

## Complejos binarios de la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo con NAD o NADH

C. Lluís, A. Cortés, S. Gubert y J. Bozal

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Barcelona

(Recibido el 13 de septiembre de 1972)

C. LLUIS, A. CORTES, S. GUBERT and J. BOZAL. *Binary Complexes of Lactic Dehydrogenase with NAD or NADH*. R. esp. Fisiol., 28, 309-320. 1972.

When working with a purified hepatic lactic dehydrogenase (LDH) of chicken it has been noticed the formation of binary complexes with NAD and NADH coenzymes.

The cofactors are slowly eliminated through dialysis of LDH-NADH (NAD) mixtures, which is an indication of the existence of unions with the enzyme. On the other hand, the mixtures LDH-NADH show an electrophoretic movility greater than the one of the free enzyme, whilst the movility of the mixtures of LDH and NAD is only slightly superior to the last one. The simultaneous formation of the corresponding enzyme-cofactor complexes is shown by the electrophoresis of the enzymes and both cofactors, whose movilities coincide with those before indicated.

The NADH behaves as a competitive inhibitor of the L-lactate-LDH-NAD system regarding the NAD. The  $K_i$  values are independent of the duration of the LDH-NADH contact. NAD (up to  $5 \times 10^{-4}$ ) displaces NADH from the combination with LDH, since when putting during 60 min into contact the cofactor with the complex postulate, LDH-NADH, it is noted a fall in the size of the inhibitions. But, when the NAD concentrations are greater than the indicated ones, the inhibition phenomena are produced by the excess of NAD.

This last one inhibits in a competitive way the piruvate-LDH-NADH system in respect of the NADH ( $K_i = 0.78 \times 10^{-4}$  M) and the value of the constant becomes greater when it is increased the previous LDH-NAD contact break.

The urea (2 M) and the guanidine (0.6 M) reversibly inhibit the hepatic LDH of chicken and the NADH protects the enzyme only in those actions which are induced by the urea.

El sistema reversible piruvato + NADH + H<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  L-lactato + NAD<sup>+</sup>, catalizado por la lacticodeshidrogenasa (LHD) procedente de homogeneizados de hígado de pollo, se rige, de acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (3), por un mecanismo secuencial ordenado bi-bi (5), en concordancia con lo postulado para la

LDH de diversos orígenes (1, 9). En ambos casos el cofactor es el primer sustrato que se adiciona al enzima.

En el presente trabajo se aporta evidencia experimental de la existencia de dos complejos binarios formados por la LDH purificada con los cofactores NAD y NAD reducido, cuya formación ya se deduce

del mecanismo cinético establecido cuando se trabaja con la LDH presente en los homogeneizados de la glándula (5).

El mecanismo indicado implica la competencia del NAD y el NADH por idéntico «locus» de la molécula enzimática, de ello pudiera constituir una confirmación la adsorción de LDH por columnas de NAD y su elución por NADH (2).

Nosotros hemos determinado la cinética de la inhibición que el cofactor NADH (NAD) ejerce sobre el postulado complejo binario LDH-NAD (NADH) cuya formación ponemos de manifiesto en el presente trabajo.

El NAD reducido ejerce un efecto protector en la inhibición provocada por la urea sobre la LDH de diversos orígenes (8); el fenómeno puede atribuirse a la formación del complejo LDH-NADH, anteriormente indicada, por ello hemos investigado el efecto protector que dicho cofactor ejerce en la inhibición inducida por la urea y la guanidina.

### Material y métodos

El preparado enzimático empleado es un purificado de lacticodeshidrogenasa de hígado de pollo, obtenido de homogeneizados frescos de la glándula según las técnicas de tratamiento térmico, fraccionamiento con sulfato amónico y cromatografía con DEAE celulosa ya descritas por nosotros (6) y cuya actividad específica, medida frente a piruvato y NAD reducido, fue de 143,2 U/mgP.

Como sustratos se emplearon piruvato (Boehringer), ácido láctico (U.C.B.), NADH (Boehringer), NAD (Boehringer). Los agentes desnaturizantes utilizados son urea (U.C.B.) y clorhidrato de guanidina (Schuchardt).

Las disoluciones de los distintos reactivos se efectuaron en tampón de fosfatos 0,05 M de pH 7,4, que se utilizaron recién preparadas.

La determinación de las velocidades ini-

ciales de reacción se efectuó en un espectrofotómetro (Beckman D.B.G.) midiendo los incrementos de D.O. a 340 nm del NAD reducido, expresándose en  $\Delta DO/\text{minuto}$ . Los ensayos de incubación se efectuaron a  $30 \pm 0$ , 1° C en medio de tampón fosfatos de pH 7,4 (0,05 M). Las experiencias de diálisis se realizaron frente al tampón mencionado, a 5° C, prolongándose durante 72 horas como máximo.

