

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Discriminación del efecto sobre membrana en la inhibición de la absorción de glucosa por la levadura*

Ramón Parés-Farrás**

(Recibido para publicar el 30 de mayo de 1956)

Introducción

Si una sustancia modifica la cantidad de glucosa absorbida por la levadura, su acción puede haber tenido lugar sobre la membrana o en el interior de la célula. La cantidad de glucosa tomada del medio exterior disminuirá igualmente al inhibirse su paso a través de la membrana que al inhibirse su consumo en el interior.

No existe un procedimiento general que permita discernir si un inhibidor determinado actúa exclusiva o preponderantemente sobre la penetración de glucosa a través de la membrana celular.

Se han ensayado varios procedimientos, particularmente en las investigaciones llevadas a cabo sobre la acción del ión uranilo en la absorción de glucosa por la levadura. Dichos procedimientos son muy ilustrativos desde el punto de vista de cómo puede ser abordado el problema, pero, en su mayor parte, tienen el inconveniente de estar particularmente circunscritos al referido inhibidor enzimático.

MUNTZ, SINGER y BARRON (4) sugirieron que el ión uranilo

* Parte de la Memoria doctoral leída en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona en marzo de 1956.

** Con una beca del Patronato Juan de la Cierva.

debería actuar sobre la superficie celular por cuanto existe una pronunciada diferencia en su efecto sobre células vivas y sobre extracto libre de células.

Son muy discutibles las conclusiones obtenidas de la comparación entre el efecto observado sobre un extracto celular y la inhibición de células intactas. Resulta extraordinariamente difícil poder preparar un extracto celular enzimáticamente equivalente a una determinada suspensión de células.

BARRON, MUNTZ y GASVODA (2) encontraron que la inhibición del uranilo se hace reversible por la adición al medio de pequeñas cantidades de ATP o hexosa difosfato. Como quiera que se admite que tales sustancias no penetran en la célula, para que el uranilo esté a su alcance tampoco él puede haber penetrado.

La reversibilidad de la inhibición por sustancias no penetrantes constituye un valioso recurso para poner de manifiesto algunas acciones sobre membrana. Sin embargo, como método, adolece también de limitaciones, a saber :

1.ª Dificultad de encontrar una sustancia no penetrante que haga reversible la inhibición por el agente que se investiga.

2.ª Dificultades de probar la no penetrabilidad de dicha sustancia.

3.ª Inaplicabilidad del método a los inhibidores de membrana penetrantes.

El ingenioso procedimiento aplicado por ROTHSTEIN y LARRABEE (9), también sobre el efecto del ión uranilo sobre la absorción de glucosa por la levadura, constituye una interesante variante del método anterior. La inhibición se hace reversible por la presencia en el medio de pequeñas cantidades de fosfato inorgánico, a despecho de la relativamente alta concentración de ortofosfato endocelular. Se concluye que el ión uranilo debe de actuar en la superficie por cuanto en el interior de la célula su acción se vería completamente neutralizada.

Después de haber conseguido inducir la producción de fermentación alcohólica endógena en la levadura (5, 7), se nos sugirió la posibilidad de aislar funcionalmente de un modo general el efecto de un inhibidor sobre el paso de glucosa a través de la membrana de toda otra acción que pueda llevar a cabo simultáneamente sobre la célula.

Material y métodos

En los experimentos se ha utilizado levadura fresca de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), lavada dos veces en agua destilada.

Para la determinación de la cantidad de levadura se han

practicado medidas de sedimento constante a 1.800 r. p. m., expresadas luego en equivalentes de peso seco.

Para las medidas de absorción de glucosa se ha seguido fundamentalmente el procedimiento empleado por ROTHSTEIN y LARRABEE (9). El período de vaciado de reservas se lleva a cabo en agua destilada y con aireación durante tres o cuatro horas. El pH de las suspensiones se ajusta con ClH 0,1 N a 3,5, inmediatamente antes de la absorción. Después de 30 minutos de absorción, se centrifuga y se determina la glucosa en el sobrenadante fotocolorimétricamente con el reactivo de FOLIN-WU (5, 7).

