

## Mecanismo reaccional de las LDH hepática de pollo y renal de suido

A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Barcelona

(Recibido el 9 de febrero de 1973)

A. CORTES and J. BOZAL. *Reaction Mechanism of Lactate Dehydrogenase*. Rev. esp. Fisiol., 29, 131-144. 1973.

The hepatic and renal lacticdehydrogenases of the chicken and the pig respectively, whilst showing a notable difference in their isoenzyme composition (one isoenzyme in the one belonging to the liver, and five in the renal one), present a preponderance of H subunits according to the analogy in the values of their real kinetic parameters, and inhibition due to excess of their piruvate and lactate substrates.

According to Cleland's theoretical predictions, the enzyme of both origins adapts itself to a sequential ordered mechanism classified as «bi-bi», the cofactor being the first substrate to be added, with the existence of at least two central ternary complexes.

This mechanism implies the existence of three essential active centres in the enzymatic molecule, in which piruvate and lactate occur together, whilst the cofactors are situated in a common active centre.

The balance constant of the system at pH 7.4 indicates that the reaction favours the formation of lactate and NAD, independent of the isoenzyme composition.

The analogy in the values of the real parameters, in the inhibition by substrate and the reaction mechanism, would appear to suggest that kinetic behaviour is independent of the organ and species, and depends fundamentally on the kind of predominant subunits.

La LDH hepática de pollo presenta electroforéticamente una sola banda de baja movilidad, mientras que en el fero-grama del enzima renal de suido aparecen los cinco isoenzimas; en el enzima de ambos orígenes predominan las subunidades H (4) y hemos podido demostrar también la analogía en el valor de sus parámetros cinéticos reales, en la inhibición provocada por exceso de sus propios sus-tratos piruvato y lactato, así como en el

mecanismo general de reacción que es de tipo secuencial (4).

En el presente trabajo se describe el tratamiento cinético de los sistemas rever-sibles constituidos por las dos láctico-des-hidrogenasas, que nos ha permitido esta-blecer el tipo de mecanismo secuencial mediante el que ambas LDH ejercen su acción catalítica, pues si bien se postula para algunas láctico-deshidrogenasas (2, 9) la existencia de un mecanismo secuencial

ordenado, la actuación catalítica del enzima de músculo de conejo (11) parece regirse por un mecanismo de Theorell-Chance.

La aplicación a este fin, de los métodos propuestos por ALBERTY (1), DALZIEL (5), y de las predicciones teóricas formuladas por CLELAND (3), nos han permitido establecer el tipo de mecanismo al que ajustan su actuación las láctico-deshidrogenasas en estudio.

Mediante los experimentos de inhibición por los propios productos de la reacción, hemos podido interpretar la naturaleza de la interferencia que dichos inhibidores ejercen sobre el enzima y el número de centros enzimáticos que son esenciales para la catálisis.

### Material y métodos

En la determinación del mecanismo reaccional de la LDH de ambos orígenes se han utilizado homogeneizados crudos obtenidos a partir de las glándulas hepática de pollo y renal de suido, en tampón de fosfatos pH 7,4 (50 mM), los cuales se centrifugaron a 5.000 r.p.m. 30 minutos a  $-3^{\circ}\text{C}$ , recogiendo los sobrenadantes. Se efectuaron diluciones con el mismo tampón que contenían 1/7.500 y 1/1.500 (g de órgano por ml de disolución), con el enzima hepático o el renal respectivamente al utilizar los sustratos piruvato y NADH, mientras que al experimentar con el lactato y el NAD, aquéllas fueron de 1/2.000 y de 1/500 respectivamente.

Como sustratos se utilizaron piruvato (Boehringer), DL-lactato (U.C.B.), NADH y NAD (Boehringer) en disolución en el tampón mencionado.

La determinación de la actividad LDH se ha llevado a cabo por lectura espectrofotométrica de las densidades ópticas a 340 nm del NADH producido o consumido (según sean el lactato o el piruvato los sustratos empleados) en un espectrofotómetro Beckman D.B.G. equipado con

cubetas termostataadas de 1 cm a  $30^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  y con inscriptor automático. Los valores numéricos de las velocidades iniciales obtenidas, los expresamos como incremento de densidad óptica por minuto ( $\Delta\text{D.O./min}$ ).

Entre los distintos métodos que utilizan los datos cinéticos del estado estacionario para distinguir entre los diversos mecanismos de reacción se ha aplicado el método de inhibición por los propios productos de la reacción, siguiendo las predicciones teóricas propuestas por CLELAND (3).

Trabajando con piruvato y NADH como sustratos, se estudió el efecto que el L-lactato y el NAD (productos de la reacción) ejercían sobre la actividad enzimática, utilizando concentraciones variables de uno de los sustratos, mientras que la concentración del otro sustrato permanecía constante; en todos los casos se ensayó la inhibición para una concentración no saturante y saturante, respectivamente, del sustrato que se había mantenido constante en la experiencia.

Un estudio análogo se efectuó trabajando con L-lactato y NAD como sustratos, investigando el efecto inhibitor causado por el piruvato y el NADH, en este caso productos de la reacción.

El conjunto de resultados obtenidos, permitió la información adecuada, de acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (*loc. cit.*), acerca del mecanismo de actuación de la LDH de ambos orígenes.

### PARTE EXPERIMENTAL

En un trabajo previo realizado por nosotros (4), se han determinado los valores de las concentraciones saturantes de todos los sustratos implicados en la reacción catalizada por la LDH.

Los valores correspondientes al enzima hepático fueron: [piruvato] =  $3 \times 10^{-4}$  M; [NADH] =  $1 \times 10^{-4}$  M; [L-lactato] =  $1,66 \times 10^{-2}$  M y [NAD] =  $3,3 \times 10^{-3}$  M

y los del enzima renal fueron  $7,5 \times 10^{-3}$  M para el L-lactato;  $2 \times 10^{-3}$  M la del NAD e idénticos a los del enzima hepático los del piruvato y del NADH.

Por otra parte, la inhibición por exceso de piruvato y de L-lactato se manifestó para concentraciones de ambos superiores a las de saturación, siendo la inhibición por exceso de piruvato de la LDH renal dependiente de la concentración de NADH. Los valores experimentales citados son imprescindibles para el establecimiento del mecanismo reaccional.

*Inhibición por L-lactato y NAD del sistema piruvato-LDH-NADH.* — Se estudia en primer lugar la inhibición que el L-lactato y el NAD ejercen sobre el enzima de ambos orígenes, utilizando piruvato y NADH como sustratos, y se describe la inhibición inducida exclusivamente por el L-lactato sobre la LDH de ambos orígenes.

