

Formas moleculares de la guanina aminohidrolasa de hígado de cobaya

L. Martínez-Farnós, S. Gubert y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Químicas
Universidad de Barcelona
Barcelona - 28

(Recibido el 25 de abril de 1977)

L. MARTINEZ-FARNOS, S. GUBERT and J. BOZAL. *Molecular Forms of Guanine Aminohydrolase*. Rev. esp. Fisiol., 34, 73-80. 1978.

Guanine aminohydrolase (E.C. 3.5.4.3) has been purified 11-fold from the supernatant fraction of guinea-pig liver homogenates in 0.25 M sucrose (centrifuged at $50,000 \times g$) through thermic denaturation at 60°C and ammonium sulphate fractionation (30-60 % saturation). The enzyme in the homogenates and purified preparations exhibited two K_m values. In both preparations four enzymatic electrophoretic bands have been detected. Purified guanine aminohydrolase is chromatographically resolved on DEAE-sephadex in three components whose active forms appeared separately on their pherograms. The enzymatic form eluted at lower ionic strength has the least anodic mobility, is inhibited by guanine ($4 \times 10^{-6} \text{ M}$) and presents only one K_m value ($1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$). The enzymatic form eluted at greater ionic strength exhibits the highest anodic mobility, is also inhibited by guanine ($7 \times 10^{-6} \text{ M}$) and its K_m value seems to be $6.3 \times 10^{-6} \text{ M}$. Molecular weight of enzymatic forms determined by Sephadex G-200 chromatography, is $120,000 \pm 5,000$. The preceding results, correlated with the chromatographic homogeneity of guanine aminohydrolase, purified in Sephadex G-100, suggests that the four molecular forms of the native enzyme may be considered as isozymes.

La guanina aminohidrolasa (GAH) (E.C. 3.5.4.3) cataliza la conversión de guanina en xantina, reacción que en el metabolismo purínico desempeña el papel de fuente indirecta de ácido úrico en los tejidos que poseen xantindeshidrogenasa (2, 11). Por otra parte, la posibilidad del empleo de la guanina en la síntesis de los ácidos nucleicos en procesos de emergencia depende, probablemente, de la actividad relativa de la GAH frente a la

actividad de los enzimas que la transforman en los correspondientes nucleósidos y nucleótidos (7, 10, 15).

La GAH hepática de conejo fue purificada, inicialmente, por SCHMIDT (18) y KALCKAR y SHAFRAN (6), y se han descrito las propiedades de preparados muy purificados de los enzimas de hígado de rata (12) y de conejo (2, 13). La GAH de hígado de cobaya no ha sido purificada, aunque la actividad del enzima en

el tejido es elevada, motivo por el que, en este estudio, se ha escogido el enzima de esta procedencia.

En la GAH de hígado de rata se ha señalado la presencia de isoenzimas y su carácter alostérico (4, 12). Los valores del peso molecular son discrepantes; así, se han propuesto para el enzima de hígado de conejo los de 170.000 y 520.000 (2), mientras que LEWIS y GLANTZ (13) indican el de 55.000 y no detectan ningún tipo de agregación o de disociación.

En este trabajo se describe la localización intracelular del enzima de hígado de cobaya, un método de purificación, y la determinación de su masa molecular. Se presenta, además, evidencia experimental de la existencia de cuatro formas distintas del enzima y se señalan las diferencias de comportamiento electroforético y cinético.

Material y métodos

Materiales. La guanina aminohidrolasa procede de hígados de cobaya macho separados del animal, recién sacrificado, por decapitación cervical. Las proteínas empleadas en el cálculo del peso molecular de la GAH han sido: inhibidor triptico de la soja (SBTI) (Fluka), azul de dextrano (Sigma) y adenosin desaminasa, ovoalbúmina, seroalbúmina bovina, fosfatasa alcalina, catalasa y ferritina (Boehringer).

Los sustratos empleados para la determinación de la actividad guanina aminohidrolasa y de las proteínas enzimáticas utilizadas en la confección de la curva de calibrado para el cálculo de su peso molecular han sido: guanina, p-nitrofenilfosfato y adenosina (Merck); H_2O_2 (Foret) y ester etílico de la benzoilarginina (BAEE, Boehringer).

