

CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE ISOENZIMAS

(*Transaminasa Glutámico-Aspártico de tejidos de mamífero*)*

DR. FÉLIX CÓRDOBA**
DR. AARÓN PÉREZ** y
DR. SERGIO ESTRADA O.**

Las enzimas, como otras proteínas, son antígenos capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos que, por lo general, inhiben tanto *in vivo* como *in vitro* esta actividad. Esta inhibición parece claramente compatible con una neutralización serológica y permite estudiar el modelo enzima-antienzima con todas las ventajas que ofrece el enfoque metodológico clásico de la inmunquímica, y a su vez, permite utilizar el modelo mencionado como instrumento de análisis en medicina y biología experimentales. En la medicina la aplicación de más interés inmediato sería quizás el detectar el origen tisular de la elevación de la actividad de isoenzimas séricas específicas del órgano afectado por algún padecimiento, o bien, la topografía celular y tisular de procesos neoplásicos por medio de anticuerpos contra las isoenzimas de ese tejido. En la biología experimental, la metodología inmunquímica del modelo enzima-antienzima ofrece valor potencial para estudiar los aspectos dinámicos de la síntesis inducida de proteínas, el destino de las enzimas perdidas en el curso de la evolución biológica (ureasa, uricasa, alantoicasa), la secuencia cinótica de reacciones enzimáticas específicas y, finalmente, de la posibilidad de interferir *in vivo* los patrones enzimáticos establecidos en los tejidos de los animales de experimentación.

En el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina, entre otros aspectos de la investigación, existe interés en el estudio de las características inmunquímicas de las enzimas de transaminación con el propósito de establecer posibles diferencias estructurales entre isoenzimas de diferentes tejidos y aun entre las

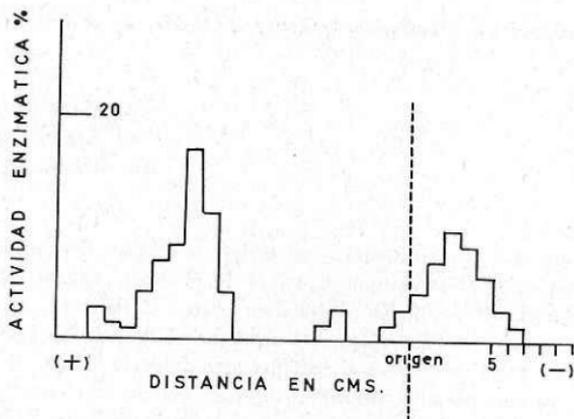
* Trabajo de Sección (Química Biológica) presentado por sus autores en la sesión ordinaria del 31 de octubre de 1962.

** Del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (UNAM).

transaminasas presentes en la misma célula. En este trabajo haremos mención, de una manera general, de las observaciones experimentales realizadas con transaminasas glutámico-aspartico de varios tejidos de mamíferos. Los detalles de estos trabajos están en las publicaciones de las referencias.^{1, 2, 3, 4}

El aislamiento y purificación preliminar de las transaminasas de los diversos tejidos se hace siguiendo el método general de Jenkins,⁵ descrito originalmente para la de corazón de cerdo. Este método ha sido aplicado tanto para enzimas

Fig 1



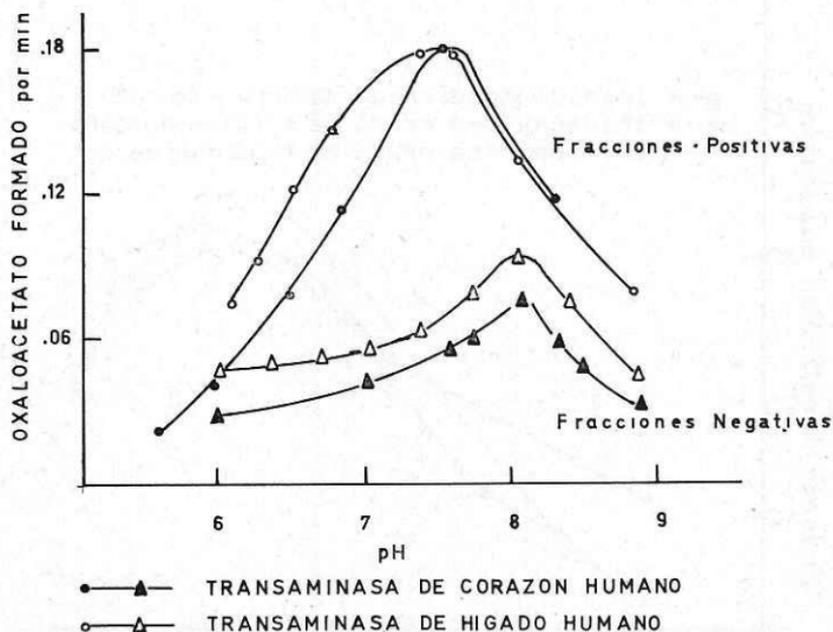
SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA EN
GEL DE ALMIDÓN DE LA TRANSAMI-
NASA DE HIGADO DE CERDO

