

Acciones inducidas por la urea, la guanidina y diversos fármacos sobre la lacticodeshidrogenasa hepática de pollo

J. García-Rafanell, A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Barcelona

(Recibido el 11 de mayo de 1973)

J. GARCIA-RAFANELL, A. CORTES, J. BOZAL. *Urea and Guanidine Actions on Chicken LDH*. Rev. esp. Fisiol., 29, 207-216. 1973.

Urea and guanidine tested at low concentrations inhibit the hepatic lactic dehydrogenase in chickens (homogenated) where it exists in the form of a single iso-enzyme (H_1). The inhibitive action increases in proportion to the time that the effector is in prior contact with the enzyme, with the former's concentration and with the temperature.

Inhibition of the LDH activity in the interval of temperatures between 5° C and 30° C is reversible up to concentrations of urea of 1.2 M and of guanidine of 0.72 M. But if the temperature is 55° C, it proves to be irreversible or partially reversible for all concentration tested.

The inhibition of both effectors is competitive with respect to the pyruvate and non-competitive with respect to the other substrates. NADH protects the inhibition induced by 2 M and 3 M urea, whilst the pyruvate and the L-lactate, do not protect. The contact between LDH and NAD, in the absence of lactate, gives rise to the formation of a stable inactive complex, where, after 24 hours of dialysis, no elimination of the co-factor is observed.

The anti-rheumatic pharmacons, salicylic acid and phenilbutazone are reversible inhibitors of LDH and acts by competing with the co-factors NAD or NADH, the inhibition not being of a competitive nature with respect to the pyruvate and the L-lactate.

En el estudio de las macromoléculas proteicas constituye un aspecto de interés general el comportamiento de las mismas frente a agentes desnaturalizantes.

La lacticodeshidrogenasa es una molécula oligómera constituida por cuatro subunidades, que se presenta como máximo en forma de cinco isoenzimas (3) designados por H_1 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 y M_4 .

En la bibliografía (1, 3, 4, 10, 15, 21) se indica que concentraciones elevadas de urea (8-12 M) y de guanidina (5 M) inactivan a la lacticodeshidrogenasa por provocar una subdivisión de los distintos isoenzimas en subunidades inactivas; a su vez los mismos pueden diferenciarse entre sí por su distinta respuesta frente a la desnaturalización provocada por la urea (2,

13, 16, 19) debido a que, probablemente, las uniones entre las distintas subunidades constituyentes pueden presentar resistencia diferente a la acción desnaturalizante.

Por ello, nosotros hemos estudiado la acción que sobre la LDH provocan concentraciones menores de los desnaturalizantes para determinar si, en estas condiciones, es de naturaleza reversible.

Por otra parte hemos creído de interés el estudiar la influencia que los sustratos piruvato, L-lactato, NADH y NAD puedan ejercer sobre la inactivación de la LDH inducida por la urea ya que se ha postulado el efecto protector de la actividad enzimática, ejercida por el NADH (17).

El ácido salicílico, fármaco antirreumático, es un inhibidor de varias deshidrogenasas (9, 14) entre ellas de la LDH de músculo de conejo, asimismo otro fármaco antirreumático, la fenilbutazona, inhibe entre otras la actividad xantindeshidrogenásica (18).

Diversos autores han señalado que su acción inhibitoria se ejerce por competencia con los cofactores NAD; NADP o con sus formas reducidas y que ello pudiera constituir una característica común a todas las deshidrogenasas; sin embargo, la inhibición que ejerce sobre la xantindeshidrogenasa es de tipo no competitivo respecto al NAD (12).

La lactícodeshidrogenasa hepática de pollo se adapta a un mecanismo secuencial ordenado bi-bi (8) y puesto que la xantindeshidrogenasa se rige por un mecanismo ping-pong (11, 20) hemos tratado de comparar el efecto inhibitorio que el salicilato ejerce sobre la lactícodeshidrogenasa con el ejercido para la xantindeshidrogenasa (12) para comprobar si su acción inhibitoria es dependiente del mecanismo reaccional de la deshidrogenasa en estudio.

A su vez se ha estudiado, también, la acción del fármaco antirreumático fenilbutazona, conocido inhibidor de la xantindeshidrogenasa (18), para comparar su acción con la del ácido salicílico.