En las separaciones cromatográficas se han utilizado las resinas: DEAE-sephadex A-50, sephadex G-100 y sephadex G-200 superfino (Pharmacia). Los geles de poli(acrilamida) empleados en las sepa-

raciones electroforéticas se han preparado con acrilamida (Merck), N,N'-metilbisacrilamida (Eastman Kodak), dimetilamino propionitrilo (Fluka) y ferricianuro potásico y persulfato amónico (UCB).

Los colorantes utilizados en la tinción de los geles de poli(acrilamida) fueron: negro amido (Merck), para el revelado general de proteínas, y p-yodonitrotetrazolium violet (INT) (Sigma) para el revelado específico de la GAH.

Métodos. La actividad de la guanina aminohidrolasa se midió por el método de ROUSH y NORRIS (17). Las mezclas de reacción contenían guanina ($6,7 \times 10^{-5}$ M), tampón de fosfatos sódicos 0,05 M de pH 7,4 y el volumen de disolución de enzima necesario para completar 3 ml. La determinación de actividad se efectúa por lectura directa de los decrementos de D.O. a 245 nm en un espectrofotómetro Beckman DBG T provisto de inscriptor, a $37 \pm 0,1^\circ$ C, en cubetas de 1 cm de paso de luz. A esta longitud de onda y pH, la relación entre los coeficientes de extinción molar de la guanina y la xantina es igual a 2,5.

Una unidad de GAH se define como la cantidad de enzima que transforma en un minuto 1 μ mol de guanina en xantina a $37 \pm 0,1^\circ$ C (condiciones normalizadas).

Las actividades del SBTI, la adenosin desaminasa, la fosfatasa alcalina y la catalasa se determinan por los métodos propuestos por SCHWERT y TAKENAKA (19), KALCKAR y SHAFRAN (5), MALAMY y HORECKER (16) y BEERS y SIZER (1), respectivamente.

La determinación de proteína se efectúa por el método de LOWRY *et al.* (14), tomando como referencia un patrón de seroalbúmina cristalizada, o por medida directa de la absorción a 280 nm (20). La ovoalbúmina, la seroalbúmina bovina y la ferritina, se valoran por lectura directa a 230 nm.

El revelado específico de la GAH presente en las bandas electroforéticas se

efectúa por incubación de los geles a 37° C con guanina 4×10^{-6} M durante 1 h y seguidamente se mantienen en contacto, a la misma temperatura con el revelador específico formado por: Xantinoxidasa de leche (E.C. 1.2.3.2) (Boehringer, 1 mg/22,5 ml), p-yodo nitrotetrazolium violeta (1 mg/ml) y tampón de fosfatos sódicos 0,05 M, pH 7,4, hasta que aparezcan las bandas rojas características de GAH. Se lavan con agua destilada hasta eliminar los reactivos reveladores y los geles se conservan sumergidos en agua bidestilada y en tubos cerrados.

Purificación de GAH de hígado de cobaya. El homogeneizado inicial se prepara a partir de 30 g de hígado de cobaya que, convenientemente troceados, se suspenden en 300 ml de disolución isotónica de sacarosa 0,25 M a 4° C (temperatura habitual de trabajo) y se trituran en un homogeneizador de cuchillas. El homogeneizado se centrifuga a $50.000 \times g$, 2 h y la mayor parte de la actividad guanina aminohidrolasa permanece en el sobrenadante (S_{50}). Este último se calienta rápidamente a 60° C, 5 min y al final del intervalo se enfría a 2° C por inmersión en una mezcla frigorífica. El precipitado que aparece se elimina por centrifugación a $5.000 \times g$, 30 min. Al sobrenadante se le añade $(NH_4)_2SO_4$ hasta alcanzar un 70 % de saturación y se mantiene en agitación durante 30 min más; se deja en reposo otros 30 min, al cabo de los cuales el precipitado se separa por centrifugación a $5.000 \times g$. Durante la adición de la sal el pH se mantiene entre 6,8 y 7,0, por adición de NaOH 0,05 M. El precipitado se disuelve en tampón de fosfato sódico 0,05 M de pH 7,4 en la proporción de 1/5 (p/v) y se somete a diálisis, frente al mismo tampón, durante 24 horas. El dializado se fracciona de nuevo con sulfato amónico entre el 30-60 % de saturación; el precipitado obtenido se recoge del modo habitual. El preparado final mantiene toda su actividad conserva-

