

**La importancia
de las membranas
biológicas en
los mecanismos
de acción hormonal**

SERGIO ESTRADA O.*

LOS DATOS ACTUALES sobre los mecanismos de acción hormonal, como sucede con todos los campos científicos en desarrollo, muestran numerosas contradicciones, mucho más ostensibles sobre todo si se piensa encontrar algún fenómeno que explique todos los efectos de alguna hormona en particular, que desafortunadamente es como se ha enfocado el terreno a estudiar hasta la actualidad.

En términos generales se ha sugerido que cualquier efecto hormonal se va a manifestar directa o indirectamente en la actividad de los sistemas enzimáticos que regulan la reacción química modificada por la hormona. El mecanismo de esta modificación en la actividad enzimática a su vez podría estar dado por los efectos siguientes:

1. Modificación en la actividad de una enzima al alterarse la magnitud a la cual se formen nuevas enzimas a partir de precursores simples. En otras palabras, que la hormona indujera un aumento o disminución en la biosíntesis de apoenzima (proteína) o coenzima de la enzima.

2. Incremento en la actividad de la enzima o las enzimas al convertir a la misma de su forma inactiva a su forma activa, modificando la cinética de una proteína preformada.

3. Modificación en la actividad de una enzima (inhibición de la actividad enzimática) por la competencia de la hormona con uno de los cofactores de la enzima con un sitio específico de la molécula de proteína de la misma.

4. Participación directa de la hormona en la reacción química general catalizada por la enzima sirviendo como coenzima o como co-sustrato de la enzima regulada por la hormona, y,

* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Ciudad Universitaria. México 20, D. F.

5. Aumento o disminución en la actividad de una enzima o un sistema multienzimático al modificar la permeabilidad o estructura de la membrana celular o membranas subcelulares hacia sustratos, cofactores o activadores metálicos o no metálicos necesarios para la actividad de la enzima regulada por la hormona, en este caso, de modo indirecto.

De las posibilidades anteriores de regulación de la actividad de una enzima por una hormona, es prudente señalar que solamente existen observaciones experimentales para tratar de validar la primera, la segunda y la quinta posibilidades. No comentaremos esta primera y segunda posibilidades por salirse de los límites de nuestra presentación, lo cual dejaremos para un trabajo posterior; nos limitaremos a señalar y criticar los datos existentes en la literatura y algunas observaciones realizadas en nuestro laboratorio para tratar de concluir si existe una justificación general a aceptar algunos mecanismos primarios de acción hormonal a nivel de las membranas celular o subcelulares.

Existen numerosas hipótesis de trabajo para aclarar los mecanismos de acción hormonal. Una de las teorías más antiguas era la de considerar los efectos biológicos de las hormonas como acciones farmacológicas. Para explicar ésto, se recurría a la hipótesis de Ehrlich¹ que suponía que la célula tenía ciertos aceptores que reaccionaban con la hormona como la llave con la cerradura para producir sus efectos biológicos. Sin embargo, más recientemente Green² propuso un mecanismo en aparente contraposición al primero al afirmar que cualquier sustancia que en pequeñas cantidades produce efectos biológicos, lo hace participando en algún sistema enzimático, posiblemente al modificar la actividad, la síntesis de la enzima o cualquiera de los mecanismos antes expuestos.

A su vez, se han publicado numerosos trabajos que señalan el aumento o disminución en la actividad de numerosas enzimas ante determinado componente hormonal. Sin embargo, estos deben verse como *efectos* de la hormona y no necesariamente como mecanismo de acción de la misma para explicar múltiples caminos metabólicos. El paso a seguir en estas observaciones es estudiar el *mecanismo* del efecto, o sea la activación enzimática inducida por una hormona, para tratar de correlacionarlos con todos los efectos de la hormona que a su vez pueden tener diferentes mecanismos de acción. En principio, la suposición de que las hormonas puedan tener un *efecto directo* sobre cualquier sistema enzimático es difícil de aceptar para *todos* los mecanismos de acción hormonal ya que en la actualidad no existe ninguna reacción enzimáti-

ca en que se haya demostrado que algún componente hormonal es esencial para el desarrollo de la reacción química catalizada por esa enzima, además de que los efectos hormonales obtenidos sobre sistemas enzimáticos parecen no explicar la acción fisiológica completa de una hormona. Sin embargo, esta posibilidad la dejaremos para comentarla en una ocasión posterior.