Material y métodos

Se obtuvo un homogeneizado de la glándula hepática de pollo, recién eviscerada, por trituración del parénquima en la proporción de 1 g de tejido y 4 ml de tampón de fosfatos ($\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{Na}$) 50 mM de pH 7,4 que se sometió posteriormente a centrifugación (5.000 r.p.m. durante 30 minutos) a la temperatura de -3°C . Constituye el preparado enzimático con el que se trabajó y en él predomina el isoenzima H_1 de la lactícodeshidrogenasa.

Como sustratos se han empleado piruvato (Boehringer), ácido láctico (U.C.B.), NADH (Boehringer) y NAD (Boehringer).

La disolución de lactato se preparó por neutralización del ácido láctico con NaOH hasta pH 7,4 enrasando a continuación la disolución con el tampón de fosfatos indicado hasta el volumen final requerido.

Las disoluciones de urea (U.C.B.) y de clorhidrato de guanidina (Schuchardt) se prepararon por disolución en el tampón de fosfatos de pH 7,4 habitual a cuyo pH se ajustaron. El ácido salicílico y la fenilbutazona (4-butil-1,2-difenil-3,5-pirazolidindiona) se solubilizaron con la cantidad justa de NaOH 0,1 N y se ajustó a continuación el pH a 7,4 con ClH diluido, enrasándose posteriormente al volumen final con el tampón de fosfatos.

La determinación de las velocidades iniciales de reacción se efectuó en un espectrofotómetro Beckman D.B.G. provisto de cubetas termostatadas ($30 \pm 0,1^\circ\text{C}$) e inscriptor. Se midió la variación de la densidad óptica a lo largo del tiempo a 340 nm, utilizando NADH (NAD) como dador (aceptor electrónico) en presencia y en ausencia de los inhibidores.

La reversibilidad en la inhibición provocada por los inhibidores ensayados se determinó por diálisis de los preparados enzimáticos tratados con el inhibidor, comparando su actividad con la de una disolución enzimática que actuaba de control y se había sometido a las mismas vicisitudes.

Las experiencias de diálisis de las distintas muestras se efectuaron a 5° C frente al tampón de fosfato de las características reseñadas prolongándose entre 24 y 72 h.

Resultados

ACTIVIDAD RESIDUAL DE LA LACTICODESHIDROGENASA CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE UREA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

Se determina el efecto que distintas concentraciones de urea ejercen en la actividad catalítica del enzima empleando como sustratos piruvato 3×10^{-4} M y NADH 10^{-4} M, concentraciones con las que se obtiene la máxima actividad catalítica (7).

La acción de la urea sobre la LDH se investigó a diversas temperaturas comparando la actividad de las muestras del enzima disueltas en el tampón de fosfatos habitual con la de otras que contienen, además, distintas concentraciones de aquella, con objeto de determinar la acción conjunta de ambos factores (tabla I).

De los resultados obtenidos se deduce que la inhibición aumenta con la temperatura y con la concentración de urea, siendo de carácter reversible hasta que la concentración de aquella es 1,2 M, en el intervalo de temperaturas entre 5° C y 30° C. Sin embargo, cuando el contacto previo se realiza a 55° C, las mismas concentraciones de urea inhiben irreversiblemente al enzima, es decir, en estas condiciones parecen apreciarse los efectos desnaturalizantes simultáneos de la temperatura y de la concentración de urea presente.

Cuando se determina la actividad LDH de muestras preincubadas a 30° C, frente a L-lactato $1,66 \times 10^{-2}$ M y NAD $3,3 \times 10^{-3}$ M, concentraciones saturantes de ambos sustratos (7), se obtienen porcentajes de inhibición que son algo menores que en las condiciones anteriores (tabla II).

De los valores tabulados se deduce que concentraciones de urea de hasta 1,2 M, no afectan a la actividad de la LDH; sin embargo, para concentraciones superiores el porcentaje de inhibición aumenta con la concentración de urea y con el tiempo de contacto previo entre LDH-urea, y se mantiene prácticamente constante a partir de las 2 horas de contacto previo.

Se observa por otra parte que, tan sólo la urea 1,2 M que antes de dializar ejercía una débil inhibición (9 %), recupera totalmente su actividad por diálisis, mientras que cuando las concentraciones de urea son superiores no se recupera la actividad enzimática; es decir, la urea inhibe irreversiblemente al enzima en estas condiciones.

