

Estudios cinéticos de la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo y renal de suido

A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Barcelona

(Recibido el 13 de septiembre de 1972)

A. CORTES and J. BOZAL. *Kinetic Studies with Lactic Dehydrogenase*. R. esp. Fisiol., 28, 297-308. 1972.

The hepatic lactic dehydrogenase (LDH) of chicken and the renal one in swine show a very distinctive difference in their isoenzymes composition. The hepatic enzyme is in the form of an only isoenzyme whilst the renal one contains the five isoenzymes, their intensity increasing with the anodic movility although both shown a predominance in H subunits.

The calculation of the initial reaction rates in the piruvate-LDH-NADH and L-lactate-LDH-NAD systems with the hepatic enzyme in the chicken and the renal one in the swine, is according the theoretical predictions of Cleland in agreement with a sequential mechanism in which the addition of all the substrates is prior to the freeing of the reaction products.

The real kinetic parameters of both systems have been calculated applying the Vestling-Florini and Dalziel methods.

When determining the initial reaction rates with piruvate concentrations superior to the 3×10^{-4} M for both of LDH and those of the L-lactate superior to the 1.66×10^{-3} M and 7.5×10^{-3} M with the hepatic LDH of chicken and the renal one of swine respectively, the enzyme of both origins shows an inhibition phenomena due to excess of both substrates (piruvate and lactate).

The inhibition analysis by the kinetic Dalziel method, shows that in all cases it is acompetitive, regarding the corresponding cofactors.

The fact that both LDH present a similar behaviour in respect of their kinetic parameters and inhibition due to their own substrates, suggest that their behaviour does not depend fundamentally from the organ or species, but from the type of predominant subunits.

En la mayor parte de las especies animales existen dos tipos principales de lacticodeshidrogenasa (LDH); el que se designa por M_4 , que se encuentra en gran cantidad en el músculo esquelético, y el H_4 que predomina habitualmente en el múscu-

lo cardíaco (1). Existen, además, otras tres formas del enzima, que son híbridas de las dos anteriores y se designan por M_3H , M_2H_2 y MH_3 .

Las distintas formas isozímicas de la lacticodeshidrogenasa se diferencian nota-

blemente en su movilidad electroforética, en la reactividad inmunológica (9, 14), en su estabilidad térmica (17, 10) y en el comportamiento cinético (16).

La asignación de un papel metabólico a los distintos isoenzimas es objeto del máximo interés.

Se ha aceptado hasta el presente que la distribución de los isoenzimas en los tejidos se hallaba condicionada por su sensibilidad frente a la inhibición que ejercen los sustratos piruvato y lactato sobre aquéllos (5). Los trabajos de VESELL *et al.* (23) sugieren que puedan ser otras las funciones metabólicas; así, en el caso del isoenzima M_4 , el que ejerza una función reguladora, pues FRITZ (7) observó que el procedente de músculo esquelético de conejo se comportaba como un enzima alostérico.

Otros autores (15) han sugerido que el isoenzima M_4 predomine en células que se dividen rápidamente o en tejidos capaces de una rápida proliferación celular.

Finalmente, se ha indicado que otro papel metabólico podía constituirlo el que los isoenzimas se asociasen en proporciones diferentes en varias partículas subcelulares, en particular el M_4 dentro del núcleo (18); o bien que ejerzan un papel metabólico conservador en el que un isoenzima debe ser requerido para mantener la función enzimática crítica en un tejido en donde otro isoenzima fuese rápidamente degradado (8).

En el presente trabajo se comparan el comportamiento cinético de las lacticodeshidrogenasas de hígado de pollo y de riñón de suido que, como demostraremos, presentan una notable diferencia en su composición en isoenzimas aunque en ambas predomine el mismo tipo de subunidad (H).

Para ello hemos efectuado la determinación de los parámetros cinéticos reales por aplicación de los métodos de VESTLING-FIORINI (6) y de DALZIEL (4), y establecido las condiciones en que tiene lugar la inhibición de las LDH de ambos oríge-

nes por exceso de los propios sustratos piruvato y lactato, con objeto de averiguar si la analogía en el tipo de subunidad predominante implica un comportamiento semejante del enzima.

Material y métodos

Como fuente enzimática de lacticodeshidrogenasa se han utilizado homogeneizados crudos de parénquima hepático de pollo y de riñón de suido, obtenidos por trituración de los órganos suspendidos en tampón de fosfatos $pH = 7,4$ (0,05 M) mediante un homogeneizador adecuado y operando a $+5^\circ C$ en cámara frigorífica.

La identificación electroforética de los isoenzimas de la lacticodeshidrogenasa se realizó empleando tiras de acetato de celulosa gelatinizadas («Celogel») y el revelado se efectuó con el revelador específico de lacticodeshidrogenasa (11).