Concretémonos a analizar los efectos obtenidos en diferentes sistemas biológicos por la insulina, la hormona adrenocorticotrófica, el estradiol, la desoxicorticosterona y los esteroides suprarrenales para tratar de ver si es posible integrar algunos de sus efectos metabólicos celulares con un posible mecanismo de acción primario a nivel de las membranas biológicas.

INSULINA

Mucho antes de que se conociera la maquinaria enzimática de las células, Höber³ postuló una teoría sobre la permeabilidad de la membrana celular a la glucosa como posible mecanismo de acción de la insulina. Esta hipótesis ha vuelto a ser puesta en actualidad por los trabajos de Levine y Goldstein⁴ quienes perfundieron algunas pentosas y hexosas en perros eviscerados y nefrectomizados y demostraron que los azúcares previa introducción de insulina, estaban casi selectivamente en el espacio extracelular, sin embargo, después de la inyección de la hormona, los azúcares entraron rápidamente al compartimento intracelular. De aquí surgió la hipótesis de que la insulina podía actuar en el músculo al modificar directamente la permeabilidad de la membrana celular.

En contra de esta hipótesis existía la demostración hecha por los Cori^{5,6} de la activación de la hexoquinasa por la insulina, sin embargo, esta observación que ha respaldado a toda una teoría cada vez es menos aceptada por cuatro razones fundamentales: 1. Se ha demostrado que la fosforilación previa de los azúcares permite la entrada de la glucosa al interior de la célula⁷; 2. la teoría del efecto de la insulina sobre la hexoquinasa no explica el conocido efecto de hipersensibilidad de los animales hipofisectomizados a la insulina; 3. la penetración de azúcares se ha demostrado que puede suceder en condiciones de concentración de azúcar y temperatura en las cuales es imposible que actúe el sistema de la hexoquinasa; 4. la penetración de azúcares se realiza con más rapidez y en mayor magnitud en condiciones anaeróbicas que impiden la participación de la hexoquinasa⁹ y, además de todo esto,

los trabajos originales de los esposos Cori que permitieron pensar en esa posibilidad, no han podido ser reproducidos por otros investigadores¹⁰.

Los experimentos de Levine no pudieron llegar en un momento más oportuno. Después de este trabajo se han realizado numerosas observaciones experimentales para validar la sugestión original de este investigador. Wick y col.¹¹ han confirmado y ampliado estas experiencias con azúcares marcados en 1-C C^{14} ; asimismo, los hallazgos de Haft y Mirsky¹² sobre el consumo de azúcar por el diafragma de rata *in vivo* están de acuerdo con las hipótesis de Levine hechas también *in vivo*. Los mismos datos encontrados con glucosa parecen hacerse extensivos a la conducta de la D-xilosa en estos sistemas¹³ así como para la D-galactosa, como lo han demostrado Hechter y su grupo¹⁴.

El efecto de la insulina para acelerar el transporte de solutos hidrocarbonados en la membrana celular también parece hacerse extensivo para algunas otras moléculas como lo han demostrado: Cristensen¹⁵ quien en presencia de insulina logra demostrar un aumento de captación de AIB (ácido alfa amino-iso butírico) en músculo y Zierler¹⁶ quien demostró que en presencia de insulina las células acumulan mayor cantidad de potasio independiente de la concentración extracelular de azúcares; este mismo efecto se ha observado que existe sobre la incorporación de acetato marcado con C^{14} en la fracción lipídica de hígado, que aumenta en presencia de insulina¹⁷.

Todos estos efectos de la insulina sobre la penetración de sustratos en la membrana celular están acordes con el posible efecto inhibitorio de competencia que ejercen otros componentes hormonales sobre todo hipofisarios a nivel de la membrana celular. A su vez estos datos pueden correlacionarse si se acepta la presencia de un componente receptor estereoespecífico en la membrana celular que tendría una interacción estructural con el azúcar para permitir su transporte a través de la membrana en presencia de insulina, como han sugerido Morgan, Cadenas y Park¹⁹.