La producción de CO₂ se mide con la técnica standard de WARBURG (1, 13). Se consiguen condiciones anaeróbicas reemplazando el aire con nitrógeno previamente purificado (5, 7).

AISLAMIENTO DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

1. — Efecto sobre la utilización de glucosa exterior y sobre la fermentación endógena.

Primeramente, se estudia la acción de la sustancia problema sobre la utilización de glucosa exterior. Se sigue la marcha siguiente :

1. Tratamiento previo de vaciado de reservas.
2. Purificación de la levadura.
3. Ajuste del pH entre 3 y 4.
4. Determinación del sedimento y ajuste de la concentración celular para un valor final de 0,03 ml./ml. (14,253 miligramos/ml.).
5. Treinta minutos de absorción anaeróbica a 30° C. y con una concentración inicial de glucosa del 0,3 %.
6. Centrifugación.
7. Determinación de la glucosa en el sobrenadante.

Este ensayo permite determinar la glucosa absorbida sin inhibidor y en presencia de una determinada cantidad de inhibidor. De ambos valores puede calcularse el porcentaje de inhibición.

De una experiencia a otra se observan pequeñas diferencias en la glucosa tomada del medio exterior. Sin embargo, los valores de inhibición permanecen siempre sensiblemente constantes.

Cuando se encuentra inhibición, se prosiguen las determinaciones hasta que sea posible trazar una gráfica que relacione la inhibición con la concentración de inhibidor. En la fig. 1 (A),

Inhibición (%)

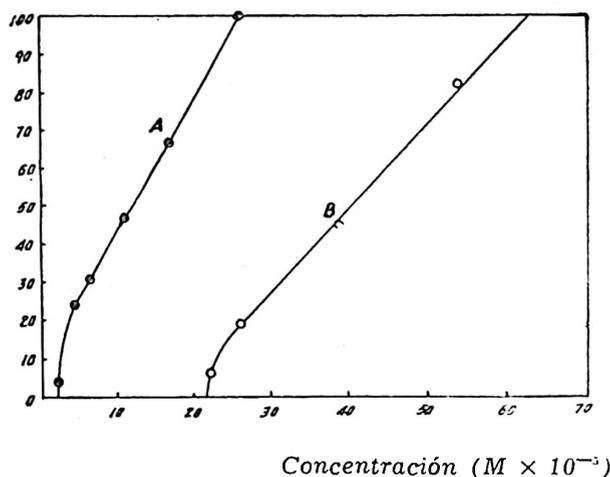


Fig. 1.—Acción del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil amonio sobre la utilización de glucosa exterior (A) y sobre la fermentación alcohólica endógena.

se representa la curva así obtenida para el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio (cuadro I).

Conocida la acción del inhibidor sobre la utilización de glucosa exterior, se procede al estudio de su acción sobre la fermentación alcohólica endógena. Para ello se sigue la siguiente técnica :

1. Se pesan 5 g. de levadura comprimida y se dispersan lo más perfectamente posible en agua destilada. Aparte, se disuelven 5 g. de glucosa en agua destilada. Se mezclan las dos porciones y se completa el volumen hasta 100 ml. con agua destilada.
2. La suspensión de levadura se mantiene por espacio de una hora en un baño a 30° C. Durante todo este tiempo se agita y se mantiene constante la presión parcial de oxígeno mediante continua inyección de una fuerte corriente de aire.
3. La levadura incubada se centrifuga. El sedimento obtenido se lava dos veces con agua destilada.
4. Se ajusta el pH entre 3 y 4.
5. Se determina el sedimento y se fija la concentración celular para un valor final de 0,03 ml./ml. (14,253 mg./ml.).
6. Se colocan 4 ml. de suspensión en los frascos de WARBURG.