Las velocidades iniciales de reacción se determinaron espectrofotométricamente en Beckman D.B.G. provisto de cubetas termostataadas e inscriptor. Se midieron las variaciones de densidad óptica a 340 nm al emplear NADH (NAD) como dador (aceptor) electrónico en tampón de fosfatos $pH = 7,4$ (0,05 M) a $30^\circ C$. La actividad enzimática de los homogeneizados hepático y renal se estableció con piruvato ($3 \times 10^{-4} M$) y NADH ($1 \times 10^{-4} M$) y fue de unas 900 y 250, respectivamente, unidades por gramo de tejido (1 unidad = $1 \Delta D.O./min$).

La determinación de los parámetros cinéticos reales para la lacticodeshidrogenasa de ambos orígenes se ha efectuado por aplicación de los métodos de VESTLING-FIORINI (6) y de DALZIEL (4), aplicables, ambos, a sistemas birreactantes. El método de DALZIEL nos ha permitido, también, caracterizar la inhibición que un exceso de los sustratos piruvato y lactato ejercen sobre la LDH, así como el establecimiento de la naturaleza de dicha inhibición respecto al coenzima correspondiente.

Resultados

Determinación electroforética de los isoenzimas de la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo y renal de suido.

Para determinar la composición en isoenzimas de la lacticodeshidrogenasa de ambos órganos se obtuvieron sendos homogeneizados en tampón de fosfatos de pH 7,4; 0,05 M, de la glándula hepática de pollo y de la renal de suido en la proporción de 1/25 y 1/5 gramos de tejido por ml de disolución, respectivamente, los cuales se centrifugaron a 5000 r.p.m. y -3°C durante 30 minutos. Mediante una micropipeta se aplicaron 10 μl del sobrenadante (equivalente a 400 γ y 2000 γ de tejido, respectivamente) sobre tiras de acetato de celulosa sumergidas previamente en el tampón veronal de pH = 8,6 (0,056 M). El ferograma se desarrolló en el tampón mencionado, por espacio de 3 horas, con una diferencia de potencial de 200 voltios/cm.

Al finalizar dicho intervalo se extraen las tiras y se procede a su revelado, me-

diante el empleo del reactivo específico compuesto por: 1 ml de lactato sódico 1 M; 1 mg NAD; 3 mg sal de tetrazolio (MTT); 0,3 mg de metasulfato de fenazina y 4,3 ml de agua destilada, siguiendo las técnicas propuestas por LATNER y SKILLEN (11).

Se observa en los electrogramas (fig. 1) que la lacticodeshidrogenasa procedente de la glándula renal de suido exhibe cinco bandas, con una intensidad creciente conforme aumenta la movilidad anódica. Interpretamos, por tanto, que en el órgano existen cinco isoenzimas y se observa el predominio de las subunidades H.

El ferograma correspondiente a la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo presenta una sola banda de baja movilidad, correspondiente, por tanto, a un único isoenzima.

Su escaso desplazamiento anódico sugiere exista en su composición un predominio de subunidades M. Por otra parte en la glándula hepática del hombre (22) y de la mayoría de mamíferos [rata (20), conejo (19), mono (21)] el isoenzima M_1 es el predominante. Sin embargo, se co-

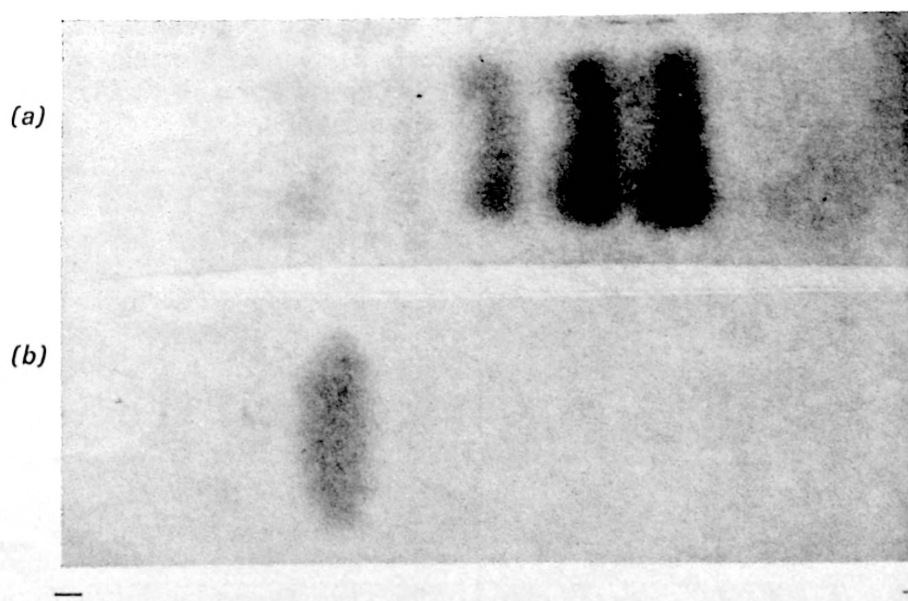


Fig. 1. Isoenzimas de la lacticodeshidrogenasa de riñón de suido (superior) y de hígado de pollo (inferior).

nocen diversas excepciones; tal es el caso del hígado de buey y otros rumiantes (1).