Los ensayos electroforéticos se efectuaron sobre tiras de poliactato de celulosa gelatinizadas (Poliphor) y como reveladores se utilizaron el colorante Ponceau S para proteína y el revelador específico de lacticodeshidrogenasa (7) que utiliza como aceptor al MTT.

El sistema enzimático que nos ocupa es birreactante, por ello hemos aplicado los métodos cinéticos de CLELAND (4) para la caracterización de las inhibiciones de acuerdo con las definiciones propuestas por dicho autor.

### Resultados

#### *Formación de complejos LDH-cofactor*

La posible formación de combinaciones binarias entre la lacticodeshidrogenasa purificada y sus cofactores NAD y NAD reducido, ha sido puesta de manifiesto mediante el empleo de técnicas de diálisis y electroforéticas.

#### *Experiencias de diálisis*

Con objeto de comprobar el efecto que el contacto previo entre la LDH y el NAD reducido pueda provocar en la actividad de la deshidrogenasa se confeccionaron sendas muestras que contenían 20 ml de disolución de LDH (1/100.100); a una de ellas se le adicionó NAD reducido para que su concentración fuese de  $3 \times 10^{-4}$  M, y disolución del tampón fosfatos de pH 7,4 para completar un volumen de 60 ml, mientras que a la muestra

control se le adicionó únicamente tampón de fosfatos.

Después de transcurrida una hora de contacto previo LDH-NADH se tomaron partes alícuotas de las dos disoluciones a las que se les adicionó, en la cubeta del espectrofotómetro, los volúmenes necesarios de disolución de piruvato y de NAD reducido de modo que la concentración final de los sustratos fuese de  $3 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M, respectivamente, en ambas muestras. El valor de la velocidad de reacción de las dos muestras es de  $4 \times 10^{-2}$   $\Delta$ DO/min, que indica que el contacto previo entre la deshidrogenasa y el cofactor no induce alteración alguna en la actividad enzimática.

Se sometieron a diálisis frente al tampón de fosfatos habitual tres porciones de 15 ml de cada una de las muestras iniciales, estableciéndose el espectro de la muestra control, y de la que contiene NADH, antes y después de sometidas a los diferentes intervalos de diálisis que fueron de 24, 48 y 63 horas. El coeficiente de extinción molar del NAD reducido, calculado por nosotros,  $\epsilon = 5,2 \times 10^{-3}$  (DO/M) permite el cálculo del NADH remanente después de la diálisis, cuyas cantidades aparecen en la tabla I.

Los valores obtenidos muestran la lenta eliminación del cofactor y, por otra parte, las velocidades de reacción obtenidas después de distintos tiempos de diálisis están en concordancia con la concentración de NADH existente y sugieren la formación de una combinación enzima-NADH que es enzimáticamente activa, a

diferencia de la unión LDH-NAD (COR-TÉS, *loc. cit.*) que da lugar a un complejo que es estable después de 24 horas de diálisis y que se muestra como un destacado inhibidor del sistema que utiliza al lactato y al NAD como sustratos, a diferencia de lo que ocurre sin el contacto previo LDH-NAD.

#### Ensayos electroforéticos

La existencia de los complejos binarios LDH-NADH y LDH-NAD se puede poner de manifiesto al estudiar las movilidades electroforéticas de las combinaciones enzima-cofactor por comparación con la exhibida por el enzima libre.

Se sometieron a electroforesis diversas muestras de la siguiente composición:

I (control): disolución de LDH (1/2.000). Las muestras II y III contenían, además, NADH ( $\frac{1}{2} \times 10^{-5}$  M), NAD ( $5 \times 10^{-5}$  M), respectivamente, y la IV, la disolución de LDH más NADH y NAD a las mismas concentraciones expresadas para las II y III.

Las concentraciones de NAD y NADH son suficientes para la formación del correspondiente complejo enzima-cofactor y por otra parte la concentración de NAD empleada no provoca inhibición de la LDH y permite poner de manifiesto correctamente el complejo con el revelador específico de LDH.

Las distintas muestras se mantuvieron en preincubación durante una hora y a continuación se aplicaron 5  $\mu$ l de cada una de ellas sobre tiras de poliacetato de celulosa (Poliphor), en tampón veronal pH 8,6 (0,056 M). La electroforesis se efectuó durante 60 minutos con una diferencia de potencial de 200 voltios.

En la figura 1 aparecen los ferogramas obtenidos.

Se observa que la muestra III (E+NAD) presenta una movilidad ligeramente superior a la I (control); por otra parte, en la tira que contenía la muestra IV (E+NAD

Tabla I. Determinación del contenido de NADH residual mediante diálisis

Tiempo de diálisis (horas)	NADH residual	
	D.O.	%
0	0,429	100
24	0,130	30,3
48	0,030	8,9
63	0,015	—

+NADH) se detectan dos bandas perfectamente separadas que por sus movilidades corresponden a los dos complejos enzima-coenzima.