Tabla I. *Purificación de GAH de hígado de cobaya.*

Etapa	Proteína total mg	Actividad total U	Actividad específica U/mg prot.
Homogeneizado	9.185	2.066,7	0,225
S_{50}	4.876	1.866,7	0,383
Sobrenadante tratamiento térmico	1.382	1.586,7	1,148
Precipitado 70 % saturación $(NH_4)_2SO_4$	905	1.216,7	1,344
Sobrenadante 30 % saturac. $(NH_4)_2SO_4$	781	1.200,0	1,537
Precipitado 60 % saturación $(NH_4)_2SO_4$	464	1.096,7	2,400

do a 4° C durante un mínimo de 6 meses.

El método de purificación propuesto permite conservar en el purificado el mismo número de formas moleculares que se observan, electroforéticamente, en los homogeneizados iniciales. En la tabla I aparecen las etapas de la purificación de la guanina aminohidrolasa.

Resultados

Localización subcelular de la actividad GAH. La localización celular del enzima se lleva a cabo por aplicación del método de centrifugación diferencial de HOGBOOM *et al.* (3), modificado por KUMAR *et al.* (8).

Las distintas fracciones celulares, separadas a partir de un homogeneizado en sacarosa 0,25 M, se suspenden en disolución hipertónica de tampón fosfatos 0,2 M, pH 7,4. Transcurridos 30 min de agitación, se centrifugan a $15.000 \times g$, 30 min a 4° C; en los sobrenadantes se determina la actividad enzimática.

Los resultados alcanzados muestran que la guanina aminohidrolasa se localiza casi exclusivamente en la fracción soluble de la célula; la actividad medida es de $6,7 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$, mientras que en la fracción mitocondrial ligera es de $0,03 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$, y no se observa actividad

alguna en las fracciones nuclear, mitocondrial pesada y microsomal.

Estabilidad de la actividad GAH de los homogeneizados (S_{50}) frente a la temperatura y el pH. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la GAH se evalúa manteniendo el sobrenadante S_{50} (dilución 1/100) preparado en tampón fosfatos 0,05 M, pH 7,4, en el margen de temperatura comprendido entre 37° y 60° C durante 10 min; seguidamente, las muestras se enfrían rápidamente hasta que alcancen los 2° C, se centrifugan a 15.000 \times g, 20 min y 4° C y se determina su actividad del modo habitual, comparándola con la de una muestra que se mantiene a temperatura ambiente.

La actividad enzimática promedio de las muestras tratadas en el margen de temperatura ensayado ha sido de $0,67 \pm 0,1$ μ moles/min, mientras que la actividad de la muestra control fue de 0,67 μ moles/minuto, lo que indica una estabilidad muy apreciable del enzima frente a la temperatura.

La acción del pH sobre la estabilidad de la GAH se investiga a pH 5,0, empleando como muestra enzimática el sobrenadante S_{50} diluido 1/100 en tampón fosfatos 0,05 M, pH 7,4. Las muestras se mantienen 1/2, 1 y 2 h; una vez centrifugadas a 15.000 \times g, 15 min, se llevan a pH 7,4 (pH óptimo de actuación) y se determina su actividad enzimática en comparación con la del enzima que se mantiene a pH 7,4.

Los resultados obtenidos muestran que el enzima es muy estable a pH 5,0, ya que la actividad de la muestra control (0,67 μ moles/min) no se modifica después del tratamiento a pH 5,0 (valor promedio igual a $0,67 \pm 0,3$ μ moles/min).

Características cinéticas y electroforéticas de la GAH. El cálculo del valor de K_m se ha efectuado mediante la representación doble recíproca de v vs $[S]$. Los resultados obtenidos con homogeneizados (S_{50}) (fig. 1A) indican la aparición de dos valores distintos de K_m ($K_{m1} = 3,2 \times 10^{-6}$ M y $K_{m2} = 1,5 \times 10^{-5}$ M); asimismo, la gua-