CUADRO I

Acción del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio sobre la utilización de glucosa exterior en la levadura

Concentración de inhibidor	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 hora a 30° C.		Inhibición
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
2×10^{-5} M.	19,5	18,5	5
	20	19,5	3
	Media 20	19	4
4×10^{-5} M.	20	18	10
	22	19	14
	Media 21	18,5	12
6.5×10^{-5} M.	23	16	31
	23	16	31
	Media 23	16	31
11×10^{-5} M.	21	13	40
	21	12	42
	Media 21	13,5	41
17×10^{-5} M.	21	7	67
	21	6	71
	Media 21	6,5	69
26×10^{-5} M.	19,5	0	—
	20	0	—
	Media 20	0	—

7. Se desplaza el aire por paso de nitrógeno purificado durante 30 minutos.

8. Se miden los microlitros de anhídrido carbónico desprendidos en 30 minutos a 30° C.

Para cada ensayo se disponen tres frascos sin inhibidor y tres con inhibidor. Con la media de los resultados obtenidos en cada uno de ellos se obtiene el volumen de anhídrido carbónico desprendido en media hora sin inhibidor y el obtenido en pre-

sencia de una determinada concentración del mismo. De los dos valores puede calcularse el porcentaje de inhibición.

Con las condiciones de trabajo establecidas, no se obtienen valores constantes del volumen de anhídrido carbónico producido. Sin embargo, las inhibiciones resultan sensiblemente iguales con independencia del valor absoluto del metabolismo endógeno. En dos experiencias distintas con la misma cantidad de células y de inhibidor, las producciones absolutas de CO_2 no son comparables, pero el valor de la inhibición es el mismo

CUADRO II

Acción del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio sobre la fermentación alcohólica endógena en la levadura

Concentración de inhibidor	$\mu\text{l. de CO}_2$ desprendidos de 1/2 hora a 30° C.		Inhibición
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
$21,5 \times 10^{-5}$ M.	30	28	7
	32	32	0
	34	30	13
	Media 32	30	7
26×10^{-5} M.	54	49	11
	52	—	—
	59	40	27
	Media 55	44,5	19
39×10^{-5} M.	34,5	—	—
	39	16	59
	32	27	16
	Media 35	19	46
54×10^{-5} M.	57,5	14	76
	60,5	8,5	86
	51,5	7,5	85
	Media 56,5	10	82
$107,5 \times 10^{-5}$ M.	34,5	7,2	80
	—	0	—
	36,5	0	100
	Media 36	—	—

La determinación del efecto de un inhibidor sobre la fermentación endógena puede iniciarse con la concentración del mismo que proporcionó la inhibición máxima de la utilización de glucosa exterior. Luego se prosigue con otras concentraciones hasta poder trazar la gráfica que relaciona la inhibición con la concentración de inhibidor. En la fig. 1 (B) se representa la curva obtenida de este modo para el cloruro de diisobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio (cuadro II).

2. — Acción sobre membrana ; comprobación con sustancias de efecto conocido.

Se admite que una determinada sustancia actúa sobre el paso de glucosa a través de la membrana celular cuando inhibe su absorción y no afecta a la fermentación alcohólica endógena (fig. 2). Para una concentración celular de 0,03 ml./ml., pequeñas cantidades de nitrato de uranilo inhiben fuertemente la utilización de glucosa exterior (5). Para la misma cantidad de células, el ión uranilo no inhibe apreciablemente la producción anaeróbica de CO₂ de las células incubadas por lo menos hasta una concentración tan grande como de 10⁻⁵ M. (5). Por lo tanto, el nitrato de uranilo presenta el comportamiento pe-

