

Formas moleculares de la malato deshidrogenasa citoplasmática de hígado de pollo

J. Baró, A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona (Central)
Barcelona - 28

(Recibido el 30 de enero de 1979)

J. BARO, A. CORTES and J. BOZAL. *Molecular Forms of Chicken Liver Cytoplasmic Malate Dehydrogenase*. Rev. esp. Fisiol., 35, 437-446. 1979.

Cytoplasmic malate dehydrogenase has been purified 20 — fold from the supernatant fraction of chicken liver homogenates in 0.25 M sucrose (differential centrifugation at 100,000 $\times g$) through calcium phosphate gel absorption, ammonium sulphate fractionation (45-80 % saturation) and Sephadex G-100 chromatography.

Two molecular forms, A and B, of the enzyme are unmodified during the purification process, observed by electrophoresis. Two additional bands that appear in the electrophoretic patterns are not attributable to molecular forms of the enzyme, but to the lack of non-dehydrogenase activity of the preparation used.

Both forms differ in their thermal stability (form A is more thermolabile) and net charge; and they both have the same molecular weight ($67,000 \pm 5,000$ daltons), determined by Sephadex G-200 chromatography.

The enzyme in the purified preparations exhibits two K_{M} values in the double reciprocal plot v vs [L-malate], due to the presence of two forms with different affinity for the hydroxyacid.

La malato deshidrogenasa (L-malato : NAD⁺ oxidoreductasa; E.C. 1.1.1.37) citoplasmática (MDH-s) aparece bajo diversas formas moleculares en numerosas especies de vertebrados (8, 15, 18, 20), y la multiplicidad se ha justificado por diversos criterios según la procedencia del enzima; figuran entre ellos: variaciones de la conformación (28), la desamidación de restos de glutamina y de asparagina (12), la diferencia en la composición aminoácida de las subunidades (15, 34), las

variaciones en el número de grupos de fosfato enlazados covalentemente (6) y, también, una evolución divergente limitada de los genes duplicados que originan las subunidades presentes en la molécula oligómera (2). En ocasiones, el número de formas moleculares de MDH-s se observa que depende del grado de pureza de la preparación y del soporte (5, 10) o del pH (11) al que se efectuó la electroforesis.

En este trabajo se demuestra que la MDH-s de hígado de pollo aparece en dos

formas de igual peso molecular que se han caracterizado cinéticamente con L-malato y NAD^+ como sustratos.

La diferente estabilidad térmica de las dos formas moleculares del enzima permite interpretar las anomalías cinéticas que se observan cuando se trabaja con concentraciones elevadas de L-malato.

Material y métodos

La malato deshidrogenasa procede de hígados de pollo separados del animal recién sacrificado. Los productos empleados son ácido oxalacético y β -dimetilamino propionitrilo (Fluka), NAD^+ , NADH , adenosín desaminasa, seroalbúmina bovina y fosfatasa alcalina (Boehringer), ácido DL-málico, p-nitrofenilfosfato y adenosina (Merck), ovoalbúmina, γ -globulinas y azul de dextrano (Sigma), Sephadex G-100 y Sephadex G-200 Superfino (Pharmacia), acrilamida y $\text{N,N}'$ -metilenbisacrilamida (Eastman Kodak), ferricianuro potásico y persulfato amónico (U.C.B.) y azul de p-nitrotetrazolio (Serva).

La actividad de la malato deshidrogenasa se determinó por medida de las variaciones de absorbancia a 340 nm y $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$, en un espectrofotómetro Beckman Modelo 25 provisto de inscriptor, en cubetas de 1 cm de paso de luz. La mezcla de reacción standard utilizada en la determinación de la actividad MDH durante el curso de la purificación y en el establecimiento de su peso molecular, contenía tampón de fosfatos 100 mM (pH 7,4), oxalacetato 0,6 mM, NADH 0,1 mM y el volumen de disolución enzimática necesario para obtener una variación lineal de la absorbancia durante los dos primeros minutos de la reacción, en un volumen final de 3 ml. En todos los casos se emplearon disoluciones recién preparadas de los sustratos en el tampón mencionado, ajustándose al pH adecuado (pH metro).