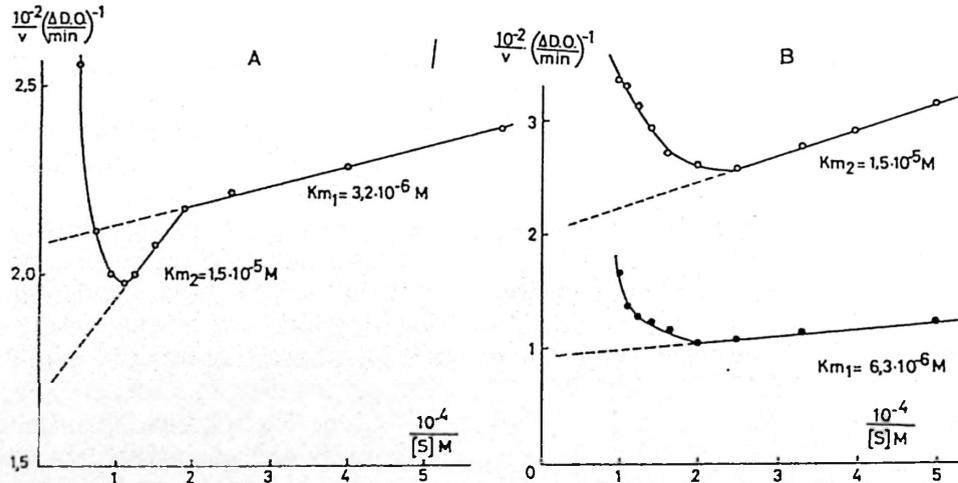


Fig. 1. Velocidades iniciales de reacción del sistema guanina-GAH.

[Enzima] = 1 g tejido/100 ml en homogeneizados y 0,7 μ moles/min/ml para la F-I y 1,5 μ moles/min/ml para la F-III. [Guanina] = $1,6 \times 10^{-5}$ M — $2,4 \times 10^{-4}$ M. Tampón: fosfatos sódicos 0,05 M, pH 7,4. Temp. = $37 \pm 0,01$ ° C. A) K_m del sistema Guanina-GAH para el homogeneizado (S_{50}). B) K_m del sistema Guanina-GAH para las fracciones cromatográficas F-I (O—O) y F-III (●—●).

nina inhibe por exceso de sustrato (superior a 8×10^{-5} M). Los valores de K_m calculados con homogeneizados tratados a 60°C , 10 min y posteriormente 1 h a pH 5,0 fueron de K_{m1} estimada = $3,1 \times 10^{-6}$ M y K_{m2} estimada = $1,2 \times 10^{-5}$ M, valores plenamente concordantes con los hallados para el enzima nativo, lo que confirma la estabilidad del enzima frente a los tratamientos térmicos y ácidos.

Al determinar la K_m de la guanina aminohidrolasa purificada se obtienen también dos valores, que son de $4,5 \times 10^{-6}$ M y $1,3 \times 10^{-5}$ M, mientras que la inhibición por sustrato aparece cuando las concentraciones de guanina son de 7×10^{-5} M o superiores. Los mencionados valores muestran que el método de purificación propuesto no altera el comportamiento cinético de la GAH presente en los homogeneizados iniciales.

Finalmente, el revelado específico de los ferogramas de la fracción soluble (figura 2A) muestra la existencia de 4 bandas bien definidas de movilidad electroforética distinta, lo cual parece sugerir que en la fracción soluble de hígado de cobaya existen formas múltiples con actividad guanina aminohidrolasa; los tratamientos ácidos y térmicos del enzima no provocan alteraciones sensibles de los ferogramas.

Formas moleculares de GAH de hígado de cobaya. — Separación cromatográfica. Se ha conseguido la separación de las formas moleculares de GAH por empleo de la resina DEAE-sephadex.

La actividad GAH se eluye en tres picos (fig. 3A) casi coincidentes con los tres de proteína, designados como fracciones F-I, F-II y F-III, de acuerdo con el aumento de la concentración del tampón de elución. Una vez reunidas las fracciones que presentan los valores máximos de actividad enzimática, se concentran por filtración a presión. La fracción F-I exhibe un grado de purificación de 12 veces respecto al homogeneizado inicial,

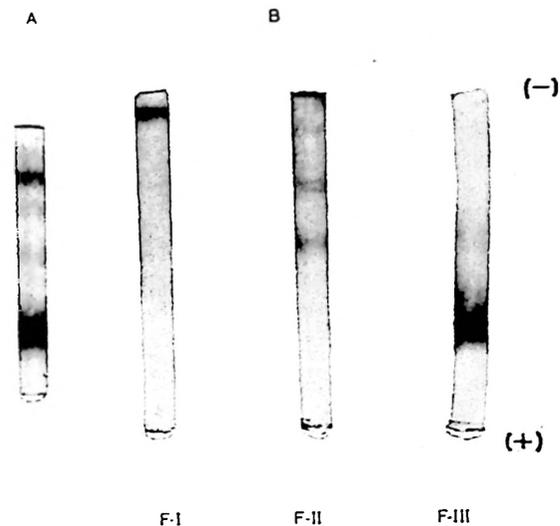


Fig. 2. Electroforesis de GAH hepática de cobaya.