de este tejido, con buenos resultados, como para los homogeneizados de otros órganos tanto de cerdo como de rata y de hombre. En estos últimos casos los rendimientos no han sido muy satisfactorios.

Al finalizar la purificación preliminar se toman los preparados activos y se analizan, ya sea por electroforesis en gel de almidón o por cromatografía de columna en adsorbentes del tipo del Sephadex DEAE. Tanto en un caso como en el otro la actividad enzimática se separa en varias zonas; en el caso de la electroforesis en almidón, como aparece en la Figura 1, se demuestran dos zonas de actividad, una positiva, ligeramente menos rápida que las albúminas y otra con movilidades semejantes a las gamma globulinas, en la región catódica del gel. La medición de actividad, directamente en la superficie del gel, se lleva a cabo de acuerdo con una modificación del método de medición enzimático de Karmen descrito por Boyde⁶ que permite discernir claramente las isoenzimas. Estos resul-

tados confirman los nuestros anteriores de este laboratorio obtenidos al analizar los eluidos de fragmentos de gel de almidón y los de otros autores usando técnicas de electroforesis en papel.⁷ El hallazgo importante es que tanto en hígado como en corazón aparecen las dos actividades y estas bandas están presentes en tejidos de rata, cerdo y hombre de manera bastante uniforme. Asimismo se ha demostrado en este laboratorio que en tejidos neoplásicos, a saber, carcinoma cérvico-uterino y

Fig 2



sarcoma de músculo humanos también existen dos isoenzimas demostrables por este criterio, lo que denota una aparente homogeneidad en la conducta electroforética de estas isoenzimas en diferentes especies animales y en tejidos sanos y neoplásicos.

Una vez establecida la presencia común de las dos isoenzimas de transaminación se hicieron experimentos para obtener estas enzimas aisladas para comparaciones más estrictas. Se estableció, en el caso de las enzimas de corazón humano, que la isoenzima positiva tiene un comportamiento a los cambios del pH del medio, característica y similar a la isoenzima positiva presente en extractos de

hígado humano; el pH óptimo se encontró alrededor de 7.5. Por el contrario, las dos preparaciones recuperadas de la zona negativa del gel tienen óptimos de actividad alrededor de pH 8.2, diferentes de las actividades recuperadas en la zona positiva. Las diferencias observadas no permiten distinguir al tejido de origen ya que ambos tienen dos componentes activos principales, electroforéticamente opuestos y con diferente sensibilidad al pH, pero por estos criterios no es posible diferenciar la isoenzima positiva de corazón de la similar de hígado, ni las dos negativas entre sí (Figura 2).