*Inhibición por L-lactato del sistema piruvato-LDH-NADH.* — Se determina la

acción inhibitoria ejercida por el L-lactato sobre el enzima de ambos orígenes, utilizando concentraciones variables de piruvato (ninguna de las cuales produce inhibición por sustrato de la actividad LDH) y una concentración constante y no saturante de NADH de  $2 \times 10^{-5}$  M para el enzima hepático y de  $3 \times 10^{-5}$  M para el renal.

Paralelamente se ha efectuado, también, la inhibición en condiciones en las que la concentración del sustrato que se mantiene constante (NADH) es la saturante ( $1 \times 10^{-4}$  M).

En la figura 1 aparece el tipo de inhibición ejercida por el L-lactato sobre la LDH hepática para concentraciones no saturantes (a) y saturantes (b) de NADH. Se observa que, en todos los casos, el L-lactato es un inhibidor no competitivo independientemente de que la concentración del NADH utilizado sea o no saturante, siendo los valores de las constantes de inhibición del orden de  $10^{-2}$  M.

El enzima renal es también inhibido no competitivamente por el L-lactato, siendo

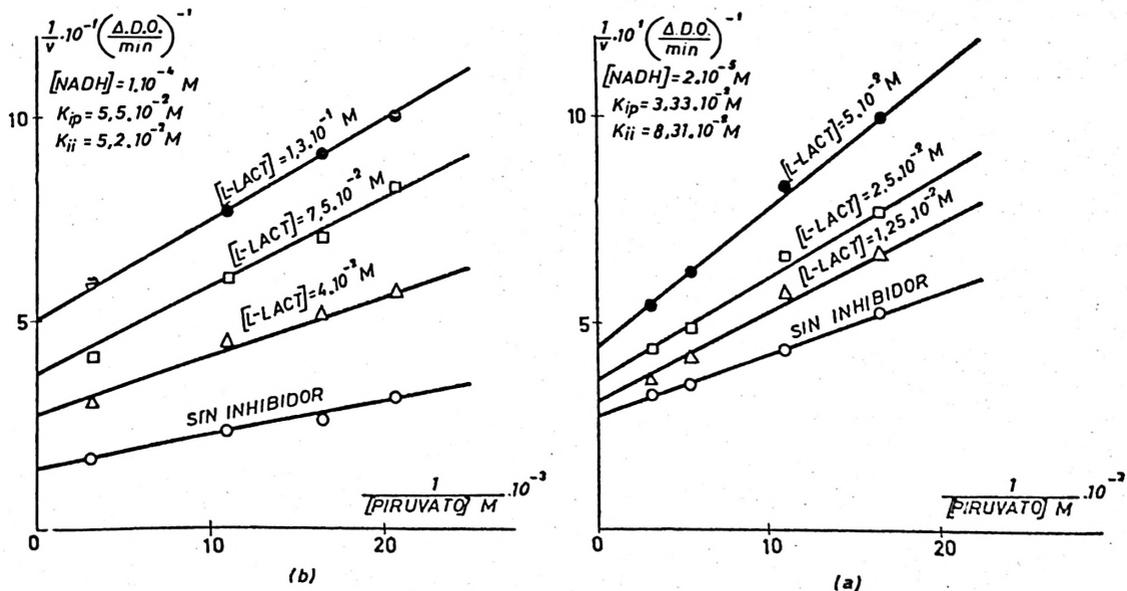


Fig. 1. Inhibición por L-lactato del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH. Con concentración de NADH: a) no saturante; b) saturante.

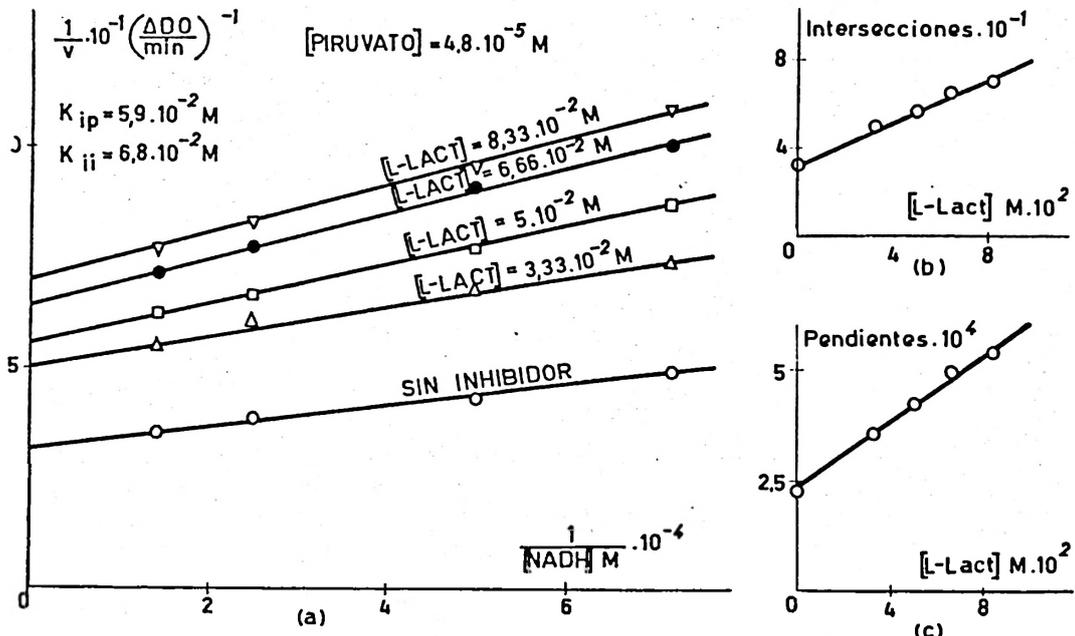


Fig. 2. Inhibición por L-lactato del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH. a) Inhibición no competitiva ejercida por el L-lactato. Representaciones secundarias: b) intersecciones; c) pendientes.

los valores de las constantes de inhibición  $K_{ip} = 3,56 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $K_{ii} = 7,04 \times 10^{-2} \text{ M}$ , cuando la concentración de NADH es no saturante, mientras que si la concentración del cofactor es saturante los valores obtenidos fueron  $K_{ip} = 4,2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $K_{ii} = 5,2 \times 10^{-2} \text{ M}$ .

La inhibición ejercida por el L-lactato sobre la LDH hepática y renal, cuando el sustrato variable es el NADH y se opera con una concentración no saturante y constante de piruvato de  $4,8 \times 10^{-5} \text{ M}$  es, en ambos casos, de carácter no competitivo y se caracteriza por un valor del orden de  $10^{-2} \text{ M}$  de las constantes de inhibición (fig. 2). La inhibición no competitiva ejercida sobre la LDH renal se caracteriza por las constantes  $K_{ip} = 4,8 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $K_{ii} = 5,7 \times 10^{-2} \text{ M}$ .