5 mA/gel, 90 min, 4°C . Tampón tris-glicina 0,01 M, pH 8,5. Revelado específico (véase Métodos). A) Ferograma de la fracción soluble de hígado de cobaya; aplicación 50-300 μg proteína. B) Ferogramas de las fracciones cromatográficas; aplicación 50 μg proteína.

mientras que el grado de purificación de las fracciones F-II y F-III es, respectivamente, de 61 y 62 veces.

El revelado específico de los geles de poliacrilamida de las tres fracciones anteriores muestra que se han separado las distintas formas de GAH (fig. 2B). En la fracción F-I se observa una sola banda, en la fracción F-II aparecen las dos bandas de movilidad anódica intermedia presentes en los homogeneizados iniciales, mientras que en la fracción F-III se detecta una sola banda que coincide con la de movilidad anódica superior, presente en los ferogramas de los homogeneizados de GAH.

Por otra parte, la cromatografía en sephadex G-100 del preparado purificado muestra (fig. 3B) un único pico de actividad enzimática desplazado ligeramente del máximo de proteína. La actividad específica alcanzada para la fracción de máxima actividad representa una purifi-

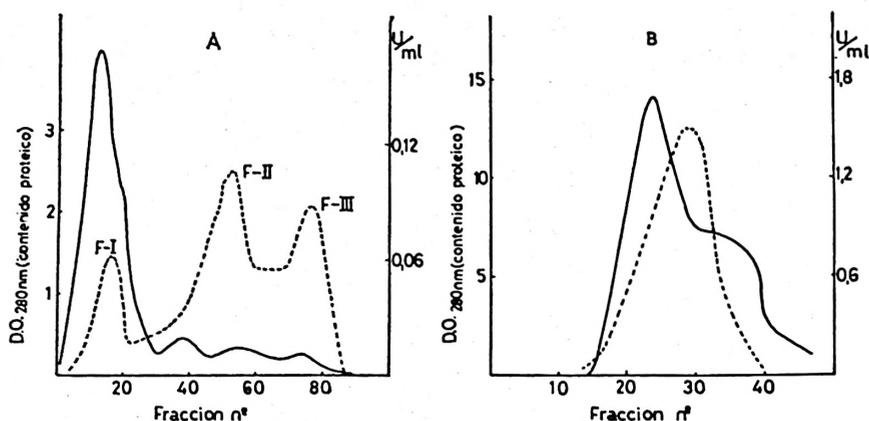


Fig. 3. Cromatografía de guanina aminohidrolasa purificada.

Columna: 3×70 cm. Ritmo de elución = 1 ml/min. Contenido proteico (—) y actividad guanina aminohidrolasa (-----); ambos se determinan según lo indicado en Materiales y métodos. Las fracciones con actividad máxima se reúnen y concentran por filtración en un aparato Sartorius equipado con membrana SM 11733. A) Con DEAE-sephadex. La resina se equilibra con tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7,4. Se eluye por lavados sucesivos con 500 ml del tampón y molaridad creciente: 0,05, 0,15 y 0,2 M. B) Con sephadex G-100. La resina se equilibra con el tampón de elución tris-HCl 0,05 M (0,1 M en KCl) de pH 7,4.

cación de 51 veces respecto al homogeneizado inicial. Sin embargo, lo más significativo es que esta fracción sometida a electroforesis sobre geles de poli-acrilamida presenta 4 bandas perfectamente definidas (revelado específico de GAH) que coinciden con las exhibidas tanto por los homogeneizados como por los preparados purificados. La aparición de un solo pico de actividad con las cuatro formas moleculares de GAH parece descartar la existencia de agregados en la GAH del tejido hepático de cobaya.