CINÉTICA DE LA ACTUACIÓN DE LA UREA SOBRE LA LACTICODESHIDROGENASA

Se estudia la cinética de actuación de la urea como inhibidor reversible de la LDH hepática de pollo, con objeto de dilucidar cuál sea el tipo de inhibición que exhibe respecto a cada uno de los sustratos de la reacción enzimática, así como el cálculo de las correspondientes constantes de inhibición.

a) *Con piruvato y NADH como sustratos.* Se prepararon distintas muestras enzimáticas, de modo que las concentraciones finales de urea fueran 0, 0,75 M y 1,2 M, que inhiben reversiblemente (tabla I). El contacto se prolongó durante una hora, intervalo de tiempo suficiente para conseguir que la inhibición provocada por la urea sea la máxima.

En la figura 1 se observa que la urea es un inhibidor competitivo respecto al piruvato (a) y no competitivo respecto al NADH (b).

b) *Con L-lactato y NAD como sustratos.* En estudio análogo al descrito en el subapartado anterior, se han utilizado

Tabla I. *Inhibición de la actividad lacticodeshidrogenásica (%) a distintas temperaturas.* Las muestras contienen 20 ml de homogeneizado hepático (1 g/9.000 ml) y 40 ml de disolución de tampón de fosfatos o el volumen adecuado de disolución de urea. Las muestras sometidas a diálisis habían sido preincubadas durante 3 h a las temperaturas indicadas. La actividad LDH se determinó con piruvato 3×10^{-4} M y NADH 10^{-4} M a 30° C. Las concentraciones de urea expresadas son las finales en la cubeta. Se procedió a la determinación de la actividad LDH después de preincubar el intervalo de tiempo indicado y previa dilución de las muestras en la proporción de 4,5/5.

[UREA] M	ANTES DE DIALIZAR					DESPUES DE 24 h DIALISIS
	Tiempo preincubación (h) Urea + Enzima					
	0	1/2	1	2	3	
Preincubación a 5° C						
—	—	—	—	—	—	—
0,6	—	—	—	—	—	—
0,9	—	2,9	6,6	5,9	5,9	—
1,2	8,8	23,5	27,6	24,7	30,6	4,1
1,5	17,1	41	43,8	52,4	50,4	46,8
1,8	39,3	58,8	61,9	63,3	62	55
Preincubación a 30° C						
—	—	—	—	—	—	—
0,6	2,3	2,3	2,3	2,3	9,1	—
0,9	4,6	11,3	11,3	11,3	11,3	—
1,2	11,6	25	25	25	27,5	7,1
1,5	23,2	36,3	40,9	40,9	42	30,9
1,8	37,1	52,2	65,9	63,6	63,6	57,1
Preincubación a 55° C						
—	—	—	—	—	—	—
0,6	—	27,7	37,5	35,7	42,8	25,6
0,9	—	32,3	36	42,8	40	38,5
1,2	25,7	46,1	56,2	58,5	71,4	65,8
1,5	48,5	63,1	84,3	91,4	100	100
1,8	60	90,7	100	100	100	100

Tabla II. *Inhibición de la actividad lacticodeshidrogenásica (%)* Las muestras contienen 10 ml de homogeneizado hepático (1 g/1.200 ml) y 50 ml de disolución de tampón de fosfatos o el volumen adecuado de disolución de urea. Las muestras sometidas a diálisis habían sido preincubadas durante 8 h a 30° C. Las concentraciones de urea expresadas son las finales en cubeta. Actividad LDH igual que en tabla I. La determinación de la actividad LDH se efectuó después de preincubar el intervalo de tiempo indicado y previa dilución de las muestras en la proporción de 4,5/5.

[UREA] M	ANTES DE DIALIZAR					DESPUES DE 24 h DIALISIS
	Tiempo preincubación (h) Urea + Enzima (30° C)					
	0	2	4	6	8	
—	—	—	—	—	—	—
0,9	—	—	—	—	—	—
1,2	—	—	3,6	8,6	9	—
1,5	12,9	17,3	23,3	22	21,8	22
1,8	22,2	40,3	41,4	42	41,8	42,8
2,1	37	50	51	52,6	52,7	—