La unidad enzimática (μ katal) se define como la cantidad de enzima que produce la transformación de 1 μmol de sus-

trato por segundo y se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar para el NADH de $6.220 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, a 340 nm (16).

El contenido en proteína de las distintas disoluciones se determinó por el método de WARBURG y CHRISTIAN (33) y por el método de LOWRY (23), tomando como referencia un patrón de seroalbúmina bovina.

Los geles de poliacrilamida fueron preparados por modificación del método de RAYMOND *et al.* (27), con una concentración de acrilamida del 7,5 %. Se aplicaron 0,015 unidades de MDH que se sometieron a electroforesis en un aparato ACRYLOPHOR analítico 140, durante 90 min a 4°C , con una intensidad de 5 mA/gel, en tampón tris-glicina 217 mM de pH 8,5. Al aplicar el método de HEDRICK y SMITH (13) se emplearon concentraciones de acrilamida comprendidas entre el 6 % y el 10 %. Las formas moleculares de la MDH-s se detectaron por tinción específica según el método de THORNE *et al.* (32). La actividad no deshidrogenásica de los preparados proteicos se determinó utilizando el revelador específico carente de L-malato. Finalizada la tinción, los geles se lavan con agua destilada hasta eliminar el reactivo revelador y, posteriormente, se conservan sumergidos en agua bidestilada y en tubos cerrados.

El peso molecular de la MDH-s se determinó por el método de ANDREWS (1), en una columna (3 cm \times 70 cm) de Sephadex G-200 superfino, equilibrada con tampón tris-HCl 25 mM de pH 7,5 que era 100 mM en KCl. La curva de calibrado se confeccionó con adenosín desaminasa (35.000 daltones), ovoalbúmina (45.000), seroalbúmina bovina (67.000), fosfatasa alcalina (115.000) y γ -globulinas (160.000). El volumen de exclusión se calculó mediante azul de dextrano (2×10^6). Las cantidades de las distintas proteínas empleadas en la confección de la curva de calibrado oscilaron entre 0,1 y 2,5 mg. Las actividades de la adenosín desaminasa

y de la fosfatasa alcalina se determinaron por los métodos de KALCKAR y SHAFRAN (17) y de MALAMY y HORECKER (24), respectivamente. Las demás proteínas se valoraron por lectura directa de la absorbancia a 230 nm (1).

La oxidación enzimática del L-malato por el NAD⁺ se determinó a pH 9,6 (tampón glicina-NaOH 50 mM), iniciándose la reacción con 0,003 unidades de MDH-s. La variación de las velocidades iniciales con la concentración de sustrato se expresó mediante la representación de 1/v vs 1/S. El análisis de los resultados obtenidos se ha efectuado según las predicciones de CLELAND (7) y la determinación de los parámetros cinéticos del sistema por aplicación del método de VESTLING-FIORINI (9).

Purificación de la MDH-s de hígado de pollo. Los hígados frescos troceados, exentos de adherencias grasas y de tejido conjuntivo, se suspenden en la proporción de 1 g de tejido por 9 volúmenes de disolución de sacarosa 0,25 M a 4° C (temperatura habitual de trabajo) y se homogenizan en Potter-Elvehjem. Se eliminan las fracciones nuclear y mitocondrial del homogeneizado por centrifugación diferencial (29) y el sobrenadante se centrifuga a 100.000 × g, 60 min. La fracción soluble obtenida se trata con gel de fosfato cálcico (1 g gel/g tejido) y el conjunto se mantiene en agitación 20 min a 4° C. La MDH-s se extrae por suspensión de 1 g de gel en 9 volúmenes de tampón de fosfatos 100 mM, pH 7,4; por centrifugación de aquélla a 5.000 × g, 20 min, se obtiene un sobrenadante activo, que se lleva al 80 % de saturación en (NH₄)₂SO₄. El precipitado se separa por centrifugación (5.000 × g, 30 min) y se disuelve en tampón de fosfatos 20 mM pH 7,4 (1 : 2 p/v) frente al que se dializa a 4° C. Al dializado centrifugado se le añade (NH₄)₂SO₄ recogiéndose, por centrifugación, el precipitado activo que aparece entre el 45 % y el 80 % de saturación.

