

Cátedra de Fisiología Animal Aplicada de la Facultad de Farmacia
Universidad de Madrid
Sección de Fisiología Comparada del Instituto Español
de Fisiología y Bioquímica del C. S. I. C.
(Profesor: Dr. J. Lucas Gallego)

Acción experimental del trifosfato de tiamina sobre el corazón

por

J. Lucas Gallego y J. Ardaiz-Solchaga

(Recibido para publicar el 24 de enero de 1959)

Son bien conocidas desde hace tiempo las alteraciones a que da lugar la carencia de vitamina B₁ en el organismo. Sin llegar a los extremos del «corazón beribérico» producido en carencias graves, las hipovitaminosis B₁ pueden producir notables alteraciones en el corazón, como nos lo demuestra el E.C.G.: prolongación del espacio PR (bloqueo aurículo-ventricular), alteraciones de las ondas P y T, extrasístoles nodales y ventriculares y fibrilación auricular [WINTROBE y cols. (1)].

También es conocido el hecho de que los ritmos heterotópicos son una alteración seria que pueden llevar a alteraciones más graves en la formación y transformación del impulso, como es la fibrilación auricular e incluso ventricular.

Y sin embargo, la vitamina B₁ apenas ha sido estudiada desde este punto de vista.

Por otra parte, en las carencias de vitamina B₁ hay disminución de las oxidaciones, con el consiguiente aumento de ácido pirúvico, que no se metaboliza, y de ácido láctico, probablemente por inhibición de la deshidrogenasa láctica. La alteración del metabolismo pirúvico tiene mucha importancia, por-

que perturba la formación del ácido adenosintrifosfórico, que es una fuente muy importante para la producción de energía.

Experimentalmente en ranas, SHOCK y SEBRELL (2) estudian músculos perfundidos en Ringer, con y sin vitaminas, estimulándolos eléctricamente y observan que la respuesta es más enérgica cuando añaden tiamina al Ringer. Estos efectos no se pueden relacionar con la determinación de las necesidades cuantitativas de vitamina B₁ en el hombre. Se ha demostrado que el aumento de tiamina sobre las dosis normales no produce aumento de la capacidad para el trabajo [KEYS y cols. (3); BRANSKY y cols. (4)].

La vitamina B₁ es empleada por el organismo al estado de difosfato (difosfotiamina, DPT, o cocarboxilasa) y ha sido este cuerpo el que ha atraído la atención de muchos investigadores, con preferencia a los otros derivados fosfóricos, como el tri y el monofosfato de tiamina (TPT y MPT respectivamente). El 90 % de la vitamina B₁ presente en la sangre lo está en forma de pirofosfato.

La cocarboxilasa era hasta hace poco tiempo el único derivado fosfórico de la tiamina de interés biológico. VELLUZ, AMIARD y BARTOS pensaron comparar el éster trifosfórico de la tiamina con la cocarboxilasa, lo cual hicieron en una serie de trabajos sobre el corazón de rana y conejo, indicando una acción comparable a la del ácido adenosintrifosfórico y superior, incluso, a la del DPT. En clínica humana se han observado efectos terapéuticos del TPT.

En cuanto al MPT, descrito por LOHMAN y SCHUSSTER, hemos visto que se han empleado experimentalmente en el pichón beribérico y también en clínica humana, demostrando tener una acción comparable a la de la vitamina B₁, pero menos tóxica.

Para poder comprobar las acciones de los ésteres fosfóricos de la tiamina y deducir cuál de ellos realiza mejores efectos sobre el corazón, hemos procedido a realizar una serie de experimentos en corazón de rana, gato y perro. En este primer trabajo estudiamos la acción sobre el corazón del TPT y posteriormente publicaremos otro referente al DPT y MPT.

VELLUZ, AMIARD y BARTOS (5) asignaron actividad carboxilásica al TPT, aún a dosis mínimas y creyeron que podía ofrecer un ejemplo de intervención de los ésteres trifosfóricos en las reacciones enzimáticas. Según SILIPRANDRI (6) la acción del TPT sería superponible a la del DPT, pero DE LA FUENTE y BEGUÉ (7) han comprobado que el TPT puro no tiene acción carboxilásica.

VELLUZ, JEQUIER y PLOTKA (8) atribuyen al TPT una acción

poco marcada sobre el corazón de conejo y corazón de rana en estado normal, pero muy significativa sobre estos corazones experimentalmente deprimidos. También observaron acortamiento del tiempo de detención del corazón aislado de rana sometido a inhibición eléctrica.

PLOTKA y JEQUIER (9) le conceden un efecto inotropo positivo a concentraciones débiles (10^{-6} a 10^{-5}).

Sobre el corazón «in situ» del conejo el TPT tendría acción antifibrilatoria.

Material y métodos

Para observar el efecto del TPT sobre el corazón de rana hemos empleado la técnica del corazón aislado con la cánula de Straub.

Hemos buscado la alteración del latido cardíaco por la adición al suero Ringer de ClK (10 a 50 mgr/100 c. c. de suero), Cl_2Ca (75 a 400 mgr/100 c.c. de suero) y Cl_2Ba (50 a 100 mgr/100 c. c. de suero).

Otro procedimiento ha sido provocar la detención del latido cardíaco conectando el corazón con los dos electrodos de una corriente eléctrica inducida, suministrada por un carrete de Rumkorff, el cual estaba alimentado por una corriente continua de 6 voltios; distancia del primario al secundario de 5 cm. y tiempo de contacto 6 segundos.

