

## Malicodeshidrogenasas citoplasmática y mitocondrial de hígado de pollo

J. Baró, A. Cortés y J. Bozal

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química  
Barcelona

(Recibido el 28 de junio de 1974)

J. BARO, A. CORTES and J. BOZAL. *Cytoplasmic and Mitochondrial Malicdehydrogenases of Chicken Liver*. Rev. esp. Fisiol., 30, 241-248. 1974.

Chicken liver cytoplasmic (MDH-s) and mytocondrial (MDH-m) malicdehydrogenases appear to be in the forms of the four and of the three possible isoenzymes, respectively. The optimum pH for MDH-s lies between 6.9-7.5 and that of MDH-m between 7.3-7.7; the activity of the first mentioned enzyme considerably diminishes with alkaline pH, whereas the activity of the second one decreases in the acid zone.

The optimum temperature of both MDHs is 50° C; at higher temperatures, MDH-m becomes almost totally inactive whilst MDH-s partially retains its activity.

MDH-s shows two  $K_m$  (O.A.A.) values ( $[NADH] = 1.4 \times 10^{-4}$  M) that are of the order of  $10^{-5}$  M and  $10^{-4}$  M respectively, and in both cases, the general mechanism of the catalysis is sequential.

MDH-m does not show this particular feature, and its action seems to be adjusted to a ping-pong mechanism, thus differing from mytocondrial enzymes from other sources.

The real parameters of the enzyme systems calculates by using the Vestling-Florini and Dalziel methods are as follows: MDH-s:  $K_m$  (O.A.A.) =  $2.45 \times 10^{-5}$  M;  $K_m$  (NADH) =  $1.3 \times 10^{-5}$  M;  $K_{OAA-NADH} = 0.93 \times 10^{-9}$  M<sup>2</sup> when the O.A.A. are smaller than  $7 \times 10^{-5}$  M, whereas when the O.A.A. are higher than  $7 \times 10^{-5}$  M, the values the obtained are:  $K_m$  (O.A.A.) =  $3.15 \times 10^{-4}$  M;  $K_m$  (NADH) =  $1.18 \times 10^{-5}$  M and  $K_{OAA-NADH} = 1.21 \times 10^{-8}$  M<sup>2</sup>.

The real parameters of the MDH-m are:  $K_m$  (O.A.A.) =  $5.4 \times 10^{-5}$  M;  $K_m$  (NADH) =  $6.04 \times 10^{-5}$  M and  $K_{OAA-NADH} = 0$ . Oxalacetate inhibits MDH-m non-competitively by excess of substrate (when [O.A.A.] is greater than  $1.2 \times 10^{-4}$  M), and shows to be an acompetitive inhibitor of the MDH-s (when [O.A.A.] higher the  $1.2 \times 10^{-3}$  M), determined, in both cases, with respect to NADH.

La malicodeshidrogenasa (E.C.1.1.1.37) se encuentra localizada en las fracciones citoplasmática (MDH-s) y mitocondrial (MDH-m) de la célula (5, 8, 14) de una gran variedad de órganos y su distribu-

ción varía con el origen (12). Ambas MDH aparecen en forma de isoenzimas, si bien no existe unanimidad sobre su número (8, 16, 17) ni acerca de las subunidades constituyentes (8, 10, 13).

En el presente trabajo se comparan las MDH-s y MDH-m de hígado de pollo, se determinan los valores de  $pH$  y de temperatura óptimos, efectuándose el estudio de la estabilidad térmica y respecto al  $pH$  de ambas MDH. Mediante electroforesis sobre soporte de poliacetato de celulosa se ponen de manifiesto la existencia de diversas formas isozímicas de aquéllas.

El estudio cinético de la reacción catalizada por ambas MDH, con oxalacetato y NADH como sustratos permite asignar un mecanismo general de reacción, en cada caso, y efectuar el cálculo de las correspondientes concentraciones saturantes y los parámetros cinéticos reales por aplicación de los métodos propuestos por ALBERTY (1), DALZIEL (3), VESTLING-FIORINI (6) y de las predicciones teóricas formuladas por CLELAND (2). El método de DALZIEL (*loc. cit.*) nos ha permitido interpretar la inhibición provocada por concentraciones elevadas de oxalacetato sobre las dos MDH en estudio.

