

Influencia de la colchicina y del alopurinol sobre la uricogenesis. II. Efectos de su administración a polluelos y ratones

C. Escarmís, J. Bozal y F. Calvet

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona

(Recibido el 23 de septiembre de 1969)

C. ESCARMIS, J. BOZAL and F. CALVET, *Influences of Colchicine and Allopurinol upon Uricogenesis. II. The Effects of their Administration to Chicks and Mice.* R. esp. Fisiol., 26, 121-130, 1970.

Colchicine injected intraperitoneally to chicks and mice induces a decrease in liver xanthine dehydrogenase activity which is not recovered by dialysis of the hepatic homogenates. The injection of allopurinol into young chicken also greatly reduces the activity of their hepatic and kidney enzymes, although it is partially recovered by dialysis of the homogenates. The presence of allopurinol in the animal organism induces a marked decrease of uric acid levels in liver, kidney and serum, accompanied by an increment of hypoxanthine. These effects of the drug tend to decrease with time and completely disappear 24 hours after the injection.

Colchicine inhibits the *in vitro* dehydrogenation of hypoxanthine to xanthine catalyzed by xanthine dehydrogenase of chicken liver homogenates, and also the transformation of adenine into uric acid. Neither colchicine nor allopurinol interfere with the conversion into hypoxanthine of both inosine and adenosine. Colchicine does not inhibit the *de novo* biosynthesis of hypoxanthine performed by pigeon liver homogenates, starting from glycine, formate and carbon dioxide.

En un trabajo anterior (6) describimos las características de la acción *in vitro* de la colchicina y del alopurinol sobre la xantindeshidrogenasa hepática de pollo. El objeto de este trabajo se centra en el estudio *in vivo* de los efectos respectivos que inducen su administración a animales; asimismo, se describe la incidencia *in vitro* de cada uno de dichos agentes terapéuticos sobre algunas de las acciones enzimáticas implicadas en la biosíntesis del ácido úrico.

Material y métodos

SUSTRATOS, ACEPTORES ELECTRÓNICOS E INHIBIDORES. La procedencia de los productos empleados, xantina, adenina, hipoxantina, colchicina, alopurinol y azul de metileno, así como las técnicas de preparación de sus respectivas disoluciones son idénticas a las descritas en un trabajo anterior (6). Las disoluciones de inosina (Fluka) y de adenosina (Schuchardt) se prepararon en tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4.

PREPARADOS ENZIMÁTICOS. (*homogenados de hígado y de riñón*). Los homogenados de hígado y de riñón se obtuvieron por trituración de las glándulas recién disecadas, utilizando un pequeño desintegrador Turmix, o un triturador Potter-Elvehjem, empleando tampón de fosfatos 0,05 M pH 7,4 como medio dispersante y trabajando en cámara refrigerada a 5° C.

TÉCNICAS DE INCUBACIÓN. La descripción detallada de las técnicas empleadas para la determinación analítica de actividades xantindeshidrogenásicas, se describen en un trabajo anterior (6).

Para el estudio de la biosíntesis *de novo* de hipoxantina se utilizaron homogenados hepáticos de pichón y la temperatura de incubación fue de $37 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Como precursores se adicionaron glicocola y formiato, conteniendo además la mezcla tampón fosfatos 0,05 H pH 7,4 y Cl₂Mg 0,13 M, CO₂HK 0,04 M y Cl₂Mg 0,0025 M (18). Durante la incubación aerobia se hizo burbujear en el líquido una corriente de oxígeno y además otra, poco intensa, de anhídrido carbónico — para asegurar la presencia de ion bicarbonato.

MÉTODOS ANALÍTICOS. El ácido úrico se determinó colorimétricamente mediante el reactivo de BROWN (1).

Las determinaciones de xantina y de ácido úrico en una mezcla de ambas purinas se llevó a cabo combinando la técnica colorimétrica basada en el empleo del reactivo de FOLIN-CIICALTEU (7), con el que se establece conjuntamente la xantina y el ácido úrico, y el método colorimétrico que utiliza el reactivo de BROWN (1) y que sirve para valorar específicamente el ácido úrico.

La determinación de cada una de las bases hipoxantina y xantina copresentes en un medio previamente defecado de proteínas con ácido perclórico, se llevó a cabo mediante una adaptación del método espectrofotométrico diferencial de KALCKAR (8), descrito previamente (11).