Antes de proceder a la adición del ion (K, Ca o Ba) o al contacto con el carrete de Rumkorff, hemos tenido el corazón perfundido con TPT a la concentración que deseábamos experimentar, durante 10 a 60 minutos.

El TPT ha sido probado a concentraciones que variaron desde 10^{-6} a 10^{-3} y, finalmente, hemos elegido tres concentraciones: 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} .

Para el corazón de gato hemos operado con el corazón «in situ»: a estos efectos, se ha colocado una cánula traqueal para la respiración artificial y, al mismo tiempo, para proporcionarle anestesia (éter). Tórax abierto. En la gráfica se recogen cuatro registros, que, de arriba abajo, son: 1.º Presión arterial, medida en la carótida; 2.º Registro eléctrico conectado con el carrete de Rumkorff para ver la duración del estímulo eléctrico (corriente inducida); 3.º Registro del latido auricular (orejuela derecha), y 4.º Registro del latido ventricular (punta del corazón). Hemos provocado la fibrilación conectando el corazón con los electrodos del carrete de Rumkorff. Distancia del primario al secundario de 9 cm. Tiempo de excitación variable de unos animales a otros, buscando el

tiempo necesario para que la fibrilación del corazón sea irreversible o que se prolongue lo suficiente para que podamos encontrar diferencia con estímulos posteriores, después de inyectar TPT, y veamos si tiene acción o no sobre el corazón.

Si la fibrilación no desaparecía espontáneamente, hemos hecho compresión cardíaca con la mano hasta la parada completa y, a continuación, inyección de adrenalina (1 c. c. de la dilución al 1/10.000) y masaje.

En perro hemos practicado la preparación corazón-pulmón de Starling. Anestesia con barbitúricos. Se ha canulado siempre la arteria subclavia. Desde una derivación de la subclavia canulada hemos tomado la presión arterial y además se ven en las gráficas los mismos registros que dijimos en gato y en el mismo orden.

Se ha hecho fibrilar el corazón, igual que en el gato, haciendo contacto sobre él con los electrodos procedentes de un carrito de Rumkorff. Distancia del primario al secundario: 9 cm. Tiempo de contacto, variable.

La adición del fármaco se hace, disuelto en 5 a 10 c. c. de suero fisiológico, en el recipiente de sangre periférica. Hemos empleado de 10 a 20 mg. por kilogramo de peso.

Resultados

a) Resultados obtenidos en las experiencias realizadas en rana.

El K, Ca y Ba actuando sobre el corazón de rana nos ha dado los resultados conocidos: inotropismo negativo hasta parada en diástole con el K; inotropismo positivo con el Ca que llega hasta la parada sistólica al aumentar la concentración. Y parada también sistólica con el Ba.

El TPT a concentraciones de 10^{-8} y 10^{-7} no tiene ninguna influencia. Si aumentamos la concentración a 10^{-6} y 10^{-5} , no hay en un principio ninguna alteración, pero al cabo de 10 minutos la amplitud de los latidos cardíacos ha disminuido. Si aumentamos la concentración a 10^{-4} el efecto inotropo negativo es aún más acusado (fig. 1). A concentración de 10^{-3} todavía es mayor la acción depresora y reduce al mínimo la amplitud de los latidos.

Si el corazón tiene bloqueo aurículo-ventricular (provocado por nosotros o no) el TPT no es capaz de mejorarlo a ninguna concentración.

No hemos podido comprobar acción protectora del TPT ante los trastornos producidos por el K en el corazón.