Los resultados obtenidos ponen de relieve notables diferencias en el comportamiento cinético de ambas MDH, que inducen a la realización de posteriores estudios que permitan la adecuada definición de la MDH de ambas procedencias.

### Material y métodos

Como material enzimático se han empleado homogeneizados de hígado de pollo, obtenidos por trituración del órgano en un homogeneizador Potter-Elvehjem a 4° C, en un medio isotónico de sacarosa 0,25 M en la proporción de 1/5 (g de órgano/ml).

Las fracciones mitocondrial y soluble se separaron por centrifugación diferencial del homogeneizado, siguiendo las técnicas de HOGEBOM-SCHNEIDER (7) y KUMAR (9).

La MDH-m se extrajo suspendiendo, con agitación constante, la fracción mitocondrial obtenida (carente de MDH-s contaminante, que fue eliminada por su-

cesivos lavados con sacarosa 0,25 M) en tampón de fosfatos ( $PO_4H_2Na/PO_4HNa_2$ ) 50 mM  $pH$  7,4. La suspensión se centrifugó a 20.000 g durante 30 minutos a -3° C y la MDH-m se recuperó en el sobrenadante.

Los estudios cinéticos se efectuaron con preparados, de ambas fracciones, sometidos a una purificación parcial mediante el tratamiento siguiente: La MDH-s se calentó a 50° C y la MDH-m a 45° C, durante 30 minutos con agitación constante; al final del intervalo la disolución se enfrió rápidamente por inmersión en baño de hielo y se centrifugó a 5.000 r.p.m., 30 minutos, a -3° C.

Los sobrenadantes obtenidos se llevaron al 40 % de saturación en  $(NH_4)_2SO_4$  (243 g/l), se mantuvieron a 4° C durante una hora y se centrifugaron a 5.000 r.p.m., 30 minutos, a -3° C; el precipitado obtenido carece de actividad MDH. El sobrenadante se llevó al 80 % de saturación de sulfato amónico por adición de 285 g/l, y el precipitado obtenido, que contiene la actividad MDH, se separó por centrifugación del modo indicado.

Los sustratos utilizados son ácido oxalacético (O.A.A.) (Fluka) y NADH (Boehringer).

La identificación electroforética de los posibles isoenzimas de ambas MDH se realizó sobre tiras de poliacetato de celulosa (poliphor) y el revelado se efectuó con un revelador específico de MDH (16) que contiene 1,5 ml de disolución de malato sódico 2 M, 1,8 mg de NAD, 0,6 mg de metasulfato de fenazina, 1 mg de sal de tetrazolio (N.B.T.) y 23,3 ml de tampón tris-HCl 0,1 M de  $pH$  8,5.

La determinación del  $pH$  óptimo de actuación de los enzimas en estudio se efectuó por disolución de los distintos reactivos en tampón tris-fosfatos (sal sódica)-KCl 0,142 M en el intervalo de  $pH$  comprendido entre 5,5 y 9,5.

En los estudios cinéticos se emplearon disoluciones enzimáticas en el tampón de fosfatos antes descrito que se adicionaron

a cubetas de 1 cm, que contenían ya los substratos, completando un volumen final de 3 ml, midiéndose las velocidades iniciales de reacción, a  $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$ , en un espectrofotómetro Beckman DBG provisto de inscriptor, por el cambio de la densidad óptica a 340 nm que experimenta el NADH empleado como dador electrónico.

### Resultados

**Ensayos electroforéticos.** Se sometieron a electroforesis las disoluciones de MDH-s y MDH-m obtenidas por el método de centrifugación diferencial de los homogeneizados ya indicado (7, 9), y se preparó una disolución de las mismas en el tampón de fosfatos (sal sódica) en la proporción de 1/5 (P/v).