El precipitado se disuelve en tampón tris-HCl 50 mM pH 7,4 (100 mM en KCl) en la proporción 1 : 2 p/v; la disolución se dializa frente al mismo tampón y se cromatografía después en una columna (3 cm × 70 cm) de Sephadex G-100 equilibrada con el mismo tampón con el que también se efectúa la elución. Se recogen fracciones de 5 ml a una velocidad de 25 ml/h. Se reúnen los eluidos activos, se llevan al 80 % de saturación en (NH₄)₂SO₄ y se recoge el precipitado del modo habitual. El preparado de MDH-s conserva inalterada su actividad durante varios meses a -20° C. En la tabla I aparecen las etapas de la purificación de la MDH-s.

Los preparados obtenidos por el método de purificación que se ha descrito, conservan el mismo número de formas moleculares que las que se observan por electroforesis de la fracción soluble.

Resultados

Formas moleculares de la MDH-s de hígado de pollo. En la electroforesis (a pH 8,5, en geles de poliacrilamida) de la MDH-s de hígado de pollo purificada aparecen, por revelado específico, cuatro bandas: A, B, C y D (fig. 1A). La banda A es la de mayor movilidad anódica.

Al efectuar el revelado específico, las bandas A y B aparecen al cabo de 10-15 minutos de incubación de los geles a 37° C con el revelador específico, mien-

Tabla I. Purificación de la MDH-s de hígado de pollo.

Etapa	Proteína total (mg)	Unidades totales (μkat)	Actividad específica (μkat/mg prot.)
Fracción soluble	11.965	453,5	0,038
Adsorción gel de fosfatos	2.569	336,7	0,131
Fraccionamiento (NH ₄) ₂ SO ₄	775	273,3	0,352
Cromatografía en Sephadex G-100	306	226,8	0,741

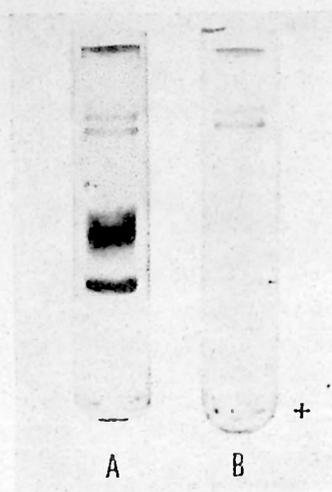


Fig. 1. Electroforesis en geles de poliacrilmida de las formas moleculares de la MDH-s de hígado de pollo.

(A) Tinción con el revelador de la MDH;
(B) Actividad no deshidrogenásica.

tras que las C y D lo hacen después de 45-60 min.

Cuando el revelador específico no contiene L-malato, solamente se perciben dos bandas (fig. 1B) que también se detectan al cabo de 45-60 min de incubación de los geles y que coinciden, en movilidad e intensidad, con las bandas C y D. Puede afirmarse, por tanto, que solamente las bandas A y B corresponden a formas moleculares de MDH-s, que se designarán, en adelante, por MDH-s (A) y MDH-s (B); esta última es la predominante. Se han obtenido resultados análogos en la electroforesis de la fracción soluble y no se aprecian alteraciones en el ferograma cuando se modifica el pH al que se efectúa la electroforesis en el intervalo de pH 7-9.

El número de bandas obtenidas por electroforesis en geles de poliacrilmida y posterior tinción con el revelador específico completo (fig. 1A) es idéntico al deducido utilizando tiras de poliacetato de celulosa como soporte electroforético (4).

El número de bandas no varía al modi-

ficar la concentración de acrilamida del gel (desde el 6 % hasta el 10 %). Al aplicar el método de HEDRICK y SMITH (13) a las formas A y B de la MDH-s se obtienen rectas paralelas (fig. 2), lo que sugiere que ambas poseen el mismo peso molecular y difieren en su carga neta.