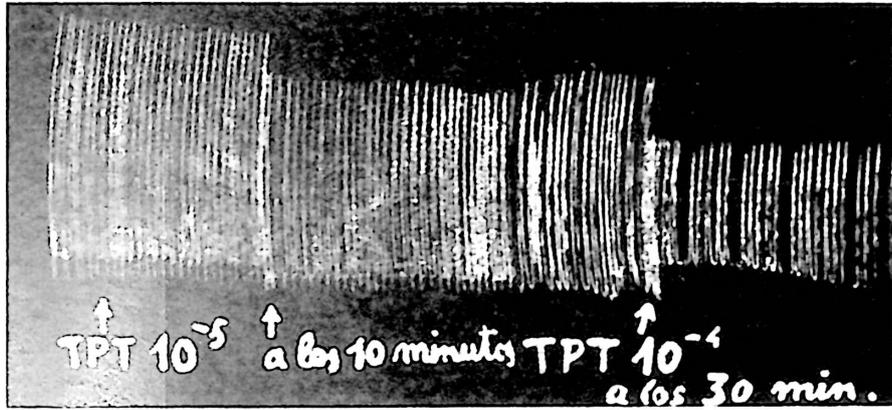


Figura 1

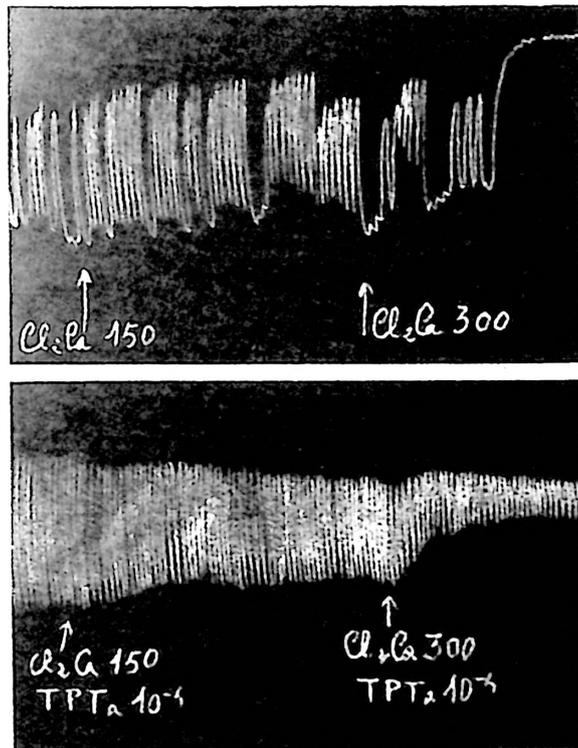


Figura 2

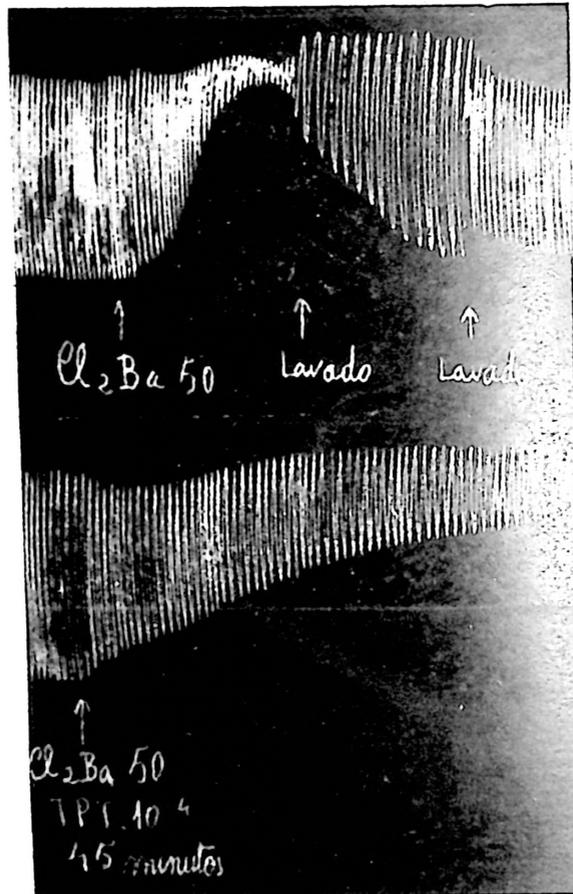


Figura 3

Parece que hay alguna protección frente al ion Ca: los bloqueos que se producen con 150 mg. de Cl₂Ca y la parada sistólica con 300 mg., no los vemos después de la perfusión con TPT a 10⁻⁴; aunque no deja de haber una clara dificultad para la relajación diastólica (fig. 2).

Frente al Ba también se ve efecto protector y así el corazón tolera mejor la misma dosis de Cl₂Ba con TPT a 10⁻⁴ y a 10⁻³ que sin TPT (fig. 3).

Cuando provocamos la detención del corazón mediante el estímulo eléctrico, la recuperación es con latidos débiles, aunque de amplitud creciente y, en general, bradicárdicos. En el corazón perfundido con TPT no hay disminución del tiempo de detención, pero se ve una energía en los primeros

latidos de la recuperación cardíaca que no se veía en la experiencia testigo; en general, basta la concentración de 10^{-5} (fig. 4), pero alguna vez hay que llegar a 10^{-4} .

b) *Resultados obtenidos en las experiencias realizadas en gato.*

En la primera serie de gatos testigo, comprobamos que era frecuente que cuanto más tiempo llevaba el preparado funcionando más tiempo duraba la fibrilación provocada con los mismos tiempos de excitación. Pero, como norma general, podemos afirmar que: a mayor tiempo de estímulo corresponde mayor tiempo de fibrilación, suponiendo que ésta sea reversible.

La presión arterial suele descender después de los estímulos eléctricos y queda en una cifra más baja que en un principio, pero en la que se mantiene durante una o dos horas. Achacamos este descenso al traumatismo que supone el tórax abierto, a las sucesivas fibrilaciones cardíacas, etc.

Hemos podido comprobar que la inyección intravenosa o intracardíaca de 10 mg. del compuesto/kg. de peso, protege al corazón contra sucesivos estímulos con la corriente inducida, de tal manera que, a igualdad de tiempo con la prueba testigo, la duración de la fibrilación cardíaca será menor. O que se recupera espontáneamente de la fibrilación un corazón que en la prueba testigo necesitó de compresión, adrenalina y masaje — según dijimos anteriormente — porque la fibrilización era irreversible.