La muestra II (E + NADH) presenta también dos bandas y creemos que la de menor movilidad pertenece al enzima libre, en exceso.

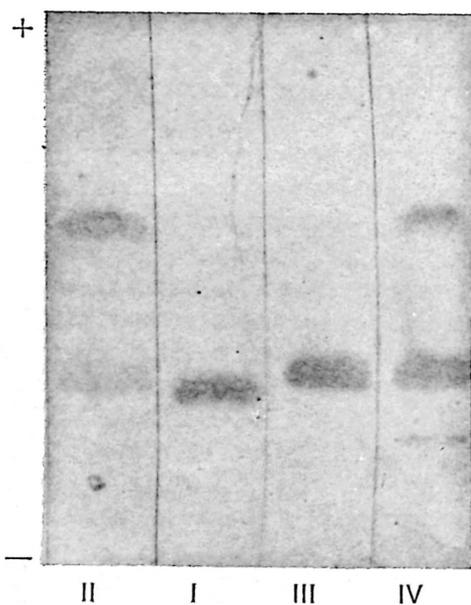


Fig. 1. Ferogramas de mezclas enzima co-factor.

De izquierda a derecha. LDH-NADH ( $1 \times 10^{-5}$  M); LDH; LDH-NAD ( $5 \times 10^{-5}$  M); LDH-NAD ( $5 \times 10^{-5}$  M)-NADH ( $1 \times 10^{-5}$  M).

#### INHIBICIÓN POR NAD DEL SISTEMA L-LACTATO-LDH-NAD

Se ha estudiado el efecto inhibitor ejercido por el NADH sobre el sistema L-lactato-LDH-NAD, utilizando concentraciones variables de NAD y una constante de L-lactato.

El estudio cinético se efectuó sobre muestras que se sometieron a los tratamientos siguientes:

a) Sin establecer contacto previo entre LDH y NADH; b) Con contacto previo LDH-NADH de 60 minutos, y c) Contacto previo LDH-NADH de 60 minutos y

preincubación posterior de 60 minutos de la muestra con NAD.

a) *Sin contacto previo LDH-NADH.* Las concentraciones de NAD empleadas estaban comprendidas entre  $3 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-2}$  M y se mantuvo constante la concentración de L-lactato ( $1,66 \times 10^{-2}$  M); las concentraciones de NADH fueron  $1 \times 10^{-5}$  M y  $3,6 \times 10^{-5}$  M, respectivamente.

En la representación de Lineweaver-Burk (fig. 2a) se observa una pérdida de la linealidad cuando las concentraciones de NAD son elevadas, lo cual parece sugerir que, en estas condiciones, el NAD ejerce una inhibición de la LDH atribuible al exceso de sustrato.

El NADH es un inhibidor competitivo ( $K_i = 3,4 \times 10^{-6}$  M) de la LDH, cuando se trabaja con concentraciones de NAD inferiores que, como se observa, presentan linealidad.

La acción inhibitor ejercida por exceso de NAD, ya observada en la figura 2a, se ha estudiado determinando las velocidades iniciales de reacción en el margen de concentraciones de NAD comprendido entre  $3 \times 10^{-4}$  M y  $2 \times 10^{-2}$  M, manteniendo constante la concentración de L-lactato ( $1,66 \times 10^{-2}$  M).

La inhibición por exceso de NAD aparece cuando sus concentraciones son superiores a  $1 \times 10^{-3}$  M (fig. 3).

b) *Con contacto previo LDH-NADH de 60 minutos.* La demostración experimental de la existencia del complejo LDH-NADH nos ha inducido a estudiar la posible influencia del contacto previo enzima-cofactor en la inhibición provocada por el mismo sobre el sistema L-lactato-LDH-NAD. Las experiencias se han efectuado operando con concentraciones de NAD comprendidas entre  $3 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-3}$  M, para las que no se manifiesta el fenómeno de inhibición de la LDH por este sustrato.

La reacción se inició por vertido de

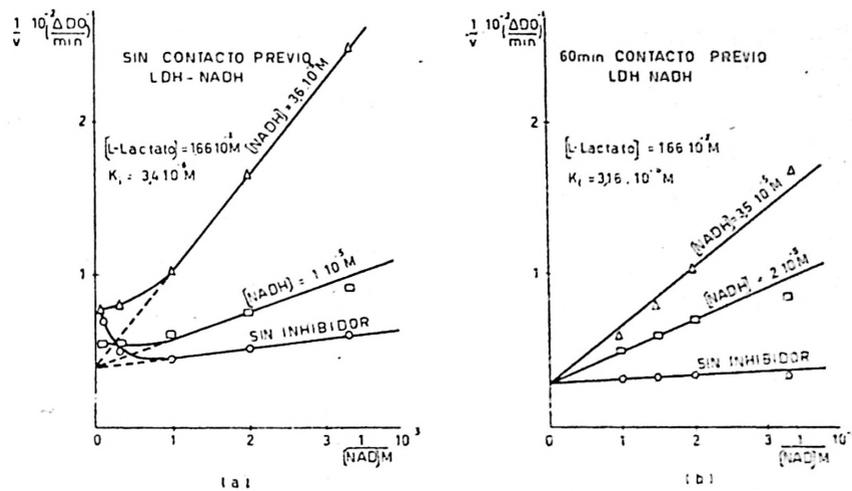


Fig. 2. Inhibición por NADH del sistema L-lactato-LDH-NAD.