Las representaciones secundarias de las distintas pendientes e intersecciones son función lineal de la concentración del inhibidor, lo cual ya es un indicio de que no

se trata de un mecanismo secuencial al azar, ya que en dicho mecanismo se obtienen hipérbolas, en lugar de líneas rectas, para las intersecciones, y curvas todavía más complejas para las pendientes (3).

La inhibición provocada por L-lactato, en presencia de una concentración saturante y constante de piruvato de  $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ , sobre el enzima hepático es ahora de tipo

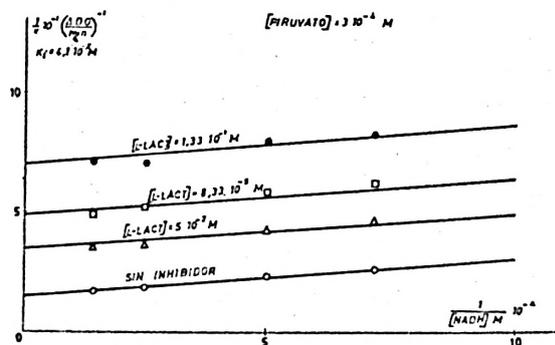


Fig. 3. Inhibición por L-lactato del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH

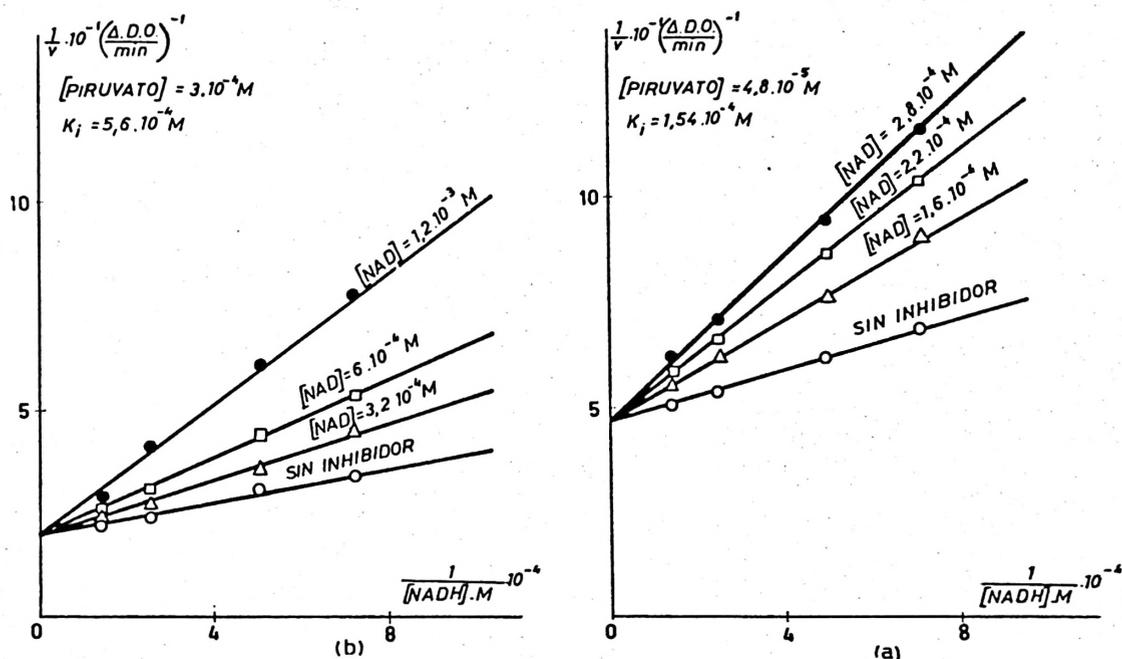


Fig. 4. Inhibición por NAD del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH. Con concentración de piruvato: a) no saturante; b) saturante.

acompetitivo (fig. 3), caracterizada por  $K_i = 4,1 \times 10^{-2}$  M.

Comoquiera que la inhibición provocada por exceso de piruvato sobre la LDH renal es dependiente de la concentración de NADH (4), no ha podido efectuarse la experiencia en estas condiciones, puesto que si la concentración de piruvato es de  $3 \times 10^{-4}$  M, se provoca inhibición por exceso de sustrato si las concentraciones de NADH son inferiores a  $10^{-4}$  M.

De todo lo expuesto precedentemente se deduce que, en ningún caso, el L-lactato compite por el mismo centro activo en que se transforma el NADH.

*Inhibición por NAD del sistema piruvato-LDH-NADH.* — El NAD se comporta como inhibidor de la LDH de ambos orígenes, como hemos podido poner de manifiesto en un estudio cinético análogo al efectuado con el L-lactato.

Se determina, en primer lugar, el efecto

inhibidor inducido por el NAD, operando con concentraciones variables de NADH. De los resultados obtenidos con el enzima hepático (fig. 4) se observa que la inhibición provocada por el NAD es de tipo competitivo para las dos concentraciones de piruvato ensayadas; una no saturante de  $4,8 \times 10^{-5}$  M (a) y la saturante de  $3 \times 10^{-4}$  M (b).

La inhibición experimentada por el enzima renal se estudió únicamente con una concentración de piruvato ( $4,8 \times 10^{-5}$  M) no saturante, ya que, como se indicó, cuando su concentración es saturante provoca inhibición por sustrato del enzima siempre que se empleen concentraciones de NADH inferiores a  $10^{-4}$  M.

La inhibición por NAD experimentada por el enzima renal es asimismo competitiva respecto al NADH, siendo  $K_i = 2,28 \times 10^{-4}$  M.