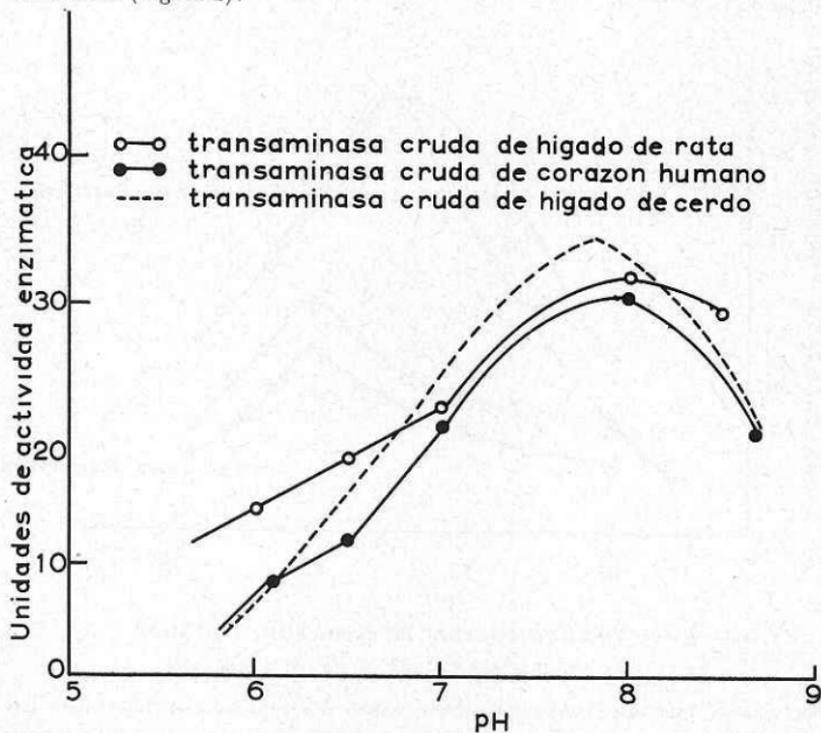


Fig. 3

Por otra parte, la dificultad de distinguir por este método el origen tisular de las enzimas se pone de manifiesto en la figura 3, donde se aprecia cómo los extractos transaminantes crudos presentan un mismo patrón general al cambiar el pH de 6 a 9. Las curvas de enzimas de corazón humano, hígado de cerdo e hígado de rata son muy similares. Existen diferencias entre los tejidos examinados que

todavía pueden ser debidas al error experimental. Únicamente, como se menciona antes, cuando se obtiene la separación de las isoenzimas, el comportamiento al pH varía en cada una de ellas, pero no es característica que pudiera servir para aclarar el origen de la enzima, sino más bien distinguir las isoenzimas catódicas de las anódicas.

Como parte importante de este trabajo de caracterización de isoenzimas de transaminación se prepararon sueros de conejo anti-enzima de una manera similar a los preparados en trabajos anteriores usando gallinas.² El propósito es el de estudiar tanto el efecto del antisuero en la actividad enzimática de cada uno de los diversos tejidos, en extractos homólogos y heterólogos, para decidir si las inhibiciones permiten deducir relaciones estructurales entre las enzimas; por otro lado, este nuevo sistema enzima-anti-enzima permite enfocar problemas más básicos; i.e. sitio de acción del anticuerpo, requerimientos moleculares para la inhibición, efecto de los cofactores en este proceso, efecto de los sustratos, etc.

TABLA 1
ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE PREPARACIONES DE TRANSAMINASAS
GLUTAMICO-ASPARTICO EN PROCESOS DE PURIFICACION

(0.001 D.O. min/mg. Proteína)*					
<i>Actividad ensayada:</i>	<i>Cor. cerdo</i>	<i>Cor. humano</i>	<i>Hig. cerdo</i>	<i>Hig. hum.</i>	<i>Hig. rata</i>
Transaminasa glutámico oxalacético	2,666	1,228	2,500	145	349
Transaminasa glutámico pirúvico	133	158	20	725	19
Deshidrogenasa málica	288	52,631	625	72	1,190
Deshidrogenasa láctica	233	263	291	0	3,174
	(1)	(2)	(1)	(3)	(2)

(1) Preparación semipurificada.

(2) Preparación cruda.

(3) Preparación cruda y almacenada en el congelador.

* Las unidades de actividad de la TGO corresponden a absorción del oxalacetato formado a 290 mu. En las otras enzimas corresponde a absorción del DPNH a 340 mu. Los detalles técnicos de la medición de estas últimas actividades se publicarán aparte.

Algunos resultados típicos de este primer enfoque están ilustrados en las Tablas 1 y 2. Para analizar de manera conveniente estos datos y su significado, conviene decir que los conejos fueron inmunizados con extractos tisulares crudos y semipurificados conteniendo entre muchas actividades enzimáticas y proteínas inactivas, las enzimas mencionadas en la Tabla 1: transaminasa glutámico-oxalacética, transaminasa glutámico-pirúvico, deshidrogenasa málica y deshidrogenasa láctica. Se observa claramente que las preparaciones purificadas presentan efectivamente una riqueza relativa de las enzimas de transaminación glutámico-oxalacético y que las preparaciones crudas presentan por el contrario una actividad importante de enzimas que pueden considerarse de contaminación para el interés principal de este trabajo. Tal es el caso de las preparaciones crudas de corazón

humano que tienen una elevada actividad de deshidrogenasa málica o las de hígado de rata que tienen actividades de deshidrogenasa málica y láctica de cuantía.