2 ml de disoluciones del enzima y del inhibidor, cuya concentración era de  $3 \times 10^{-5}$  M y  $5,25 \times 10^{-5}$  M, respectivamente, y sus actividades se compararon con la actividad de una muestra control que contenía 2 ml de disolución tamponada del enzima. Todas las muestras se preincubaron durante 60 minutos.

Los resultados obtenidos (fig. 2b) indican que el NADH después de un contacto previo con el enzima ejerce asimismo una inhibición competitiva.

La constante de inhibición hallada ( $K_i = 3,16 \times 10^{-6}$  M) muestra que el contacto previo E-NADH no ejerce acción significativa sobre dicho sistema.

c) Acción inducida por el NAD sobre el complejo LDH-NADH. El que el NAD y el NADH compitan por el mismo locus enzimático de la LDH y la elevada estabilidad del complejo LDH-NAD (5), induce a investigar las condiciones en que el NAD puede provocar un desplazamiento del NADH unido previamente a la LDH (véase más arriba).

Para ello se ha estudiado la influencia que un contacto previo de 60 minutos con el NAD, cuyas concentraciones en la cubeta espectrofotométrica oscilan desde  $3 \times 10^{-4}$  M a  $1 \times 10^{-3}$  M, ejerce sobre el complejo LDH-NADH obtenido con las concentraciones de NADH (en cubeta espectrofotométrica) de  $2 \times 10^{-5}$  M y  $3,5 \times 10^{-5}$  M. Se compararon las velocidades iniciales de reacción obtenidas en estas condiciones, con las de una muestra de LDH control que se había mantenido carente de NAD y que se adicionó posteriormente para determinar la actividad.

Se observa una disminución en la inhibición provocada por el NADH al aumentar la concentración de NAD de  $3 \times 10^{-4}$  M a  $5 \times 10^{-4}$  M, de acuerdo con su competencia por el mismo centro activo (fig. 4); sin embargo, concentraciones de NAD superiores a  $5 \times 10^{-4}$  M provocan

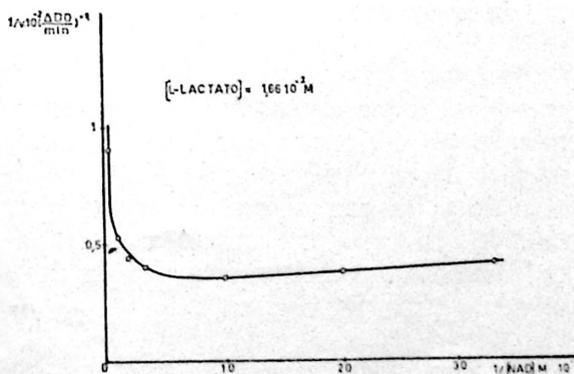


Fig. 3. Inhibición por sustrato NAD en el sistema L-lactato-LDH-NAD.

un aumento en la inhibición, que creemos atribuible al hecho de que una vez desplazado el NADH, el complejo E-NAD dé lugar a una disminución de la velocidad inicial.

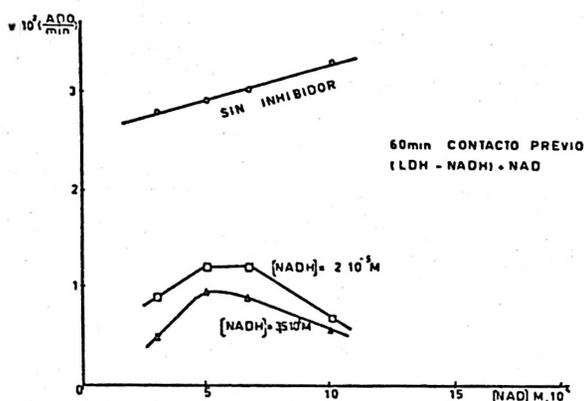


Fig. 4. Inhibición por NADH del sistema L-lactato-LDH-NAD.