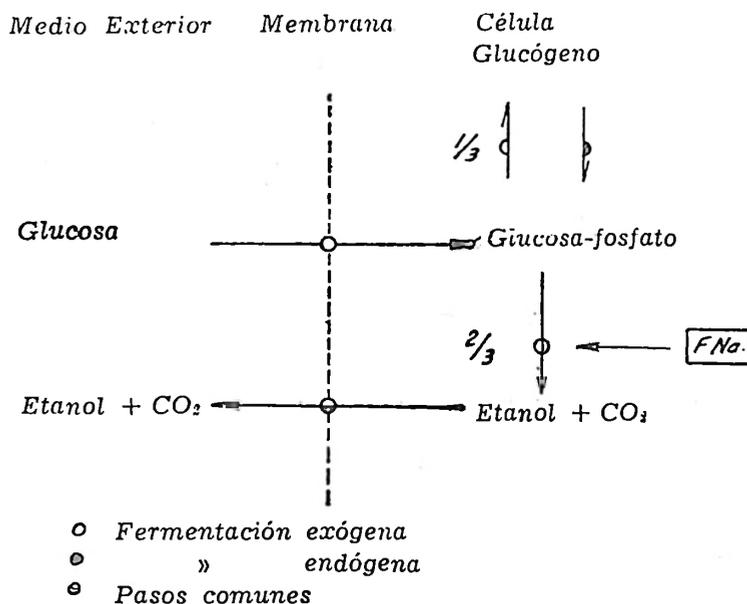


Fig. 2. — Esquema de la fermentación endógena y exógena de la glucosa en la levadura (pH 3,5).

cular de un inhibidor que actúa exclusivamente sobre el paso de glucosa a través de la membrana.

Una concentración de 10^{-2} M. de fluoruro sódico inhibe fuerte y aproximadamente igual la utilización de glucosa exterior y la producción anaeróbica de CO_2 de una suspensión en agua destilada de células de levadura previamente incubadas (5). Es el resultado correspondiente a un inhibidor endocelular sin acción selectiva sobre membrana.

El cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio constituye un caso intermedio entre los dos tipos descritos de inhibidores. Inhibe el metabolismo exógeno y endógeno, pero la utilización de glucosa exterior es más sensible que la fermentación endógena (cuadros I y II y fig. 1). Para una concentración de $2,1 \times 10^{-4}$ M. no se afecta a esta última, en tanto que la absorción se reduce en un 82 %. Hasta esta concentración, la acción del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio debe tener lugar exclusivamente sobre membrana. En consecuencia, se admite que este cuerpo presenta una inhibición selectiva del paso de glucosa a través de la membrana celular.

3. — Selectividad sobre membrana.

Con independencia de la actividad absoluta, la selectividad sobre membrana viene expresada por la mayor inhibición de la utilización de glucosa exterior conseguida con la máxima concentración de inhibidor que no afecte a la fermentación endógena. Dicho valor se refiere en tantos por ciento del mayor grado de inhibición de la absorción que sea posible conseguir. Así, para las tres sustancias estudiadas, se obtienen los valores de selectividad sobre membrana señalados en el cuadro III.

CUADRO III

Selectividad sobre membrana

Inhibidor utilizado	Inhibición máxima de la absorción	Inhibición mayor sin efecto sobre la fermentación endógena	Selectividad sobre membrana
Fluoruro sódico	100	0	0
Cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio	100	82	82
Nitrato de uranilo	86	86	100

4. - Ensayos con florricina.

La florricina es uno de los inhibidores enzimáticos más estudiados en relación con el problema de la transferencia de glucosa a través de la membrana celular.

Con la florricina y otras sustancias químicamente afines se han encontrado inhibiciones de la transferencia de glucosa en los glóbulos rojos que alcanzan hasta el 100 % (3, 8). También existen numerosos trabajos que refieren una pronunciada actividad sobre la absorción de glucosa por el intestino y por los túbulos renales (6, 8, 12). Sin embargo, no conocemos ningún dato publicado sobre el efecto de estos inhibidores sobre la absorción de glucosa en la levadura.

En medios ácidos la florricina es poco soluble y la floretina prácticamente insoluble. Esto constituye una grave dificultad para el ensayo de estas sustancias en la levadura, de acuerdo con la técnica seguida por nosotros.