Estabilidad térmica. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las formas moleculares de la MDH-s de hígado de pollo se evalúa manteniendo la fracción soluble o el preparado purificado del enzima durante 10 min a diversas temperaturas (55° C-80° C). Seguidamente las muestras se enfrían rápidamente a 2° C y se centrifugan a 15.000 × g, 20 min, a 4° C. Se efectúa la electroforesis (gel de poliacrilmida) del sobrenadante y se compara con la de una muestra que se mantuvo a temperatura ambiente. La observación de los electrogramas (fig. 3) muestra que la forma A se ha inactivado en la calefacción a 55° C, mientras que la MDH-s (B) lo hace a 70° C. Las formas que originan las bandas C y D, de las que no se posee evidencia completa de que sean de MDH-s, son más estables ya que

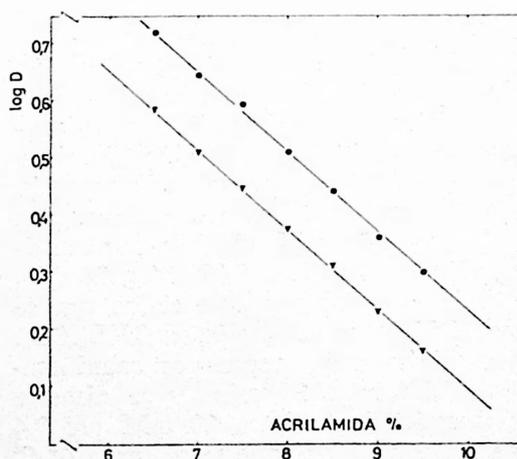


Fig. 2. Electroforesis en geles de poliacrilmida de la MDH-s purificada, a diferentes concentraciones de acrilamida.

(●-●) MDH-s (A); (▼-▼) MDH-s (B).

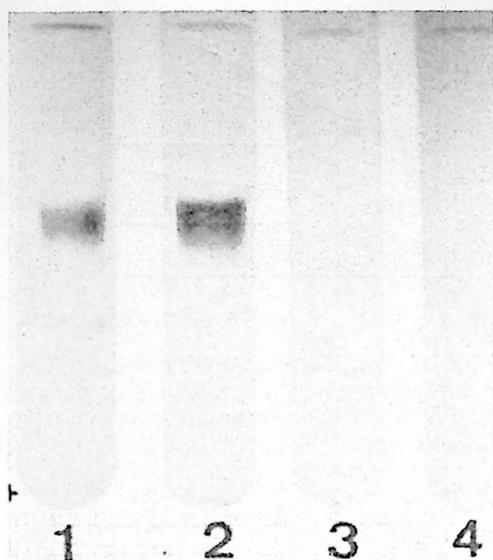


Fig. 3. Estabilidad térmica de las formas moleculares de la MDH-s de hígado de pollo. (1) Enzima no tratado térmicamente; (2) Calefacción a 55° C 10 min; (3) Calefacción a 70° C 10 min; (4) Calefacción a 80° C 10 min.

la D se destruye a 80° C, a cuya temperatura todavía la C conserva su actividad.

Características cinéticas. La influencia del pH sobre la actividad de la MDH-s de hígado de pollo de la fracción soluble y del purificado se ha determinado con L-malato (1 mM) y NAD⁺ (1 mM), en el intervalo de pH 8,5-10, a 30 ± 0,1° C, en medio de tampón glicina-NaOH 50 mM. Para evitar la pérdida de actividad de las disoluciones de MDH-s en esta zona de pH alcalino, la disolución se mantiene a pH 7,4, al que conserva su actividad inalterada durante varias horas. La reacción se inicia por adición de 0,2 ml de dicha disolución a los 2,8 ml de la mezcla tamponada de los sustratos (se ha comprobado que el pequeño volumen adicionado no modifica el pH del conjunto).

Los resultados obtenidos indican que el pH óptimo de la reacción es 9,6, similar al deducido para el enzima de otras pro-

cedencias (15, 18, 21, 22) con L-malato y NAD⁺ como sustratos.

