

Efecto de la cisteína sobre la membrana interna de la mitocondria

J. Eugui y E. Santiago

RESUMEN

La cisteína produce lisis de la membrana interna mitocondrial.

Paralelamente a la lisis tiene lugar una disminución del contenido en los fosfolípidos totales de la membrana interna.

El fósforo correspondiente a estos fosfolípidos desaparecidos se encuentra "ligado" a la fracción proteica.

La fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina son los fosfolípidos principalmente afectados, y su disminución es progresiva a lo largo de la incubación de las membranas internas con cisteína.

Algunos antioxidantes y queladores (inhibidores de la producción de peróxidos de lípidos) bloquean el efecto de la cisteína sobre la membrana interna mitocondrial: no se producen cambios en la densidad óptica ni en el contenido en fosfolípidos.

La cisteína aumenta la producción de peróxidos de lípidos de la membrana interna, hasta llegar a un máximo que coincide con el comienzo de la lisis (seguida por los cambios de la densidad óptica).

Los fragmentos derivados de la lisis de la membrana interna por la acción de la cisteína, son diferentes desde el punto de vista morfológico, inmunológico y químico.

En trabajos anteriores^{1, 2, 3}, se estudió el efecto del escorbato sobre mitocondria y membrana interna mitocondrial. El ascorbato produce lisis mitocondrial acompañada de una disminución de fosfolípidos, y afecta fundamentalmente a la membrana interna².

Los fragmentos derivados de la lisis de la membrana interna son diferentes en su aspecto morfológico, inmunológico, y en su composición lípido-proteica. Apoyan la tesis presentada por Vázquez y col.⁴ de que la membrana interna mitocondrial contiene dos tipos de estructuras:

estructuras lamelares, desprovistas de subunidades proyectantes, y estructuras lamelares, recubiertas de subunidades.

Muy diversos autores han utilizado el fenómeno de la lisis mitocondrial, y la obtención de partículas submitocondriales (por sonicación, tratamiento con digitonina, detergentes, etc.), para una mejor comprensión del funcionamiento y localización enzimática^{5, 6, 7, 8, etc.}; de la interacción lípidos - proteínas⁹, estudiada también en membranas de bacterias y hongos^{10, 11}; de la estructura mitocondrial^{12, 13, 14}; incluso se ha intentado reconstruir la membrana^{15, 16, 17}.

En el presente trabajo intentamos, utilizando un compuesto, la cisteína, que posiblemente rompe la membrana interna mitocondrial de manera diferente al ascorbato, un mejor conocimiento de la arquitectura de la membrana interna, de la interacción lípidos proteínas, de la distribución de los mismos dentro de la membrana, etc.

Orientamos nuestra investigación hacia el estudio de: 1) la lisis que produce la cisteína en la membrana interna mitocondrial, y los posibles cambios que pueda ocasionar en el contenido en fosfolípidos y proteínas de la misma; 2) el estudio de los fragmentos de la membrana interna debidos a la acción lítica de la cisteína, desde el punto de vista morfológico, inmunológico, y de su composición en fosfolípidos y proteínas; 3) y el estudio del mecanismo de acción sobre la membrana interna mitocondrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas machos Wistar, decapitadas después de 16 horas de ayuno. El hígado se homogeniza en sacarosa 0,25 M, y se aíslan las mitocondrias por el método de Hogeboom¹⁸ y las membranas internas por el de Parsons

y col.¹⁹ ligeramente modificado por nosotros².

La incubación de las membranas internas mitocondriales se realiza en un medio que contiene cisteína 8×10^{-4} M, tampón Tris—ClH 0,02 M a pH 7,4, sacarosa 0,25 M; a 30° C. Los controles se incuban en un medio sin cisteína. Los cambios de la densidad óptica se siguen en un Espectrofotómetro Zeiss PMQ II, a 520 m μ .

El material resultante de la incubación se somete a centrifugación a 8.500 x g durante 10 minutos. El sedimento se llama fracción F I; y el sobrenadante se centrifuga de nuevo a 100.000 x g durante una hora, obteniéndose un sedimento, fracción F II, y un sobrenadante, fracción F III.

Muestras de estas fracciones y de los correspondientes controles se examinan en el microscopio electrónico, un Siemens Elmiskop IA, con contraste negativo, después de fijación con tetróxido de osmio, según la técnica de Parsons y col.¹⁹.

Los fosfolípidos se extraen por el método de Folch²⁰ y se cromatografían en papel impregnado en ácido silícico según la técnica de Marinetti y col.²¹, y su contenido en fósforo es determinado por el método de Bartlett²². Las proteínas son determinadas por el método de Lowry²³.