#### INHIBICIÓN POR NAD DEL SISTEMA PIRUVATO-LDH-NADH

El efecto inhibitorio inducido por el NAD sobre la LDH, cuando se utilizan concentraciones variables de NADH y constantes de piruvato, ha sido puesto de manifiesto mediante las experiencias que se describen a continuación:

a) Sin contacto previo LDH-NAD;  
b) Tras un contacto previo LDH-NAD de 60 minutos, y c) Contacto previo LDH-NAD de 60 minutos y posterior preincubación de 60 minutos con NADH.

a) *Sin contacto previo LDH-NAD.* Se determinó la actividad de muestras que contenían concentraciones variables de NADH, comprendidas entre  $2 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M, siendo constante la de piruvato ( $3 \times 10^{-4}$  M) en presencia de NAD, cuyas concentraciones fueron de  $4 \times 10^{-4}$  M y  $6 \times 10^{-4}$  M.

La representación de Lineweaver-Burk (fig. 5a) obtenida, muestra que la inhibición ejercida por el NAD cuando no se establece contacto previo con la LDH es

de tipo competitivo, caracterizado por  $K_i = 0,78 \times 10^{-4}$  M.

b) *Con contacto previo LDH-NAD de 60 minutos.* Se preincubaron durante 60 minutos a  $30^\circ$  C muestras de LDH y NAD, a las que se adicionaron posteriormente los volúmenes adecuados de disolución de piruvato y de NADH, necesarios para determinar su actividad, de modo que sus concentraciones fuesen las indicadas precedentemente mientras que las de NAD fueron de  $4$  y  $7 \times 10^{-5}$  M, respectivamente. La representación de Lineweaver-Burk (fig. 5b) muestra que también en estas condiciones el NAD inhibe competitivamente a la LDH ( $K_i = 0,9 \times 10^{-5}$  M) y que el contacto previo provoca un aumento en la magnitud de la constante de inhibición.

c) *Acción inducida por el NADH sobre el complejo LDH-NAD.* Se ha determinado la actividad de muestras de características análogas a las descritas anteriormente, pero a las que se adicionó, al cabo del período de 60 minutos de contacto LDH-NAD, una cantidad de NADH y se prolongó el contacto entre el enzima y ambos cofactores durante 60 minutos más. Los resultados obtenidos muestran, mediante la representación de Lineweaver-Burk (fig. 5c) que la inhibición en estas condiciones sigue siendo de naturaleza competitiva y únicamente varía la magnitud de la constante ( $K_i = 1,17 \times 10^{-5}$  M).

*Acciones inducidas por la urea y la guanidina sobre la LDH.* Hemos determinado las acciones ejercidas por ambos agentes sobre purificados de LDH hepática de pollo con objeto de obtener un modelo comparativo respecto a los resultados obtenidos con homogeneizados de la glándula (CORTÉS, *loc. cit.*).

a) *Acción de la urea.* Las experiencias se han efectuado con concentraciones de urea crecientes (1 M-4 M), para distin-

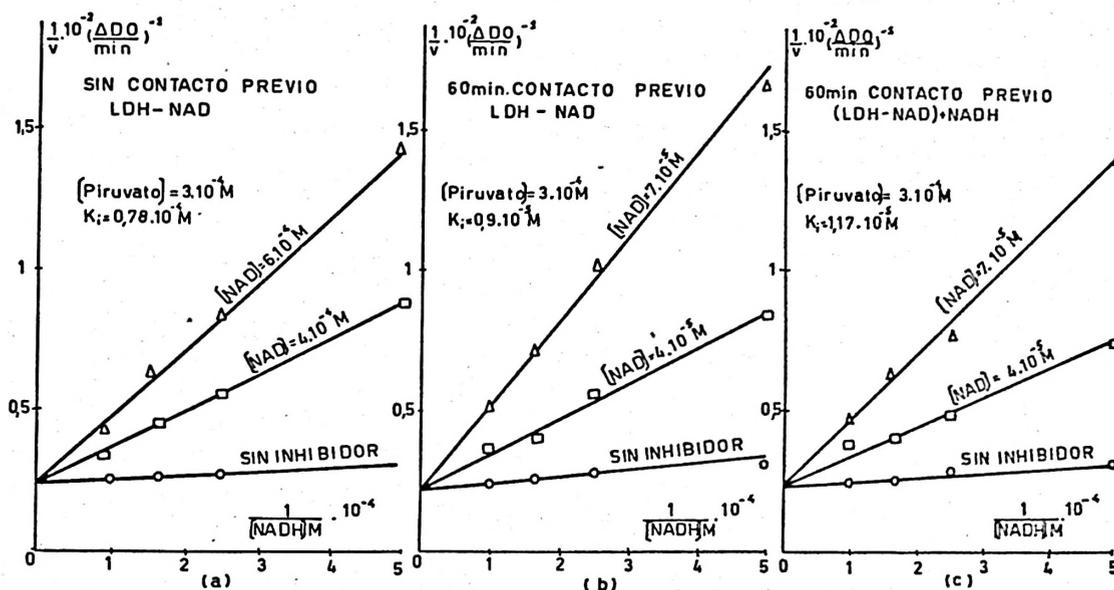


Fig. 5. Inhibición por NAD del sistema piruvato-LDH-NADH.

tos tiempos de contacto previo entre el enzima y la urea; asimismo se ha determinado la posible reversibilidad de dicha acción mediante una diálisis de 24 horas de las distintas muestras, las cuales se habían mantenido previamente en contacto durante 2 horas como máximo (tabla II).