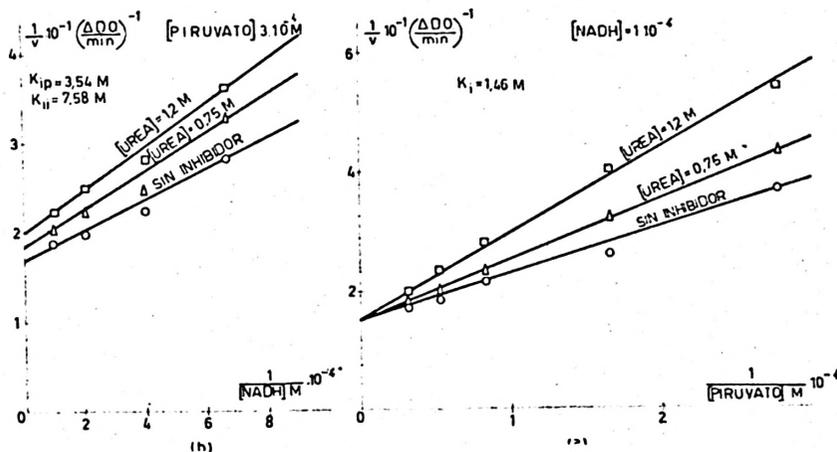


Fig. 1. Inhibición por urea del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH.

L-lactato y NAD como sustratos. Las concentraciones de urea ensayadas (1,32 M; 1,5 M) inhiben irreversiblemente a la LDH ya que concentraciones de urea más bajas apenas provocan inhibición (tabla II), con lo cual la cinética de la inhibición aquí establecida es aparente. La determinación de la actividad después de 2 horas de contacto enzima-urea, con el que se consigue inhibición máxima, permite observar (figura 2) que la inhibición es no competitiva tanto respecto al L-lactato (a) como al NAD (b).

EFFECTO PROTECTOR DEL NADH EN LA INHIBICIÓN POR UREA DE LA LACTICO-DESHIDROGENASA HEPÁTICA DE POLLO.

Se determina previamente los posibles efectos que un contacto prolongado de los distintos sustratos con el enzima pueda ejercer sobre su actividad catalítica.

Se ha comprobado que un contacto de hasta 2 horas de la LDH con piruvato, lactato y NADH no provoca alteración alguna en la actividad enzimática; sin embargo, la incubación LDH-NAD ($3,4 \times$

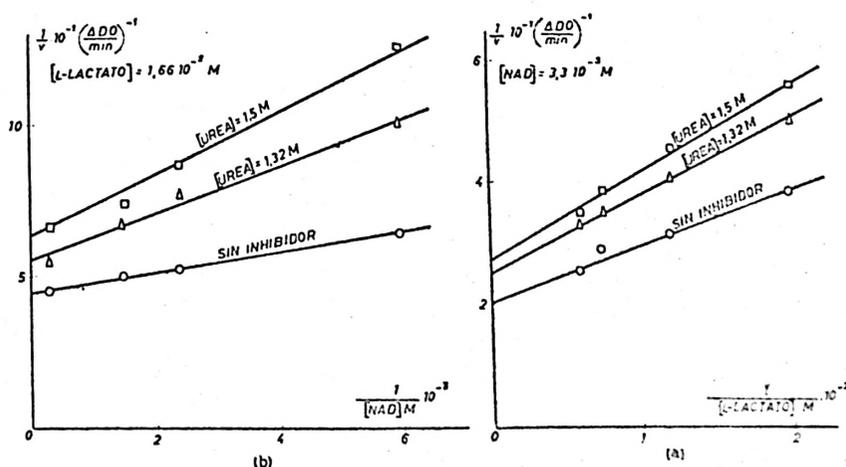


Fig. 2. Inhibición por urea del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD.

10^{-3} M) implica una acusada disminución de la misma, que aumenta con el contacto previo enzima-cofactor, la cual no se recupera después de una diálisis de la mezcla LDH-NAD, pudiéndose comprobar por el espectro del dializado que la cantidad de NAD eliminada tras 24 horas de diálisis es nula, lo que indica que el complejo LDH-NAD, inactivo si se forma en ausencia de lactato, es sumamente estable, extremo ya puesto de manifiesto por nosotros al comparar el valor de su constante de disociación respecto a la del complejo LDH-lactato (8).

Todo lo expuesto anteriormente ha inducido a estudiar únicamente el efecto que el piruvato y el NADH puedan ejercer en la inhibición de la LDH inducida por urea 2 M y 3 M.

Se prepararon muestras (e, f) en las que se preincubó durante 90 minutos el enzima con piruvato o NADH y posteriormente se adicionó la urea de modo que su concentración final fuera 2 M y 3 M, y otras (c, d) en las que la incorporación de aquella se efectuó sin haber establecido contacto previo enzima-sustrato o enzima-cofactor. La velocidad de reacción se determinó después de 0, 45 y 90 minutos de la adición de la urea y se comparó con la de un control (a) que contiene solamen-

te LDH y la de otra muestra (b) que contiene además urea.