Incorporación de P³² a cortes de tejidos: cortes de hígado de rata de aproximadamente 100 μ de espesor se incuban en el medio de Krebs-Henseleit²⁴, a 37° C, conteniendo 1 mc de ortofosfato radiactivo.

Seguidamente se homogenizan y se aíslan las membranas internas mitocondriales según se ha indicado.

Los fosfolípidos fueron extraídos, cromatografiados, y su radiactividad determinada en un contador Geiger de ventana fina.

Determinación de peróxidos de lípidos: se toman muestras, de 5 en 5 minutos, de los matraces de incubación, y el aumento de peróxidos se registra por el TBA test según el proceder de Hunter y col.²⁵

RESULTADOS

Incubación de membranas internas mitocondriales con cisteína. Lisis. Cambios en la composición lípido-proteica.

La densidad óptica a 520 mμ de la suspensión de membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína, experimenta un descenso notable, que comienza aproximadamente a los 65 minutos de la incubación (fig. 1, parte superior). La pendiente es acentuada, aunque menos que la del ascorbato y hace presumir un fenómeno de lisis, confirmado por el examen de muestras en el microscopio electrónico, y por centrifugación diferencial (ver apartados siguientes).

El análisis del material resultante de la incubación con cisteína mostró una disminución en los fosfolípidos totales, a

costa principalmente de la fosfatidil colina y de la fosfatidil etanolamina.

Con objeto de confirmar estos resultados marcamos los fosfolípidos de la membrana interna con P³², incubando cortes de tejido de hígado en un medio conteniendo 1 mc de dicho elemento. Se homogenizaron, y las membranas internas aisladas fueron incubadas con cisteína, y extraídos sus fosfolípidos después de la incubación.

Los resultados expresan un exacto paralelismo entre la disminución de la radiactividad y la disminución de fósforo determinado por el método de Bartlett²²: el descenso de los fosfolípidos totales por ambos procedimientos es del 30 %; el de fosfatidil-colina del 40 % y el del fosfatidil etanolamina del 60 % (tabla I).

Para observar cómo transcurren estas alteraciones del contenido en fosfolípidos a lo largo de la incubación, se tomaron muestras durante ésta, a diferentes tiempos, de la suspensión de membranas internas controles, y de las tratadas con

TABLA I
EFECTO DE LA CISTEINA SOBRE MEMBRANAS INTERNAS MITOCONDRIALES MARCADAS CON P³²

Las membranas internas fueron marcadas con P³² antes de la incubación con cisteína. Medio de incubación: cisteína 8 x 10⁻⁴ M, tampón Tris-ClH 0,02 M a pH 7,4, sacaro-sa 0,25 M. Proteína de la membrana interna, 1,5 mg. Volumen de incubación, 5 ml. Temperatura 30° C. Los fosfolípidos fueron extraídos después de 120 minutos de incubación y separados por cromatografía.

	Control no incubado		Control incubado		+ Cisteína	
	Radiactividad c. p. m.	P μ g	Radiactividad c. p. m.	P μ g	Radiactividad c. p. m.	P μ g
Fosfolípidos totales	1.300	8,0	1.200	7,7	810	5,4
Fosfatidil cclina	500	2,1	490	2,0	275	1,2
Fosfatidil etanolamina	371	1,5	366	1,5	144	0,68

cisteína, se extrajeron los fosfolípidos, se cromatografiaron y se determinó su contenido en fósforo.

En la figura 1 puede verse claramente el paralelismo existente entre el descenso de la densidad óptica de la suspensión

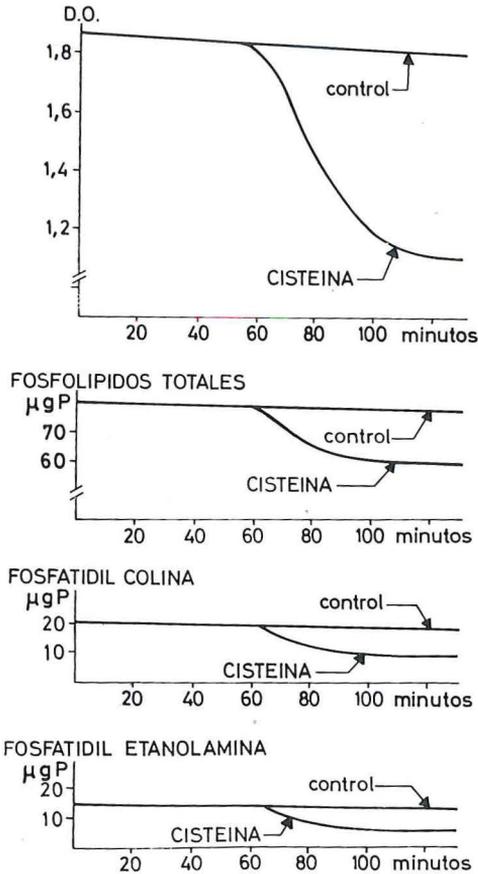


Fig. 1. Cambios de la densidad óptica a 520 $m\mu$, fosfolípidos totales, fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina de una suspensión de membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína. Medio de incubación: cisteína 8×10^{-4} M, tampón Tris-ClH 0,02 M a pH 7,4, sacarosa 0,25 M. Proteína de la membrana interna, 105 mg. Volumen de incubación 70 ml. Temperatura 30° C.