Conviene mencionar que las inmunizaciones realizadas se practicaron con preparaciones que contenían actividades enzimáticas independientes de la de principal interés, así como proteínas simples, lo que hace factible que los animales en la fase inicial de la respuesta hayan producido anticuerpos contra transaminasas y contra las "impurezas". Sin embargo, las inmunizaciones, unas veces con adyuvante y otras con material soluble, fueron repetidas a lo largo de varios meses, las últimas con mezclas antigénicas semipurificadas, similares en calidad a la preparación de cerdo (corazón) de esta tabla, suponiendo entonces que la respuesta

TABLA 2
PORCIENTO DE INHIBICIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS CON GAMMA GLOBULINAS DE SUERO DE CONEJO ANTITRANSAMINASA DE CORAZÓN HUMANO

Mg. proteína inhibidora	Actividades enzimáticas analizadas													
	C.H.	H.H.	C.C.	H.C.	H.R.	H.H.	C.H.	H.H.	C.C.	H.C.	H.R.	C.H.	H.R.	
0.0078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.078	1	0	0	0	3	0	5	4	0	0	11	0	0	0
0.78	8	12	0	2	7	0	0	6	0	0	0	0	0	0
7.8	60	56	46	30	39	0	0	18	0	0	5	0	0	0
23.4	100	100	98	89	90	0	0	23	0	0	0	0	0	0
Unidades en- sayadas	200	400	260	570	200	90	4000	100	100	100	270	80	1820	
Enzimas	TGO	TGO	TGO	TGO	TGO	TGP	DM	DM	DM	DM	DM			DL
CH:	Preparación de corazón humano						TGO: Transaminasa glutámico oxalacético							
HH:	Preparación de hígado humano						TGP: Transaminasa glutámico pirúvico							
CC:	Preparación de corazón de cerdo						DM: Deshidrogenasa málica							
HC:	Preparación de hígado de cerdo						DL: Deshidrogenasa láctico							
HR:	Preparación de hígado de rata													

inmunitaria de los animales, al ser finalmente sangrados, diese sueros que de modo preferente estarían enriquecidos con anticuerpos antitransaminasa y que la respuesta inhibidora o precipitante contra otras enzimas no sería notable. Esta serie de eventos, que condujo a la selección deseada de los anticuerpos explica, creemos nosotros, los resultados de las inhibiciones enzimáticas de la Tabla 2. En estos datos se observa cómo las globulinas de sueros antiTCH inhiben de modo importante las actividades enzimáticas de transaminación aspártico-glutámico de los tejidos ensayados y no lo hacen o son relativamente inertes, hacia otras enzimas que estaban presentes en los extractos usados para inyectar y que *a priori* deberían ser tan antigénicas como las transaminasas administradas. Con excepción de una pequeña inhibición de la deshidrogenasa málica, en el extracto de hígado humano tanto esa enzima como la transaminasa glutámico-pirúvico y la deshidrogenasa

láctica no fueron inhibidas. Este fenómeno es aún más notable si consideramos que las actividades ensayadas que están al pie de la tabla, a veces son menores comparativamente que la de transaminación del mismo tejido, como ejemplo podemos describir lo que sucede con el extracto enzimático de corazón humano (Tabla 2), reacción homóloga, y lo que sucede en el extracto de hígado de rata, reacción heteróloga. En el primer caso, 23.4 mg de gamma globulina de suero antitransaminasa de corazón humano, son capaces de inhibir 200 unidades de esta enzima del extracto antigénico, o sea, la totalidad de la enzima, pero resultan inertes frente a 4000 U. de deshidrogenasa málica y 80 U. de deshidrogenasa láctica. De una manera similar esta misma preparación de anticuerpos, a la misma concentración, es capaz de inhibir cruzadamente 90 por ciento de la actividad transaminante de hígado de rata sin inhibir en absoluto a la deshidrogenasa málica ni a la láctica, una con actividad de 280 U. y la otra con 1830 U. en el extracto crudo.

Si tomamos estas evidencias como ejemplo general, puede concluirse que los sueros obtenidos son, hasta cierto punto, bastante específicos e inhiben preferencialmente y quizás debido a las razones anteriormente expuestas, a la transaminasa en estudio.