La acción de esta hormona producida en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas podría asimismo explicar el conocido efecto de hipersensibilidad a la insulina de los animales hipofisectomizados al admitir que ambos componentes hormonales actuaría compitiendo por la transferencia de azúcares en la membrana y la ausencia de uno de los dos componentes hormonales daría lugar a la preponderancia en efecto del existente. Esto parece ser cierto. La hipofisectomía lleva a un mar-

cado aumento en el transporte de azúcares (preponderancia en el efecto insulínico en la interacción de competencia) comparándolo con el animal normal; asimismo, lo que se esperaría con la presencia de cantidades importantes de hormonas hipofisarias, o sea, disminución en el transporte de azúcares aún en presencia de insulina, también se cumple como lo han demostrado Morgan y col.¹⁸ ya que la inyección de hormona de crecimiento durante días sucesivos da lugar a un estado idéntico al de la diabetes clínica. Este efecto de competencia parece existir entre la SHH y la insulina incluso *in vitro*¹⁹ ya que la hormona adrenocorticotrófica parece producir su efecto diabetogénico en un mecanismo mediado por la suprarrenal y por tanto ligado al efecto gluconeogénico de los esteroides suprarrenales.

En apariencia casi todos los efectos de la insulina sobre el metabolismo intermedio se explicaban al admitir que el aumento de la concentración de sustrato (glucosa) inducido por la hormona era el paso inicial para alimentar el ciclo de la glucólisis anaeróbica y por tanto para permitir el consumo normal y producción de energía en la célula. Sin embargo Krahl²⁰ realizó una observación que abrió la puerta a nuevas posibilidades para explicar los efectos de la insulina. Este autor demostró que la insulina estimula la síntesis de péptidos en rebanadas de hígado de rata acorde con la concentración de glucosa en el medio pero no dependiente de ella, lo que sugiere un efecto directo de la insulina sobre la síntesis de proteínas independiente de su efecto sobre la permeabilidad celular a los azúcares. No obstante, quizá la objeción más importante a todos los datos mencionados sean las observaciones de E. B. Chain quien ha demostrado que la insulina tiene un efecto directo sobre la síntesis de glucógeno independiente en absoluto de los efectos antes descritos de la insulina a otros niveles celulares y quien por tanto propone que los efectos metabólicos de la insulina no se encuentran a ninguno de estos niveles, sino en vías termodinámicas mal conocidas que se estudian en la actualidad en su laboratorio²¹.

ACTH

Ya se había sugerido que la hormona adrenocorticotrófica podría llevar a cabo su efecto trófico en la síntesis de esteroides suprarrenales modificando la permeabilidad de la membrana de las células suprarrenales a diferentes sustratos de un modo similar al que realiza la insulina con la penetración de azúcares en las células musculares. Esta hipóte-

sis fue tomada por Hechter como una posibilidad factible y por tanto cuantificó la captación de sacarosa y manitol 1-C-C¹⁴, AIB también marcado con C¹⁴ y Na y Rb isotópicos²² en tejido de rata en presencia de ACTH. Demostró un efecto claro de esta hormona sobre la captación en suprarrenal aislada de los sustratos antes mencionados. Sugirió entonces este autor que la mayor captación de glucosa inducida por la ACTH en suprarrenal da lugar a una mayor formación instantánea de glucosa 6-fosfato, la que a su vez en el ciclo colateral de las pentosas da lugar a un aumento en la concentración intracelular de TPNH (trifosfo piridin nucleótido reducido que según Haynes sería el factor limitante de la corticoesteroidogénesis. Estos hallazgos de Hechter y col. tendrían validez indiscutible de no ser por dos observaciones que hacen que las hipótesis de estos autores caigan por tierra; por un lado, se ha demostrado que el aumento de corticosteroidogénesis observado *in vitro*, puede disociarse *in vivo* de modo definitivo de la concentración de azúcar y, como lo ha publicado Schonbaum²³ que la insulina en suprarrenales produce un aumento en la entrada de glucosa a las células pero no un aumento en la síntesis de corticoides, como habría de esperarse de ser ciertas las suposiciones de Hechter. Estos últimos datos sugieren que el modelo de un mecanismo de permeabilidad propuesto para explicar la acción de la ACTH sobre la síntesis de esteroides no puede explicarse por un efecto de la hormona sobre la permeabilidad a los azúcares.

ESTRADIOL

Szego y Roberts sugirieron que la entrada de glucosa en la célula inducida por el estradiol podría significar el mecanismo de acción primario de esta hormona. La idea desde un principio parecía poco factible por lo difícil que es valorar los efectos estrogénicos de la hormona desde el punto de vista metabólico y sobre todo tomando como alimentador de todas las sutiles y hasta psicológicas acciones de la misma a la glucosa. Desde el principio se notaba algo de falta de imaginación y originalidad en esta hipótesis; sin embargo, otra vez Hechter, tomando como base las observaciones de Noall²⁴ quien demostró un aumento de captación de AIB en útero de rata aislado en presencia de insulina, se dió a la tarea de demostrar lo falso o verdadero de la suposición de Szego y Roberts. Para el efecto, hizo lo mismo que había hecho con la ACTH y la suprarrenal, solo que en este caso utilizó la captación

de sacarosa y manitol C^{14} , AIB marcado y Na y Rb isotópicos en útero aislado de rata en presencia de estradiol. Las observaciones de este grupo permiten afirmar que el mecanismo de acción del estradiol no parece depender de un aumento de incorporación de glucosa en las células uterinas por un efecto del estradiol al disminuir la permeabilidad de la membrana celular a los azúcares.