El fósforo de fosfolípidos fue determinado en alícuotas de 10 ml conteniendo 15 mg de proteínas de la membrana interna, después de 20, 40, 65, 80, 100 y 120 minutos de incubación.

de membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína y el descenso de los fosfolípidos totales a lo largo de la incubación; la fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina disminuyen progresivamente durante la incubación.

Hay por tanto, una relación evidente entre el fenómeno de lisis de la membrana interna por la acción de la cisteína y el descenso en fosfolípidos de la misma. En otras experiencias se intentó averiguar el destino del fósforo de lípidos disminuidos durante la incubación de las membranas internas con cisteína.

No se encontró un aumento del fósforo de lípidos hidrosoluble, ni un aumento de fósforo en la fracción de ácidos nucleicos. En cambio, en la fracción proteica se halló un aumento de fósforo, en relación a las membranas internas control, que se correspondía con gran aproximación al fósforo de lípidos disminuido (tabla II). Y tomando muestras de los matraces de incubación a diferentes tiempos y determinando su contenido en fósforo de lípidos y en fósforo ligado a la fracción proteica, se encontró un aumento progresivo de este último a lo largo de la incubación.

Este fósforo está fuertemente unido a la fracción proteica ya que no se liberó por diálisis, ni por hidrólisis con ácido tricloroacético al 5 % a 100° C.

Por otra parte no se encontró alteración en las proteínas. Estudios inmunológicos (ver más adelante) demostraron una total identidad de antígenos entre las membranas internas controles y las incubadas con cisteína: no hay cambios estructurales en las proteínas, al menos en las detectadas antigénicamente.

Estudio de los fragmentos derivados de la lisis de las membranas internas mitocondriales por acción de la cisteína.

Las membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína fueron sometidas

TABLA II

FOSFOLIPIDOS TOTALES Y FOSFORO LIGADO A LA FRACCION PROTEICA DE MEMBRANAS INTERNAS MITOCONDRIALES

Medio de incubación: cisteína 8×10^{-4} M, tampón Tris-ClH 0,02 M a pH 7,4, sacarosa 0,25 m. Proteína de membrana interna, 8,6 mg. Volumen de incubación, 10 ml. Temperatura 30° C. Los fosfolípidos fueron extraídos después de 120 minutos de incubación.

	Control incubado (1)	+ Cisteína (2)	Diferencia entre (1) y (2)
μ g P fosfolípidos totales	44,5	35,5	+ 9
μ g P de proteínas	11	19,4	- 8,4

a centrifugación diferencial, y se aislaron 3 fracciones: F I (sedimento de 8.500 x g) F II (sedimento de 100.000 x g) y F III (sobrenadante de 100.000 x g).

Su contenido en fosfolípidos y proteínas puede verse en la tabla III.

Es notable el hecho de que la fracción F I; que recoge el 30 % del total de proteína recuperada, tiene un contenido en fosfolípidos muy alto (65 % del total), mientras que la fracción F III, que corresponde a un 62 % del total de proteína recuperada sólo tiene un 1 % del total de fosfolípidos.

El examen de estas fracciones, con contraste negativo, en el microscopio electrónico puede verse en las figuras 2, 3, 4 y 5. La fracción F I está compuesta predominantemente por delgadas estructuras membranosas, lamelares⁴. La fracción F II presenta un material bastante desintegrado, conglomerado, pero con frecuentes estructuras lamelares, más finas y pequeñas que las observadas en la fracción F I.

La fracción F III muestra un material muy granular, apenas conglomerado, y no se observan estructuras lamelares.

TABLA III

FOSFOLIPIDOS TOTALES, PROTEINAS, RELACION FOSFOLIPIDOS-PROTEINAS, Y PORCENTAJE DE PROTEINA RECUPERADA. DE LAS SUBFRACCIONES DE MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Medio de incubación: cisteína 8×10^{-4} M, tampón Tris-ClH 0,02 M a pH 7,4, sacarosa 0,25 M. Proteína de la membrana interna, 40 mg. Volumen de incubación, 30 ml. Temperatura 30° C.

