytology*, págs. 943-971. North Holland Publ. Amsterdam, 1969.
23. LEBEUX, Y., G. HETENYI JR. y M. J. PHILLIPS. *Z. Zellforsch.*, 99: 491, 1969.
24. LEHNINGER, A. L. *The Mitochondrion*. Benjamin Inc. New York, 1964.
25. NOVIKOFF, A. B., E. ESSNER y N. QUINTANA. *Fed. Proc.*, 23: 1.010, 1964.
26. PACKER, L. *Energy-linked low amplitude mitochondrial swelling. Methods in Enzimology*, vol. X, 685-689. Academic Press. New York, 1967.
27. RODRÍGUEZ, T. O. *J. Ultrastruct. Res.*, 19: 116, 1967.
28. ROUILLER, Ch. *The Liver*, vol. II, 335-476. Academic Press. New York, 1964.
29. SEIFERT, G. y R. GIESEKING. *Beitr. path. Ant.*, 124: 81, 1961.
30. SVOBODA, D. y J. HIGGINSON. *Amer. J. Path.*, 45: 353, 1964.
31. SWIFT, H. y Z. HRUBAN. *Fed. Proc.*, 23: 1.026, 1964.
32. TRUMP, B. F. y J. L. E. ERICSSON. *The Inflammatory Process*, 35-120. Academic Press. New York, 1965.
33. VERBIN, R. S. y E. FARBER. *J. Cell Biol.*, 5: 649, 1967.
34. VERBIN, R. S., P. J. GOLDBLATT y E. FARBER. *Lab. Invest.*, 20: 529, 1969a.
35. VERBIN, R. S., R. J. SULLIVAN y E. FARBER. *Lab. Invest.*, 21: 179, 1969b.
36. WEISBLUM, B., L. HERMAN y P. J. FITZGERALD. *J. Cell Biol.*, 12: 313, 1962.