Se completa el estudio de la acción del NAD, determinando, el efecto inhibitor

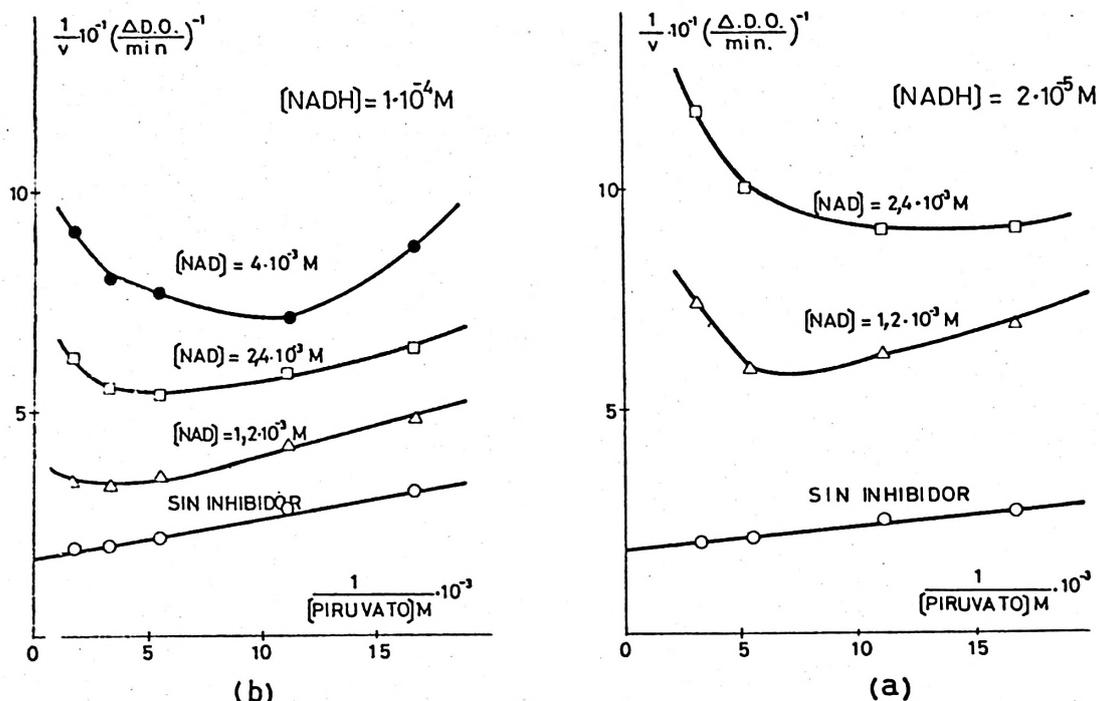


Fig. 5. Inhibición por NAD del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH. Con concentración de NADH: a) no saturante; b) saturante.

inducido por el cofactor sobre la LDH de ambos orígenes, cuando el sustrato variable es el piruvato (fig. 5). Se observa que las rectas correspondientes a las diversas concentraciones de NAD experimentan una pérdida de linealidad respecto a la recta en que la concentración del mismo es nula. El efecto es más acusado cuando las concentraciones de NADH son no saturantes (a) que cuando se utilizan condiciones de saturación (b). Creemos que el efecto es atribuible a la formación del complejo ternario abortivo LDH-NAD-piruvato; ya que la adición de NAD al medio da lugar a la formación de los complejos LDH-NADH y LDH-NAD, de acuerdo con la competencia existente entre ambos cofactores, los cuales en presencia del piruvato originan dos complejos ternarios LDH-NADH-piruvato (activo) y LDH-NAD-piruvato (abortivo), siendo el último tanto más significativo cuanto

mayores sean las concentraciones de NAD y de piruvato presentes, de ahí que al aumentar la concentración de NAD y de piruvato se acuse una progresión en la pérdida de la linealidad de las distintas rectas obtenidas en presencia del inhibidor. Se han obtenido, también, resultados análogos al ensayar la acción del NAD sobre el enzima renal.

*Inhibición por piruvato y NADH del sistema L-lactato-LDH-NAD.* — Una vez establecidas las condiciones en que tiene lugar la inhibición que el L-lactato y el NAD ejercen sobre la actividad del enzima siendo el piruvato y el NADH los sustratos y puesto que la reacción que cataliza la LDH es reversible, se ha completado el método de inhibición por producto estudiando la inhibición que el piruvato y el NADH provocan sobre el enzima cuando el L-lactato y el NAD actúan como sus-

tratos, en idénticas condiciones a las desarrolladas en el proceso inverso.

*Inhibición por piruvato del sistema L-lactato-LDH-NAD.* — El efecto inhibitor provocado por el piruvato sobre las LDH de ambos orígenes se ha determinado empleando concentraciones variables de L-lactato y una concentración constante y no saturante de NAD de  $4 \times 10^{-4}$  M con la LDH hepática de pollo y de  $4,8 \times 10^{-4}$  M con la LDH renal.

Paralelamente se efectuó un estudio análogo, pero en condiciones de saturación del cofactor NAD ( $3,3 \times 10^{-3}$  M con el enzima hepático y  $2 \times 10^{-3}$  M con el renal).

El enzima hepático es inhibido por el piruvato de modo no competitivo (fig. 6), independientemente de que la concentración del cofactor NAD sea no saturante (a) o saturante (b), y lo mismo ocurre con el enzima renal en el que las constantes de

inhibición son  $K_{ip} = 1,24 \times 10^{-5}$  M;  $K_{ii} = 1,86 \times 10^{-5}$  M (NAD no saturante) y  $K_{ip} = 1,5 \times 10^{-5}$  M;  $K_{ii} = 9,7 \times 10^{-5}$  M (NAD saturante).

Los valores de las distintas constantes de inhibición son, en todos los casos, del orden de  $10^{-5}$  M y el carácter no competitivo de la inhibición confirma la concurrencia a distinto *locus* activo de los sustratos piruvato y lactato.

El estudio de la acción inhibitor del piruvato se completó determinando el efecto producido cuando el sustrato variable es el NAD, mientras que se mantiene constante la concentración de L-lactato.

Cuando la concentración de este último es no saturante, la inhibición es de tipo no competitivo tanto para la LDH hepática (figura 7) como para la renal, con la que se obtuvieron las siguientes constantes:  $K_{ip} = 1,05 \times 10^{-5}$  M;  $K_{ii} = 1,08 \times 10^{-5}$  M.