Fracción	Lípidos μ g P	Proteínas mg.	Lípidos/proteínas μ g/mg.	Proteína recuperada %
Control no incubado	210	40	5,2	—
Control incubado (fracción 8.500 x g)	200	31,5	5	80
Fracción F ₁	131,5	11,3	11,4	30,8
Fracción F ₂	9	1,4	6,4	6
Fracción F ₃	1,9	23,7	0,08	61,7

Se realizaron estudios inmunológicos con el fin de estudiar la calidad y el reparto de las proteínas en las distintas fracciones.

Muestras de estas fracciones, a una concentración de proteínas de 60 mg/ml, se sometieron a análisis inmunoelectroforético sobre gel de Agar Noble al 2 %, según la técnica de Arcos y col.²⁶. El inmunosuero empleado fue obtenido por inyecciones subcutáneas repetidas, de suspensiones mitocondriales, a conejos.

Los resultados obtenidos, fig. 6, mostraron que en las membranas internas controles todos los antígenos se encuentran en la fracción que sedimenta a 8.500 x g. En las membranas internas incubadas con cisteína, no se encuentran antígenos en las fracciones que sedimentan a 8.500

x g y a 100.000 x g (fracciones F I y F II); y todos los antígenos se hallan presentes en el sobrenadante de 100.000 x g (fracción F III). Estos hechos indican que durante la desintegración de la membrana interna mitocondrial tiene lugar una liberación de proteínas, sin pérdida de su naturaleza antigénica.

Mecanismo de acción de la cisteína sobre la membrana interna mitocondrial.

La cisteína cataliza la producción de peróxidos de lípidos a partir de emulsiones de ácidos grasos insaturados²⁷. Otros autores^{28, 29, 30}, consideran que aumentan los peróxidos de lípidos en mitocondrias durante la autooxidación de compuestos reductores, como tioles y as-

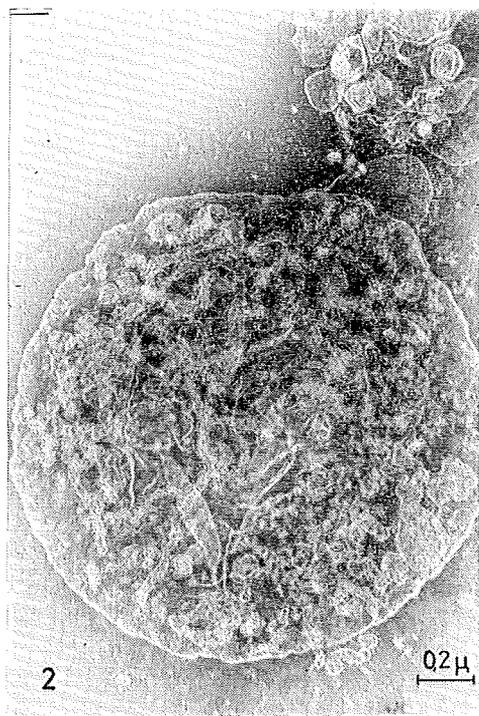


Fig. 2. Microfotografía electrónica del material del control incubado sedimentado a 8.500 x g. Ultraestructura típica de la membrana interna.

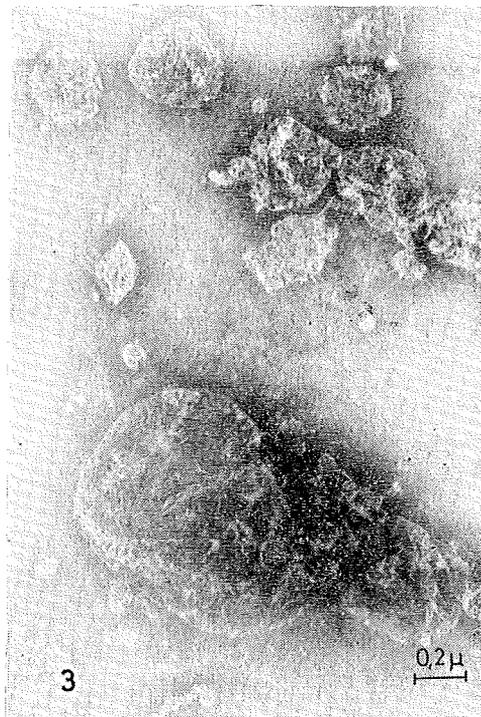


Fig. 3. Microfotografía electrónica de la fracción F₁.