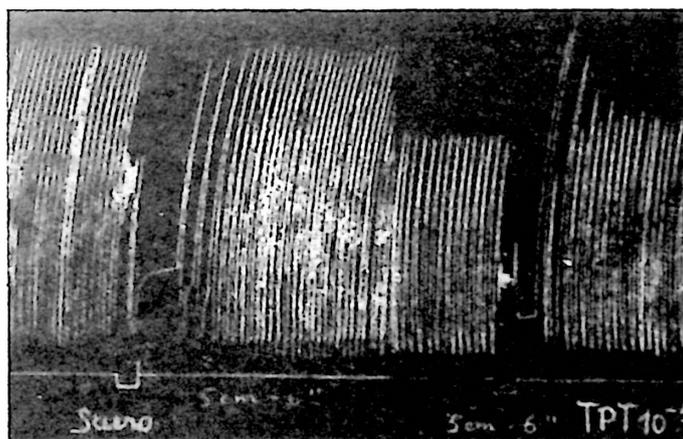


Figura 4

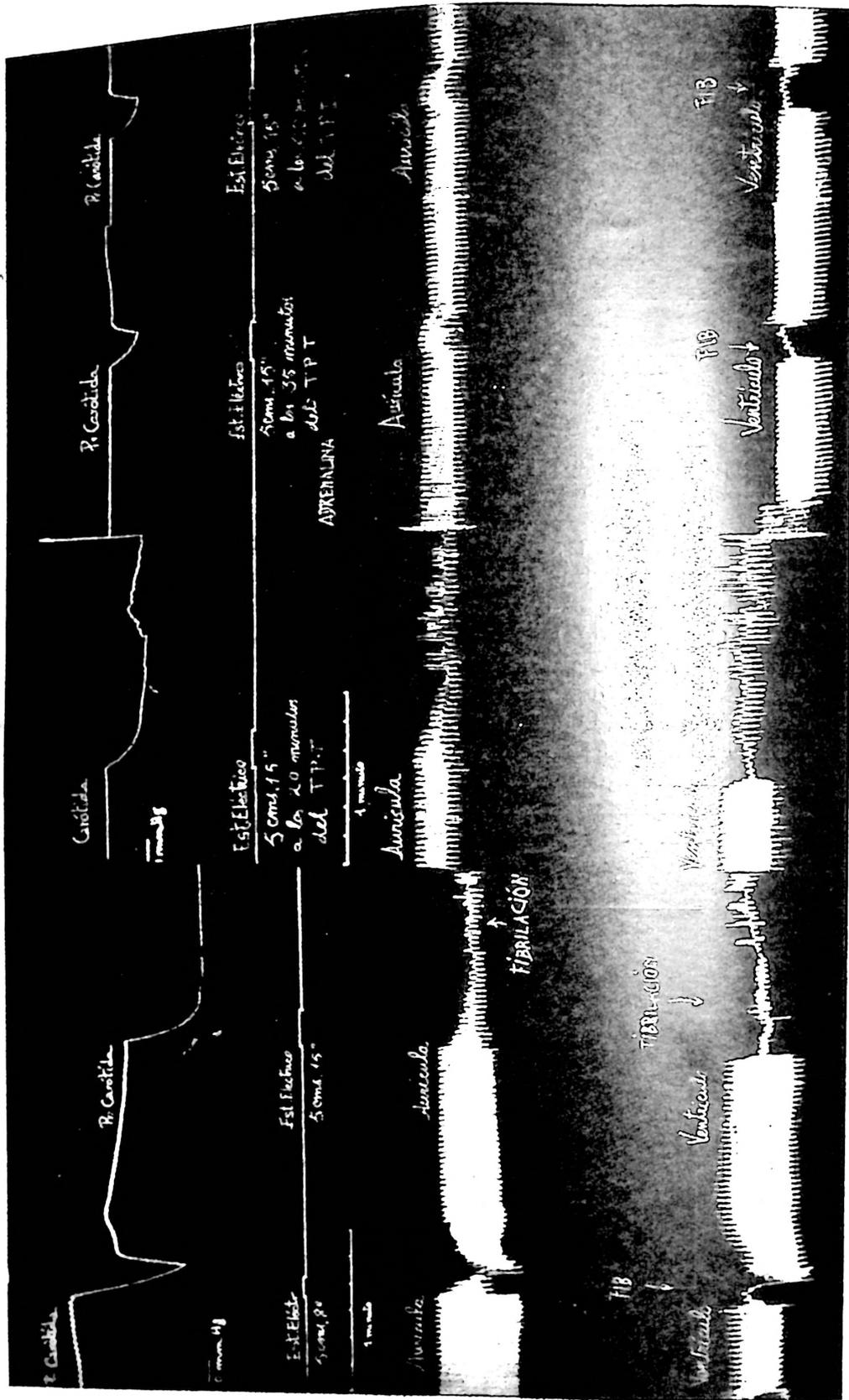


Figura 5

En la figura 5 vemos un corazón que se recupera espontáneamente de la fibrilación provocada por 8 segundos de estímulo eléctrico. Aumentamos la duración del estímulo a 15 segundos, con lo cual la fibrilación es ya irreversible. Inyectamos por vía intracardíaca 10 mg/Kg. de peso de TPT y, a los 20 minutos, repetimos el estímulo eléctrico, con lo cual producimos una fibrilación de la que acaba saliendo el corazón, aunque en malas condiciones. Treinta y cinco minutos después de la inyección de TPT volvemos a dar el mismo estímulo y ahora se ve cómo el corazón sale de la fibrilación en cuanto cesa la corriente.

Otras veces, lo que apreciamos es una disminución del tiempo de fibrilación, porque tanto sin TPT como con él, el corazón se recupera espontáneamente. Así vemos que sucede en la figura 6: el estímulo con la corriente inducida durante 20 segundos, da lugar a una fibrilación de la que el animal se recupera, pero con dificultad, como lo demuestran los registros auriculares, ventriculares y la inseguridad de la presión arterial. Algo parecido ocurre a continuación con 30 segundos de estímulo. Inyectamos 20 mg. de TPT en el corazón del gato, y 45 minutos después repetimos los estímulos eléctricos de 20 y 30 segundos de duración, comprobando cómo el animal se recupera de la fibrilación con más seguridad que antes.