Sobre el mecanismo de acción del estradiol parecen existir observaciones de más interés a otros niveles moleculares, como demostraron Mason y Gullekson²⁵ al notar que el estradiol a concentraciones muy bajas es capaz de permitir la unión del piridoxal 5-fosfato a la apoenzima de la fosforilasa y la transaminasa de la quinurenina con el consiguiente aumento de la actividad de estas enzimas por un mecanismo que puede clasificarse como semi-síntesis de enzima. Sin embargo, aun estos últimos efectos siguen sin explicar los efectos generales de la hormona.

DOCA

Es bien conocido el efecto de la DOCA en el metabolismo de los electrolitos en el mamífero ya que produce un aumento en la retención de Na y un incremento en la excreción de potasio. También es sabido que este efecto se ha adjudicado desde hace varios años a una acción primaria de la DOCA sobre los sistemas de transporte activo de los túbulos renales o sea, sobre esa nebulosa y mal definida entidad conocida con el nombre de bomba de sodio. En este caso, al estar mal definido el objeto a estudiar, es lógico que las conclusiones sacadas del estudio del mismo sean poco válidas. Aunque Hokin y Hokin han descrito en la membrana de algunas células la presencia de ácido fosfatídico que se ha sugerido es el acarreador de iones a nivel de la membrana celular, la revisión de estos conceptos da la impresión totalmente justificada por lo poco que se conoce de que los mecanismos de selección catiónica son oscuros. Hechter y col.^{26,27} han estudiado el efecto de la DOCA sobre el transporte catiónico en *Neurospora crassa* demostrando a la concentración de DOCA de 1×10^{-5} M., que la conducta del Rb, el K y el Na^{22} se modifican por la DOCA, sugiriendo el autor que los sistemas de transporte se alteraron por causa de la hormona.

El efecto obtenido por estos autores es indudable y además, parece ser específico ya que no se obtiene por otros esteroides, sin embargo, aunque el efecto es real, las especulaciones hipotéticas propuestas para

explicar este hecho se basan en su totalidad en la admisión de los sistemas de transporte del catión, que si bien puede ser ácido fosfatídico, también puede ser una o varias adenosin-trifosfatasa que no se han tomado en cuenta, y que, lo que nos parece más importante, no toman en cuenta la posibilidad de que cuantitativamente los sistemas energéticos de transporte, la cadena respiratoria y la cadena de fosforilación oxidativa intramitocondrial sean los responsables directos de la existencia de la bomba de sodio, como lo han demostrado indirectamente varios trabajos^{28,29,30,31}, que no se toman en cuenta en los modelos de permeabilidad propuestos para explicar los efectos de las hormonas en la bomba de sodio. Este parece ser el defecto fundamental del modelo propuesto por Hechter y Lester para explicar el control citoplásmico de la permeabilidad, al ignorar la importancia de la cadena respiratoria intramitocondrial en la regulación del mismo.

HIDROCORTISONA

El análisis del posible mecanismo de acción de todos los efectos inducidos por la hidrocortisona hace muy difícil adscribir un solo mecanismo del cual puedan depender todos ellos. Se sabe que en el animal íntegro este esteroide tiene efectos claros sobre el glucógeno hepático y muscular, sobre el catabolismo proteico muscular, sobre el metabolismo de lípidos y proteínas y sobre el metabolismo de los líquidos y electrolitos, sin contar algunos efectos particulares como el timolítico o el eosinopénico cuya interpretación es aun menos clara. A nadie se le ocurriría que todos los efectos mencionados dependieran de un mecanismo de acción primaria a determinado nivel molecular, como hasta ahora ha tratado de hacerse con la insulina. Con los esteroides suprarrenales de tipo glucocorticoide el problema parece ser más complejo. Creemos más razonable considerar que la hormona tiene capacidades funcionales de tipo multidimensional o multivectorial cuyo efecto metabólico general está constituido por la suma de sus efectos metabólicos particulares que no necesariamente pueden tener el mismo mecanismo de acción ni ser dependientes unas de las otras, en cuyo caso siempre podría pensarse en la existencia de un mecanismo primario que sería el inicio de una serie de reacciones en cadena de mayor o menor especificidad y en donde siempre existiría la posibilidad de encontrar un principio y un final más o menos lógicos. ¿Puede alguien afirmar que el efecto timolítico de la hidrocortisona es dependiente del