La velocidad de reacción se determinó por adición de 2 ml de las mezclas anteriores a la cubeta espectrofotométrica que contenía los volúmenes necesarios de NADH y piruvato en las muestras (a, b) preincubadas sin los sustratos, de piruvato en (c, e) preincubadas con el cofactor y de NADH en las muestras (d, f) que no lo contiene, siendo sus concentraciones finales, en todos los casos, de 3×10^{-4} M (piruvato) y de 1×10^{-4} M (NADH).

Los porcentajes de actividad de las muestras tratadas con urea 2 M aparecen en la figura 3. De la misma se deduce que el piruvato no ejerce efecto protector mientras que el NADH reduce el porcentaje de inhibición inducida por la urea probablemente por la mayor estabilidad del complejo LDH-NADH respecto al complejo LDH-piruvato (8). Los resultados obtenidos con urea 3 M son análogos y los porcentajes de protección inferiores.

ACTIVIDAD RESIDUAL DE LA LACTICODESHIDROGENASA CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE GUANIDINA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

El efecto que la guanidina ejerce sobre la actividad LDH se determinó comparan-

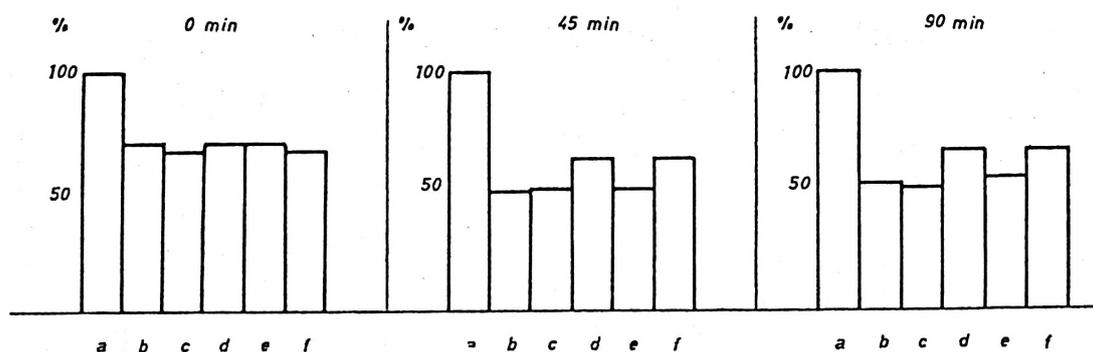


Fig. 3. Efecto del piruvato y NADH en la inhibición por urea de la lacticodeshidrogenasa a 30° C.

a: enz.; b: enz. + urea; c: enz. + urea + piruvato; d: enz. + urea + NADH; e*: enz. + urea + piruvato; f*: enz. + urea + NADH.

* 2 h. contacto previo enz. + piruvato y enz. + NADH.

Tabla III. *Inhibición de la actividad lacticodehidrogenásica (%) a distintas temperaturas.* Las muestras en preincubación contienen 20 ml de homogeneizado (1 g/6.750 ml) y 60 ml de disolución tampón (control), sustituyéndose cantidades variables del tampón por el volumen correspondiente de disolución de guanidina 4 M. Las muestras que se sometieron a diálisis fueron preincubadas con guanidina 3 h. Las concentraciones de guanidina son las existentes en la cubeta espectrofotométrica. La actividad enzimática se midió con piruvato (3×10^{-4} M) y NADH (10^{-4} M) a 30° C.

[GUANIDINA] M	ANTES DE DIALIZAR					DESPUES DE 24 h DIALISIS
	Tiempo preincubación (h) Guanidina + Enzima					
	0	1/2	1	2	3	
Preincubación a 30° C						
—	—	—	—	—	—	—
0,18	9,7	9,8	8,8	10,3	10,3	—
0,36	27,6	26,5	29,4	26,1	28,3	—
0,72	64,2	62,8	66,1	64,9	65,6	—
1,08	84,3	87,1	89,7	88	88	40
Preincubación a 55° C						
—	—	—	—	—	—	—
0,18	6,66	21,7	26,6	34	34	11,3
0,36	35,5	50	53,3	63,6	63,6	34
0,72	75,5	91,3	93,3	96,6	96,6	77,3
1,08	91,1	100	100	100	100	87,6

do, a diversos tiempos de contacto previo, las actividades de muestras de LDH disueltas en el tampón de fosfatos con otras que contenían distintas cantidades de guanidina (tabla III).