La existencia de un mecanismo secuencial al azar, como representativo de la

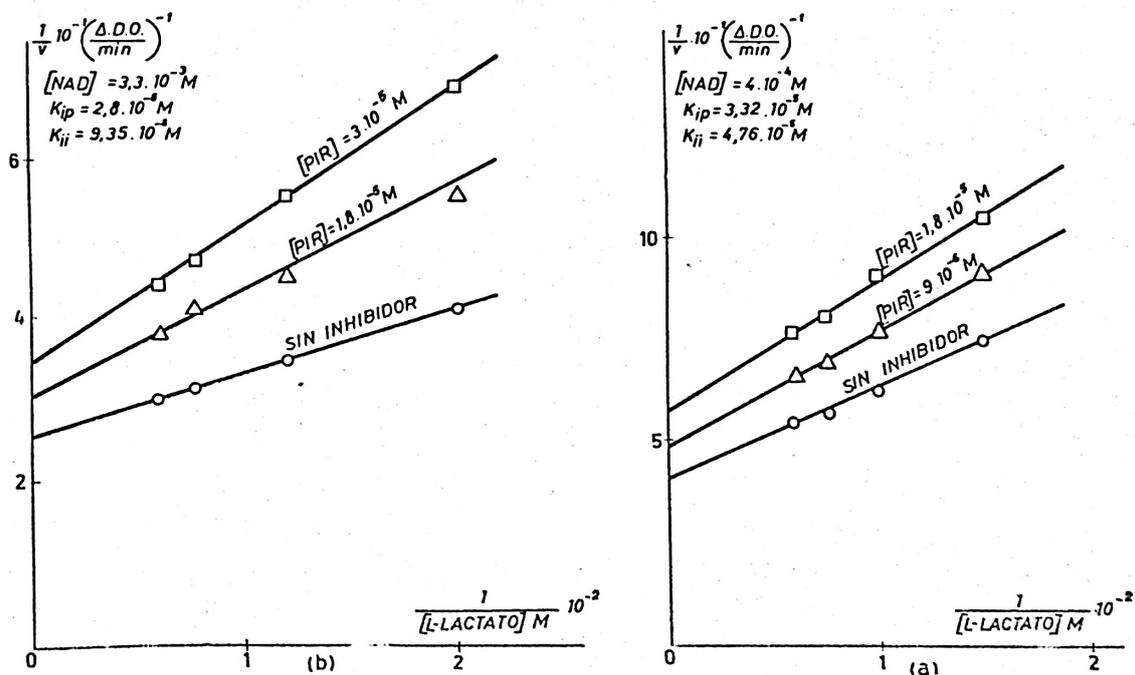


Fig. 6. Inhibición por piruvato del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD. Con concentración de NAD: a) no saturante; b) saturante.

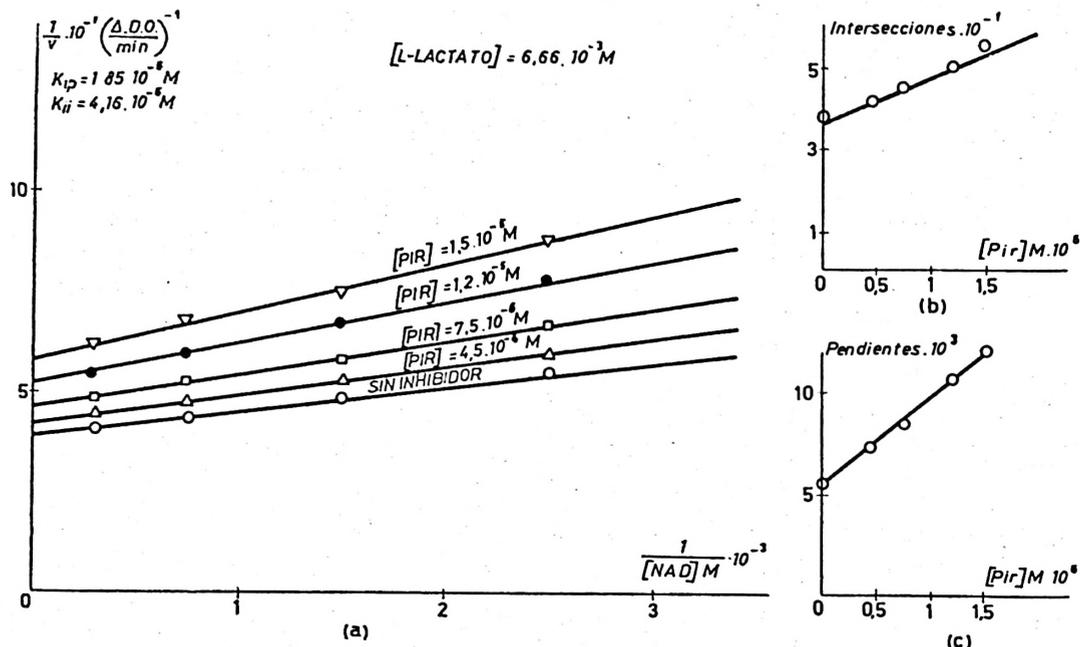


Fig. 7. Inhibición por piruvato del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD. a) El piruvato inhibe no competitivamente. Representaciones secundarias: b) intersecciones; c) pendientes.

LDH de ambos orígenes, se descarta por el hecho de que las representaciones secundarias de las pendientes e intersecciones de las distintas rectas de la figura 7

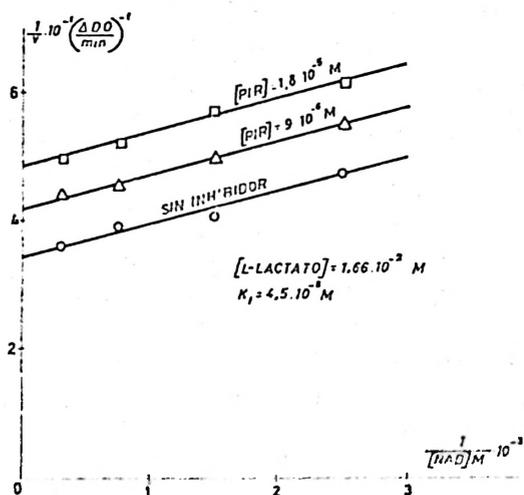


Fig. 8. Inhibición por piruvato del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD.

son función lineal de las concentraciones del inhibidor. Sin embargo, si se estudia la inhibición inducida por el piruvato en condiciones de saturación de L-lactato, se observa que la inhibición de la LDH hepática (fig. 8) y de la LDH renal es de naturaleza acompetitiva, siendo para esta última  $K_i = 1.38 \times 10^{-5}$  M.

De todo ello se confirma que en ningún caso el piruvato compite por el mismo centro activo al que concurre el NAD.

*Inhibición por NADH del sistema L-lactato-LDH-NAD.* — Se ha iniciado el estudio de la acción inhibitoria ejercida por el NADH sobre el sistema citado empleando concentraciones variables de NAD. La representación gráfica (fig. 9) indica que la inhibición producida por el NADH sobre la LDH hepática es de naturaleza competitiva respecto al NAD, independientemente de la concentración no saturante (a) o saturante (b) del L-lactato, de igual forma