Bajo las condiciones establecidas en nuestro método no pueden ser experimentadas concentraciones de florricina superiores a 1/500 M. Hasta esta concentración, esta sustancia no pone de manifiesto ninguna actividad sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura (cuadro IV). Para nuestro propósito, este resultado hace inútil todo ensayo sobre el metabolismo endógeno.

CUADRO IV

Acción de la florricina sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura

Concentración de inhibidor	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 horas a 30° C.		Inhibición
	Con inhibidor	Sin Inhibidor	
1/500 M.	24	24	0
	24	24	0
	Media 24	24	0
1/5000 M.	24	24	0
	23	23	0
	Media 23,5	23,5	0

Por lo menos a primera vista, resulta sorprendente que una concentración 1/500 M. de florricina se muestre sin efecto sobre la absorción por la levadura. Sobre intestino, por ejemplo, la

florricina actúa incluso a concentraciones 1/50.000 M. (6). Sin embargo, para las condiciones de trabajo de nuestro método y del de absorción intestinal con el que se obtuvo el referido resultado, la levadura resulta ordinariamente más sensible que el intestino a los inhibidores de la utilización de glucosa. Por tanto, la florricina no afecta a la penetración de glucosa en la levadura o es de algún modo destruída o inactivada por las propias células.

Discusión del método propuesto

1. FUNDAMENTO DE LA DISCRIMINACIÓN.

Cuando en una suspensión de levadura en atmósfera inerte la presencia de una determinada sustancia disminuye la velocidad de desaparición de la glucosa exterior, pueden haber sido inhibidos tres procesos distintos :

1. El paso a través de la membrana.
2. La formación de glucógeno.
3. El consumo de glucosa.

Por el solo examen de valores de inhibición de esta naturaleza no es posible discernir cuál o cuáles de estos tres procesos son afectados.

La inhibición de la fermentación alcohólica endógena admite a su vez dos posibilidades :

1. Inhibición de la glucogenolisis.
2. Inhibición de la glucolisis.

Para unas condiciones homogéneas de trabajo, si hay inhibición de la absorción sin que se modifique el metabolismo endógeno anaeróbico, la acción de la sustancia inhibidora habrá tenido lugar sobre el paso a través de la membrana (fig. 2).

2. IMPORTANCIA DEL PH.

En todo caso se presupone que el pH se halla comprendido entre 3 y 4, como ha sido indicado en la exposición del método. Las investigaciones sobre asimilación aeróbica o anaeróbica en la levadura sobre las que se fundan las técnicas propuestas, se han realizado en la zona ácida. Para un pH neutro o alcalino, la fermentación glicérica cobra considerable importancia (11). Como consecuencia, la absorción y el metabolismo endógeno anaeróbico resultan más difícilmente comparables.

La producción de anhídrido carbónico sólo proporciona una medida parcial del metabolismo endógeno anaeróbico. Si algún inhibidor actuara exclusivamente sobre alguno de los pasos que conducen desde el fosfato de dihidroxiacetona a glicerina, no se

pondría de manifiesto. En cambio, esta sustancia disminuiría, probablemente, la utilización de glucosa exterior y, en consecuencia, se obtendría erróneamente una acción sobre membrana.

3. LIMITACIONES DEL MÉTODO EN CONDICIONES AERÓBICAS

A primera vista el método podría utilizarse comparando la utilización aeróbica de glucosa exterior y la respiración en un medio sin sustrato. Sin embargo, las conclusiones obtenidas en este caso serían muy discutibles. En condiciones aeróbicas, las células de levadura pueden metabolizar variados sustratos endocelulares y la propia acción del inhibidor puede determinar el que sea utilizado uno u otro. En todo caso, el efecto sobre respiración endógena y su correlativo sobre la utilización aeróbica de glucosa resultan difícilmente comparables.