Con las aclaraciones anteriores parece admisible concluir que las transaminasas, al menos antes de resolverse por electroforesis y/o cromatografía en isoenzimas, son inhibidas de manera bastante similar por anticuerpos producidos contra una de ellas, la de corazón humano; que la clase de órgano, hígado o corazón que da origen a las enzimas no es diferenciado de manera definitiva por los anticuerpos, y que los órganos de cerdo, rata y humano, presentan transaminasas tentativamente calificadas como formadas por apoenzimas con alguna similaridad estructural.

Recientemente hemos podido efectuar una serie de experiencias que parecen afirmar aún más esta interpretación; se separó por cromatografía en sephadex DEAE A-50 una fracción transaminante de corazón de cerdo de elevada pureza. Esta isoenzima diluida de modo apropiado fue ensayada contra cuatro preparaciones purificadas de globulinas gama antitransaminasa, anticorazón de cerdo, antihígado de cerdo, anticorazón humano y antihígado humano. Los cuatro preparados de anticuerpos inhibieron esta isoenzima aunque en grados variables: la de corazón de cerdo inhibe 50 por ciento de la actividad con 0.20 mg de globulina, la de anticorazón humano inhibe ese mismo porcentaje con 0.7 mg; la de antihígado de cerdo lo hace con 1.25 mg y finalmente la preparación antígeno humano inhibe 50 por ciento de la actividad de la isoenzima TCC hasta que la concentración sube a 3 mg de proteína en el tubo de reacción. Las diferencias en la inhibición pueden suponerse debidas a menores concentraciones de anticuerpos contra estructuras como la isoenzima TCC en las diferentes soluciones de gamma globulinas inmunes.

Se han hecho numerosas pruebas de carácter inmunoquímico para detectar las enzimas e isoenzimas por técnicas de difusión en gel de agar; difusión simple de Ouchterlony e inmunolectroforesis de Grabar y Williams. En la gran mayoría de los casos, los patrones de precipitación obtenidos son muy complejos y el análisis de las mezclas es muy incierto; sin embargo, poco a poco se han ido depurando los preparados y en la actualidad los análisis dan 1 ó, cuando más, dos líneas de precipitación correspondientes a la enzima y no se detectan ya impurezas. Como ejemplo de la situación de nuestros preparados transaminantes en este tipo de ensayos tenemos la Fig. 4. En la primera parte tenemos, en el centro, suero de conejo antiTCC y en la periferia, alternativamente, enzima separada de la región negativa de los geles de almidón y transaminasa eluida de la zona positiva; claramente se observa una única banda de precipitación, que da reacción de

PLACAS DE DIFUSION EN AGAR CON T. C. C. PURIFICADA POR ELECTROFORESIS

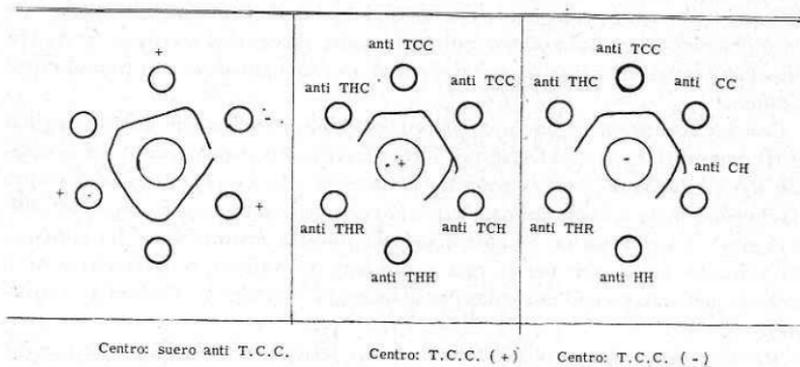


FIGURA 4

identidad, entre la isoenzima TCC positiva y la TCC negativa. Los dos esquemas siguientes de la misma figura confirman y amplían los resultados expuestos; en el centro de una placa se adicionó TCC (+) y en la otra TCC (-) y en la periferia los mismos sueros anteriores y antiTHH (antitransaminasa de hígado humano), antiTCH (antitransaminasa de corazón humano), antiTHC (antitransaminasa de hígado de cerdo) y antiTHR (antitransaminasa de hígado de rata). Es conveniente aclarar que todos estos sueros tienen poder inhibitorio contra las enzimas que les dieron origen y la falta de reacción exhibida por la preparación antiTHR y antiTHH no es debida a la pobreza de anticuerpos (contra la enzima homóloga). Se observa un patrón de precipitación parecido con ambas fracciones. En adición se aprecia la reacción de identidad de los extractos de cerdo, corazón e hígado, confirmando que con estos métodos ambas enzimas aparecen