El TPT no es capaz, como se ve en las gráficas, de mantener la presión arterial, la cual, después de una hora de funcionar el preparado, rara vez ha sido mayor de 5 ó 6 cm de Hg.

c) *Resultados obtenidos en las experiencias realizadas en perro.*

En la primera serie de perros testigo encontramos que con un primer estímulo de 1 segundo de duración — a veces fue necesario un segundo estímulo, también de 1 segundo — es suficiente para provocar fibrilación cardíaca que, desde luego, es irreversible.

No creemos que durante el tiempo de 1 segundo que dura la excitación eléctrica se produzca verdadera fibrilación ventricular. Para comprobar este extremo, registramos el ECG de un perro en estos momentos y vimos que la corriente de inducción que en este momento recibe el corazón hace imposible la toma de un registro descifrable. Cuando el corazón se recupera lo hace después de algunos extrasístoles ventriculares aislados.

Es de notar que el simple contacto de los electrodos con el ventrículo produce extrasístoles, que se manifiestan por una

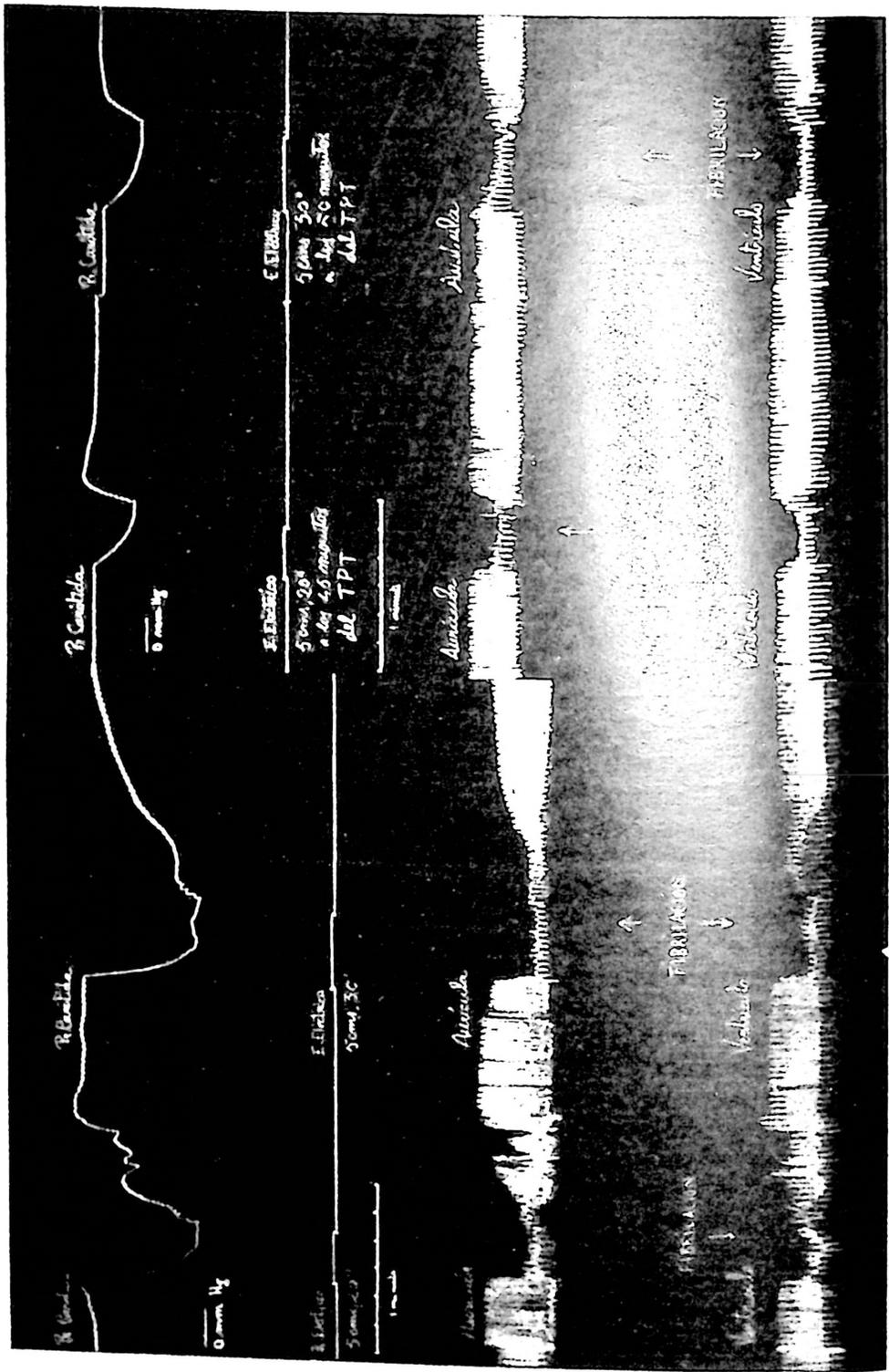


Figure 4

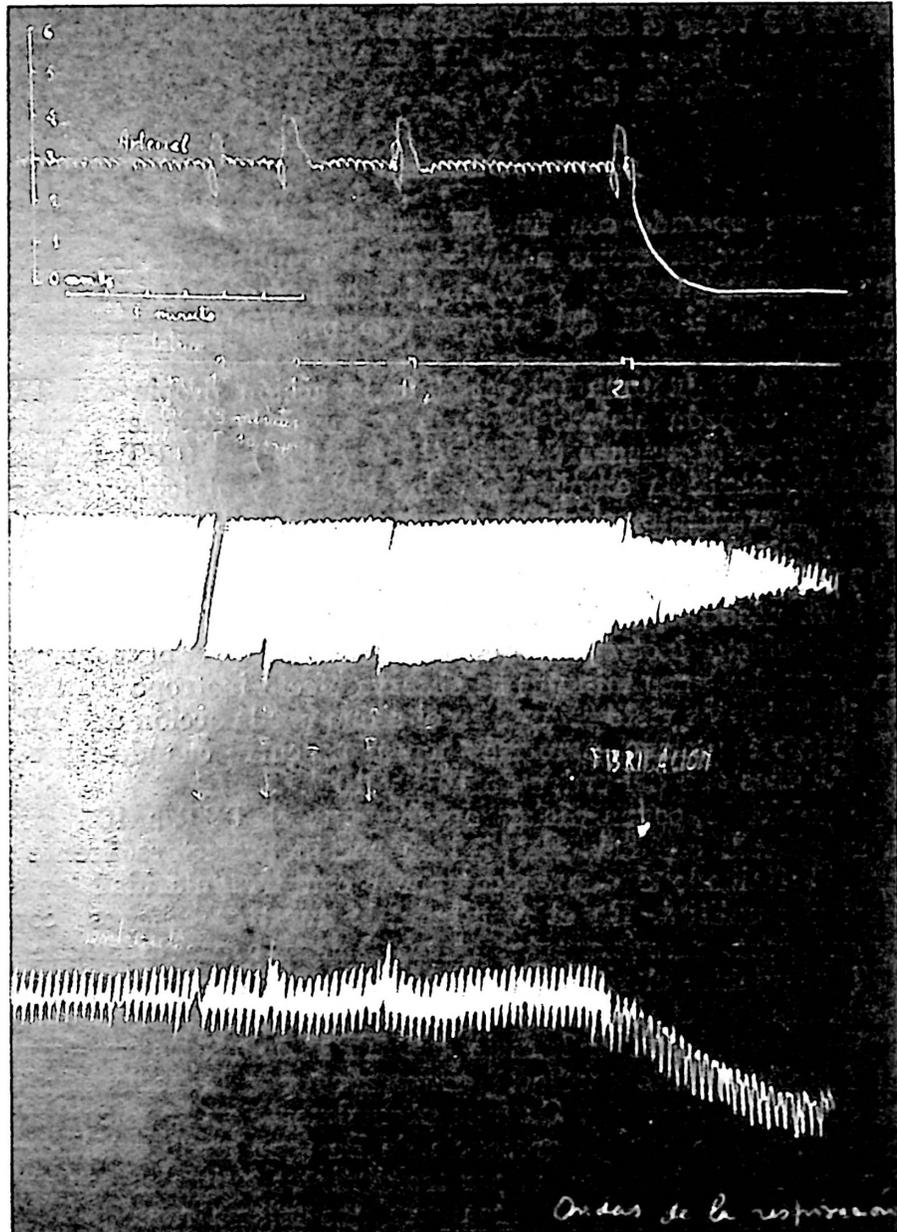


Figura 7

caída de presión seguida de una brusca subida y restitución a la normalidad. En los registros de aurícula y ventrículo no se aprecian bien por ser lenta la velocidad del quimógrafo.

Cuando al preparado cardio-pulmonar añadimos TPT en la proporción dicha, hemos visto que, en general, el corazón re-