La determinación de hipoxantina en presencia de inosina se realizó también por el método espectrofotométrico diferencial de KALCKAR (8) convenientemente adaptado, leyendo a $\lambda = 290 \text{ m}\mu$ (λ de máxima absorción del ácido úrico) el aumento de D.O. provocado por la incubación con xantinoxidasa de leche adicionada. Esta cataliza la transformación de la hipoxantina, en ácido úrico, dejando inalterada a la inosina.

El valor del coeficiente de extinción molar para el ácido úrico a $\lambda = 290 \text{ m}\mu$ fue $12,4 \times 10^3$.

La determinación conjunta de hipoxantina, inosina y ácido inosínico se realizó leyendo la D.O. a $\lambda = 250 \text{ m}\mu$ (longitud de onda de máxima absorción de las tres sustancias, según KALCKAR (8) y comprobado por nosotros).

En los estudios analíticos de las muestras que contenían colchicina — que provoca interferencias colorimétricas y espectrofotométricas — ésta se extrajo previamente con cloroformo en medio ácido, aprovechando su gran solubilidad en este disolvente.

EXPERIENCIAS in vivo. Las disoluciones de alopurinol y de colchicina para inyectar se obtuvieron, respectivamente, disolviendo el alopurinol en NaOH y diluyendo posteriormente con disolución isotónica, y disolviendo la colchicina en alcohol absoluto, disolución que después se diluyó con líquido isotónico, de modo que el contenido final en alcohol fuese del 8% aproximadamente en volumen. Se ajustó finalmente el pH de ambas disoluciones a 7,4. Los fármacos convenientemente disueltos a las concentraciones deseadas se administraron intraperitonealmente, operando con un lote de 12 animales tratados, y otro lote de 12 que, utilizados como testigo, fueron inyectados con los correspondientes volúmenes de disolución isotónica. A todos los animales se les permitió alimentarse libremente antes y después de las inyecciones. Transcurrido el

tiempo programado. se les sacrificó por decapitación, y en su caso se recogieron 20 ml de sangre sobre 10 ml de citrato sódico al 3,8 %. Inmediatamente se procedió a la adecuada evisceración, y con los hígados y los riñones de cada uno de los lotes por separado, se confeccionaron los correspondientes homogenados, en los que se determinaron las actividades xantindeshidrogenásicas.

PARTE EXPERIMENTAL

ACCIÓN DE LA COLCHICINA. La actividad de la xantindeshidrogenasa hepática inhibida *in vitro* por la presencia de colchicina, se había observado que se recupera totalmente cuando se elimina el alcaloide por diálisis de los homogenados (6). También en nuestro Departamento se había comprobado que la inyección del fármaco a polluelos y a ratones provoca una considerable disminución de actividad de la xantindeshidrogenasa hepática de los animales (16). La presente experiencia tiene por objeto averiguar si la diálisis de los homogenados de hígados de animales inyectados ocasiona o no la recuperación de sus actividades deshidrogenásicas originales.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos en un experimento realizado con ratones — raza Wistar — a los que se les inyectó 1 mg/kg de colchicina, sacrificándolos después de transcurridas 24 horas; y en otro llevado a cabo con polluelos — razas Rodi y Viandote — a los que se les inyectaron dosis de 3 mg/kg y se les sacrificó a las 6 horas.

De la inspección de los datos analíticos reunidos en la tabla I se deduce que la diálisis de los homogenados hepáticos de los animales inyectados no proporciona recuperación alguna de actividad enzimática; eliminada por la diálisis toda posible cantidad de colchicina inhibidora presente, se sugiere que la baja actividad exhibida por los homogenados de los animales tratados debe atribuirse a un bajo ni-

vel de xantindeshidrogenasa, consecuencia de un efecto represor de la biosíntesis del enzima, ejercido en el animal vivo, por el alcaloide administrado. Seguramente este fenómeno puede relacionarse con la conocida acción antimitótica de la colchicina.