De los resultados reseñados en la tabla se deduce que la acción que ejerce la urea se manifiesta ya cuando su concentración es 2 M, el efecto se incrementa notablemente al aumentar la concentración del

agente y el tiempo de contacto previo entre el enzima y la urea, estabilizándose a los 60 minutos.

Por otra parte se observa que la débil inhibición provocada por concentraciones de urea inferiores a 2 M se anula totalmente por diálisis; el efecto causado por la urea 2 M es parcialmente reversible, mientras que concentraciones superiores a 2 M desnaturalizan al enzima de modo irreversible.

b) *Acción de la guanidina.* En experiencias análogas a las descritas con la urea se ha determinado el efecto provocado por el clorhidrato de guanidina. Las concentraciones de guanidina ensayadas estuvieron comprendidas entre 0,3 y 2,5 M, y se midieron los efectos producidos a distintos intervalos de contacto previo entre el enzima y la guanidina. La posible reversibilidad de las acciones inducidas se comprobó sometiendo a una diálisis de 24 horas muestras de LDH-guanidina que se habían mantenido 3 horas en contacto previo, como máximo (tabla III).

Los valores consignados en la tabla permiten afirmar que la guanidina ejerce

Tabla II. Variación de la actividad LHD con la concentración de urea y el intervalo de incubación previo. Reversibilidad de la acción.

[UREA] M	ACTIVIDAD RESIDUAL ANTES DE DIALISIS					DIALISIS 24 h
	Tiempo de preincubación LDH+urea (20° C)					
	0 h	½ h	1 h	2 h	24 h	
—	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
1,5	100	97	95	93	91	100
2	89	80	78	70	67	77
3	79	46	42	39	40	40
4	46	30	24	22,5	22,5	22

Tabla III. Variación de la actividad LDH con la concentración de guanidina y el tiempo de contacto previo. Reversibilidad de dicha acción.

[GUANIDINA] M	ACTIVIDAD RESIDUAL ANTES DE DIALISIS					DIALISIS 24 h
	Tiempo de preincubación LDH+guanidina (20° C)					
	0 h	½ h	1 h	3 h	24 h	
—	100	100	100	100	100	100
0,3	94,5	92	94,5	92	92,5	100
0,6	78,5	80	81	78,5	81	100
1,2	58	51	47	44,5	43,5	67,5
1,5	46,5	27	26	26,5	15,0	40
2	13	15	11,5	4,5	0	11,5
2,5	0	0	0	0	0	0

una acción inhibitoria superior a la de la urea y muestra su carácter totalmente reversible hasta concentraciones de guanidina de 0,6 M; cuando las concentraciones están comprendidas entre 1,2 y 2 M la acción es parcialmente reversible, mientras que si las concentraciones de guanidina son superiores a 2 M, se provoca una desnaturización irreversible.

#### EFEECTO PROTECTOR DEL NADH SOBRE EL SISTEMA DE LA LDH EN PRESENCIA DE UREA.

Hemos investigado el posible efecto protector inducido por el NADH en la

inhibición provocada por la urea sobre la LDH.

Con dicho objeto se preincubaron muestras del enzima y el NADH durante una hora, a las que seguidamente se les adicionó el inhibidor, determinándose la actividad enzimática inmediatamente después de añadida la urea y al cabo de 90 minutos.

Las muestras en estudio contenían 10 ml de disolución de LDH (1 g/10<sup>5</sup> ml), 20 ml de disolución tampón, como máximo, y los volúmenes adecuados de disolución de NADH (1,5 × 10<sup>-3</sup> M) y de urea (9 M) para completar el total de 30 ml.

Las distintas muestras se mantuvieron en un termostato a 30° C ± 0,1° C durante una hora antes de la adición del correspondiente volumen de disolución de urea (9 M). Una vez incorporada ésta a las respectivas muestras se determinó la actividad al cabo de 0 y 90 minutos por vertido de 2 ml de las disoluciones anteriores en la cubeta espectrofotométrica; en todos los casos la concentración final de piruvato y de NADH fue de 3 × 10<sup>-4</sup> M y 1 × 10<sup>-4</sup> M, respectivamente; las concentraciones de urea aparecen en la gráfica 6a.

A partir de los valores de las velocidades iniciales se han calculado las actividades residuales de las diversas muestras (figura 6A).