idénticas a la luz de anticuerpos específicos. En otras palabras, que existe una reacción de identidad inmunológica entre las isoenzimas positivas y negativas y a su vez entre las de origen hepático y origen cardíaco. Por el contrario, el suero antiTCH producido en conejos por la inyección de preparados de corazón humano solamente da una reacción de identidad parcial. Si hay una diferencia estructural inmunológicamente detectable entre los corazones de cerdo y los de hombre al ser analizados por estos medios. Esta reacción de identidad parcial confirma de manera todavía tentativa lo que expusimos en párrafos anteriores: que las transaminasas no son fácilmente diferenciables en cuanto a su origen por sueros específicos de conejo. Los resultados obtenidos en las placas ilustradas en esa misma figura con el suero antiTHR y antiTHH siendo negativos no pueden utilizarse para refutar lo dicho; esa ausencia de reacción podría deberse a pobreza de anticuerpos en los sueros en cuestión contra las isoenzimas de transaminación de corazón de cerdo.

Por lo expuesto podemos concluir nuestros resultados con las transaminasas de mamíferos resumiendo de la manera siguiente:

1. Las transaminasas de corazón e hígado de hombre, cerdo y rata presentan, en electroforesis al menos, dos isoenzimas, una positiva y una negativa. Algunos tumores malignos humanos presentan un cuadro similar, al igual que los órganos de embriones de rata desde un gramo de peso hasta su completo desarrollo.

2. La cromatografía en sephadex DEAE de las transaminasas desdobra nuevamente 2 isoenzimas principales en las preparaciones de corazón de cerdo; una de éstas a su vez parece corresponder a dos componentes, lo que haría un total de 3 isoenzimas, en este tejido, por este método.

3. Los sueros de conejo preparados para reaccionar contra las transaminasas inhiben efectivamente la actividad. Resultados publicados con anterioridad² indican que el antisuero contra una transaminasa dada inhibe fuertemente a su vez transaminasas de otros órganos y de órganos similares de otros mamíferos. Los resultados en este trabajo indican que una transaminasa purificada —isoenzima de corazón de cerdo— es inhibida efectivamente tanto en sueros antiTCC como con sueros antiTHC, antiTCH y antiTHH.

4. Usando pruebas de difusión en placas de agar se evidencian claramente, al menos en las preparaciones de corazón de cerdo, que las isoenzimas positivas están estructuradas de manera similar a la negativa ya que se observa únicamente una misma banda de precipitación común para la proteína eluida de la zona negativa y de la zona positiva. Por otra parte, los resultados de estas mismas isoenzimas con diferentes antisueros, sugieren que también existe un parentesco con las humanas.

5. Los resultados de cambio de pH, finalmente, indican primero, que posiblemente todas las transaminasas de estos órganos, antes de ser resueltas en iso-

enzimas presentan una curva de sensibilidad al cambio de pH muy similar, con un máximo de actividad alrededor de pH 8. Por el contrario, cuando se obtiene la resolución de las dos isoenzimas principales, cada una de ellas tiene ya una curva de sensibilidad característica que permite diferenciar la isoenzima negativa de la positiva; este patrón es nuevamente común para las isoenzimas de cada tejido y no parece útil para esclarecer el origen tisular de las enzimas.

COMENTARIO

Las transaminasas glutámico-aspartico de órganos de mamíferos: hombre, cerdo y rata —principalmente las de corazón e hígado— están presentes en estos tejidos al igual que otras enzimas en forma de isoenzimas —diferentes proteínas con actividad catalítica similar—. En el caso de las de hígado de rata, una de ellas es de localización mitocondrial y la otra está distribuida en la "fracción soluble de la célula".⁷ Posiblemente esta distribución sea similar para las isoenzimas de transaminación de los tejidos de otros animales.

Quizás en el momento presente, la explicación más racional y completa de la presencia de isoenzimas es la referente a las de deshidrogenasa láctica; los trabajos de Markert⁸ y Kaplan⁹ indican que existen dos enzimas de deshidrogenasa láctica, una positiva y una negativa pero en forma de tetrámeros y en los diferentes tejidos aparecen tanto el tetrámero positivo como el negativo y los híbridos intermedios, correspondientes, en número de tres. Esto explica claramente la presencia de las 5 formas de isoenzima que aparecen en electroforesis en gel de almidón y en cromatografía. Este hecho está analizado desde el punto de vista inmunológico y permite decir que la isoenzima DL-1 es diferente a la DL-5 ya que los sueros contra una de ellas no inhiben ni cruzan con la otra, y los híbridos DL-2, DL-3 y DL-4 reaccionan y se inhiben de acuerdo con la hipótesis de tetrámeros recombinados.