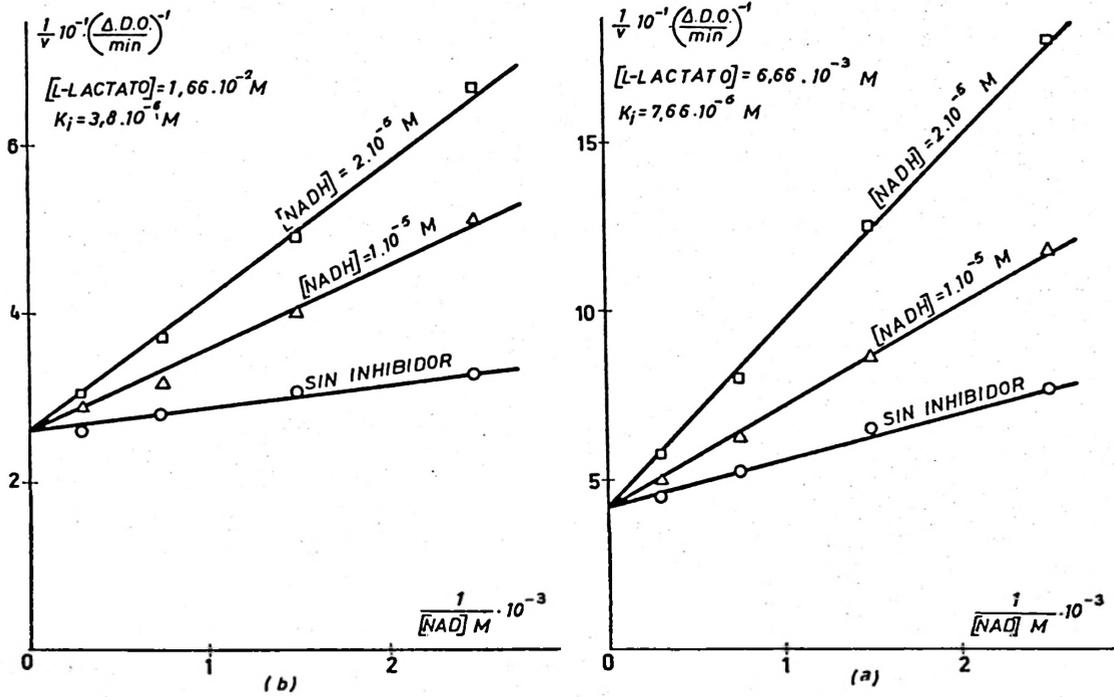


Fig. 9. Inhibición por NADH del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD. Con concentración de L-lactato: a) no saturante; b) saturante.

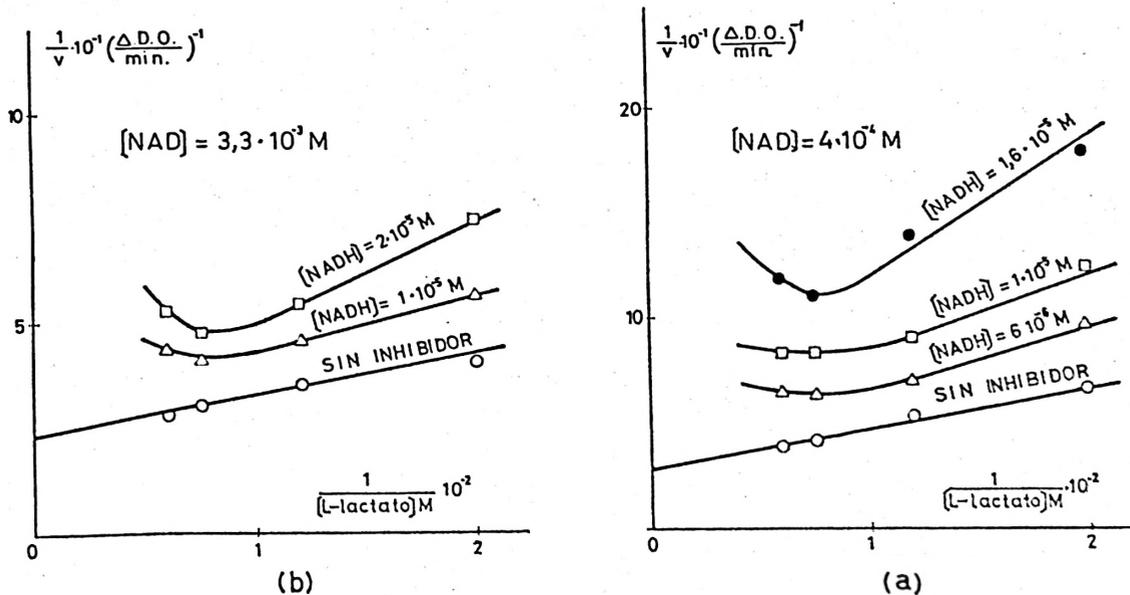


Fig. 10. Inhibición por NADH del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD. Con concentración de NAD: a) no saturante; b) saturante.

con lo que ocurre con el enzima renal, cuyas constantes de inhibición son  $K_i = 3,54 \times 10^{-6}$  M (lactato no saturante) y  $K_i = 4,77 \times 10^{-6}$  M (lactato saturante); es decir, en todos los casos se deduce que ambos cofactores compiten por el mismo centro activo de la molécula enzimática.

Finalmente, se ha investigado el efecto ejercido por distintas concentraciones de NADH sobre la actividad LDH, al trabajar con concentraciones variables de L-lactato, manteniendo constante la concentración del cofactor NAD.

En la figura 10 se puede comprobar la acción inhibitoria inducida por el NADH sobre la LDH hepática, atribuible a la formación de un complejo ternario abortivo LDH-NADH-L-lactato, tanto más significativo cuanto mayores sean las concentraciones de NADH y de L-lactato, de ahí que la pérdida de la linealidad se acuse antes en condiciones de no saturación (a), que para las concentraciones saturantes (b) exhibiendo un comportamiento análogo el enzima renal.

Se resumen los resultados obtenidos por aplicación del método de inhibición por producto, en la reacción catalizada por la LDH, respecto a cada uno de los sustratos, cuando se emplean concentraciones constantes, saturantes y no saturantes, del otro sustrato (tabla I).

Las concentraciones saturantes y no saturantes son las utilizadas en el estudio efectuado con la LDH hepática de pollo, aunque el carácter de las distintas inhibiciones es de validez general para ambas LDH. Los resultados indicados están en concordancia, según las predicciones teóricas de CLELAND (3), con un mecanismo secuencial ordenado bi-bi, en el cual la adición de los pares piruvato-NADH o L-lactato-NAD sigue un orden definido, de igual forma que la liberación de los productos de la reacción.

Por otra parte, este modelo implica la existencia de tres centros activos esenciales en la actividad enzimática. En uno de

ellos concurre el piruvato, en otro el L-lactato y finalmente existe un tercer centro común para los cofactores NAD y NAD reducido.

*Cálculo de las constantes de disociación y de equilibrio de la reacción catalizada por la LDH.* — Se demuestra que el mecanismo de actuación de la LDH de ambos orígenes se adapta a las características de un mecanismo secuencial ordenado bi-bi; resulta, por tanto, de interés, el poder discernir cuál de los dos sustratos (piruvato y NADH, en un caso; o L-lactato y NAD en el proceso inverso) es el que se adiciona en primer lugar al enzima.

Según las predicciones teóricas de CLELAND (3), en un mecanismo secuencial ordenado bi-bi el primer sustrato adicionado es inhibido competitivamente por su propio producto de reacción.

De nuestros resultados se deduce que dicha competencia se manifiesta tan sólo entre los cofactores NAD y NAD reducido, lo cual es una prueba en favor de que, dentro de la secuencia mecanística, el coenzima es el primer sustrato que se adiciona al enzima.