Peso molecular. La determinación del peso molecular de la GAH hepática de cobaya se ha efectuado por cromatografía en columna de sephadex G-200. Por interpolación del volumen de elución de la GAH, en la recta de calibrado (fig. 4), se halla tanto para el purificado como para las formas moleculares presentes en las fracciones F-I, F-II y F-III, un peso molecular promedio de 120.000 ± 5.000 .

Características cinéticas. Las fraccio-

nes cromatográficas F-I y F-III muestran electroforéticamente la presencia de una sola banda proteica con actividad GAH; el estudio de su comportamiento cinético permite relacionar dichas formas enzimáticas con las presentes tanto en los homogeneizados iniciales como en los purificados. El preparado enzimático procede de las fracciones cromatográficas F-I y F-III concentradas por filtración a presión.

La representación de los valores de $1/v$ vs. $1/[S]$ aparece en la figura 1B, de la que se deduce que la forma de menor movilidad electroforética (F-I) presenta inhibición por su sustrato a partir de concentraciones de guanina de 4×10^{-5} M, mientras que para la forma de mayor movilidad electroforética (F-III) la inhibición por el propio sustrato no aparece hasta que la concentración de guanina es de 7×10^{-5} M. Los valores de K_m para ambas ($1,5 \times 10^{-5}$ M para F-I y $6,3 \times 10^{-5}$ para F-III) se corresponden con los de K_{m2} y K_{m1} observados en los homogeneizados iniciales y en los purificados; también cabe destacar que la forma

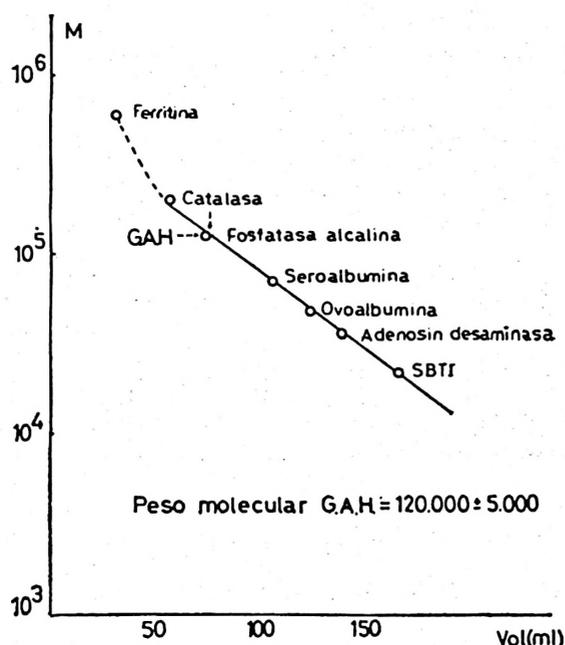


Fig. 4. Determinación del peso molecular de la GAH de hígado de cobaya en sephadex G-200.

Las columnas (3 × 70 cm) se equilibran con el tampón de elución Tris-HCl 0,05 M (0,1 M en KCl), pH 7,4. Velocidad de elución = 0,3 ml/minuto. Proteínas de calibrado: SBTI, adenosin-desaminasa, ovoalbúmina, seroalbúmina, fosfatasa alcalina, catalasa y ferritina. El volumen de exclusión se calcula mediante azul de dextrano ($M = 2 \times 10^6$). [Proteínas control] = 0,05-2 mg. El contenido proteico y la actividad enzimática en los eluyentes, que permite localizar la posición de cada uno de los marcadores, se determinan como se describe en Material y métodos.

molecular de mayor movilidad electroforética es la que presenta menor K_m respecto a la guanina.

Discusión

En la guanina aminohidrolasa soluble de hígado de cobaya (homogeneizados) aparecen cuatro bandas proteicas con distinta movilidad electroforética, las cuales son estables frente a la acción de tratamientos ácidos y térmicos. Asimismo, el

hecho que la representación doble recíproca de v vs. $[S]$ delimite dos rectas de distinta pendiente, es consecuente con la existencia de cuatro formas múltiples en la guanina aminohidrolasa de esta procedencia, en concordancia con lo observado en el enzima de otros orígenes (4, 12).

La purificación de la guanina aminohidrolasa de hígado de cobaya que se describe permite la obtención de un preparado que mantiene la composición electroforética de los homogeneizados iniciales. La cromatografía del purificado sobre DEAE-sephadex permite la separación de dos formas, lo que sugiere la existencia de diferencias estructurales entre las distintas formas moleculares, en concordancia con el distinto comportamiento cinético de las formas aisladas cuyos valores de K_m coinciden, respectivamente, con los hallados para el enzima nativo.