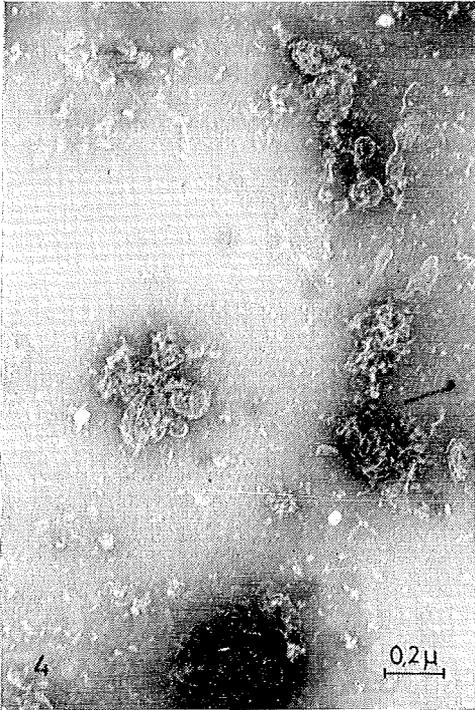


Fig. 4. Microfotografía electrónica de la fracción F₂. Material desintegrado y conglomerado.

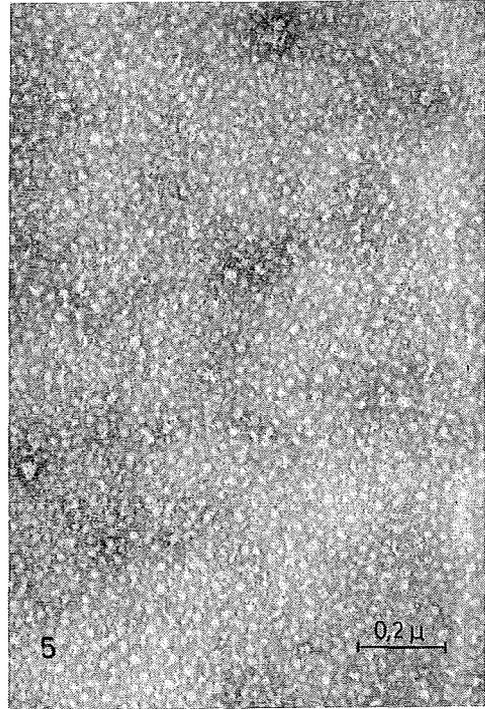


Fig. 5. Microfotografía electrónica de la fracción F₃. Material muy granular apenas conglomerado.

corbato. Wills³¹ es de la opinión de que los peróxidos de lípidos proceden de la oxidación de los ácidos grasos insaturados catalizada por hemoproteínas, o por Fe^{+++} un agente reductor (cisteína, ascorbato). Otros tioles estimulan también la producción de peróxidos de lípidos en mitocondrias y microsomas^{32, 33}.

Iniciamos nuestros estudios sobre este posible mecanismo de acción de la cisteína determinando el aumento de producción de peróxidos de lípidos en membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína, en relación a los correspondientes controles. Se tomaron muestras de los matraces de incubación, de 5 en 5 minutos, y los peróxidos se detectaron por el test del TBA. En la figura 7 pue-

de verse cómo éstos van aumentando hasta un máximo que coincide con el momento en que se inicia la lisis, seguida por el descenso de la densidad óptica.

En otras experiencias se probó el efecto de antioxidantes y queladores —inhibidores de la producción de peróxidos de lípidos— sobre membranas internas incubadas con cisteína.

La tiroxina es capaz de inhibir algunos tipos de swelling, en los cuales se produce también un aumento de peróxidos de lípidos: por glutatión, Fe^{++} , y ascorbato^{34, 35, 36}, y su acción se achaca a un efecto antioxidante.

La tiroxina mostró una total eficacia a la concentración de 10^{-5} M en la inhi-

bición del descenso de la densidad óptica de una suspensión de membranas internas incubadas con cisteína. También bloqueó el efecto de disminución de los fosfolípidos (tabla IV).

Con objeto de estudiar este efecto inhibitorio de la tiroxina a lo largo de la incubación de las membranas internas con cisteína, se fue añadiendo la tiroxina en diferentes tiempos durante la incubación. La tiroxina es capaz de bloquear la acción de la cisteína si es añadida an-

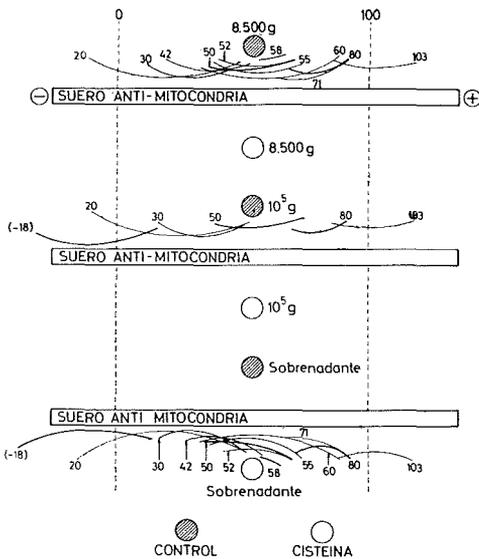


Fig. 6. Análisis inmunoeléctroforético, frente a inmunosuero específico anti-mitocondria, de membranas internas (M.I.) de mitocondrias de hígado de rata.