ACCIÓN DEL ALOPURINOL *in vivo*. Se procedió a estudiar la acción *in vivo* del alopurinol, inyectando intraperitonealmente 15 mg/kg a polluelos de 12-14 días (razas Rodi y Viandote) y operando en forma análoga a la descrita anteriormente con colchicina. En este caso se determinaron las actividades xantindeshidrogenásicas, hepática y renal — antes y después de dializar los homogenados de los parénqui-

Tabla I. *Inhibición (%) de la actividad xantindeshidrogenásica hepática por la acción de la colchicina in vivo.*

Administración intraperitoneal de la colchicina, con posterior diálisis de los homogenados hepáticos. Dosis: ratones, 1 mg/kg (sacrificio a las 24 horas de la inyección). Polluelos, 3 mg/kg (sacrificio a las 6 horas de la inyección). Las concentraciones de xantina empleadas para la determinación de la actividad xantindeshidrogenásica en los experimentos realizados con ratones garantizan la inhibición (14) de la uricasa presente en los homogenados de hígado de roedor, que, de otro modo, falsearía los resultados.

Xantina [M]	Tiempo diálisis horas	Incubación (min.)	
		5	10
Ratones			
$1,2 \times 10^{-3}$	0	32	23
	48	30	20
$2,5 \times 10^{-3}$	0	29	35
	48	20	20
Polluelos			
5×10^{-5}	0	13	33
	48	25	21
1×10^{-4}	0	25	36
	48	34	42

Tabla II. *Inhibición (%) de la actividad xantindeshidrogenásica hepática por la acción del alopurinol in vivo.*

Los polluelos recibieron 15 mg/kg por vía intraperitoneal.

Intervalo entre adon. y sacrificio	[Xantina] M :	Sin diálisis				48-72 h diálisis previa			
		5×10^{-5}		1×10^{-4}		5×10^{-5}		1×10^{-4}	
Incubación min.:		5	10	5	10	5	10	5	10
H o m o g e n a d o d e h í g a d o									
$\frac{1}{2}$ horas		73	94	89	94	67	46	72	74
3		100	100	100	100	61	47	65	45
6		69	65	59	37	57	33	29	37
12		10	11	8	19	0	0	0	0
24		20	11	19	13	-	-	-	-
H o m o g e n a d o d e r i ñ ó n									
$\frac{1}{2}$ horas		91	90	82	93	77	33	74	72
3		93	89	95	94	32	62	53	64
6		92	86	91	61	64	69	67	32
12		100	90	100	100	0	0	0	0
24		17	13	37	33	-	-	-	-

mas glandulares —, así como los niveles de purinas en sangre, hígado y riñón: se estableció espectrofotométricamente el contenido en xantina e hipoxantina, y en ácido úrico por colorimetría, tanto de la sangre — cuyas proteínas habían sido defecadas con perclórico — como de porciones alícuotas de los homogenados hepáticos y renales — también después de defecadas análogamente de sus proteínas.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos en varias experiencias. Se

puede observar que la administración de alopurinol provoca una fuerte inhibición de las actividades xantindeshidrogenásicas hepática y renal. Sin embargo, la actividad enzimática se recupera parcialmente al someter a diálisis — eliminación del alopurinol — a los homogenados de las respectivas glándulas.

La presencia del alopurinol en el organismo del animal origina asimismo un decremento del nivel de ácido úrico (tabla III), acompañado de un incremento

Tabla III. *Acción del alopurinol in vivo sobre el nivel de ácido úrico y de hipoxantina en polluelos.*

Dosis inyectada intraperitonealmente: 15 mg/kg.

Intervalo entre administración y sacrificio	Decremento nivel de ácido úrico			Incremento nivel de hipoxantina		
	Hígado $\Delta\mu\text{moles/g}$	Riñón $\Delta\mu\text{moles/g}$	Sangre $\Delta\mu\text{moles/g}$	Hígado $\Delta\mu\text{moles/g}$	Riñón $\Delta\mu\text{moles/g}$	Sangre $\Delta\mu\text{moles/g}$
$\frac{1}{2}$ horas	2,42	3,99	0,17	2,28	3,17	0,33
3	2,01	2,62	0,33	1,45	4,57	1,10
6	1,06	0,75	0,15	0,83	1,40	0,10
12	0	1,41	0,05	0	0,45	0
24	0	0	0	0	0	0

del nivel de hipoxantina. En la concentración de xantina no se apreció variación sensible.