cosinopénico y previo al efecto catabólico de proteínas de tejido periférico? ¿Puede decirse que el efecto observable en el metabolismo de los electrolitos es secundario a la inhibición del metabolismo oxidativo mitocondrial inducido por la hidrocortisona? En ninguna de estas dos posibilidades la respuesta es afirmativa y a la vez cierta. Es indudable que la secuencia de algunos efectos metabólicos generales, como el catabólico de proteínas (o antianabólico) en tejido periférico está en relación con el efecto de estos glucocorticoides sobre la síntesis hepática de glucógeno que en este caso sería dependiente y secundario al catabolismo de proteínas musculares. Sin embargo ni en esta situación que parece simple y clara la relación causal es precisa, ya que parece existir cierta independencia en cada uno de los dos fenómenos.

Podríamos decir que para el caso de los glucocorticoides debe tratarse de estudiar el mecanismo de acción de cada uno de sus efectos metabólicos y no uno solo para todos ellos. Así como es cierto que todos los efectos guardan una relación entre sí, aunque no de dependencia obligada, también es posible que los mecanismos íntimos de estos efectos puedan estar relacionados entre sí.

En el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de México se han realizado algunas observaciones que sugieren un efecto aparente de la hidrocortisona sobre la permeabilidad de las membranas. En 1960 en trabajos realizados por Gómez Puyou y col.³², se demostró que la hidrocortisona aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial al DPN (difosfopiridin nucleótido lo que se pensó podría explicar en parte la inhibición de las enzimas DPN dependientes bajo el efecto del esteroide. Este aumento en la reducción del DPN demostrada por medios espectrofotométricos puede ser un efecto directo del esteroide sobre la estructura de la membrana mitocondrial ya que demostró ser específico de la hidrocortisona; la triamcinolona sin embargo, tuvo un efecto opuesto al esperado no obstante que también inhibe el metabolismo oxidativo de la célula; sin embargo, como este último esteroide desacopla la fosforilación oxidativa de modo parecido al dinitrofenol como ha demostrado Gómez Puyou³³, cosa que no hace la hidrocortisona *in vitro*, sugiere que el mecanismo o los mecanismos de inhibición del metabolismo oxidativo inducidos por los dos esteroides son diferentes, aunque los efectos metabólicos globales de los mismos solo difieran en grado cuantitativamente.

Por otro lado, recientemente se ha podido observar en experimentos preliminares un efecto particular de activación enzimática *in vivo*

en hígado de rata perfundido con hidrocortisona³⁴ que sugieren que la presencia de la membrana celular es esencial para la manifestación del hecho ya que los efectos de activación desaparecen al romper la célula con vibraciones ultrasónicas. En otras palabras, al romper la integridad de la membrana desaparece el efecto de activación enzimática lo que posiblemente señala un fenómeno de permeabilidad o de transporte de algunos sustratos necesarios para la cinética de las enzimas estudiadas que se pierde al desaparecer la membrana celular.

Con los datos analizados podemos concluir que en la actualidad no existe ninguna hormona cuyos efectos generales se expliquen en forma completa por un mecanismo de acción primario a nivel de la membrana celular, mitocondrial, microsomal, reticuloendoplásmico o del citoesqueleto como llama Peters al conjunto de barreras o intervalos estructurales que existen entre la célula. Existen efectos particulares de diferentes hormonas cuyo mecanismo de acción, también particular puede estar a nivel de las membranas celular o mitocondrial, como el caso de la tiroxina que desacopla la fosforilación oxidativa y aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, sin embargo no es factible suponer que todos los efectos de la hormona observados en el animal íntegro se deban a ese único mecanismo.

Queda por averiguar a la investigación actual hasta que grado son específicos, primarios, independientes y de significación fisiológica los efectos de las hormonas sobre la permeabilidad celular a diversos sustratos, cofactores y activadores e inhibidores que permitan explicar las modificaciones en la actividad de sistemas multienzimáticos importantes y que a la vez permitan de modo indirecto conocer mejor la delicada y sutil organización de los edificios moleculares que constituyen a la célula.