El que no sea posible lograr la separación de las distintas formas por cromatografía en sephadex G-100 y el que una vez separadas muestren idénticos pesos moleculares (cromatografía en sephadex G-200) demuestra que estas formas moleculares no son agregados del enzima.

Finalmente, cabe considerar que la presencia en el hígado de cobaya de distintas formas moleculares del enzima, con distinta proporción relativa y diferentes características cinéticas, junto con la aparición de inhibición por sustrato a diferentes concentraciones, puede estar relacionada, de alguna manera, con una autorregulación de la actividad guanina aminohidrolasa en estado nativo.

Resumen

Se ha purificado 11 veces la guanina aminohidrolasa (E.C. 3.5.4.3) procedente del sobrenadante de homogeneizados de hígado de cobaya en sacarosa 0,25 M (centrifugados a 50.000×g), por desnaturalización térmica a 60° C y fraccionamiento con sulfato amónico (30-60 % de saturación).

Tanto el enzima que se halla en los homogeneizados como en los preparados purificados posee dos valores de K_m ; ambas preparaciones exhiben cuatro bandas electroforéticas con actividad enzimática. La guanina aminohidrolasa purificada se resuelve por cromatografía en DEAE-sephadex en tres componentes cuyos ferogramas muestran las formas activas separadas. La forma enzimática eluida a menor fuerza iónica es la de movilidad anódica inferior, es inhibida por guanina (4×10^{-5} M) y sólo posee un valor de K_m ($1,5 \times 10^{-5}$ M). La forma enzimática eluida a mayor fuerza iónica exhibe una sola banda (la de movilidad anódica superior); también se inhibe por guanina (mayor de 7×10^{-5} M) y su valor de K_m es de $6,3 \times 10^{-6}$ M.

El peso molecular para las distintas formas enzimáticas, determinado por cromatografía en sephadex G-200, es de 120.000 ± 5.000 .

Los resultados anteriores y la homogeneidad cromatográfica de los purificados de guanina aminohidrolasa en sephadex G-100 sugieren que las cuatro formas moleculares presentes en el enzima nativo puedan considerarse como isoenzimas.

Bibliografía

1. BEERS, R. F. y SIZER, I. W.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140, 1952.
2. CURRIE, R., BERGEL, F. y BRAY, R. C.: *Biochem. J.*, **104**, 634-638, 1967.
3. HOGEBOOM, G. A., SCHNEIDER, W. C. y STRIEBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 111-120, 1952.
4. JOSAN, V. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 299-302, 1968.
5. KALCKAR, H. M. y SHAFRAN, M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443, 1947.
6. KALCKAR, H. M. y SHAFRAN, M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 461-475, 1947.
7. KELLEY, W. N., ROSENBLOOM, F. M., HENDERSON, J. F. y SEEGMILLER, J. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 340-345, 1967.
8. KUMAR, S., TEWARI, K. K. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. J.*, **95**, 797-802, 1965.
9. KUMAR, S., TEWARI, K. K. y KRISHNAN, P. S.: *J. Neurochem.*, **13**, 1550-1552, 1966.
10. KUMAR, K. S. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 600-602, 1970.
11. KUMAR, K. S. y SANGER, K. C. S.: *Enzymologia*, **39**, 49-56, 1970.
12. KUMAR, K. S., SITARAMAYYA, A. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. J.*, **128**, 1079-1088, 1972.
13. LEWIS, A. S. y GLANTZ, M. D.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 3862-3866, 1974.
14. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
15. MAGER, J., HERSHKO, A., ZEITLIN, R., SHOSHANI, T. y RAZIN, A.: *Biochem. Biophys. Acta*, **149**, 50-58, 1967.
16. MALAMY, M. H. y HORECKER, B. L.: *Biochemistry*, **3**, 1893-1897, 1964.
17. ROUSH, A. y NORRIS, E. R.: *Arch. Biochem.*, **29**, 124-129, 1950.
18. SCHMIDT, G.: *Z. Physiol. Chem.*, **219**, 191-206, 1933.
19. SCHWERT, G. W. y TAKENAKA, Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **16**, 570-575, 1955.
20. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1941.