Nuestros resultados muestran también cómo la acción del alopurinol va disminuyendo al prolongar el intervalo de tiempo que media entre la inyección y el sacrificio de los animales, y desaparece por completo del hígado a las 12 horas, y del riñón a las 24, aproximadamente.

En la figura 1 se representan los porcentajes de inhibición de la actividad xantindeshidrogenásica en el hígado y en el riñón — medidos después de 10 minutos de incubación analítica, y operando con una concentración de xantina igual a $0,5 \times 10^{-4}$ M — en función del tiempo transcurrido entre la inyección y el sacrificio de los animales.

INCIDENCIA DE LA COLCHICINA EN LA DESHIDROGENACIÓN DE LA HIPOXANTINA A XANTINA. Siendo un hecho conocido que la colchicina inhibe la deshidrogenación de la xantina a ácido úrico (11, 13, 16), catalizada por la xantindeshidrogenasa hepática de pollo, estudiamos aquí la acción del fármaco sobre la transformación de hipoxantina en xantina por dicho enzima. Se trabajó con homogenados hepáticos de pollo, dializados o sin dializar, en medio aerobio y en presencia o ausencia de un transportador electrónico exógeno — azul de metileno (M. B.) — con el objeto de poder establecer la actuación del alcaloide en condiciones lo más aproximadas posible a las fisiológicas. Si se opera en aerobiosis y sin incorporación de azul de metileno, la xantindeshidrogenasa del homogenado puede disponer únicamente de los transportadores electrónicos naturales (NAD, citocromos, etc.) presentes en el homogenado hepático, y tan sólo funcionar en muy pequeña proporción con el aceptor oxígeno molecular, dada la muy escasa actividad oxidásica de la xantindeshidrogenasa hepática de pollo (15). En la figura 2 se representan los resultados obtenidos trabajando en medio aerobio y en

presencia de azul de metileno. Se puede observar la existencia de una definida inhibición de la deshidrogenación de la hipoxantina a xantina, ya que en ningún caso se provoca una acumulación de xantina, que debería ser la equivalente a la disminución de producción de ácido úrico que tiene lugar como consecuencia de la presencia inhibitoria del alcaloide.

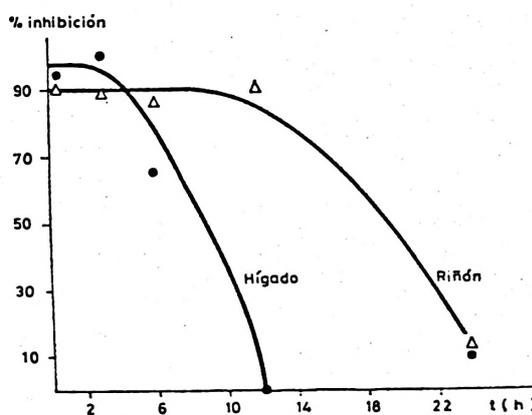


Fig. 1. Acción del alopurinol in vivo.

TRANSFORMACIÓN DE LA INOSINA, LA ADENOSINA Y LA ADENINA, EN HIPOXANTINA. INCIDENCIA DE LA COLCHICINA Y DEL ALOPURINOL. En la biosíntesis *de novo* de purinas, el primer derivado purínico sintetizado es el ácido inosínico (18), el cual puede transformarse en ácido úrico mediante la formación intermedia de inosina. Esta se convierte en hipoxantina gracias al concurso de la purin-nucleósido-fosforilasa (2). Por otra parte, la adenosina — procedente de la degradación de los ácidos nucleicos — podría convertirse en hipoxantina, primeramente por la acción catalítica de la adenosindesaminasa, que la transformaría en inosina, para pasar después a hipoxantina gracias a la fosforilasa antes citada (8).

Nosotros estudiamos la influencia de la colchicina y del alopurinol sobre las transformaciones de la inosina, la adenosina y la adenina, en hipoxantina. Se trabajó