Por otra parte, se cree que el primer sustrato que se incorpore en la secuencia reaccional ha de ser aquel que dé lugar a la formación del complejo binario correspondiente que posea la constante de disociación más pequeña.

Basándonos en las predicciones teóricas formuladas por diversos autores (5, 6), se han calculado las constantes de disociación de todos los complejos binarios posibles, LDH-NADH y LDH-piruvato para el sistema directo y LDH-NAD y LDH-L-lactato para el sistema inverso cuya explicación se detalla a continuación.

*Constantes de disociación de los complejos binarios enzima-sustrato.* — En el cálculo de dichas constantes, para la LDH de ambos orígenes se han utilizado distintos métodos. El método gráfico permite la obtención de dichas constantes a partir de

Tabla I. Inhibición por producto (Cleland). (LDH hepática de pollo.)

INHIBIDOR	PIRUVATO		NADH		INHIBIDOR	L-LACTATO		NAD	
	NADH $1 \times 10^{-4}$ M sat.	NADH $2 \times 10^{-5}$ M no sat.	Piruvato $3 \times 10^{-4}$ M sat.	Piruvato $4,8 \times 10^{-5}$ M no sat.		NAD $3,3 \times 10^{-3}$ M sat.	NAD $4 \times 10^{-4}$ M no sat.	L-lactato $1,66 \times 10^{-2}$ M sat.	L-lactato $6,66 \times 10^{-3}$ M no sat.
L-lactato	No comp.	No comp.	Acomp.	No comp.	Piruvato	No comp.	No comp.	Acomp.	No comp.
NAD	Complejo inactivo	Complejo inactivo			NADH	Complejo inactivo	Complejo inactivo	Complejo inactivo	Complejo inactivo
	E-NAD-pir	E-NAD-pir	Comp.	Comp.		E-NADH-lact.	E-NADH-lact.	Comp.	Comp.

Tabla II. Constantes de disociación de los complejos binarios enzima-sustrato.

Constantes disociación	LDH HEPATICA DE POLLO				LDH RENAL DE SUIDO			
	Método gráfico	Método Dalziel	Método Vestling-Florini	Valor promedio	Método gráfico	Método Daiziel	Método Vestling-Florini	Valor promedio
$K_{SADH} \text{ M} \times 10^5$	1,11	1,20	1,17	1,16	1,25	1,20	1,23	1,23
$K_{pir.} \text{ M} \times 10^5$	3,84	3,82	3,73	3,80	7,40	7,50	7,50	7,47
$K_{SAD} \text{ M} \times 10^3$	0,22	0,21	0,22	0,22	0,62	0,70	0,66	0,66
$K_{L-lact.} \text{ M} \times 10^3$	13,50	12,30	12,86	12,90	4,16	4,46	4,20	4,27

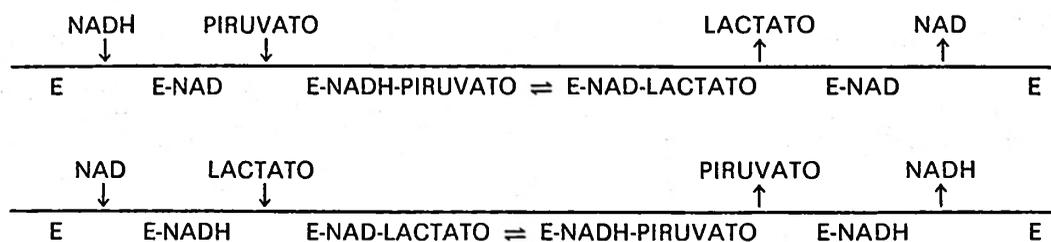


Fig. 11. Mecanismo reaccional de las LDH hepática de pollo y renal de suido.

la inversa de la abscisa del punto de intersección de las distintas rectas obtenidas en las representaciones de Lineweaver-Burk de inversas de velocidades iniciales frente a inversas de concentraciones del sustrato variable (4). Se han deducido, también, mediante el método de DALZIEL (*loc. cit.*) a partir de los valores de los coeficientes cinéticos  $\phi_i$  (4) y por el método de VESTLING-FLORINI (*loc. cit.*) a partir de los parámetros cinéticos reales (4).

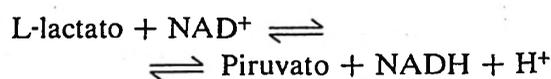
El conjunto de valores obtenidos se reseña en la tabla II; de la misma se deduce que, en todos los casos, la constante de disociación del complejo LDH-cofactor es más pequeña que la correspondiente al complejo LDH-sustrato, lo cual indica la mayor afinidad por el enzima del cofactor y apoya la suposición, anteriormente indicada, de que el cofactor sea el primer sustrato que se adicione en la secuencia mecanística reaccional.

*Constantes de disociación en la secuencia reaccional de la LDH.* — Nuestros resultados, anteriormente reseñados, permiten afirmar que la LDH de ambos orígenes sigue un mecanismo secuencial ordenado bi-bi, en el que el cofactor es el primer sustrato que se adiciona al enzima, a la

vez que en la secuencia pueden existir uno o más complejos ternarios.

Del cálculo efectuado por nosotros de las constantes de velocidad para un mecanismo secuencial ordenado con un solo complejo ternario central por aplicación de los métodos de CLELAND (3) y DALZIEL (5), resulta que algunas de las constantes de velocidad obtenidas son negativas, lo que indica que la LDH de ambos orígenes no se adapta al mismo, con lo que se deduce que dentro de la secuencia reaccional existen como mínimo dos complejos ternarios, tal como se esquematiza gráficamente según la nomenclatura de CLELAND (*loc. cit.*) (fig. 11).

*Constante de equilibrio de la reacción catalizada por la LDH de ambos orígenes.* Se determina el valor de la constante de equilibrio de la reacción:



a pH 7,4, catalizada por el enzima de ambos orígenes, por aplicación de las expresiones formuladas por diversos autores (1, 5), válidas para mecanismos secuenciales ordenados.

Tabla III. Constante de equilibrio del sistema de la LDH.  
 $\text{L-lactato} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Constante equilibrio	LDH HEPATICA DE POLLO				LDH RENAL DE SUIDO			
	Alberty	Dalziel	Relación Haldane	Valor promedio	Alberty	Dalziel	Relación Haldane	Valor promedio
$K_{eq.} \text{ M} \times 10^{12}$	1,48	1,51	1,43	1,47	2	1,88	1,99	1,96

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla III.

Del valor promedio de dichas constantes ( $1,47 \times 10^{-12}$  M para el enzima hepático y  $1,96 \times 10^{-12}$  M para el renal), se deduce que el equilibrio de la reacción está desplazado en estas condiciones hacia la formación de lactato y NAD.