El revelado de las tiras se efectuó con el revelador específico (*loc. cit.*) y en los ferogramas obtenidos se observa que la MDH-s exhibe cuatro bandas (fig. 1a) atribuibles a cuatro posibles isoenzimas. La MDH-m, por su parte, se presenta en forma de tres bandas (fig. 1b). Resultados análogos se han obtenido con los preparados parcialmente purificados de ambas fracciones.

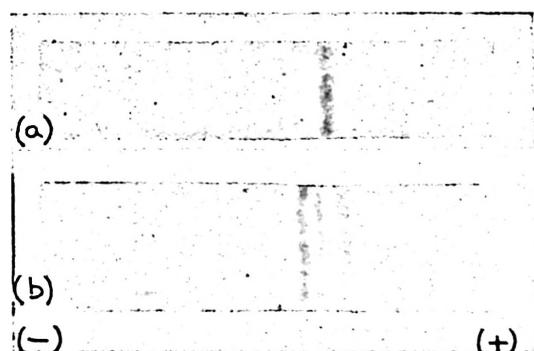


Fig. 1. Isoenzimas de la malicodeshidrogenasa de hígado de pollo. a) citoplasmática; b) mitocondrial. Homogeneizados 1/5 (P/v) en poliphor; 5-6  $\mu\text{l}$ ; 220 voltios/centímetros; 2-3 horas.

**Determinación del pH óptimo de las MDH-s y MDH-m.** El establecimiento del pH óptimo de actuación de las MDH-s y MDH-m presentes en los homogeneizados de hígado de pollo se ha efectuado en un medio de tampón tris-fosfatos-KCl (0,142 M), ya mencionado, en el intervalo de valores de pH comprendidos entre 5,5 y 9,5.

La actividad MDH se ha determinado en todos los casos con O.A.A.  $6 \times 10^{-5} \text{M}$  y NADH  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ , iniciándose la reacción por adición de 0,5 ml de la disolución enzimática. 1/5.000 (P/v) (MDH-s) o 1/1.000 (P/v) (MDH-m), ajustada al correspondiente pH.

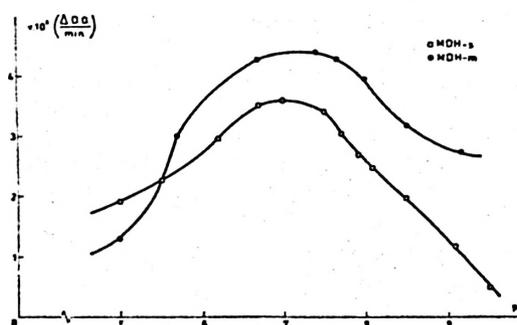


Fig. 2. pH óptimo de las MDH con oxalacetato y NADH como substratos.

En la figura 2 puede observarse que la MDH-s presenta una zona de máxima actividad cuando el pH está comprendido entre 6,7 y 7,5 y que la velocidad decrece más rápidamente en la región alcalina que en la ácida.

La MDH-m muestra su máxima actividad cuando el pH se halla comprendido entre 7 y 8 y es sensiblemente menor en la zona de pH ácido.

Un estudio análogo, efectuado en medio tamponado de fosfatos (sal sódica) 50 mM, en el intervalo de pH comprendido entre 5,7 y 8,2 indicó que el pH óptimo de actuación de la MDH-s se halla situado aproximadamente entre 6,9 y 7,5 y el de la MDH-m lo está entre 7.3

y 7,7, valores concordantes con los obtenidos utilizando el tampón tris-fosfatos-KCl.

La actividad de ambas enzimas, mantenidos hasta dos horas en el intervalo de pH reseñado (5,5-9,5), es constante y la menor actividad observada en la zona alcalina de pH se recupera casi por completo al llevar el enzima a su pH óptimo; cuando el pH inicial es ácido, no se observa recuperación de la actividad.

*Temperatura óptima de las MDH-s y MDH-m.* La determinación de la temperatura óptima de actuación de ambas MDH, procedentes de homogeneizados de hígado, se llevó a cabo a pH 7,4 (tampón fosfatos-sal sódica 50 mM).