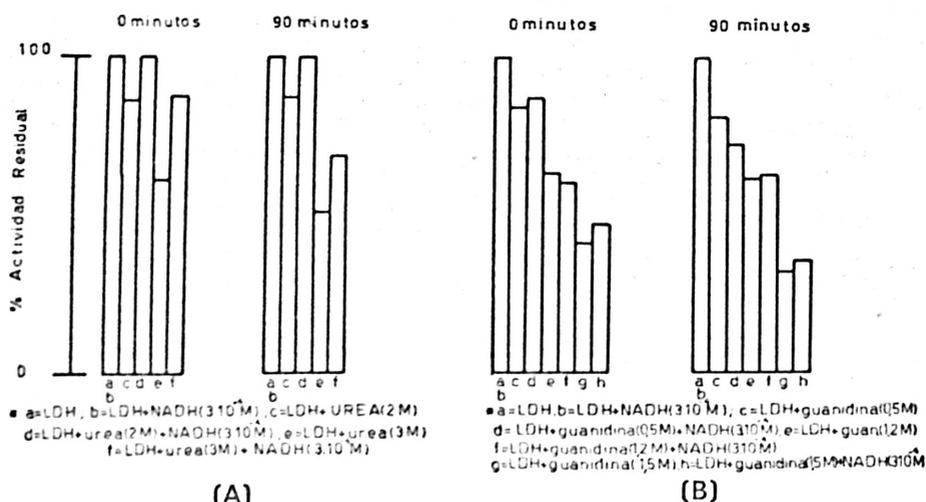


Fig. 6. Efecto del NADH en la inhibición de la LDH por urea y por guanidina.

De la figura se deduce que la presencia del NADH disminuye aproximadamente en un 27 % a los 0 minutos y en un 18 % a los 90 minutos, la inhibición ejercida por la urea 3 M sobre la LDH; por otra parte, la inhibición ejercida por la urea 2 M (13 %) se anula por completo en presencia del cofactor.

#### EFFECTO DEL NADH SOBRE EL SISTEMA DE LA LDH EN PRESENCIA DE GUANADINA

Hemos investigado también la posible acción que el NADH ejerce en la inhibición provocada por concentraciones de guanidina, 0,6, 1,2 y 1,5 M sobre la LDH en forma análoga a la descrita con la urea. La actividad residual de las distintas muestras aparece indicada en la figura 6B.

De la misma se deduce que el NADH prácticamente no ejerce efecto protector alguno en la inhibición que la guanidina provoca sobre el enzima.

#### Discusión

La lenta eliminación por diálisis del NADH (NAD) de disoluciones de LDH hepática de pollo que contienen el cofactor correspondiente constituye un indicio de la formación de complejos binarios entre el enzima y los correspondientes cofactores.

En efecto, hemos comprobado que las disoluciones de LDH a las que se les ha adicionado NADH  $1 \times 10^{-4}$  M, precisan tiempos de diálisis superiores a las 48 horas para la eliminación total del cofactor, lo que sugiere la existencia de una unión entre el enzima y el NAD reducido. Este hecho está de acuerdo con lo establecido por Cortés (5), en estudios realizados con la forma oxidada del coenzima.

La caracterización de los complejos se ha logrado mediante electroforesis de mezclas de LDH y NADH (NAD); los ferogramas obtenidos muestran para el

complejo E-NADH una banda de elevada movilidad respecto a la del enzima libre, mientras que cuando se trabaja con mezclas del enzima y de NAD se observa que el complejo E-NAD presenta una movilidad electroforética ligeramente superior a esta última.

El estudio de mezclas del enzima y de ambos cofactores pone de manifiesto la formación simultánea de los correspondientes complejos E-cofactor, cuyas movilidades coinciden con las anteriormente reseñadas.

La existencia de estos complejos y el hecho de que ambos cofactores concurren en el mismo centro activo de la molécula enzimática, de acuerdo con el mecanismo secuencial ordenado postulado para la LDH hepática de pollo (5), nos han inducido a determinar las características cinéticas de las inhibiciones ejercidas por los cofactores cuando están unidos previamente al enzima.

Hemos determinado la inhibición que el NADH ejerce sobre el sistema L-lactato-LDH-NAD con NAD como sustrato variable, en concentraciones de hasta  $1 \times 10^{-3}$  M, ya que concentraciones superiores provocan inhibición de la LDH por exceso del sustrato, tal como hemos podido demostrar.

El carácter de la inhibición se ha determinado sin establecer un contacto previo entre LDH y NADH y también después de mantener un contacto previo de 60 minutos entre ambos; finalmente, después de mantener un contacto previo entre el enzima, el NADH y el NAD.

En los dos primeros casos el NADH se muestra inhibidor competitivo del sistema L-lactato-LDH-NAD, los valores de las constantes de inhibición obtenidas,  $K_i = 3,4 \times 10^{-6}$  M,  $K_i = 3,16 \times 10^{-6}$  M, indican que la preincubación de 60 minutos no provoca aumentos en el porcentaje de inhibición inducido por el cofactor.