REFERENCIAS

1. Ehrlich, P.: citado por Hechter, O en *vitamines and hormones*. 13: 293. 1955.
2. Green D., E.: *Advances in enzymology*. 1: 177-178, 1941.
3. Höber, O.: citado por Tepperman A., y Tepperman, J.: en *Pharmacological Reviews*. 12: 301, 1960.
4. Levine, R.; Goldstein M., S.; Klein, S. y Huddleston, B.: *American Journal of Physiology*. 163: 70-76, 1950.

5. Colowick, S. P.; Gori G., T. y Slein W. W.: *Journal of Biological Chemistry*. 168: 583-596, 1947.
6. Price W. H.; Cori C., F. y Colowick S., P.: *Journal of Biological Chemistry*. 160: 633-634, 1945.
7. Park. C., R.; Reinwein, D.; Henderson M., J.; Cadenas, E. y Morgan H., E.: *American Journal of Medicine*. 26: 674-684, 1959.
8. Park C., R.; Johnson, L.; Wright J., H. y Batsel, H.: *American Journal of Physiology*. 191: 13-18, 1957.
9. Citado en *J. Biol. Chem.* 236:262, 1961.
10. Stadie W., C. y Haaugard N.: *Journal of Biological Chemistry*. 177: 311-324, 1949.
11. Wick A., N. y Drury D. R.: *American Journal of Physiology*. 173: 229-232, 1953.
12. Haft, D.; Mirsky I., A., y Perissutty, G.: *Procedures of the Society for Experimental Biology*. N. Y. 82: 60-62, 1953.
13. Kipnis D., M., y Cori C., F.: *Journal of Biological Chemistry*. 224: 681-693, 1957.
14. Norman, D.; Menozzi, P.; Reid, D.; Lester, G. y Hechter, O.: *Journal of General Physiology*. 42: 1277-1283, 1959.
15. Christensen, H., N.: citado por Hechter, O. en *Recent Progress in Hormone Research*. Cell permeability and Hormone action. Pág. 141, 1960.
16. Zierler K., M.: *American Journal of Physiology*. 197: 524-529, 1959.
17. Haft D., E., y Miller L., L.: *Biochimica et Biophysica Acta*. 19: 386-394, 1956.
18. Morgan H., E.; Cadenas, E., y Park C.: en el libro *Mechanism of insulin action*. Symposium. editado por Young, F., G.; Broom W. A. y Wolff, F., W.: Charles C. Thomas Publisher. Springfield Il. U. S. A., Pág. 31, 1960.
19. Bronk, M., y Fisher R., B.: *Journal of Physiology*. 136: 345-352, 1957.
20. Krahl M., E.: *Recent Progress in Hormone Research*. 12: 199-207, 1956.
21. Chain E., B.: *Some observations on the mode of action of insulin* en la referencia 18, Pág. 49, 1960.
22. Hechter, O.: *Recent Progress in Hormone Research*. 1960.
23. Schonbaum, E.; Davidson, M.; Large R. E., y Casselmann W. G.: *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 1209, 1959.

24. Noall M., W.; Riggs T. R.; Walker L. M., y Christensen H.: *Science*. 126: 1002-1005, 1959.
25. Mason, M., y Gullekson, E.: *Journal of the American Chemical Society*. 81: 1517-1523, 1959.
26. Lester G., y Hechter, O.: *Procedures of the Natural Academy of Sciences*, 44: 1141-1152, 1958.
27. Lester G., y Hechter O.: *Procedures of the Natural Academy of Sciences*. 45: 1792-1805, 1959.
28. Bartley, W.; Davies R., y Krebs H. A.: *Procedures of the Royal Society London*. 142: 127-197, 1954.
29. Mac Farlane G., y Spencer A., G.: *Biochemical Journal* 64: 569-584, 1953.
30. Price C. A.; Davies R., E. y Fonnessu, A.: *Biochemical Journal*. 64: 754-776, 1956.
31. Gamble J. L., Jr.: *Journal of Biological Chemistry*. 288: 955-967, 1957.
32. Estrada O., S.: Tesis Recpcional. Universidad Nacional de México, 1960.
33. Gómez Puyou, A., y Peña Díaz A.: Trabajo presentado en el V Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, San Luis Potosí, S. L. P. Abril 1962.
34. Estrada O., S. y Córdoba A., F.: Por publicarse.