### Discusión

Se ha determinado el mecanismo reaccional de las LDH hepática de pollo (que contiene un isoenzima) y renal de suido (contiene los cinco isoenzimas), si bien en ambos predominan las subunidades H (4), lo cual está de acuerdo con la analogía observada en el valor de sus parámetros reales y en el grado en que experimentan el fenómeno de inhibición por exceso de sus propios sustratos piruvato y lactato.

La aplicación a este fin del método de inhibición por los propios productos de reacción, basándonos en las predicciones teóricas formuladas por CLELAND, pone de manifiesto que la secuencia mecanística del ciclo catalítico de la LDH de ambos orígenes se rige por un mecanismo secuencial ordenado bi-bi, en el cual la adición de los sustratos sigue un orden preestablecido, análogamente a la liberación de los productos de la reacción.

La adaptación de las LDH de ambos orígenes a este modelo implica la existencia de tres centros esenciales en la molécula enzimática. En uno de ellos concurre el piruvato, en otro el L-lactato y finalmente existe un tercer centro común para el NAD y el NAD reducido.

Se pone de manifiesto, también, la existencia de los complejos ternarios abortivos LDH-NAD-piruvato y LDH-NADH-lactato, cuya formación es tanto más favorable cuanto más elevada sea la concentración de cofactor que produce la inhibición y más elevadas sean las concentraciones del sustrato.

La demostración de la existencia del complejo LDH - NAD - piruvato está de

acuerdo con el detectado por otros autores (2) con LDH de hígado de rata, mientras que el complejo LDH-NADH-lactato hallado por nosotros no se puso de manifiesto por los autores mencionados al operar con el enzima de rata. Ambos complejos abortivos fueron detectados también por FROMM *et al.* (7, 8, 11) con LDH de músculo de conejo, y la naturaleza de los mismos es idéntica a la de los complejos ternarios responsables de la inhibición de ambas LDH por exceso de sus sustratos piruvato y lactato (4), resultados que concuerdan con los de WUNTCH *et al.* (10) para la LDH de corazón de cerdo y riñón de rata.

En orden a establecer cuál es el primer sustrato que se adiciona al enzima, CLELAND (*loc. cit.*) postula que el sustrato que interacciona con prioridad con el enzima es inhibido competitivamente por su propio producto de reacción. En nuestro caso esta competencia se observa tan sólo entre el NADH y el NAD.

Por otra parte, se ha creído que una prueba en favor de que el coenzima sea el que se adicione en primer lugar al enzima, consiste en demostrar que la constante de disociación del complejo binario enzima-coenzima (NADH o NAD) sea menor que la correspondiente al complejo enzima-sustrato (piruvato o lactato); es decir, que el coenzima tenga una mayor afinidad por el enzima que la exhibida por el correspondiente sustrato.

La determinación de los valores de las constantes de disociación mencionadas se ha efectuado por aplicación de distintos métodos (5, 6) y en todos los casos se ha observado un valor inferior de la constante de disociación del complejo binario enzima-coenzima respecto a la correspondiente al complejo enzima-sustrato, lo cual confirma que el cofactor es el primer sustrato adicionado.

En la representación gráfica del mecanismo de actuación de la LDH de ambos orígenes (fig. 11) se observa que en la se-

cuencia reaccional existen como mínimo dos complejos ternarios, puesto que hemos comprobado que las LDH hepática de pollo y renal de suido no se adaptan a un mecanismo con un solo complejo ternario central.

El hecho de que las LDH de ambos orígenes exhiban una gran analogía en sus parámetros cinéticos reales e inhibición por exceso de sus propios sustratos (4) y que presenten idéntico mecanismo reaccional, muestra que, aunque su composición en isoenzimas es notablemente diferente, en ambos órganos las subunidades H son las predominantes, no observándose diferencias fundamentales al estudiar su comportamiento cinético, de lo cual parece sugerirse que el mismo sea independiente del órgano y de la especie siempre que los isoenzimas presentes en los mismos exhiban un predominio de las mismas subunidades.

Por otra parte, los estudios cinéticos *in vitro* de la LDH permitieron calcular el valor de la constante de equilibrio de la reacción  $L\text{-lactato} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$  efectuado a pH 7,4; el resultado obtenido ( $1,47 \times 10^{-12}$  M para el enzima hepático y  $1,96 \times 10^{-12}$  M para el renal) indica que el sistema aislado de la LDH está desplazado hacia la formación de lactato, lo cual sugiere que en los órganos en los que se forma lactato, éste se difunde, una vez formado, por el torrente circulatorio hacia otros órganos en los que pueda ser reoxidado a piruvato; parece deducirse por el valor de la constante de equilibrio que esto ha de tener lugar en órganos aeróbicos, en los que se precisa mucha energía, y por ello el piruvato se ha de metabolizar a través de vías metabólicas que produzcan más energía que la de la vía glucolítica, ya que si no su presencia impediría la reoxidación del lactato.

### Resumen

Las láctico-deshidrogenasas hepática de pollo y renal de suido, si bien exhiben una notable

diferencia en su composición en isoenzimas (un isoenzima en la de hígado y cinco en la renal), presentan un predominio de subunidades H, de acuerdo con la analogía en los valores de sus parámetros cinéticos reales, e inhibición por exceso de sus sustratos piruvato y lactato.

El enzima de ambos orígenes se adapta, según las predicciones teóricas de Cleland, a un mecanismo secuencial ordenado «bi-bi», siendo el cofactor el primer sustrato adicionado, con la existencia como mínimo de dos complejos ternarios centrales.

Este mecanismo implica la existencia de tres centros activos esenciales en la molécula enzimática en los que concurren el piruvato y el lactato, mientras que los cofactores se sitúan en un centro activo común.

La constante de equilibrio del sistema, a pH 7,4, indica que la reacción está favorecida hacia la formación de lactato y de NAD, independientemente de la composición en isoenzimas.

La analogía en los valores de los parámetros reales, en la inhibición por sustrato y en el mecanismo reaccional, parecen sugerir que el comportamiento cinético es independiente del órgano y especie, y depende fundamentalmente del tipo de subunidades predominantes.

### Bibliografía

1. ALBERTY, R. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1928, 1953.
2. ANDERSON, S. R., FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2991, 1964.
3. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 1963.
4. CORTÉS, A. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **28**, 297, 1972.
5. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706, 1957.
6. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575, 1957.
7. FROMM, H. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 199, 1961.
8. FROMM, H. J.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2938, 1963.
9. TAKENAKA, Y. y SCHWERT, G. W.: *J. Biol. Chem.*, **223**, 157, 1956.
10. WUNTCH, TH., CHEN, R. F. y VESELL, E. S.: *Science*, **167**, 63, 1970.
11. ZEWE, V. y FROMM, H. J.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1668, 1962.