Con objeto de comprobar si la eliminación sucesiva, por calefacción, de las distintas formas de MDH-s (fig. 3) se traduce en diferencias de comportamiento cinético respecto al del enzima que no se ha sometido a calefacción, se han determinado las velocidades iniciales de reacción a pH 9,6 y 30 ± 0,1° C con concentraciones variables de L-malato y una concentración constante de NAD⁺ (1 mM). Los resultados obtenidos con la fracción soluble o con el preparado purificado (fig. 4a) indican la aparición de dos valores distintos de K_M (0,46 mM y 1,84 mM) en la representación doble recíproca de v frente a [S]. Aparece inhibición por exceso de L-malato si la concentración del hidroxácido es mayor que 2,4 mM. Al trabajar con el mismo preparado enzimático después de su calefacción a 55° C 10 min, condiciones en las que la MDH-s (A) se inactiva (fig. 3), se obtiene una línea recta (fig. 4b) siendo K_M = 0,41 mM y la inhi-

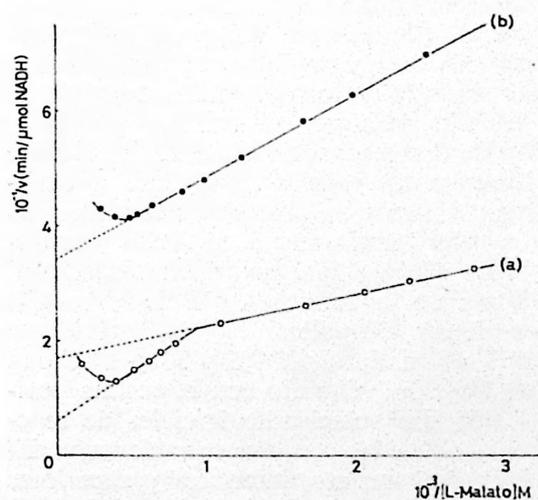


Fig. 4. Velocidades iniciales de reacción del sistema L-malato-MDH-s-NAD⁺.

[NAD⁺] = 1 mM.

(a) Enzima no tratado térmicamente; (b) Calefacción a 55° C 10 min.

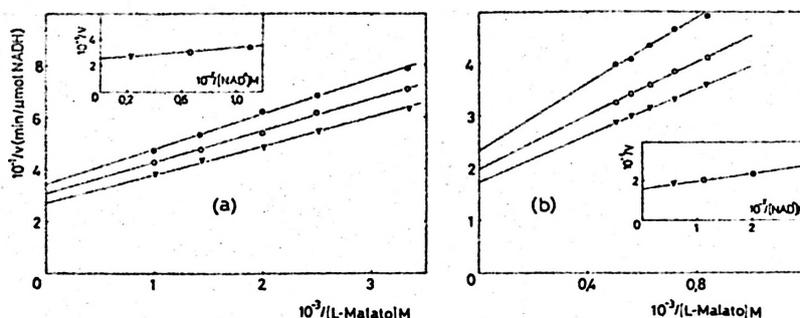


Fig. 5. Velocidades Iniciales de reacción del sistema L-malato-MDH-s-NAD⁺. (a) [L-malato] variable < 1,1 mM. [NAD⁺] mM, de arriba a abajo: 0,9; 1,5; 4,5. (b) [L-malato] variable > 1,1 mM. [NAD⁺] mM, de arriba a abajo: 0,5; 0,9; 1,8. En recuadro, representación secundaria de Vestling-Florini.

bición por exceso de sustrato aparece para concentraciones de L-malato superiores a 2 mM.

Cuando se experimenta con el enzima que se ha calentado a 70° C (que por electroforesis conservaba las bandas C y D) y a 80° C (que conserva la banda C), se observa que no cataliza la oxidación del L-malato por el NAD⁺, aunque se utilice una concentración proteica cien veces superior a la habitual, lo que constituye una prueba de que las bandas C y D no son atribuibles a formas moleculares de la MDH-s de hígado de pollo.