La determinación de las concentraciones óptimas de los sustratos, de los parámetros cinéticos reales y el grado en que se manifiesta el fenómeno de inhibición por sus sustratos nos han permitido emitir un juicio sobre la composición en subunidades M o H de dicho isoenzima.

Velocidades iniciales de reacción del sistema piruvato-LDH-NADH. Para establecer el tipo de mecanismo cinético general a que ajustan su ciclo catalítico las LDH objeto de nuestro estudio hemos procedido, en primer lugar, a determinar

las velocidades iniciales de reacción. A este fin hemos estudiado la influencia que distintas concentraciones de piruvato y de NADH ejercen sobre la actividad del enzima de ambos orígenes. Las experiencias se han efectuado con el sobrenadante obtenido por centrifugación a 5000 r.p.m., a -3°C , durante 30 min, de homogeneizados de ambas glándulas, siendo la concentración enzimática final en la cubeta espectrofotométrica de 1/45.000 para el enzima hepático y de 1/9.000 para el renal.

Los valores de las velocidades iniciales de reacción, obtenidas con varias concentraciones de piruvato y de NADH, conducen a rectas no paralelas en la representación de LINEWEAVER-BURK (12), tanto para el enzima hepático (fig. 2a y b) como para el renal (fig. 3a y b), en las que se observa cómo al variar la concentración de uno de los sustratos, se modifica la pendiente y la intersección de las rectas obtenidas respecto al otro sustrato.

La variación en los valores de $K_m(\text{piruvato})$ y $V_m(\text{piruvato})$ aparentes para las distintas concentraciones de NADH y de los de $K_m(\text{NADH})$ y $V_m(\text{NADH})$ aparentes con las concentraciones de piruvato para la lacticodeshidrogenasa de ambos orígenes, aparecen en las tablas I y II, respectivamente.

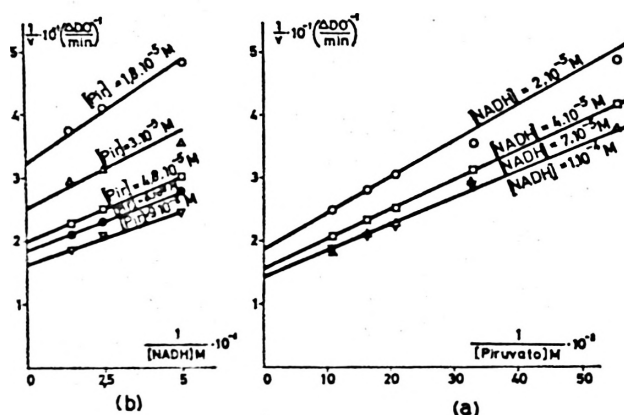


Fig. 2. Velocidades iniciales de reacción del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH.

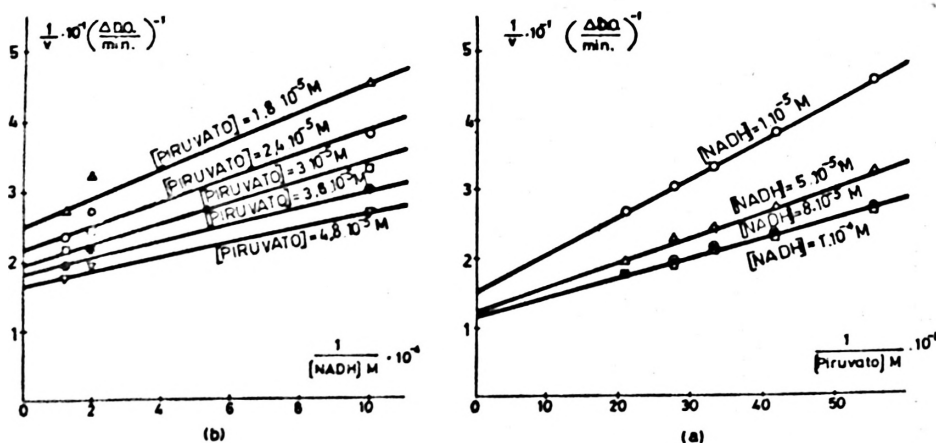


Fig. 3. Velocidades iniciales de reacción del sistema piruvato-LDH (renal de suido)-NADH.

Tabla I. Variación de K_m y de V_m (piruvato) con la concentración de NADH.