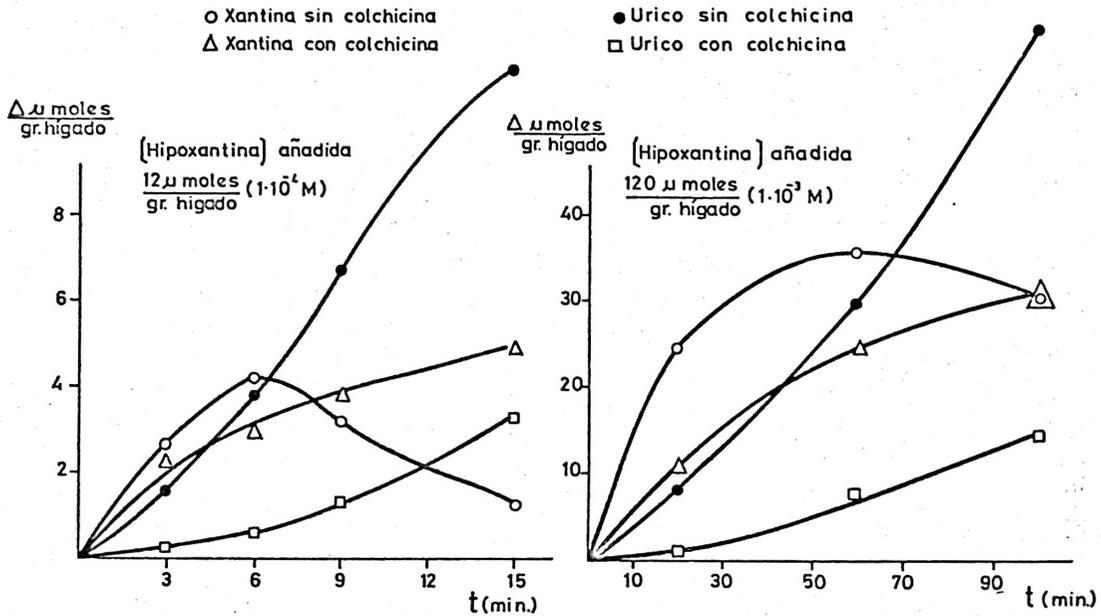


Fig. 2. Acción de la colchicina sobre la transformación de hipoxantina por homogenados dializados de hígado de pollo con azul de metileno.

con homogenados completos de hígado de pichón, en los que se puede valorar directamente la hipoxantina producida, debido a la ausencia de xantindeshidrogenasa en la glándula hepática de este ave. Se pudo comprobar que los dos nucleósidos, inosina y adenosina, son totalmente transformados en hipoxantina, más rápidamente la inosina que la adenosina (figura 3), lo cual está de acuerdo con la senda metabólica admitida para la adenosina, ya comentada anteriormente.

La adenina no es transformada en hipoxantina por los homogenados hepáticos de pichón. Este resultado probablemente deba su explicación a la circunstancia de que la adenina no es sustrato de la purinucleósido-fosforilasa del hígado de pichón, de acuerdo con observaciones paralelas realizadas experimentando con diversos tejidos de mamíferos (9, 10); el hecho contrasta con lo que ocurre con los homogenados de hígado de pollo, los cuales la transforman lentamente en ácido

úrico. La colchicina $3,1 \times 10^{-3} \text{ M}$ inhibe efectivamente esta transformación.

La colchicina $6,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ y el alopurinol $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, en cambio, no manifiestan poder inhibitor alguno sobre la formación de hipoxantina a partir de inosina o de adenosina.

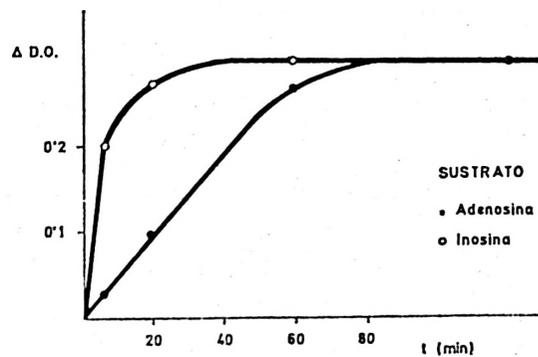


Fig. 3. Incubación de homogenados de hígado de pichón con nucleósidos. Producción de hipoxantina.

La colchicina $6,2 \times 10^{-3}$ M tampoco inhibe la biosíntesis *de novo* de la hipoxantina, utilizando como precursores glicocola, formiato y carbónico, y como sistema enzimático, el de un homogenado completo de hígado de pichón. Se determinaron conjuntamente ácido inosínico, inosina e hipoxantina por espectrofotometría.