La acción inducida por la guanidina a 30° C se muestra reversible cuando su concentración es de hasta 0,72 M. La inhibición ejercida por cualquiera de las concentraciones de guanidina ensayadas a 55° C es parcialmente reversible, indudablemente por el efecto desnaturalizante que, en estas condiciones, provoca la temperatura.

CINÉTICA DE LA ACTUACIÓN DE LA GUANIDINA SOBRE LA LACTICODESHIDROGENASA.

Para determinar la naturaleza de la inhibición que la guanidina ejerce sobre la LDH hepática de pollo se han utilizado concentraciones del efector en las que actúa como inhibidor reversible (tabla III).

a) *Con piruvato y NADH como sustratos.* Se ha determinado la actividad

LDH con piruvato como sustrato variable y una concentración constante y saturante de NADH de 1×10^{-4} M (a) y con concentraciones variables del cofactor en presencia de piruvato saturante 3×10^{-4} M (b). Las concentraciones de guanidina empleadas se hallan comprendidas entre 0,2 M y 0,6 M. Los resultados obtenidos (fig. 4) indican que la guanidina es inhibidor competitivo respecto al piruvato, y no competitivo respecto al NADH.

b) *Con L-lactato y NAD como sustratos.* En estudio análogo con L-lactato y NAD como sustratos, las concentraciones de guanidina utilizadas son 0,26 M y 0,4 M y la inhibición provocada es no competitiva respecto a ambos sustratos (figuras 5a y b).

CINÉTICA DE LA ACTUACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DE LA FENILBUTAZONA SOBRE LA LACTICODESHIDROGENASA.

Se describe la acción inhibidora que el ácido salicílico y la fenilbutazona ejercen

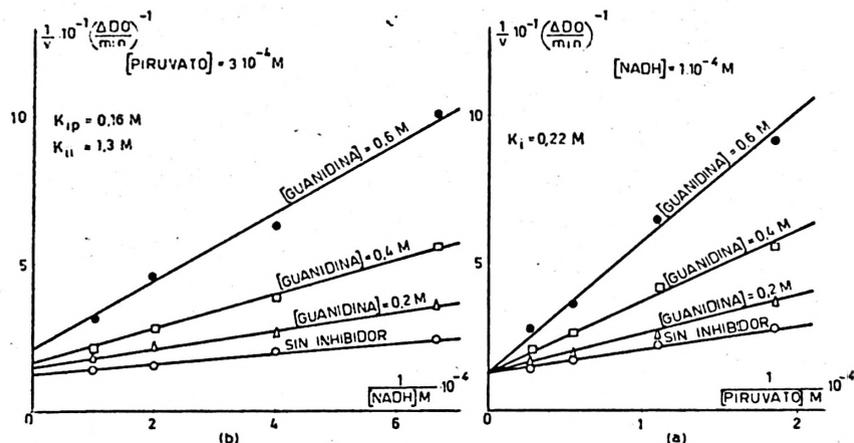


Fig. 4. Inhibición por guanidina del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH.

sobre la actividad laticodeshidrogenásica, la cual, como hemos podido comprobar por diálisis, es de naturaleza reversible en el margen de concentraciones ensayadas.

a) *Con piruvato y NADH como sustratos.* La inhibición inducida por el ácido salicílico con respecto al piruvato (a) y al NADH (b) aparece en la figura 6.

Se observa que la inhibición es no competitiva respecto al piruvato y competitiva respecto al NADH. La fenilbutazona exhibe un comportamiento análogo siendo su acción inhibitoria competitiva respecto

al NADH ($K_i = 4 \times 10^{-3}$ M) y no competitiva respecto al piruvato ($K_{ip} = 1,55 \times 10^{-2}$ M; $K_{ii} = 7,5 \times 10^{-2}$ M).

b) *Con L-lactato y NAD como sustratos.* En este caso, los resultados obtenidos (fig. 7) son análogos a los descritos en el apartado anterior; es decir, la inhibición inducida por el ácido salicílico se ejerce por competencia con el cofactor y no es competitiva respecto al L-lactato. La fenilbutazona inhibe también competitivamente al NAD ($K_i = 6,5 \times 10^{-3}$ M) y no competitivamente al lactato ($K_{ip} = 3,74 \times 10^{-2}$ M; $K_{ii} = 0,1$ M).