LDH hepática de pollo			LDH renal de suido		
[NADH]	K_m (piruvato) M	V_m (piruvato) (Δ DO/min)	[NADH] M	K_m (piruvato) M	V_m (piruvato) (Δ DO/min)
2×10^{-5}	$3,1 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-2}$	1×10^{-5}	$3,6 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-2}$
4×10^{-5}	3×10^{-5}	$6,45 \times 10^{-2}$	5×10^{-5}	$2,8 \times 10^{-5}$	8×10^{-2}
7×10^{-5}	$2,9 \times 10^{-5}$	7×10^{-2}	8×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-5}$	$8,69 \times 10^{-2}$
1×10^{-4}	$2,9 \times 10^{-5}$	7×10^{-2}	1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-5}$	$8,69 \times 10^{-2}$

Tabla II. Variación de K_m y de V_m (NADH) con la concentración de piruvato.

LDH hepática de pollo			LDH renal de suido		
[piruvato] M	K_m (NADH) M	V_m (NADH) (Δ DO/min)	[piruvato] M	K_m (NADH) M	V_m (NADH) (Δ DO/min)
$1,8 \times 10^{-5}$	$10,3 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-6}$	4×10^{-2}
3×10^{-5}	$10,2 \times 10^{-6}$	4×10^{-2}	$2,4 \times 10^{-5}$	$7,8 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-2}$
$4,8 \times 10^{-5}$	10×10^{-6}	5×10^{-2}	3×10^{-5}	$7,1 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-2}$
6×10^{-5}	$9,7 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-6}$	$5,5 \times 10^{-2}$
9×10^{-5}	$9,7 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-5}$	$5,9 \times 10^{-6}$	$6,1 \times 10^{-2}$

Tabla III. Variación de K_m y de V_m (lactato) con la concentración de NAD.

LDH hepática de pollo			LDH renal de suido		
[NAD] M	K_m (lactato) M	V_m (lactato) (Δ DO/min)	[NAD] M	K_m (lactato) M	V_m (lactato) M (Δ DO/min)
2×10^{-4}	$9,2 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-2}$	2×10^{-4}	3×10^{-3}	$2,3 \times 10^{-2}$
4×10^{-4}	$8,2 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-2}$	4×10^{-4}	$2,6 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-2}$
$3,3 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-2}$	2×10^{-3}	$1,8 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-2}$
5×10^{-3}	$7,2 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-2}$

Tabla IV. Variación de K_m y de V_m (NAD) con la concentración de lactato.

LDH hepática de pollo			LDH renal de suido		
[lactato] M	K_m (NAD) M	V_m (Δ DO/min)	[lactato] M	K_m (NAD) M	V_m (Δ DO/min)
5×10^{-3}	$1,79 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-2}$
$8,3 \times 10^{-3}$	$1,65 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-2}$	5×10^{-3}	$3,7 \times 10^{-4}$	4×10^{-2}
$1,3 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-2}$	$5,8 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-2}$
$1,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-2}$	$6,6 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-2}$
$2,6 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-4}$	4×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-2}$

Velocidades iniciales de reacción del sistema L-lactato-LDH-NAD. Con el mismo fin que el indicado en el párrafo precedente se ha determinado el efecto producido por distintas concentraciones de

L-lactato y de NAD en la actividad catalítica del enzima de ambos orígenes. La dilución enzimática fue de 1/2000 (enzima hepático) y de 1/500 (enzima renal). En la representación de LINEWEAVER-

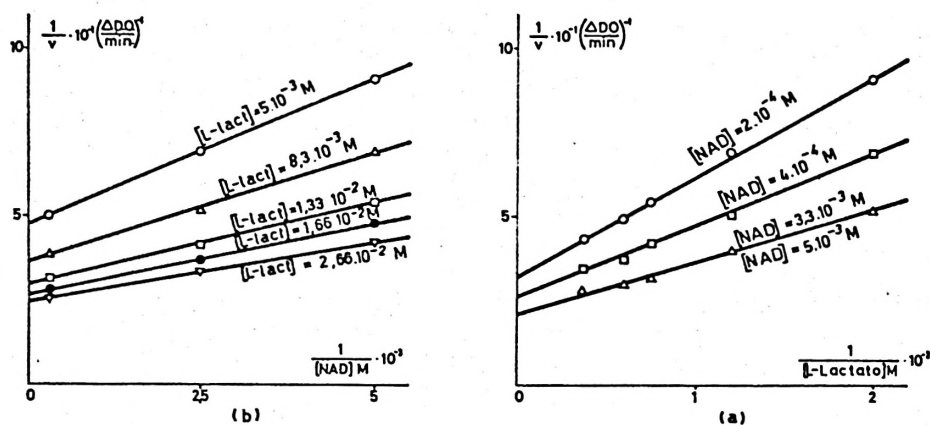


Fig. 4. Velocidades iniciales de reacción del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD.

BURK se obtienen rectas no paralelas, tanto para la lacticodeshidrogenasa hepática (figura 4a y b) como para la renal (figura 5a y b).

De acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (2, 3) el hecho de que, tanto en el proceso directo como en el inverso, la variación de la concentración de uno de los sustratos afecte a la pendiente y a la intersección de las rectas obtenidas respecto al otro sustrato, indica que la reacción enzimática transcurre según un mecanismo secuencial en el cual la adición de todos los sustratos es previa a la liberación de los productos de la reacción.

La variación que experimentan los valores de $K_m(\text{lactato})$ y $V_m(\text{lactato})$ aparentes para las distintas concentraciones de NAD y de las $K_m(\text{NAD})$ y $V_m(\text{NAD})$ aparentes con las concentraciones de L-lactato para el enzima de ambos orígenes, se resumen en las tablas III y IV, respectivamente.

Determinación de los parámetros cinéticos reales de los sistemas piruvato-lactico-deshidrogenasa-NADH y L-lactato-lactico-deshidrogenasa-NAD.

Con objeto de alcanzar una mayor precisión en la definición de los sistemas en-

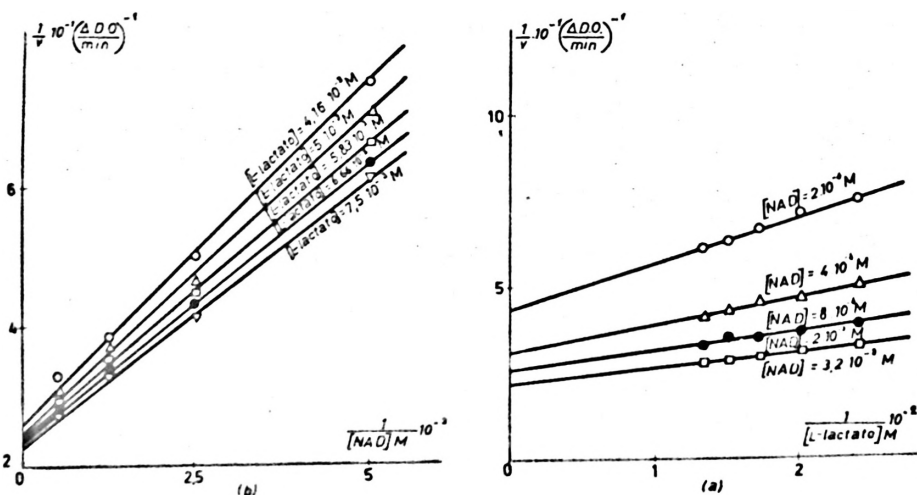


Fig. 5. Velocidades iniciales de reacción del sistema L-lactato-LDH (renal de suido)-NAD.

zimáticos que nos ocupan resulta de interés el determinar el valor de los parámetros cinéticos reales de la reacción catalizada por la lacticodehidrogenasa de ambos orígenes. Para ello se han aplicado los métodos de VESLING-FIORINI (6) y de DALZIEL (4).

La aplicación del método de Vestling-Florini permite el cálculo de los valores

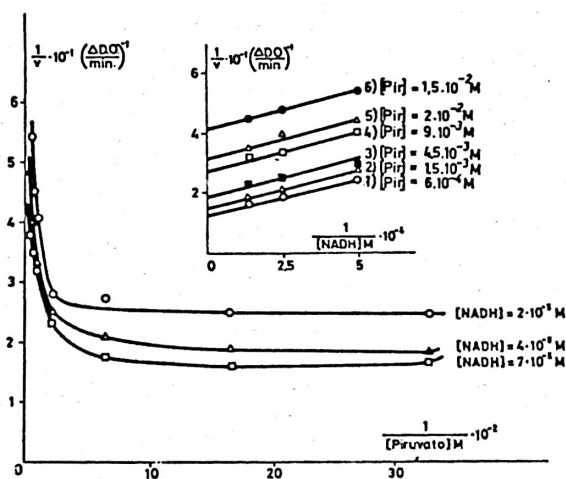


Fig. 6. Inhibición por sustrato en el sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH.

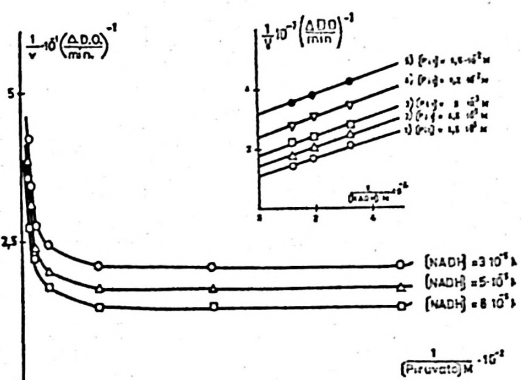


Fig. 7. Inhibición por sustrato en el sistema piruvato-LDH (renal de suido)-NADH.

de los parámetros cinéticos en forma sencilla. En dicha representación se disponen en ordenadas las inversas de las velocidades máximas aparentes para cada sustrato y en abscisas los valores de las inversas de las concentraciones de los mismos, los cuales se deducen de los datos numéricos indicados en las tablas I, II, III y IV.