siste 2 ó 3 veces el estímulo eléctrico de 1 segundo de duración, y hemos de llegar a 2 segundos de estímulo para que se presente la fibrilación (fig. 7).

Discusión

Hemos operado con un pH variable entre 6,8 y 7,2; no hemos visto diferencias notables en la amplitud de los latidos como señalan JACKSON y WALD (10) con sólo unas décimas de variación en el pH del Ringer que perfunde el corazón de rana.

PLOTKA y JEQUIER (9) estudian la acción propia del TPT sobre el corazón aislado de rana y sacan la consecuencia de que, a concentraciones débiles (10^{-6} y 10^{-5}) el TPT refuerza moderadamente la amplitud de los latidos ventriculares y retarda, ligeramente, el ritmo de una manera duradera; y que este efecto es inverso a concentraciones más fuertes (10^{-4} y 10^{-3}) para las cuales se observa un efecto inotrope negativo.

Para nosotros, las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} no tienen ningún efecto inotrope positivo, sino que, por el contrario, transcurridos unos minutos se observa efecto inotrope negativo. Tampoco hemos visto retardo en el ritmo por la acción del TPT. El mismo fenómeno, pero más acusado, ocurre cuando las concentraciones son del orden de 10^{-4} y 10^{-3} .

También exponen dichos autores que el TPT a 10^{-4} pone de manifiesto con más claridad su acción protectora frente al corazón fatigado o que se comporta con irregularidad en su ritmo o amplitud. En el resultado de nuestros ensayos, como hemos dicho anteriormente, nunca hemos conseguido que el TPT regularice el ritmo de un corazón que presenta bloqueos por la acción del K o espontáneamente.