En el caso de las transaminasas aquí estudiadas no podemos decidir si una explicación similar es la apropiada: el análisis directo con sustrato sobre los bloques de electroforesis en almidón indica en la mayoría de los casos únicamente 2 bandas de actividad, si bien estas bandas son anchas permitiendo la posibilidad de una tercera isoenzima. Esta posibilidad tiene que tomarse seriamente en cuenta ya que en cromatografía aparecen 3 actividades netamente separadas de la columna y aun en el mismo bloque de almidón algunas veces se aprecian claramente 3 isoenzimas (ver trabajos anteriores).

Aparentemente la estabilidad, facilidad de desnaturalización, no es igual en todas ellas y eso podría servir como explicación para la falta estricta de reproducibilidad en los resultados. Indudablemente las transaminasas muy purificadas son muy inestables en solución y rápidamente se precipitan. Aun tomando las mayores precauciones recomendadas con amortiguadores de glicina, glutatión, EDTA,

etcétera, la actividad decrece rápidamente. Aparentemente sólo en soluciones saturadas con sulfato de amonio en frío, se puede preservar la actividad de la transaminasa purificada. Este hecho, en muchas circunstancias, representa un obstáculo insoluble para realizar otros estudios.

No creemos que con la evidencia experimental que se tiene sea posible, por ahora, proponer una explicación racional de la multiplicidad de las transaminasas. Es sugerente suponer que la biosíntesis de estas importantes isoenzimas en tejidos de mamíferos está regulada de manera similar a como parece estarlo la deshidrogenasa láctica; 2 genes regulando la síntesis de 2 unidades monoméricas que se estructuran en tetrámeros diferentes en número de cinco. En el caso de las transaminasas tenemos 2 ó cuando más 3 isoenzimas, lo que excluye la posibilidad de tetrámeros. La evidencia de similitud estructural entre la positiva y la negativa es fuerte y sugiere una unidad parcial; sin embargo, el comportamiento electroforético es tan diferente que no cabe duda en una diferencia en aminoácidos, ya sea ácidos o básicos en proporción diferente entre ambas isoenzimas principales. Posiblemente pudiera tratarse no de tetrámeros, sino de dímeros; dos monómeros de peso molecular aproximado de 55,000 que daría una molécula completa con un peso molecular de 110,000. Una estructuración de esta forma permitiría la existencia teórica de 3 isoenzimas, la AA, la AB y la BB y suponiendo que alguna de las variedades puras, la AA o la BB fuesen muy inestables, quedarían presentes en la mayoría de los análisis las formas AA y AB o AB y BB con características estructurales e inmunoquímicas muy parecidas.

Las experiencias y observaciones futuras decidirán si la evidencia objetiva lograda puede tener esta explicación o si por el contrario, las isoenzimas de transaminación son debidas a otro mecanismo distinto del postulado para las de deshidrogenación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pérez, A.: *El empleo de anticuerpos para el estudio de las transaminasas*. Tesis Recrepcional. Facultad de Medicina, U.N.A.M., 1962.
2. Córdoba, F., González, C. y Pérez, A. *Nature*: 194: 1156, 1962.
3. Córdoba, F., González, C., Estrada O., S. y Pérez, A.: *Resúmenes del V Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. p. 37. San Luis Potosí, México, 1962.
4. Córdoba, F., Amezcua, M. E., Orozco, S. y Pérez, A.: *Resúmenes del V Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. p. 51. Villahermosa, Tabasco, México, 1963.
5. Jenkins, W. T., Yphantis, D. A. y Sizer, I. W.: *J. Biol. Chem.* 234:51, 1959.
6. Boyde, T. R. C. y Latner A.: *Proceed. Biochem. Soc.* 82:51, 1962.
7. Boyd, J. W.: *Biochem. J.* 81:434, 1961.
8. Markert, C. L.: *Science*: 140, 1329, 1963.
9. Cahn, R., Kaplan, N. O. y Levine, L. *Zwilling*, E.: 136, 962, 1962.