4. TIPOS DE INHIBIDORES DE MEMBRANA.

El nitrato de uranilo, el fluoruro sódico y el cloruro de diisobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio constituyen ejemplos de las tres posibilidades que existen con respecto a la acción de un inhibidor sobre la membrana: inhibición exclusiva (uranilo), inhibición selectiva (compuesto de amonio cuaternario) y no inhibición (fluoruro). Además, cabe también considerar la posibilidad de sustancias que actuando sobre membrana posean una acción selectiva sobre la glucogenolisis. En este caso, se obtendrá mayor inhibición del metabolismo endógeno que de la absorción. El método podrá revelar o no la acción sobre membrana.

5. ANTECEDENTES DEL MÉTODO.

Una de las pruebas de la acción sobre membrana del ión uranilo aportada por ROTHSTEIN y HURWITZ (10), consiste en haber puesto de manifiesto que dicho inhibidor no resulta efectivo ni sobre la respiración endógena, ni sobre la fermentación alcohólica endógena inducida por el DNP o la azida. En un sentido extenso, estos autores aplican con ello el mismo principio utilizado en el planteamiento del método seguido por nosotros.

Ya hemos señalado más arriba las dificultades que supone utilizar la respiración en lugar de la fermentación endógena. La posibilidad de utilizar la fermentación alcohólica endógena inducida por el DNP o la azida también resulta poco apropiada para el planteamiento del método de discriminación. Para establecer unas condiciones homogéneas, el inductor también de-

bería emplearse en los ensayos de utilización de glucosa exterior. Asimismo, cabría considerar en cada caso la interferencia o sinergia de aquella sustancia con el inhibidor problema.

Seguramente, estas circunstancias influyeron en el hecho de que ROTHSTEIN y HURWITZ (10) no tomaran los ensayos referidos como punto de partida de un método general para la discriminación de los inhibidores de membrana.

A nuestro entender, la producción espontánea de fermentación alcohólica endógena constituye la base más simple sobre la que se puede establecer una comparación cuantitativa de los resultados.

Resumen

Se establece un método para determinar el lugar de acción de los inhibidores de la absorción de glucosa por la levadura, admitiéndose que una determinada sustancia actúa sobre el paso a través de la membrana cuando inhibe la absorción sin afectar a la fermentación alcohólica endógena.

Se comprueba que el nitrato de uranilo es un inhibidor exclusivo del transporte de glucosa a través de la membrana.

También se comprueba que el fluoruro sódico es un inhibidor endocelular sin acción selectiva sobre la membrana.

Se encuentra que un compuesto de amonio cuaternario, el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio, actúa en la membrana y dentro de la célula, pero presenta una pronunciada acción selectiva sobre el transporte de glucosa.

Se elabora un índice de selectividad sobre membrana en la inhibición de la absorción de glucosa.

No se encuentra acción de la florricina sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura hasta concentraciones de 1/500 M.

Se determina que el método propuesto sólo es aplicable en medio ácido (pH 3-4) y bajo condiciones anaeróbicas.

Se establece que la fermentación alcohólica endógena inducida por previa incubación en glucosa ofrece unas condiciones más favorables para la discriminación que la que se obtiene por la acción del DNP o la azida.

Summary

Separation-out of the effect upon membrane in sugar uptake inhibition in yeast

Ordinarily, it is difficult to discern whether an inhibitor of glucose uptake acts exclusively or preponderantly on penetration through the membrane, or exercises its action in the cell-interior. Here we discuss the recourses utilised by various authors (2, 4, 9), to show that the uranyl ion inhibits the utilisation of exterior glucose by acting exclusively on penetration through the cell-membrane.

After having succeeded in inducing spontaneous alcoholic fermentation in yeast (5, 7), in the present work the author suggests the possibility of isolating functionally in a general way, the effect of an inhibitor on the passage of glucose through the membrane from all other action which could be brought about simultaneously inside the cell.