Los reactivos, previamente ambientados a las distintas temperaturas en estudio, comprendidas entre 30 y 70° C, se introducen en la cubeta espectrofotométrica a la misma temperatura; se añaden 2,5 ml de la mezcla de los substratos O.A.A. y NADH cuyas concentraciones finales serán de  $1 \times 10^{-4}$  M.

La reacción se inicia por vertido de 0,5 ml de la disolución enzimática 1/10.000 g/ml MDH-s) y 1/2.500 g/ml (MDH-m) que se halla a idéntica temperatura. La temperatura óptima de ambas MDH es de 50° C, y de la observación de las curvas puede deducirse que la MDH-m es más termolábil (fig. 3).

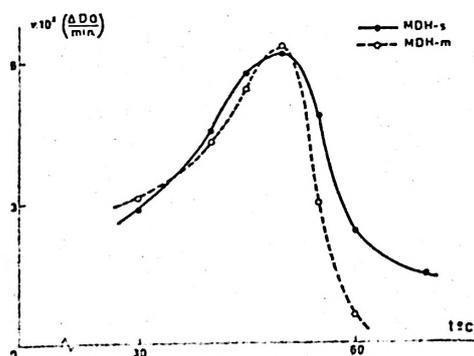


Fig. 3. Temperatura óptima de las MDH con oxalacetato y NADH como substratos.

La actividad de ambas enzimas mantenidos hasta 30 minutos en el intervalo de temperaturas de 30-50° C (MDH-s) y de 30-45° C (MDH-m) es prácticamente constante; si las temperaturas de calefacción son superiores, se observa una pérdida paulatina y creciente de la actividad, la cual no se recupera al atemperar de nuevo las disoluciones enzimáticas a 30° C.

*Cinética de actuación de la MDH-s con O.A.A. y NADH como substratos.*

Los efectos que provocan distintas concentraciones de O.A.A. sobre la actividad de la MDH-s parcialmente purificada, en presencia de una concentración constante y saturante de NADH de  $1,4 \times 10^{-4}$  M aparecen en la figura 4, donde se observa la existencia de dos rectas con una inflexión correspondiente a una concentración de oxalacetato de  $7 \times 10^{-5}$  M. La recta correspondiente a concentraciones inferiores posee una  $K_m$  de  $3,75 \times 10^{-5}$  M, mientras que a la obtenida con concentraciones superiores le corresponde un valor de  $K_m$  de  $1,18 \times 10^{-4}$  M. El fenómeno se observa también al trabajar con la MDH-s presente en la fracción soluble de los homogeneizados de hígado.

En el estudio de la cinética de actuación de la MDH-s en las dos zonas citadas, se ha trabajado, en primer lugar, con concentraciones variables de O.A.A. (inferiores a  $7 \times 10^{-5}$  M) y de NADH, en

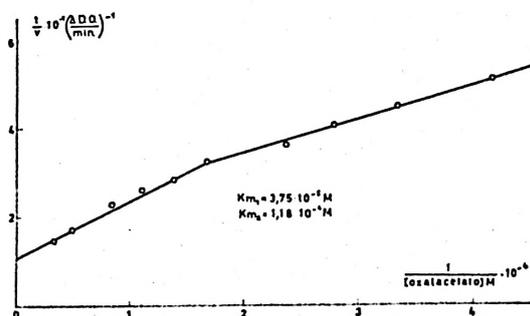


Fig. 4. Variación de la  $K_m$  (OX) con la concentración de oxalacetato en MDH-s.

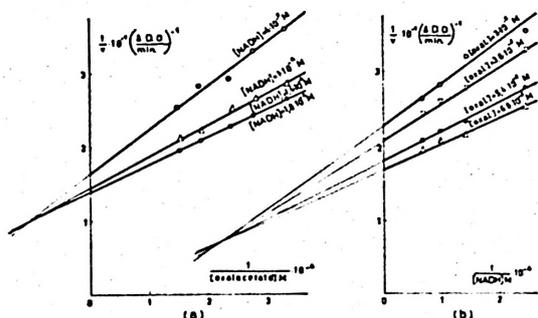


Fig. 5. Velocidades iniciales de reacción del sistema OX-MDH-s-NADH a bajas concentraciones de oxalacetato.

cuyas condiciones se han determinado las velocidades iniciales de reacción, empleando un preparado parcialmente purificado de MDH-s. En la representación de Lineweaver-Burk (fig. 5) se obtienen rectas no paralelas 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. Resultados análogos (fig. 6) se obtienen cuando se opera con concentraciones variables de NADH y de O.A.A. superiores a  $7 \times 10^{-5}$  M.

De acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (2), el hecho de que la concentración de uno de los sustratos afecte a la pendiente e intersección de las rectas obtenidas respecto al otro sustra-

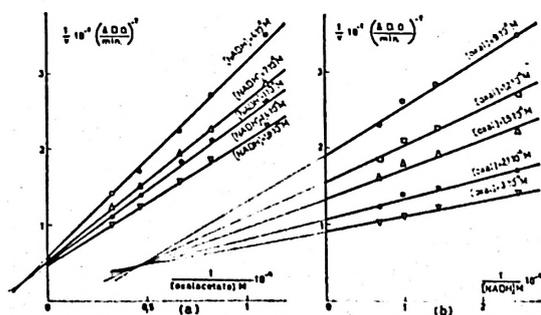


Fig. 6. Velocidades iniciales de reacción del sistema OX-MDH-s-NADH a altas concentraciones de oxalacetato.

to es un indicio de que la reacción transcurre según un mecanismo general de tipo secuencial en el que la adición de todos los sustratos es previa a la liberación de los productos de la reacción.

*Cinética de actuación de la MDH-m con O.A.A. y NADH como sustratos.* Para establecer el comportamiento cinético de la MDH-m se ha trabajado con preparados parcialmente purificados y concentraciones variables de los sustratos oxalacetato y NADH.

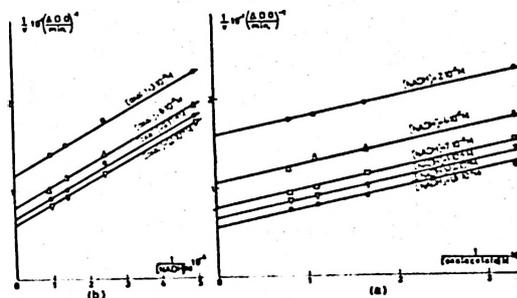


Fig. 7. Velocidades iniciales de reacción del sistema OX-MDH-m-NADH.

La representación de Lineweaver-Burk (fig. 7) da lugar a rectas paralelas, es decir, la variación en la concentración de uno de los sustratos modifica únicamente la intersección de las rectas obtenidas con respecto al otro sustrato. De acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (2) la MDH-m parece que se adapta a un mecanismo general de tipo ping-pong en el cual se produce la liberación de algún producto de la reacción antes de que hayan interactuado todos los sustratos. Resultados análogos se obtienen con la MDH-m presente en extractos mitocondriales sin purificar.

*Parámetros cinéticos reales de los sistemas O.A.A.-MDH-s (MDH-m)-NADH.* Para definir con mayor exactitud los sistemas enzimáticos descritos en este trabajo se ha determinado el valor de los

Tabla I. Parámetros cinéticos reales de la reacción catalizada por la MDH.