- 1) M.I. controles, y M.I. incubadas con cisteína 8×10^{-4} M antes de ser sometidas a centrifugación diferencial.
- 2) Sedimento de 8.500 x g.
- 3) Sedimento de 100.000 x g.
- 4) Sobrenadante de 100.000 x g.

Todos los antígenos fueron ensayados a 60 mg/ml de proteína. El cátodo a la izquierda.

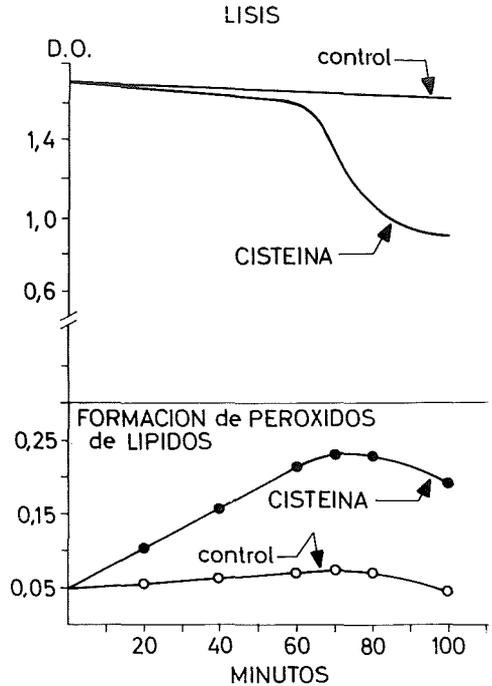


Fig. 7. Parte superior: cambios de la densidad óptica a 520 $m\mu$ de una suspensión de membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína.

Medio de incubación como en la figura 1. Proteína de la membrana interna, 39 mg. Volumen de incubación 40 ml. Temperatura 30° C.

Parte inferior: producción de peróxidos de lípidos a partir de la suspensión de membranas internas incubadas con cisteína y del correspondiente control. Los peróxidos se determinaron en alícuotas tomadas cada 5 minutos, por el test del TBA según el método de Hunter y col.²⁵ modificado por nosotros. Las lecturas se efectuaron a una longitud de onda de 532 $m\mu$.

tes del minuto 30 de la incubación (figura 8).

Este fenómeno brinda la posibilidad de un control del proceso que inicia la cisteína sobre la membrana interna mitocondrial.

El tocoferol, antioxidante, y el EDTA,

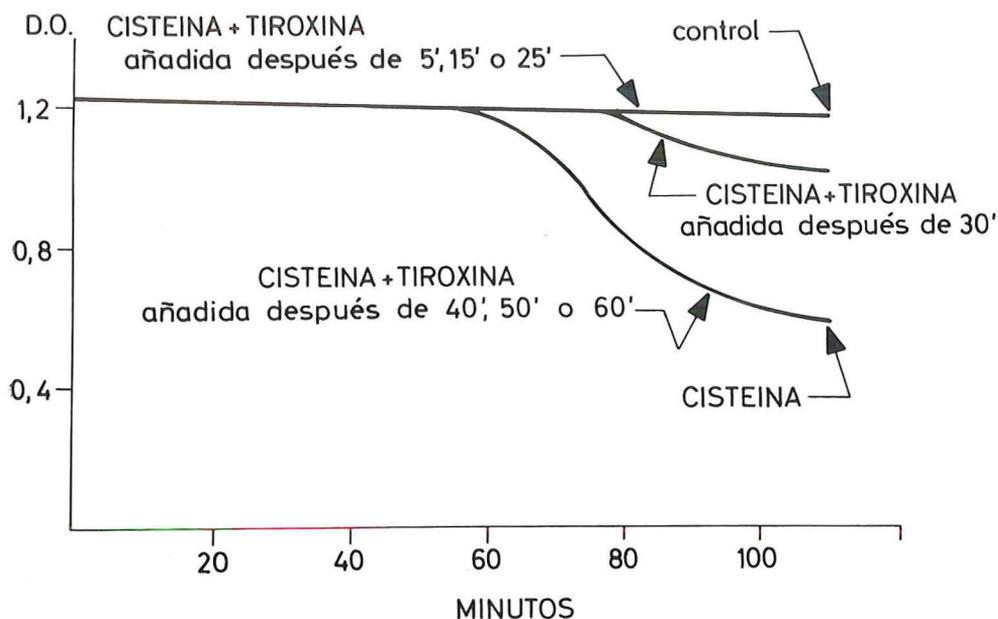


Fig. 8. Efecto de la tiroxina 10^{-5} M, añadida en distintos tiempos, sobre los cambios de la densidad óptica a $520\text{ m}\mu$ de una suspensión de membranas internas mitocondriales incubadas con cisteína.