De los resultados expuestos se deduce que los dos valores de K_M que se obtienen al trabajar con los preparados no tratados térmicamente, se deben a la distinta afinidad que presentan respecto al L-malato las formas A y B de la MDH-s de hígado de pollo.

Trabajando a pH 9,6 y $30 \pm 1^\circ$ C con la fracción soluble o con el enzima purificado, las velocidades iniciales de reacción obtenidas con concentraciones variables de L-malato, inferiores y superiores a las del punto de inflexión (1,1 mM) (fig. 4a) y distintas concentraciones de NAD⁺, originan, en todos los casos, en la representación doble recíproca rectas no paralelas con un punto de intersección común a la izquierda del eje de ordenadas

(fig. 5). Ello está de acuerdo con un mecanismo general de tipo secuencial (7). Por aplicación del método de VESTLING-FIORINI (9) a los resultados obtenidos se han calculado las constantes de Michaelis reales del sistema, que aparecen en la tabla II; en la misma se indican, también, los valores de las constantes de disociación (\bar{K}) de los complejos enzima-sustrato y enzima-coenzima.

Peso molecular. El peso molecular de la MDH-s de hígado de pollo se ha determinado por cromatografía en columna de Sephadex G-200. La interpolación del volumen de elución de la MDH-s en la recta de calibrado (fig. 6) proporciona un peso molecular de 67.000 ± 5.000 daltones. Los eluidos cromatográficos presentan un solo pico de actividad MDH y en ellos se hallan las formas A y B del enzima; ambas poseen, por tanto, el mismo peso molecular, en concordancia con los resultados

Tabla II. Parámetros cinéticos del sistema L-malato - MDH-s - NAD⁺.

[L-Malato] (mM)	K_M (L-Malato) (mM)	K_M (NAD ⁺) (mM)	$\bar{K}_{L-Malato}$ (mM)	\bar{K}_{NAD^+} (mM)
<1,1	0,4	0,3	0,38	0,29
>1,1	1,21	0,29	1,55	0,23

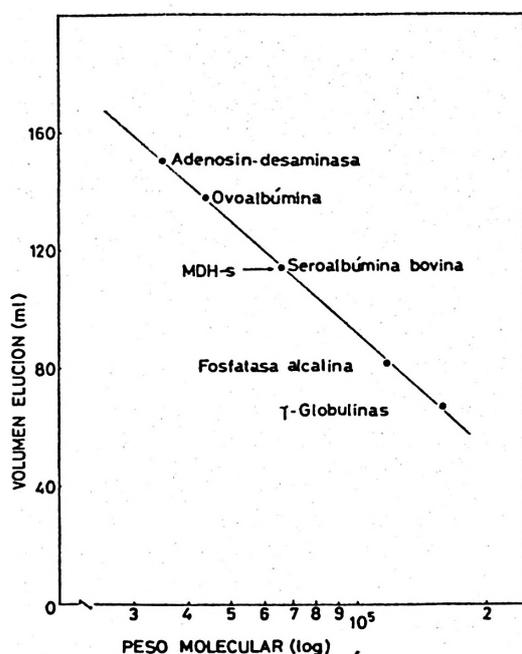


Fig. 6. Peso molecular de la MDH-s de hígado de pollo por filtración en gel (Sephadex G-200).

obtenidos al aplicar el método de HEDRICK y SMITH (*loc. cit.*) al preparado enzimático que la contiene (fig. 2).

Discusión

La electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8,5, de la fracción soluble de hígado de pollo demuestra, mediante revelado específico de la MDH, la presencia de cuatro bandas A, B, C y D con movilidad decreciente; las dos primeras son las que aparecen con mayor rapidez por revelado específico (10-15 min), mientras que las C y D lo hacen al cabo de 45-60 min.

La purificación de la malatodeshidrogenasa citoplasmática de hígado de pollo que se describe, permite la obtención de un preparado purificado con una activi-

dad específica 20 veces superior a la de la fracción soluble y que da lugar a un ferograma idéntico al de aquella.