En cuanto a la influencia del TPT sobre los trastornos del funcionamiento cardíaco, provocados por la acción de un exceso de los iones K y Ca (que normalmente ya se encuentran en el Ringer) o ante la presencia de Ba (que no lo está), diremos que las dosis acusadas por los distintos animales son muy variables, pero muy constantes para una misma rana.

PLOTKA y JEQUIER (9) observan que el TPT a 10^{-4} se opone a la parada en diástole provocada por el K y también — aunque con menos eficacia — a la parada en sístole provocada por el Ca y por el Ba, así como a los bloqueos producidos por estos iones.

Como resumen de los resultados obtenidos por nosotros, exponemos que no hay acción protectora del TPT para inhibir los fenómenos producidos por el K. Que existe protección

frente a los excesos de ion Ca, de tal modo, que vemos en la figura 3 como no llega a presentarse la parada sistólica, aunque sí se ve una clara dificultad para la relajación diastólica. Con el ion Ba hemos registrado gráficas muy parecidas a las del ion Ca, aunque con mayor número de resultados negativos.

VELLIZ, JEQUIER y PLOTKA (8) afirman que cuando el corazón aislado de rana ha estado perfundido con TPT a 10^{-3} se consigue abreviar el tiempo de detención eléctrica provocado por una corriente inducida y que incluso disminuye o suprime la bradicardia consecutiva. En nuestros resultados hemos visto cómo el TPT no actúa disminuyendo el tiempo de detención del corazón, ni suprime la bradicardia de manera evidente, ya que en unos casos disminuye y en otros no. Sin embargo, hemos hecho constar que la contracción después de la recuperación tiene mayor amplitud.

En los experimentos en corazón «in situ» de gato, hemos obtenido más de un 90 % de resultados positivos, por lo que concedemos al TPT en el gato una evidente acción antifibrilatoria.

Como PLOTKA y PETERFALVI (11) hemos visto que deben transcurrir al menos 10 minutos desde la administración del TPT para que esta acción tenga lugar; y que este efecto se mantiene varias horas. Hemos notado, además, que la protección es más evidente cuando ha pasado más tiempo, como si los 10 minutos no fuesen suficientes para metabolizar el producto: así vemos en la figura 5 cómo el efecto protector es más evidente a los 35 que a los 20 minutos.

No estamos de acuerdo con estos autores en que la inyección intracardiaca de más producto pueda hacer reaparecer los latidos en un corazón afectado de fibrilación durante algún tiempo. Nunca hemos visto este hecho y, además, el exceso de TPT no puede actuar sobre el corazón inmediatamente.

Hemos querido terminar el estudio de la acción del TPT sobre el corazón con la experimentación en el perro, pues el gato es muy resistente a la fibrilación y los resultados obtenidos en gato no son fácilmente aplicables a la clínica humana. En cambio, el perro tiene unas características, en cuanto a la fibrilación cardíaca, mucho más aplicables al hombre. Además, queríamos ver la acción del TPT sobre el músculo cardíaco aislado. Por estas dos razones elegimos la técnica del preparado cardio-pulmonar de Starling.

Como hemos visto, es difícil valorar el estímulo de un modo cuantitativo, pues lo único que interviene en la respuesta es el tiempo: es decir, la duración del estímulo eléctrico. Y ya

hemos dicho que las variaciones son de un segundo. El tipo de respuesta es siempre extremo: o hay fibrilación o no la hay. Por todo esto es más difícil sacar conclusiones de estos experimentos. No obstante, estadísticamente, los resultados son claros y con el TPT hemos obtenido siempre resultados que calificamos de positivos, porque después de 2, 3 ó 4 estímulos de 1 segundo de duración, hemos tenido que recurrir a un estímulo de 2 segundos para provocar la fibrilación; mientras que en los preparados testigo bastaba con 1 ó, como máximo, 2 estímulos de 1 segundo.

Conclusiones

De todo lo expuesto sacamos las siguientes conclusiones:

El TPT sobre corazón aislado de rana tiene un efecto inotrope negativo, tanto más acusado cuanto mayor sea la concentración. La dosis mínima eficaz ha resultado ser de 10^{-6} a 10^{-5} .

A concentración de 10^{-4} el TPT no tiene acción sobre las alteraciones provocadas en el corazón de rana por el ion K. En cambio tiene acción protectora contra las alteraciones producidas por el Ca y el Ba y más apreciables en el primer caso que en el segundo.

Frente a la detención cardíaca provocada en el corazón de rana por una corriente inducida, no abrevia el tiempo de detención, pero da energía a la contracción cardíaca cuando el corazón sale de la parada. La concentración eficaz es de 10^{-5} .

En el corazón «in situ» de gato, el TPT a la dosis de 10 mg/kilogramo de peso disminuye el tiempo de fibrilación cardíaca consecutiva al paso de una corriente inducida. Y muchas veces consigue que el corazón se recupere espontáneamente de la fibrilación cuando la prueba testigo produjo fibrilación irreversible espontáneamente.

En el corazón del preparado cardio-pulmonar también el TPT protege de la fibrilación cardíaca provocada por una corriente inducida, siempre que la duración de ésta no pase de 1 segundo.

Resumen

Se ha estudiado experimentalmente la acción del trifosfato de tiamina (TPT) sobre el corazón en rana (corazón aislado, técnica de Straub), gato (corazón «in situ») y perro (preparado cardio-pulmonar).