Medio de incubación como en la figura 1. Proteína de la membrana interna, 7,4 mg. Volumen de incubación, 10 ml. La tiroxina fue añadida a los matraces conteniendo cisteína en los minutos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, y 70 de la incubación.

TABLA IV

EFFECTO DE LA TIROXINA SOBRE MEMBRANAS INTERNAS INCUBADAS CON CISTEINA. CONTENIDO EN FOSFOLIPIDOS TOTALES, FOSFATIDIL COLINA, FOSFATIDIL ETANOLAMINA Y PROTEINAS.

Medio de incubación: como en la figura 1. Proteína de la membrana interna, 12,5 mg. Volumen de incubación 10 ml. Temperatura 30°C . Los fosfolípidos fueron extraídos después de 120 minutos de incubación.

	Control no incubado	Control incubado	+ Cisteína	+ Tiroxina 10^{-5} M	Tiroxina 10^{-5} M + Cisteína
$\mu\text{g P}$ fosfolípidos totales	74	66	53	70	68
$\mu\text{g P}$ fosfatidil colina	20	19	13	20,1	20,3
$\mu\text{g P}$ fosfatidil etanolamina	18	18,2	10	18	18,1
mg Proteínas	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5

quelador, resultaron igualmente inhibidores de la acción de la cisteína, a la concentración de 5×10^{-5} M.

DISCUSIÓN

Nuestras experiencias apuntan hacia un mecanismo de acción de la cisteína sobre la membrana interna mitocondrial de producción de peróxidos a partir de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de la misma.

En los fosfolípidos atacados aparecerían grupos funcionales muy activos (hidróxilo, oxo, carboxilo, etc.) —encontrados en los compuestos originados durante el proceso de autoxidación de ácidos grasos insaturados³⁷— que podrían establecer un enlace fuerte con la fracción proteica.

Esto explicaría la disminución de los fosfolípidos extraídos por disolventes orgánicos, y el paralelo aumento del fósforo ligado a las proteínas.

La fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina son los fosfolípidos principalmente disminuidos, y son precisamente los de un mayor contenido en ácidos grasos de elevado índice de insaturación³⁸, es decir, los que darían lugar a una mayor producción de peróxidos.

El ataque de la cisteína sobre los fosfolípidos sería la causa de la desagregación de la membrana, sin resultar estructuralmente afectadas las proteínas. Indica también, que la interacción lípidos-proteínas se realiza mediante enlaces de naturaleza débil.

Nuestros resultados muestran una acción selectiva de la cisteína sobre la membrana interna mitocondrial: se han aislado fracciones de composición química y antigénica diferentes. Probablemente las fracciones sedimentadas a 8.500 x g y 100.000 x g, después del tratamiento con cisteína, corresponden a las estructuras lamelares de Vázquez y col.⁴. Tienen una alta proporción de fosfolípidos, y sus proteínas no son detectables antigénicamente.

Las fracciones sobrenadantes de 100.000 x g de membranas internas incubadas con cisteína, serían las estructuras tubulares⁴ desintegradas. Su contenido en fosfolípidos es muy bajo, y sus proteínas son antigénicas.

Hay por tanto 2 zonas química y estructuralmente distintas en la membrana interna mitocondrial, una de las cuales es destruida por la cisteína, probablemente por poseer sus lípidos un mayor índice de insaturación, mientras que la otra no es afectada.

SUMMARY

Effect of cysteine on inner mitochondrial membranes

Inner mitochondrial membranes incubated in the presence of cysteine undergo structural lysis, coinciding with a decrease in extractable phospholipids. The phospholipids mainly affected are phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine. The disappearance of the extractable lipid P progresses along the incubation time; simultaneously this results in a parallel increase in P strongly bound to the precipitated proteins.

Some antioxidants and chelating agents —which block lipid peroxide formation— inhibit the effect of cysteine on the inner mitochondrial

membrane and therefore no optical density change of the suspension is observed and the phospholipids remain unaltered.

Cysteine enhances the lipid peroxide production in inner mitochondrial membrane and a maximum is reached coincident with the initiation of the lysis (followed by the optical density changes).

Differential centrifugation after incubation has allowed the separation of subfractions which are different from the morphological, chemical and immunological point of view.