El examen de la posible actividad no deshidrogenásica del preparado revela la aparición de dos bandas cuyo recorrido e intensidad es coincidente con el de las bandas C y D, lo que introduce incertidumbre acerca de su naturaleza.

La composición electroforética se altera tanto si el enzima presente en la fracción soluble como en el preparado purificado se calientan durante 10 min a distintas temperaturas; a 55° C desaparece la banda A, a 70° C la banda B y a 80° C la banda D, a cuya temperatura todavía se detecta la banda C.

Las muestras que han sido calentadas a 70° C y a 80° C no catalizan la oxidación del L-malato por el NAD⁺, lo que demuestra que la MDH-s de hígado de pollo presenta dos formas moleculares A y B, siendo esta última la predominante. El resultado es idéntico al deducido por KITTO y KAPLAN (18) al trabajar con la MDH-s de corazón de pollo. Por todo ello puede afirmarse que las bandas C y D no corresponden a formas moleculares del enzima, sino que son debidas a artefactos preparativos que surgen por actividad no deshidrogenásica originada por interacciones entre el revelador específico del enzima con otras proteínas presentes en el preparado. El fenómeno es frecuente cuando se emplea un revelador específico de deshidrogenasas que contengan NAD⁺ y se experimenta con preparados proteicos parcialmente purificados (3, 26), siendo una de las causas más frecuentes la reducción del NAD⁺ del revelador por grupos tiólicos de otras proteínas presentes en el preparado (31).

En general, se reconoce que la estabilidad térmica de la malato deshidrogenasa citoplasmática es superior a la del enzima mitocondrial (4, 18, 19), pero el estudio de las diferentes formas moleculares del enzima citoplasmático de animales superiores ha recibido poca atención. Los re-

sultados que se describen en este trabajo demuestran que las dos formas moleculares de la MDH-s de hígado de pollo se diferencian en su estabilidad térmica en concordancia con el comportamiento de las formas moleculares de la MDH-s de maíz (34) y de fasciola hepática (25), aunque difieren del que exhiben las del enzima de corazón de cerdo (20).

La aplicación del método de HEDRICK y SMITH (13) pone de manifiesto que las formas A y B poseen el mismo peso molecular pero difieren en su carga neta, lo que está de acuerdo con el que no sea posible lograr su separación por cromatografía a través de Sephadex G-100. El valor del peso molecular obtenido (67.000 ± 5.000 daltones) por cromatografía de exclusión en Sephadex G-200, es análogo al descrito para la MDH-s de otras procedencias (10, 11, 15, 18, 19).

Finalmente cabe destacar que a pH 9,6 (pH óptimo del enzima con L-malato y NAD^+ como sustratos), la representación doble recíproca de v vs [L-malato] delimita dos rectas caracterizadas por un distinto valor de K_M (0,46 mM y 1,84 mM), en forma análoga a lo que sucedía a pH 7,4 con oxalacetato variable (4). El fenómeno se debe a la existencia de las formas A y B del enzima en el preparado, que poseen distinta afinidad por el sustrato; después de la eliminación de la forma A del enzima por calefacción a 55°C , 10 min, sólo aparece una recta en dicha representación ($K_M = 0,41$ mM). Se ha observado la existencia de dos K_M (L-malato) en la malato deshidrogenasa mitocondrial de corazón bovino (pH 9,8 $K_{M1} = 0,37$ mM, $K_{M2} = 1,8$ mM) (30) y de cerebro bovino (pH 8,1 $K_{M1} = 1,9$ mM, $K_{M2} = 28$ mM) (14).

Resumen

Se ha purificado veinte veces la malato deshidrogenasa citoplasmática procedente de la fracción soluble de homogeneizados de hígado de pollo, obtenida por centrifugación diferen-

cial a $100.000 \times g$ en sacarosa 0,25 M, mediante adsorción en gel de fosfato cálcico, fraccionamiento del eluido con sulfato amónico (45 %-80 % saturación) y cromatografía de exclusión a través de Sephadex G-100.