El método permite el cálculo de la velocidad máxima de reacción, de las constantes de Michaelis de los sustratos y de

Tabla V. Parámetros cinéticos reales de la reacción catalizada por la lacticodehidrogenasa.

SISTEMA PIRUVATO — LDH — NADH				
	LDH hepática de pollo		LDH renal de suido	
	Vestling-Florini	Dalziel	Vestling-Florini	Dalziel
$V_m \left(\frac{\Delta DO}{\text{min}} \right)$	$7,69 \times 10^{-2}$	$7,69 \times 10^{-2}$	$9,1 \times 10^{-2}$	$9,1 \times 10^{-2}$
$K_m(\text{piruvato}) \text{ M}$	$2,70 \times 10^{-5}$	$2,69 \times 10^{-5}$	$2,22 \times 10^{-5}$	$2,27 \times 10^{-5}$
$K_m(\text{NADH}) \text{ M}$	$8,54 \times 10^{-6}$	$8,46 \times 10^{-6}$	$3,70 \times 10^{-6}$	$3,64 \times 10^{-6}$
$K(\text{piruvato-NADH}) \text{ M}^2$	$3,11 \times 10^{-10}$	$3,23 \times 10^{-10}$	$2,75 \times 10^{-10}$	$2,81 \times 10^{-10}$
SISTEMA L-LACTATO — LDH — NAD				
	LDH hepática de pollo		LDH renal de suido	
	Vestling-Florini	Dalziel	Vestling-Florini	Dalziel
$V_m \left(\frac{\Delta DO}{\text{min}} \right)$	$4,96 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	5×10^{-2}	5×10^{-2}
$K_m(\text{lactato}) \text{ M}$	$6,66 \times 10^{-3}$	7×10^{-3}	$1,54 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$
$K_m(\text{NAD}) \text{ M}$	$1,10 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,38 \times 10^{-4}$	$2,35 \times 10^{-4}$
$K(\text{lactato-NAD}) \text{ M}^2$	$1,48 \times 10^{-6}$	$1,48 \times 10^{-6}$	$0,95 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$

las constantes $K_{\text{piruvato-NADH}}$ y $K_{\text{lactato-NAD}}$ que equivalen al producto de la constante de disociación del sustrato que se adiciona en primer lugar al enzima por la constante de Michaelis del segundo sustrato, constante que es característica de los mecanismos secuenciales (en los mecanismos ping-pong el valor de esta constante es cero). El método de Dalziel permite, también, el cálculo de dichos parámetros reales, merced a las representaciones secundarias de las inversas de las pendientes e intersecciones de las distintas rectas, obtenidas en la representación primaria de LINEWEAVER-BURK (*loc. cit.*) frente a las inversas de las concentraciones de los sustratos correspondientes.

Los valores de los parámetros cinéticos reales obtenidos por nosotros para la lacticodeshidrogenasa de ambos orígenes se expresan en la tabla V.

Inhibición por exceso de los sustratos piruvato y lactato. Las lacticodeshidrogenasa hepática de pollo y renal de suido presentan el fenómeno de la inhibición reversible por exceso de sus sustratos piruvato y lactato. Hemos estudiado con el enzima de ambos orígenes la magnitud de la inhibición ejercida por los sustratos mencionados a diversas concentraciones de los cofactores correspondientes, por aplica-

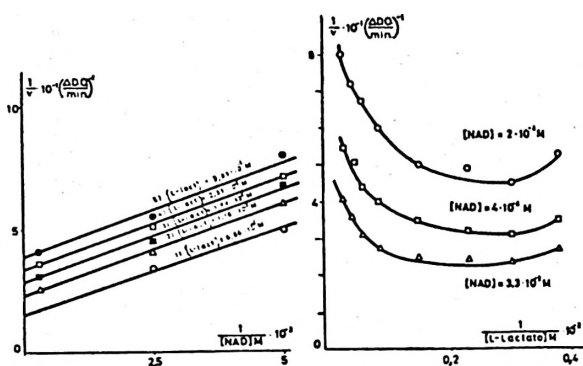


Fig. 8. Inhibición por sustrato en el sistema *L*-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD.

ción del método cinético desarrollado teóricamente por DALZIEL (*loc. cit.*) para sistemas birreactantes.