	OAA-MDH-s NADH		[[OAA] <7 × 10 <sup>-5</sup> M]		OAA-MDH-s NADH		[[OAA] >7 × 10 <sup>-5</sup> M]		OAA-MDH-m-NADH	
	VESTLING FLORINI	DALZIEL	VESTLING FLORINI	DALZIEL	VESTLING FLORINI	DALZIEL	VESTLING FLORINI	DALZIEL	VESTLING FLORINI	DALZIEL
V <sub>m</sub> (ΔDO/min)	8 × 10 <sup>-2</sup>	8 × 10 <sup>-2</sup>	2,38 × 10 <sup>-1</sup>	2,38 × 10 <sup>-1</sup>	2,44 × 10 <sup>-1</sup>	2,44 × 10 <sup>-1</sup>	2,44 × 10 <sup>-1</sup>	2,44 × 10 <sup>-1</sup>	2,44 × 10 <sup>-1</sup>	2,44 × 10 <sup>-1</sup>
K <sub>M</sub> (O.A.A.) M	2,4 × 10 <sup>-5</sup>	2,5 × 10 <sup>-5</sup>	3,21 × 10 <sup>-4</sup>	3,09 × 10 <sup>-4</sup>	5,48 × 10 <sup>-5</sup>	5,36 × 10 <sup>-5</sup>	5,48 × 10 <sup>-5</sup>	5,36 × 10 <sup>-5</sup>	5,48 × 10 <sup>-5</sup>	5,36 × 10 <sup>-5</sup>
K <sub>M</sub> (NADH) M	1,35 × 10 <sup>-5</sup>	1,27 × 10 <sup>-5</sup>	1,23 × 10 <sup>-3</sup>	1,13 × 10 <sup>-3</sup>	6,17 × 10 <sup>-5</sup>	5,90 × 10 <sup>-5</sup>	6,17 × 10 <sup>-5</sup>	5,90 × 10 <sup>-5</sup>	6,17 × 10 <sup>-5</sup>	5,90 × 10 <sup>-5</sup>
K <sub>(OAA-NADH)</sub> M <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>-9</sup>	0,87 × 10 <sup>-9</sup>	1,22 × 10 <sup>-3</sup>	1,20 × 10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	0

parámetros cinéticos reales de la reacción catalizada por ambas malicodeshidrogenasas por aplicación de los métodos de VESTLING-FLORINI (*loc. cit.*) y de DALZIEL (*loc. cit.*), lo que ha permitido obtener el valor de la velocidad máxima de reacción para concentraciones enzimáticas de 1/7.500 g/ml (MDH-s) y de 1/2.500 g/ml (MDH-m), así como el cálculo de las constantes de Michaelis de los sustratos

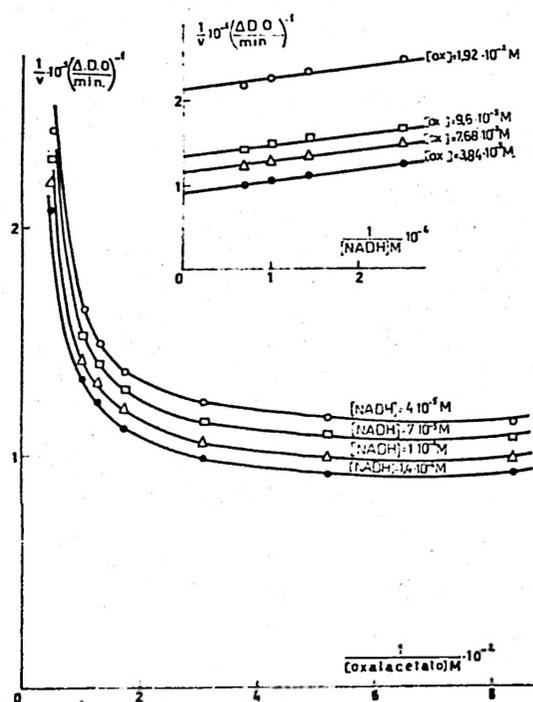


Fig. 8. Inhibición por sustrato en el sistema oxalacetato-MDH-s-NADH.

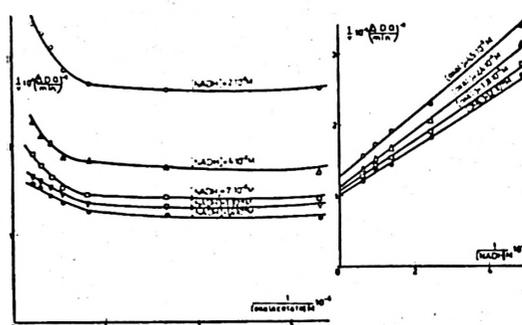


Fig. 9. Inhibición por sustrato en el sistema OX-MDH-m-NADH.

implicados en la reacción enzimática y de la constante  $K_{OAA-NADH}$ , que equivale 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; dicha constante es característica de los mecanismos secuenciales ya que en los mecanismos ping-pong su valor es cero (tabla I).