Se ha visto que el TPT tiene efecto inotrope negativo a dosis de 10^{-6} y que es más acusado a concentraciones mayores; a 10^{-4} protege al corazón contra un exceso de Ca y Ba en el suero y no tiene acción frente a un exceso de K. No disminuye el tiempo de detención cardíaca pro-

vocada en el corazón por una corriente inducida, pero mejora su recuperación.

En corazón de gato, a la dosis de 10 mgrs./kgr. de peso, protege contra la fibrilación cardíaca provocada eléctricamente.

Lo mismo ocurre en el preparado cardio-pulmonar, si bien los resultados son menos evidentes.

Summary

Experimental action of triphosphoric thiamine on the heart

The action of the triphosphoric derivative of Vit. B₁ (TPT) has been studied taking as a base the alterations which take place in the cardiac rhythm in cases of Vit. B₁ deficiency and on the grave metabolic alterations produced in those cases as a consequence — primarily — of the accumulation of pyruvic acid in the organism as a result of decarboxylation.

There are many works on the action of cocarboxylase or diphosphoric thiamine (DPT) on the heart, but very few on the action of TPT.

VELLUZ, AMIARD and BARTOS maintain, with other authors, that TPT also has cocarboxylic action, while DE LA FUENTE and BEGUE and, on the other hand, KIESSLING denie it.

Nevertheless there are series of works marking its protective action over the myocardium experimentally depressed with some ions (K, Ca and Ba) or electrically.

We have proceeded to the comparative study of the three phosphoric derivatives of thiamine, presenting in this paper the results obtained with TPT on the heart of the frog, Straub's technique, on «in situ» heart of cat and on a heart-lung preparation of dog.

On the frog's heart we have found negative inotropic effect, greater the higher the concentration used, which has oscillated between 10^{-6} - 10^{-3} . At lower concentrations there is no valuable effect.

At a 10^{-4} concentration we have seen that it protects the heart against the action of an excess of Ca (fig. 2) preventing also the systolic failure. A similar effect is seen against the Ba ion (fig. 3). There is no protection against the action of the K ion.

The action of TPT over a heart subjected to an induction current has been studied and we have seen that the time of heart failure which appears upon ending the electric stimulus is not lowered, but on the other hand, the recovery is more energetic, as can be seen by the systolic amplitude (fig. 4).

On the heart of the cat, the arterial pressure, the ventricular beat and the duration of the electric stimulus has been

recorded. It has been made to fibrillate by subjecting it to the action of an induced current and it has been observed that 10 minutes, or more, after injecting 10 mg. of TPT/Kg. of weight intravenously or intracardially, an electric stimulus of the same time of duration produces a ventricular fibrillation which last less than on the previous control experiment (fig. 6); or even makes a fibrillation reversible while on the control it was irreversible and from which the animal had to be reanimated with manual compression, adrenaline and massage (fig. 5).

As the cat's heart is very resistant to fibrillation, with the purpose of making the experiment more applicable to human clinic, we have studied the action of TPT on the heart of the dog, whose fibrillation is provoked easily and is practically irreversible. With the purpose of avoiding interferences in the metabolism of TPT in the cardiac muscle, we have used the cardio pulmonary preparation.

The results are more difficult to evaluate than on the heart of the cat, because we are dealing with differences in time of 1 second between a positive and a negative result; but based on statistics we can affirm that addition of 10 mg. of TPT/Kg. of weight lowers the appearance of ventricular fibrillations, as 2, 3 or 4 electric stimuli with induced current of 1 second duration are tolerated (fig. 7), a 2 seconds stimulus being necessary for provoking fibrillation, while on the control dogs series, this appeared with a 1 second stimulus (sometimes two were needed).

Bibliografía

- (1) WINTROBE, M. M., ALCAYAGA, R., HUMPREYS, S., y FOLLIS, R. H. : *Bull. Hopkins Hosp.*, **73**, 169, 1943.
- (2) SHOCK, N. W. y SEBRELL, W. H. : *Journ. Physiol.*, **142**, 274, 1944.
- (3) KEYS, A., y HENSCHEL, A. F. : *J. Nutrition.* **23**, 259, 1942.
- (4) BRANSKY, E. R., MAGEE, H. E. HUNTER, J. W., MILLIGAN, E. y RODGERS, T : *Brit. Med. J.*, **1**, 77, 1944.
- (5) VELLUZ, L., AMIARD, G., y BARTOS, J. : *C. R. de l'Academie des Sceances*, **226**, 735, 1948.
- (6) SILIPRANDI, D., y SILIPRANDI, N. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **14**, 52, 1954.
- (7) DE LA FUENTE, G., y BEGUE, M. L. : «Hidrólisis de los ésteres fosfóricos de la Tiamina»; *III Reunión de la Soc. de Ciencias Fisiol.*; Madrid, mayo, 1956.
- (8) VELLUZ, L., JEQUIER, R., y PLOTKA, C. : *C. R. de l'Acad. des Sceances*, **226**, 733, 1946.
- (9) PLOTKA, C., y JEQUIER, R. : *C. R. de la Soc. Biol.*, **142**, 727, 1948.
- (10) JACKSON, B., y WALD, G. : *Amer. Journ. of Physiol.*, **135**, 464, 1941.
- (11) PLOTKA, C., y PETERFALVI, M. : *C. R. Soc. Biol.*, **142**, 836, 1948.