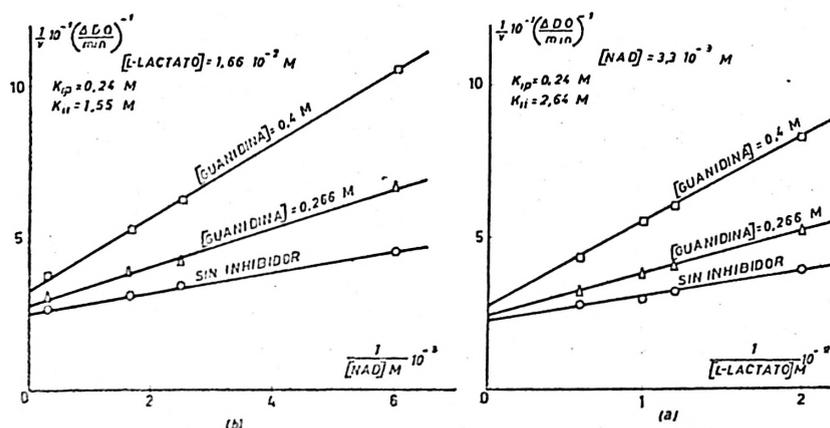


Fig. 5. Inhibición por guanidina del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD.

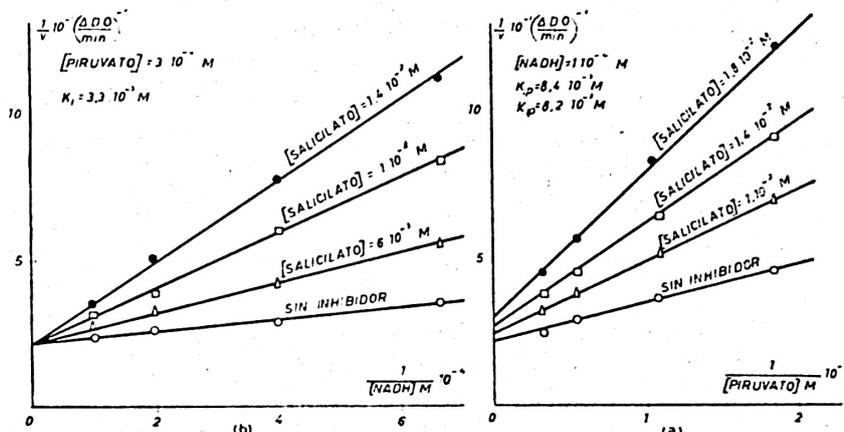


Fig. 6. Inhibición por ácido salicílico del sistema piruvato-LDH (hepática de pollo)-NADH.

Discusión

En los sistemas piruvato-LDH-NADH y L-lactato-LDH-NAD, la urea y la guanidina son inhibidores competitivos respecto del piruvato y no competitivos respecto de los demás sustratos; los resultados pueden interpretarse mediante las predicciones cinéticas de CLELAND (5, 6).

Las inhibiciones son reversibles hasta concentraciones de urea 1.2 M y de guanidina 0.72 M, y para temperaturas entre +5 y +30° C, pero cuando la temperatura es de 55° C las inhibiciones provocadas por ambos efectores son de naturaleza irreversible.

El NADH protege a la LDH de la inhibición provocada por la urea aunque sólo un 14 %, mientras que el piruvato y el lactato, no ejercen acción protectora alguna. El que en las mismas condiciones que el NADH el piruvato no ejerza efecto protector, a pesar de que la acción inhibidora de la urea se ejerce por competencia con el piruvato, constituye una prueba adicional en favor de la formación preferente del complejo LDH-NADH con respecto a la del complejo LDH-piruvato (8).

El contacto previo LDH-NAD se traduce en una pérdida de actividad enzimática por formación de un complejo estable del que no se elimina el coenzima tras 24

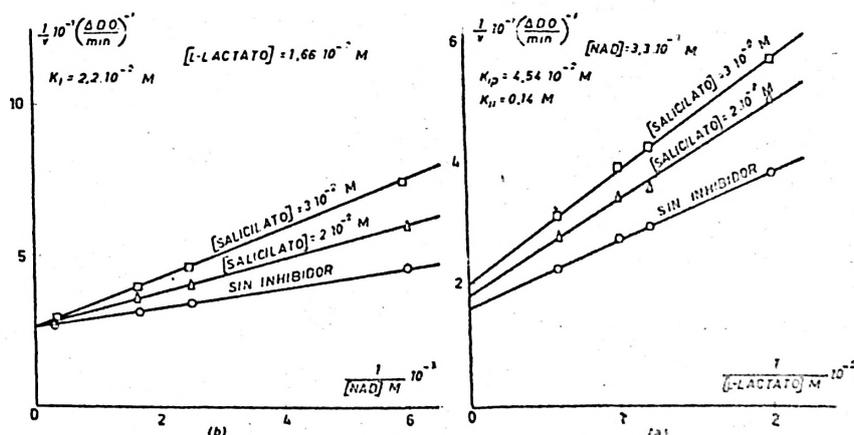


Fig. 7. Inhibición por ácido salicílico del sistema L-lactato-LDH (hepática de pollo)-NAD.

horas de diálisis, y que es inactivo si se forma en ausencia de lactato.