*Inhibición por exceso de O.A.A. de las MDH-s y MDH-m.* Trabajando con preparados parcialmente purificados de ambos enzimas hemos determinado la magnitud de la inhibición reversible provocada por un exceso de oxalacetato frente a diversas concentraciones de NADH, por aplicación del método de DALZIEL (*loc. cit.*) desarrollado teóricamente para sistemas birreactantes.

Con la MDH-s (fig. 8) se observa que las concentraciones de oxalacetato superiores a  $1,2 \times 10^{-3}$  M provocan la inhi-

bición del enzima por exceso del sustrato que crece al aumentar la concentración de oxalacetato y es de naturaleza acompetitiva respecto al cofactor.

En la MDH-m la inhibición por sustrato se manifiesta para concentraciones de éste superiores a  $1,2 \times 10^{-4}$  M (fig. 9) y es de naturaleza no competitiva respecto al cofactor; es decir, el NADH y el oxalacetato — inhibidor — no se unen al mismo centro activo sino a *locus* distintos, aunque relacionados.

### Discusión

La actividad malicodeshidrogenásica de hígado de pollo se halla localizada fundamentalmente en las fracciones celulares soluble (MDH-s) y mitocondrial (MDH-m) y ambas aparecen en forma de cuatro y de tres posibles isoenzimas, respectivamente.

El pH óptimo de actuación de la MDH-s está localizado entre 6,9-7,5 y el de la MDH-m entre 7,3-7,7, que muestran gran analogía, si bien la zona de pH óptimo correspondiente a la MDH-m es algo más básica en concordancia con lo observado con la MDH-m de otros orígenes (4, 8). La diferencia más acusada entre ambas MDH estriba en que la MDH-s posee una actividad sensiblemente menor a pH alcalino que a pH ácido, mientras que para la MDH-m ocurre el fenómeno inverso.

La temperatura óptima de actuación de ambas MDH es de 50° C, si bien a temperatura superior el descenso de la actividad enzimática es mucho más acusado en la MDH-m; el enzima mitocondrial es más termolábil que el citoplasmático, en concordancia con lo descrito para la MDH de otras procedencias (8).

El cálculo de las velocidades iniciales de reacción efectuado con la MDH-s y diferentes concentraciones de O.A.A. y una concentración constante de NADH ( $1,4 \times 10^{-4}$  M) conduce, en la representación de Lineweaver-Burk, a la obtención de dos rectas con un punto de inter-

sección que corresponde a una concentración de oxalacetato de  $7 \times 10^{-5}$  M; a cada una de ellas corresponde un valor de  $K_m$  diferente, del orden de  $10^{-5}$  M y  $10^{-4}$  M, respectivamente. La MDH-m no muestra dicha particularidad en condiciones análogas.

A su vez, la MDH-s se adapta a un mecanismo general de tipo secuencial, como se demuestra al trabajar con concentraciones variables de NADH y de oxalacetato (inferiores y superiores a  $7 \times 10^{-5}$  M), de acuerdo con lo descrito por otros autores para la MDH-s de otras procedencias (15) que indican se adapta a un mecanismo secuencial ordenado. Sin embargo, los estudios efectuados con MDH-m han permitido poner de manifiesto que su mecanismo general parece que es de tipo ping-pong, en lo que difiere de la MDH-m de otros orígenes (11, 15).

El distinto comportamiento cinético observado, que será objeto de una próxima investigación, puede ser indicio de la existencia de diferencias estructurales o de constitución en los centros activos de ambas enzimas.

El O.A.A. en exceso es inhibidor reversible de ambas MDH. La inhibición, respecto al cofactor, es acompetitiva en la MDH-s ( $[O.A.A.] > 1,2 \times 10^{-3}$  M, saturante) no competitiva con la MDH-m ( $[O.A.A.] > 1,2 \times 10^{-4}$  M, saturante); decrece en la última al aumentar la concentración del cofactor, sugiriendo que éste y el exceso de sustrato concurren en *locus* diferentes aunque muy próximos o relacionados.