Al extender las mediciones de las velocidades iniciales de reacción del sistema piruvato-LDH-NADH se observa que la representación de Lineweaver-Burk deja de ser rectilíneas cuando las concentraciones de piruvato son superiores a 3×10^{-4} M y la desviación que experimenta la gráfica, debida a una disminución de la velocidad inicial de reacción, es prueba de que el enzima presenta entonces una inhibición por exceso del propio sustrato. Puede observarse la inhibición ejercida por exceso de piruvato sobre la LDH hepática de pollo y renal de suido que es creciente al aumentar la concentración de

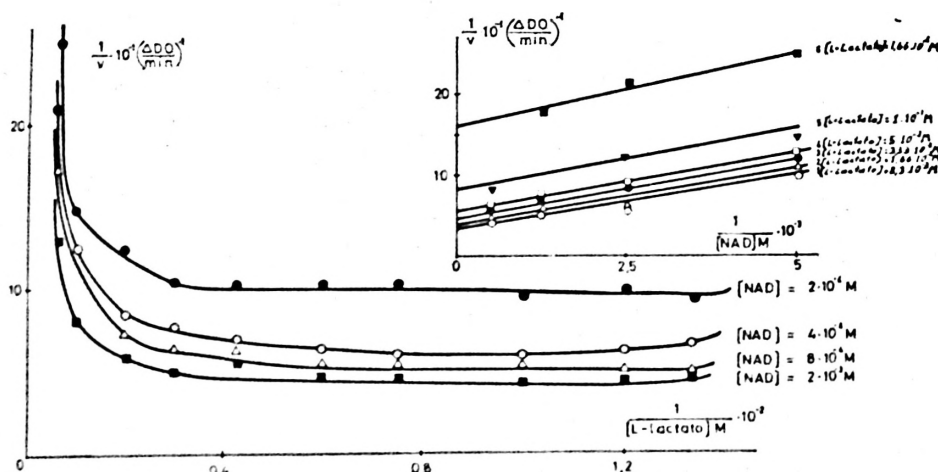


Fig. 9. Inhibición por sustrato en el sistema *L*-lactato-LDH (renal de suido)-NAD.

privato (figs. 6 y 7). A su vez en ambos casos, la inhibición por exceso de piruvato es de naturaleza acompetitiva respecto al NADH.

Resultados análogos se obtienen cuando se estudia el sistema L-lactato-lactico-deshidrogenasa-NAD. La inhibición por exceso de sustrato se manifiesta para concentraciones de L-lactato superiores a $1,66 \times 10^{-2}$ M (enzima (hepático) y $7,5 \times 10^{-3}$ M (enzima renal), respectivamente, siendo también la inhibición por exceso de lactato de naturaleza acompetitiva respecto al cofactor (figs. 8 y 9).

Discusión

Los ferogramas obtenidos con los homogeneizados de ambas glándulas ponen de manifiesto que la lacticodeshidrogenasa renal de suido se presenta en forma de cinco isoenzimas (con predominio de las subunidades H), mientras que la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo consta de un único isoenzima de baja movilidad. La comparación de este resultado con los valores $K_m(\text{piruvato}) = 2,71 \times 10^{-5}$ M y $K_m(\text{L-lactato}) = 6,83 \times 10^{-3}$ M, obtenidos por nosotros, con la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo y con el hecho de que la inhibición ejercida por los propios sustratos se manifiesta a bajas concentraciones de los mismos, permite concluir que el enzima hepático de pollo está constituido por un único isoenzima en el que predominan las subunidades H, en contraposición con lo que es habitual en el hígado de los mamíferos (19-22). La escasa movilidad exhibida por el isoenzima hepático de pollo está de acuerdo con la que exhibe el isoenzima H_4 presente en el corazón de pollo (13), lo cual parece indicar que los isoenzimas con predominio de subunidades H, presentan en el pollo un comportamiento anómalo, definido por su escasa movilidad, en relación con la que exhiben los mismos isoenzimas en otros animales (13).

La cinética de actuación del enzima de

ambos orígenes, se ajusta, según las predicciones teóricas de CLELAND (2, 3), a un mecanismo secuencial, en el cual la adición de todos los sustratos reaccionantes es previa a la liberación de los productos de la reacción. En una próxima publicación se dará cuenta del tipo concreto de mecanismo secuencial implicado.

Las lacticodeshidrogenasas de ambos orígenes presentan el fenómeno de inhibición por exceso de sus sustratos piruvato y lactato. Así, la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo, en presencia de una concentración de NADH de 1×10^{-4} M, experimenta dicho fenómeno para concentraciones de piruvato superiores a 3×10^{-4} M, en forma análoga a la que lo hace la lacticodeshidrogenasa renal de suido; a su vez, la inhibición por L-lactato se manifiesta a concentraciones superiores a $1,66 \times 10^{-2}$ M para el enzima hepático y a $0,75 \times 10^{-2}$ M para el enzima renal y en ambos casos la inhibición es de naturaleza acompetitiva respecto al cofactor correspondiente.

Estos resultados permiten sugerir que una producción exacerbada de los sustratos mencionados pudiera determinar la regulación de la actividad de la lacticodeshidrogenasa. Sin embargo, trabajos efectuados por VESFEL *et al.* (23), con los isoenzimas H_4 y M_4 de corazón de cerdo y riñón de rata, han puesto de manifiesto que existe una marcada diferencia en la inhibición ejercida por exceso de los sustratos del enzima *in vitro* o *in vivo*, la cual parece depender de la concentración intracelular de la lacticodeshidrogenasa.