Discusión

La actividad xantindeshidrogenásica específica perdida por las glándulas hepáticas de polluelos y ratones a los que se ha inyectado colchicina, no se recupera cuando los correspondientes homogenados glandulares se someten a diálisis. Este resultado es completamente distinto de los obtenidos experimentando *in vitro* con homogenados hepáticos inhibidos por el alcaloide, los cuales recuperan toda su actividad después de una diálisis en la cual tiene lugar la eliminación del inhibidor (6).

La inefectividad de la diálisis — separación de toda posible colchicina presente — en proporcionar recuperación alguna de la actividad xantindeshidrogenásica de los homogenados hepáticos de los animales tratados, es indicadora de que en su hígado se ha producido un descenso definitivo del nivel del enzima, posiblemente debido a un efecto de represión de la biosíntesis de la deshidrogenasa, inducido por la acción farmacológica del alcaloide inyectado. La actividad antimetabólica de la colchicina, desde antiguo conocida (3, 12), debe estar relacionada con este fenómeno represor ahora observado.

Por otra parte, la actuación del alopurinol administrado intraperitonealmente a polluelos, es bien distinta de la ejercida por la colchicina. Debido a su poca toxicidad, permite ser administrado en cantidades superiores — las dosis utilizadas por nosotros, 15 mg/kg, son sólo ligeramente superiores a las terapéuticas —, las cuales

provocan un gran descenso de la actividad xantindeshidrogenásica del hígado y del riñón, resultando en su inhibición casi total. Esta inhibición del enzima desaparece parcialmente al someter a diálisis prolongada los homogenados hepáticos y renales de los animales tratados. El fenómeno manifiesta un marcado paralelismo con el observado previamente *in vitro* (6), es decir, con la recuperación parcial de actividades xantindeshidrogenásicas que tiene lugar después de la diálisis, en los homogenados de hígado y de riñón previamente inhibidos por la presencia del alopurinol adicionado.

Asimismo, hemos comprobado que la inyección intraperitoneal de alopurinol ocasiona un considerable descenso en los niveles de ácido úrico en el hígado, el riñón y la sangre de los animales, junto con un aumento, aproximadamente correlativo, de sus respectivos contenidos en hipoxantina. Todo ello parece indicativo de que durante su permanencia en el organismo animal, el alopurinol inhibe, ciertamente, a la xantindeshidrogenasa, pero no a los sistemas enzimáticos que presiden la bioformación de hipoxantina. Esta concepción está de acuerdo con nuestros resultados obtenidos trabajando *in vitro*, con homogenados de hígado de pichón — que carecen de xantindeshidrogenasa: la incorporación de alopurinol 5×10^{-5} M, no provoca el menor efecto retardador sobre la producción normal de hipoxantina de los incubados —. La concentración de alopurinol que KRENITSKY *et al.* (10) observaron actúa como inhibidora de la purin-nucleósido-fosforilasa es mucho mayor, 1×10^{-3} M.

Numerosos son los observadores clínicos que han indicado que la administración de alopurinol a pacientes gotosos provoca un decremento de sus niveles uricémicos y uricosúricos, acompañados de aumentos simultáneos de los respectivos niveles de hipoxantina y xantina del suero y de la orina. Aunque también otros investigadores han manifestado que la in-

yección de alopurinol aumenta las cantidades urinarias de bases púricas (19, 20), algunos afirman que los incrementos de hipoxantina y xantina de la orina son considerablemente menores que el correspondiente descenso observado del nivel de úrico (17, 21, 22); sin embargo, otros no están de acuerdo con que se observe tanta diferencia entre el descenso de concentración del ácido en la orina y el aumento de las de hipoxantina y xantina (22). También se ha sugerido (17) que el alopurinol, o su ribonucleótido, actúa como inhibidor de la fosforibosilamidotransferasa, enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis del núcleo purínico.

La acción del alopurinol *in vivo* va desapareciendo al prolongar los intervalos de tiempo que median entre la administración intraperitoneal del fármaco y el sacrificio de los animales, anulándose prácticamente todo su efecto después de las 24 horas. Los ratones y los perros eliminan el fármaco rápidamente en forma de alopurinol y de aloxantina (4, 5), aunque en el hombre la eliminación de la aloxantina es más lenta; la acumulación de aloxantina durante una administración prolongada de alopurinol puede constituir una contribución significativa a los beneficiosos efectos terapéuticos del fármaco en los gotosos, dado que el producto también posee cierta acción inhibidora de la xantindeshidrogenasa.