El enzima se presenta en dos formas moleculares A y B identificadas por electroforesis, y la composición electroforética no se modifica en el proceso de purificación. Las dos bandas adicionales que aparecen en los ferogramas no son atribuibles a formas moleculares del enzima ya que se deben a la actividad no deshidrogenásica del preparado.

Ambas formas poseen distinta estabilidad térmica (la A es más termolábil), diferente carga eléctrica e idéntico peso molecular (67.000 ± 5.000 daltones), determinado por cromatografía en Sephadex G-200.

Cuando se experimenta con el preparado purificado, la representación doble recíproca de v frente a [L-malato] delimita dos rectas con distinto valor de K_M , debido a la distinta afinidad que poseen ambas formas respecto al hidroxácido.

Bibliografía

1. ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233, 1964.
2. BAILEY, G. S., WILSON, A. C., HALVER, J. E. y JOHNSON, C. L.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 5927-5940, 1970.
3. BARNETT, H.: *J. Clin. Pathol.*, **17**, 567-570, 1964.
4. BARÓ, J., CORTÉS, A. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 241-248, 1974.
5. BECKMAN, G. y CHRISTODOULOU, C.: *Human Heredity*, **24**, 294-299, 1974.
6. CASSMAN, M. y VETTERLEIN, D.: *Biochemistry*, **13**, 684-689, 1974.
7. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104-137, 1963.
8. DUPOURKE, D. y KUN, E.: *Eur. J. Biochem.*, **6**, 151-155, 1968.
9. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575-578, 1957.
10. FRANCIS, A. N. y COUGHLAN, M. P.: *Int. J. Biochem.*, **7**, 59-65, 1976.
11. GERDING, R. K. y WOLFE, R. G.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1164-1171, 1969.
12. GLATTHAAR, B. E., BARBARASH, G. R., NOYES, B. E., BANASZAK, L. J. y BRADSHAW, R. A.: *Anal. Biochem.*, **57**, 432-451, 1974.

13. HEDRICK, J. L. y SMITH, A. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 155-164, 1968.
14. HIGASHIDA, H., SEMBA, R. K., NIWA, F. y KASHIWAMATA, S.: *J. Biochem.*, **78**, 989-999, 1975.
15. HODNETT, J. L., EVANS, J. E., GRAY Jr, H. B. y BARTEL, A. H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**, 271-277, 1976.
16. HORECKER, B. L. y KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.*, **175**, 385-390, 1948.
17. KALCKAR, H. M. y SHAFRAN, M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443, 1947.
18. KITTO, G. B. y KAPLAN, N. O.: *Biochemistry*, **5**, 3966-3980, 1966.
19. KITTO, G. B. y LEWIS, R. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 1-15, 1967.
20. KULICK, R. J. y BARNES, F. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 1-8, 1968.
21. LEGRIS, A. J. y TSAI, C. S.: *Can. J. Biochem.*, **53**, 527-535, 1975.
22. LESKOVAC, V., JERANCE, D. y BURANY, E.: *Int. J. Biochem.*, **6**, 563-568, 1975.
23. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
24. MALAMY, M. H. y HORECKER, B. L.: *Biochemistry*, **3**, 1893-1897, 1964.
25. PROBERT, A. J. y LWIN, T.: *Exp. Parasitol.*, **41**, 89-94, 1977.
26. RACKER, E.: *Physiol. Reviews*, **35**, 1-56, 1955.
27. RAYMOND, S. y NAKAMICHI, M.: *Anal. Biochem.*, **3**, 23-30, 1962.
28. RESSLES, N. y STITZER, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 1-9, 1967.
29. SCHNEIDER, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 259-266, 1948.
30. SIEGEL, L. y ENGLARD, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 67-76, 1961.
31. SILVERSTEIN, E. y GELLER, H.: *J. Chromatogr.*, **101**, 327-337, 1974.
32. THORNE, C. J. R., GROSSMAN, L. y KAPLAN, N. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 193-203, 1963.
33. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1941.
34. YANG, N. S. y SCANDALIOS, J. G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 335-353, 1974.