Firstly the action of the problem substance on utilisation of external glucose is studied (5). The following is a scheme of the operations used :

1. Previous treatment to evacuate reserves.
2. Purification of yeast.
3. Adjustment of the pH to between 3 and 4.
4. Determination of sediment and adjustment of cell concentration to a final value of 0.03 ml./ml. (14.253 mg./ml.).
5. Thirty minutes of anaerobic absorption at 30°C. and with an initial glucose concentration of 0.3%.
6. Centrifugation.
7. Determination of glucose in the supernatant liquid.
8. This test permits one to determine the glucose absorbed without inhibitor and in the presence of a certain quantity of inhibitor. The percentage of inhibition can be calculated from these two values. In table I and figure 1 (A) the results obtained for diisobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzylammonium chloride are given.

When the action of the inhibitor on the utilisation of the exterior glucose is known, the study of its action on alcoholic endogenous fermentation is proceeded with. For this the following technique is followed :

1. 5 g. of compressed yeast are weighed and are dispersed as perfectly as possible in distilled water. In another container 5 g. of glucose are dissolved in distilled water. The two portions are mixed and the volume is brought to 100 ml. with distilled water.
2. The yeast suspension is kept a bath at 30°C. for 1 hour. During all this time, it is stirred and the partial pressure of oxygen is kept constant by continuous injection of a strong current of air.
3. The incubated yeast is centrifuged. The sediment obtained is washed twice with distilled water.
4. The pH is adjusted to between 3 and 4.
5. The sediment is determined and cellular concentration is fixed for a final value of 0.03 ml./ml. (14.253 mg./ml.).
6. 4 ml. of suspension are set in Warburg jars.
7. The air is displaced by the passage of purified nitrogen for 1/2 hour.
8. The microlitres of carbon dioxide given off in a half-hour at 30°C. are measured.

In table II and fig. 1 (B) are given the results obtained for di-isobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride.

Uranyl nitrate (5), sodium fluoride (5), and di-isobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride are examples of the three possibilities which exist with respect to the action of an inhibitor on membrane : exclusive inhibition (uranyl), selective inhibition (quaternary ammonium compound) and no inhibition (fluoride).

The action of florricine on the utilisation of exterior glucose by yeast is not found until concentrations of 1/500 M. are reached (table IV).

So that the scheme of figure 2 may be fundamentally valid, it is necessary that the experiments be performed in an acid medium (pH 3.5). On the other hand, in aerobic conditions or in the presence of others effectors, actions on the endogenous process and on the utilisation of exterior glucose would be difficult to compare.

Bibliografía

- (1) BAMANN E., y MYRBACK, K. : Die Methoden der Fermentforschung G. Thieme. Verlag. Leipzig, 1940.
- (2) BARRON, E. S. G., MUNTZ, J. A., y GASVODA, B. : *J. Gen. Physiol.*, **33**, 163, 1948.

- (3) LE FEVRE, P. G. : *Symposia of the Society for Exptl. Biol.*, **8**, 118, 1954.
- (4) MUNTZ, J. A., SINGER, T. P., y GUZMÁN BARRON, E. S. : The effect of uranium on the metabolism of yeast and bacteria. MDDC, n.º 759 (USAEC).
- (5) PARÉS, R. : *Rev. esp. Fisiol.*, **12**, 71, 1956
- (6) PONZ, F., y LARRALDE, J. : *Rev. esp. Fisiol.*, **8**, 71, 1952.
- (7) PONZ, F., y PARÉS, R. : 3 ème Cong. Intern. Biochim., 109, Bruxelles. *Rev. esp. Fisiol.*, **11**, 254, 1955.
- (8) ROSENBERG, T., y WILBRANDT, W. : *Internat. Rev. Cyt.*, **1**, 65, 1952.
- (9) ROTHSTEIN, A., y L. LARRABEE, L. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **32**, 247, 1948.
- (10) ROTHSTEIN, A., y HURWITZ, L. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **37**, 57, 1951.
- (11) ROTHSTEIN, A., y BERKE, H. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **81**, 559, 1952.
- (12) ROTHSTEIN, A. : *Protoplasmatologia*, **11**, 87, 1954.
- (13) UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., y STAUFFER, J. F. : Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publishing Co. Seventh Print. Minneapolis, 1951.