La colchicina, por su parte, inhibe la transformación de la adenina en ácido úrico, inducida por los homogenados de hígado de pollo, lo cual, aunque se debiera solamente a la inhibición ejercida por el alcaloide sobre la xantindeshidrogenasa, no carece de interés farmacológico y terapéutico.

Por el contrario, la colchicina no inhibe la transformación de la inosina y de la adenosina en hipoxantina, que efectúan los homogenados de hígado de pichón, ni tampoco la biosíntesis *de novo* de la hipoxantina a partir de sus precursores glicina, formiato y anhídrido carbónico.

Resumen

La colchicina inyectada intraperitonealmente a polluelos y ratones ocasiona una disminución de la actividad xantindeshidrogenásica hepática, que no se recupera al someter a diálisis los homogenados de hígado de los animales. La administración intraperitoneal de alopurinol a polluelos provoca un gran descenso de las actividades xantindeshidrogenásicas hepática y renal, pero que se recupera parcialmente por diálisis. La permanencia del alopurinol en el organismo disminuye el nivel de ácido úrico en el hígado, el riñón y la sangre, e induce un incremento de hipoxantina. La acción del fármaco disminuye al aumentar el intervalo de tiempo que media entre la administración del mismo y el sacrificio de los animales, llegándose a anular completamente después de transcurridas 24 horas.

La colchicina inhibe *in vitro* la deshidrogenación de la hipoxantina a xantina, y la transformación de adenina en ácido úrico, catalizadas por los homogenados hepáticos de pollo. Ni la colchicina, ni el alopurinol influyen en la transformación de la inosina en hipoxantina. La colchicina tampoco inhibe la biosíntesis *de novo* de la hipoxantina a partir de glicina, formiato y carbónico, que realizan los homogenados hepáticos de pichón.

Bibliografía

1. BROWN, H.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 601, 1945.
2. BYUNG KYU KIM, S. CHA y R. E. PARKS, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1763, 1968.
3. CREASEY, W. A.: *Cancer Chemoter. Rep.*, **52**, 501, 1967.
4. ELION, G. B.: *Ann. Rheum. Dis.*, **25**, 608, 1966.
5. ELION, G. B., A. KOVENSKY, G. H. HITCHINGS, R. W. RUNDLES y E. METZ: *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 863, 1966.
6. ESCARMÍS, C., J. BOZAL y F. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 109, 1970.
7. FOLIN, O. y V. CIOCALTEU: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927.
8. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429, 445, 461, 1947.
9. KRENITSKY, T. A.: *Mol. Pharmacol.*, **3**, 526, 1967.
10. KRENITSKY, T. A., G. B. ELION, A. M.

- HENDERSON y G. H. HITCHINGS: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2876, 1968.
11. MARÍN, A., J. MARTÍN-ESTEVE y F. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, **20**, 165, 1964.
 12. MARSLAND, D.: *Exp. Cell. Res.*, **50**, 369, 1968.
 13. MARTÍN-ESTEVE, J., J. BOZAL y F. CALVET: *Arch. Interamer. Rheumat.*, **7**, 456, 1964.
 14. PILSUM, J.: *J. Biol. Chem.*, **204**, 613, 1953.
 15. RAJAGOPALAN, K. V. y P. HANDLER: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097, 1967.
 16. RAMIA, J., J. BOZAL y F. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 85, 1966.
 17. RUNDLES, R. W., J. B. WYNGAARDEN, G. H. HITCHINGS, G. B. ELION y H. R. SILBERMAN: *Trans. Ass. Amer. Phycns.*, **76**, 126, 1963.
 18. SCHULMAN, M. P., J. C. SONNE y J. M. BUCHANAN: *J. Biol. Chem.*, **196**, 499, 513, 1952.
 19. SIMMONDS, A. H.: *Clin. Chim. Acta*, **23**, 353, 1969.
 20. SWEETMAN, L.: *Fed. Proc.*, **27**, 1055, 1967.
 21. TS'AI-FAN-YÜ: *Arth. Rheumat.*, **8**, 905, 1965.
 22. WATTS, R. W. E.: *Proc. Roy. Soc. Med.*, **59**, 287, 1966.