En el tercer caso, el posterior contacto previo con NAD disminuye la magnitud

de la inhibición ejercida por el NADH, hasta concentraciones de NAD de  $5 \times 10^{-4}$  M; mientras que concentraciones superiores de NAD producen un aumento en la inhibición que creemos es atribuible a la formación del complejo estable E-NAD.

Análogamente se ha determinado la acción inhibitoria ejercida por el NAD sobre el sistema piruvato-LDH-NADH.

En todos los casos la inhibición se muestra competitiva diferenciándose solamente en el valor de su constante.

Así, cuando no hay contacto previo E-NAD la constante de inhibición ( $K_i = 0,78 \times 10^{-4}$  M) es superior a la observada después de 60 minutos de contacto enzima-coenzima ( $K_i = 0,9 \times 10^{-5}$  M) y a la que se obtiene cuando además se adiciona NADH ( $K_i = 1,17 \times 10^{-5}$  M).

El hecho de que al aumentar el tiempo de contacto entre LDH y NAD se observe un incremento en la inhibición ejercida por el coenzima indica que el complejo E-NAD no se forma de modo instantáneo y que precisa de un tiempo de contacto para completar su formación.

La urea y la guanidina se muestran inhibidores de la LDH, y dicha acción se incrementa notablemente con la concentración de inhibidor y el tiempo de contacto previo entre el enzima y ambos agentes.

Las concentraciones de urea inferiores a 2 M inhiben reversiblemente al enzima, la urea 2 M ejerce una acción parcialmente reversible, mientras que con las concentraciones superiores el efecto desnaturante es de carácter irreversible. El NADH protege al enzima de la inhibición inducida por la urea, la cual depende también del tiempo de contacto LDH-urea; así, mientras que a los 0 minutos provoca un descenso del 27 % de la acción inhibitoria de la urea 3 M, a los 90 minutos su acción protectora es solamente del 18 %.

La guanidina presenta diferencias de

comportamiento en relación con la urea; en efecto, los porcentajes de inhibición son superiores a los mostrados por aquella. La inhibición ejercida es de carácter reversible si la concentración de guanidina es 0,6 M; es parcialmente reversible para concentraciones de guanidina de 2 M, y si son ya de 2,5 M el efecto es totalmente irreversible; a su vez el NADH no ejerce efecto alguno en la magnitud de dicha inhibición.

### Resumen

Trabajando con un purificado de lacticodeshidrogenasa hepática de pollo se observa la formación de complejos binarios con los coenzimas NAD y NADH.

Por diálisis de mezclas de LDH-NADH (NAD) se eliminan muy lentamente los cofactores, lo que constituye indicio de la existencia de uniones con el enzima; por otra parte, las mezclas LDH-NADH exhiben una movilidad electroforética que es mayor que la del enzima libre, mientras que la de las mezclas LDH-NAD es sólo ligeramente superior a esta última. Por electroforesis de mezclas del enzima y ambos cofactores se pone de manifiesto la formación simultánea de los correspondientes complejos enzima-cofactor, cuyas movilidades coinciden con las indicadas anteriormente.

El NADH se comporta como un inhibidor competitivo del sistema L-lactato-LDH-NAD respecto al NAD. Los valores de  $K_i$  son independientes del tiempo de contacto LDH-NADH. El NAD (hasta  $5 \times 10^{-4}$  M) desplaza al NADH de su combinación con la LDH ya que al poner en contacto durante 60 minutos el cofactor con el postulado complejo LDH-NADH se observan descensos de la magnitud de las inhibiciones; pero si las concentraciones de NAD son superiores a la indicada se producen fenómenos de inhibición inducidos por el exceso de NAD.

Este último inhibe competitivamente al sistema piruvato-LDH-NADH, respecto al NADH ( $K_i = 0,78 \times 10^{-4}$  M), y el valor de la constante crece al aumentar el intervalo de contacto previo LDH-NAD.

La urea (2 M) y la guanidina (0,6 M) inhiben reversiblemente a la LDH hepática de pollo y el NADH protege al enzima solamente frente a las acciones inducidas por la urea.

**Bibliografía**

1. ANDERSON, S. R., FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2991, 1964.
2. CARRAY, P. O. y BARRY, S.: *F.E.B.S. Letter*, **21**, 3 abril 1972.
3. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 1963.
4. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173, 1963.
5. CORTÉS, A.: Tesis doctoral. Marzo 1972.
6. GUBERT, S. y BOZAL, J.: *R. esp. Fisiol.*, **28**, 1972.
7. LATNER, A. L. y SKILLEN, A. W.: *Lancet* ii, 1286, 1961.
8. LINDY, S. y KONTINEN, A.: *Nature*, **209**, 5018, 79, 1966.
9. TAKENAKA, Y. y SCHWERT, G. W.: *J. Biol. Chem.*, **223**, 157, 1956.