BIBLIOGRAFÍA

1. SANTIAGO, E., F GUERRA y J. M. MACARULLA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 25, 1969.
2. SANTIAGO, E., J. J. VÁZQUEZ, F. GUERRA y J. M. MACARULLA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 31, 1968.
3. SANTIAGO, E., A GANSER, J. M. MACARULLA y F. GUERRA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 37, 1968.
4. VÁZQUEZ, J. J., E. SANTIAGO, F. GUERRA y J. M. MACARULLA. *Rev. esp. Fisiol.*, 24: 43, 1968.
5. COOPER, C. y A. L. LEHNINGER. *J. Biol. Chem.*, 219: 489, 1956.
6. LOYTER, A., R. O. CHRISTIANSEN y E. RACKER. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29: 450, 1967.
7. STOREY, B. T. *Arch Biochem. Biophys.* 126: 585, 1968.
8. HAAS, D. W. y R. R. GRAY. *Biochim. Biophys. Acta*, 172: 571, 1969.
9. URRY, D. W., M. MEDNIEKS y E. BEJNAROWICZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57: 1043, 1967.
10. ENGELMAN, D. M. y H. J. MOROWITZ. *Biochim. Biophys. Acta.*, 150: 376, 1968.
11. MC CLARE, C. W. F. *Nature*, 216: 766, 1967.
12. KOPACZYK, K., J. ASAI, D. W. ALLMANN, T. ODA y D. E. GREEN. *Arch. Biochem. Biophys.*, 123: 602, 1968.
13. MORTON, D. J., C. HOPPEL y C. COOPER. *Biochem. J.*, 107. 377, 1968.
14. PREZBINDOWSKI, K. S., F. J. RUZICKA, F. F. SUN y F. L. GRANE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31: 164, 1968.
15. KOPACZYK, K., J. ASAY y D. E. GREEN. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126: 358, 1968.
16. RACKER, E. *Federation Proc.*, 26: 1335, 1967.
17. TZAGOLOFF, A., D. G. MC COONNELL y D. H. MAC LENNAN. *J. Biol. Chem.*, 243: 4117, 1968.
18. HOGBOOM, G. H. En *Methods in Enzymology*. Volumen I, página 16. Editado por S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Academic Press. New York, 1955.
19. PARSONS, D. F., G. R. WILLIAMS y B. CHANCE. *Ann. New York, Acad. Sci.*, 137: 643, 1965.
20. FOLCH, J. En *Phosphorus Metabolism*. Volumen II, página 197. Editado por H. Mc Elroy y B. Glass. Johns Hopkins Press. Baltimore, 1952.
21. MARINETTI, C. V., J. ERBLAND y J. KOCHEN. *Federation Proc.*, 16: 837, 1957.
22. BARTLETT, C. R. *J. Biol. Chem.*, 234: 466, 1969.
23. LOWRY, O. H., N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR y R. J. RANDALL. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
24. KREBS, H. A. y K. Z. HENSELEIT. *Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's*, 210: 33, 1932.
25. HUNTER, F. E. Jr., J. M. GEBICKI, P. E. HOFFSTEN, J. WEINSTEIN y A. SCOTT. *J. Biol. Chem.*, 238: 828, 1963.
26. ARCOS, J. M., C. ALVAREZ-MORENO, A. CHORDI, J. J. VÁZQUEZ, J. M. MACARULLA y E. SANTIAGO. *R. esp. Fisiol.*, 23: 167, 1967.
27. WILBUR, K. M., F. BERNHEIM y O. W. SHAPIRO. *Arch. Biochem. Biophys.*, 24: 305, 1949.
28. OTTOLENGHI, A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 79: 355, 1959.
29. HOPKINS, F. G. *Biochem. J.*, 19: 787, 1925.
30. FORTNEY, S. R., y W. S. LYNN. *Arch. Biochem. Biophys.*, 104: 241, 1964.
31. WILLS, E. D. *Biochem. Biophys. Acta*, 98: 238, 1965.
32. SKREDE, S. y B. O. CHRISTOPHERSEN. *Biochem. J.*, 101: 37, 1966.
33. PLACER, Z., L. L. CUSHMANN y B. C. JOHNSON. *Nahrung*, 10: 551, 1966.
34. LEHNINGER, A. L. y M. SCHNEIDER. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5: 109, 1959.
35. HUNTER, F. E. Jr., A. SCOOT, J. WEINSTEIN y A. SCHNEIDER. *J. Biol. Chem.*, 239: 614, 1964.
36. CASH, W. D., M. GARDY, H. E. CARLSON y E. A. EKONG. *J. Biol. Chem.*, 241: 1745, 1966.
37. SCHAUENSTEIN, E. *J. Lipid Res.*, 8: 417, 1967.
38. HUET, C., M. LEVY y M. PASCAUD. *Biochem. Biophys. Acta*, 150: 521, 1968.