La inhibición de la LDH hepática de pollo por el ácido salicílico se ejerce por competencia con los cofactores NADH y NAD, lo cual indica una analogía de comportamiento con otras deshidrogenasas (9, 14), a diferencia del exhibido por la xantindeshidrogenasa hepática de pollo (12). El hecho de que la LDH hepática de pollo exhiba un mecanismo ordenado bi-bi (8) y que la XDH del mismo origen que actúa según un mecanismo ping-pong (11, 20), es inhibida distintamente, sugiere el empleo del mencionado efector como medio de diferenciación del mecanismo de actuación de las deshidrogenasas.

La fenilbutazona exhibe un comportamiento análogo al del ácido salicílico.

Resumen

La urea y la guanidina ensayadas a bajas concentraciones inhiben a la lacticodehidrogenasa hepática de pollo (homogeneizados) en los que existe en forma de un único isoenzima (H₁). La acción inhibitoria aumenta con el tiempo de contacto previo enzima-efector, con la concentración de éste y con la temperatura.

La inhibición de la actividad LDH en el intervalo de temperaturas entre 5° C y 30° C es reversible hasta concentraciones de urea de 1,2 M y de guanidina 0,72 M; pero si la temperatura es de 55° C resulta irreversible o parcialmente reversible para todas las concentraciones ensayadas.

La inhibición de ambos efectores es competitiva respecto al piruvato y no competitiva respecto a los demás sustratos. El NADH protege de la inhibición inducida por urea 2 M y 3 M y el efecto es nulo para el piruvato y el L-lactato. El contacto LDH-NAD, en ausencia de lactato, da lugar a la formación de un complejo estable inactivo, en el que no se elimina el cofactor tras 24 horas de diálisis.

Los fármacos antirreumáticos ácido salicílico y fenilbutazona son inhibidores reversibles de

la LDH y actúan por competencia con los cofactores NAD o NADH, siendo la inhibición de carácter no competitivo respecto al piruvato y al L-lactato.

Bibliografía

1. APPELLA, E. y MARKERT, C. L.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **6**, 171, 1961.
2. BRODY, I. A.: *Nature*, **201**, 685, 1962.
3. CAHN, R. D., KAPLAN, N. O., LEVINE, L. y ZWILING, E.: *Science*, **136**, 962, 1962.
4. CHILSON, O. P., COSTELLO, L. A. y KAPLAN, N. O.: *J. Molec. Biol.*, **10**, 349, 1964.
5. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173, 1963.
6. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188, 1963.
7. CORTÉS, A. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **28**, 297, 1972.
8. CORTÉS, A. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 131, 1973.
9. DAWKINS, E. D., GOULD, B. J., STURMAN, J. A. y SMITH, M. J. H.: *J. Pharm. and Pharmacol.*, **19**, 355, 1967.
10. DI SABATO, G. y KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1072, 1965.
11. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **25**, 275, 1969.
12. DOMINGO, E., BOZAL, J. y CALVET, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **26**, 9, 1970.
13. HARDY, S. M.: *Nature*, **206**, 933, 1965.
14. HINES, W. J. W. y SMITH, M. J. H.: *Nature*, **201**, 192, 1964.
15. JAENICKE, R. y PFLEIDERER, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 615, 1962.
16. KONTTINEN, A. y LINDY, S.: *Nature*, **208**, 782, 1965.
17. LINDY, S. y KONTTINEN, A.: *Nature*, **209**, 79, 1966.
18. MARÍN, A. C., MARTÍN-ESTEVE, J. y CALVET, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **20**, 165, 1964.
19. PLUMMER, D. T., WILKINSON, J. H. y WITCOMBE, W. A.: *Biochem. J.*, **89**, 48 P, 1963.
20. RAJAGOPALAN, K. V. y HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097, 1967.
21. WITCOMBE, W. A., PLUMMER, D. T. y WILKINSON, J. H.: *Biochem. J.*, **94**, 384, 1965.