Por todo ello parece aventurado el afirmar que la inhibición por exceso de los sustratos, que hemos detectado *in vitro*, tenga lugar en las condiciones fisiológicas y creemos que dicha inhibición no depende tanto de la concentración del sustrato sino de la relación de concentraciones entre los distintos constituyentes del sistema enzimático, es decir, el sustrato, y el cofactor y la lacticodeshidrogenasa.

El conjunto de los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* con el enzima de ambos orígenes muestran que, aunque su composición en isoenzimas es notablemente diferente (un isoenzima en el hígado de pollo y cinco en el riñón de suido), en ambos órganos las subunidades H son las predominantes, no observándose diferencias fundamentales en su comportamiento cinético, en el valor de sus parámetros reales ni en la inhibición ejercida por exceso de sus propios sustratos, lo que sugiere que el comportamiento de las lacticodeshidrogenasas pueda depender exclusivamente de que los isoenzimas presentes en los distintos órganos exhiban un predominio de las mismas subunidades.

Resumen

Las lacticodeshidrogenasas hepáticas de pollo y renal de suido exhiben una acusada diferencia en su composición en isoenzimas; el enzima hepático se presenta en forma de un único isoenzima, mientras que el renal contiene los cinco isoenzimas, en intensidad creciente al aumentar la movilidad anódica, aunque ambos muestran un predominio en subunidades H.

La determinación de las velocidades iniciales de reacción de los sistemas piruvato-LDH-NADH y L-lactato-LDH-NAD, con el enzima hepático de pollo y renal de suido está de acuerdo, según las predicciones teóricas de Cleland, con un mecanismo secuencial en el cual la adición de todos los sustratos es previa a la liberación de los productos de la reacción.

Por aplicación de los métodos de Vestling-Florini y de Dalziel a ambos sistemas se han calculado sus parámetros cinéticos reales.

Al determinar las velocidades iniciales de reacción con concentraciones de piruvato superiores a 3×10^{-4} M, para ambas lacticodeshidrogenasas, y de L-lactato superiores a $1,66 \times 10^{-2}$ M y $7,5 \times 10^{-3}$ M, con la de hígado de pollo y riñón de suido, respectivamente, el enzima de ambos orígenes experimenta el fenómeno de inhibición por exceso de sus sustratos piruvato y lactato. El análisis de la inhibición, por el método cinético de Dalziel, muestra en todos los casos que es de naturale-

za acompetitiva respecto a los cofactores correspondientes.

El hecho de que ambas lacticodeshidrogenasas presenten un comportamiento semejante en cuanto a sus parámetros cinéticos e inhibición por sus propios sustratos sugiere que su comportamiento no dependa fundamentalmente del órgano o especie de procedencia, sino del tipo de subunidades predominantes.

Bibliografía

1. CAHN, R. D., KAPLAN, N. O., LEVINE, L. y ZWILING, E.: *Science*, **136**, 962, 1962.
2. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 103, 1963.
3. CLELAND, W. W.: *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, Part. I, 77, 1967.
4. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706, 1957.
5. DAWSON, D. M., GOODFRIEND, T. L. y KAPLAN, N. O.: *Science*, **143**, 929, 1964.
6. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575, 1957.
7. FRITZ, P. J.: *Science*, **156**, 82, 1967.
8. FRITZ, P. J., VESELL, E. S., WHITE, E. L. y FRUITT, K. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **62**, 558, 1969.
9. KAPLAN, N. O. y WHITE, S.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **103**, 835, 1963.
10. KREUTZER, H. H. y FENNIS, W. H. S.: *Clin. Chim. Acta*, **9**, 64, 1964.
11. LATNER, A. L. y SKILLEN, A. W.: *Lancet* ii, 1.286 1961.
12. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Am. Chem.*, **56**, 658, 1934.
13. MARKET, C. L. y APPELLA, E.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 678, 1961.
14. NISSELBAUM, J. S. y BODANSKY, O.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **103**, 930, 1963.
15. PAPACONSTANTINOU, J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **156**, 338, 1967.
16. PESCE, A., MCKAY, R. H., STOLZENBACH, F., CAHN, R. D. y KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1753, 1964.
17. PLUMMER, D. T. y WILKINSON, J. H.: *Biochem. J.*, **87**, 423, 1963.
18. VESELL, E. S.: *Biochem. J.*, **150**, 1735, 1963.

19. WIELAND, T., PFLEIDERER, G., HAUPT, I. y WÖRNER, W.: *Biochem. Z.*, **331**, 103, 1959.
20. WIELAND, T. y PFLEIDERER, G.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 691, 1961.
21. WIEME, R. J. y VAN MAERCKE, J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 898, 1961.
22. WROBLEWSKI, F. y GREGORY, K.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 912, 1961.
23. WUNTCH, TH., CHEN, R. F. y VESELL, E. S.: *Science*, **167**, 63, 1970.