### Resumen

La malicodeshidrogenasa citoplasmática de hígado de pollo (MDH-s) y la mitocondrial (MDH-m) aparecen en forma de cuatro y de tres posibles isoenzimas, respectivamente. El pH óptimo de la MDH-s se halla entre 6,9-7,5 y el de la MDH-m entre 7,3-7,7, en tanto que la actividad de la primera disminuye sensiblemente a pH alcalino, la de la segunda lo hace en la zona ácida.

La temperatura óptima de actuación de ambas MDH es de 50° C; a temperaturas superiores la MDH-m se inactiva casi totalmente, mientras que la MDH-s conserva parcialmente su actividad.

La MDH-s muestra dos valores de  $K_m$  (O.A.A.) ( $[NADH] = 1,4 \times 10^{-1}$  M) que son del orden de  $10^{-3}$  M y  $10^{-4}$  M, respectivamente, y en ambos casos el mecanismo general es secuencial. La MDH-m no muestra dicha particularidad y parece se adapta a un mecanismo ping-pong y en ello se diferencia del enzima mitocondrial de otros orígenes.

Los parámetros reales de los sistemas enzimáticos calculados mediante los métodos de Vestling-Florini y de Dalziel son para la MDH-s:  $K_m$  (O.A.A.) =  $2,45 \times 10^{-5}$  M;  $K_m$  (NADH) =  $1,31 \times 10^{-5}$  M;  $K_{OAA-NADH} = 0,93 \times 10^{-9}$  M<sup>2</sup>, siendo las  $[O.A.A.] < 7 \times 10^{-5}$  M, mientras que si las  $[O.A.A.]$  son superiores a  $7 \times 10^{-5}$  M los valores obtenidos son:  $K_m$  (O.A.A.) =  $3,15 \times 10^{-1}$  M;  $K_m$  (NADH) =  $1,18 \times 10^{-5}$  M y  $K_{OAA-NADH} = 1,21 \times 10^{-8}$  M<sup>2</sup>.

Los parámetros reales de la MDH-m son:  $K_m$  (OAA) =  $5,42 \times 10^{-5}$  M;  $K_m$  (NADH) =  $6,04 \times 10^{-8}$  M y  $K_{OAA-NADH} = 0$ .

El oxalacetato inhibe no competitivamente a la MDH-m por exceso de sustrato. ( $[O.A.A.] > 1,2 \times 10^{-4}$  M), y es inhibidor acompetitivo. ( $[O.A.A.] > 1,2 \times 10^{-3}$  M), de la MDH-s, determinado en ambos casos respecto al NADH.

### Bibliografía

1. ALBERTY, R. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1928, 1953.
2. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 1963.
3. DALZIEL, K.: *Acta. Chem. Scand.*, **11**, 1706, 1957.
4. DUPOURQUE, D. y KUN, E.: En «Methods in Enzymology». Vol. XIII. Academic Press, New York, 1969, pág. 116.
5. ENGLARS, S.: En «Methods in Enzymology». Vol. XIII. Academic Press, New York, 1969, pág. 123.
6. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575, 1957.
7. HOGEBOOM, G. H., SCHENEIDER, W. C. y STRIEBICH, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 111, 1952.
8. KITTO, G. B. y KAPLAN, N. O.: *Biochemistry*, **5**, 3966, 1966.
9. KUMAR, S., TEWARY, K. K. y KRISHNAN, P. S.: *Biochem. J.*, **95**, 797, 1965.
10. MANN, K. G. y VESTLING, G. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 567, 1968.
11. RAVAL, D. N. y WOLFE, R. G.: *Biochemistry*, **1**, 1112, 1962.
12. SCHMIDT, E. y SCHMIDT, F. W.: *Klin. Wschr.*, **38**, 957, 1960.
13. SIEGEL, L.: *Biochemistry*, **6**, 2261, 1967.
14. SIEGEL, L. y ENGLAND, S.: En «Methods in Enzymology». Vol. XIII. Academic Press, New York, 1969, págs. 99.
15. SILVERSTEIN, E. y SULEBELE, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 297, 1969.
16. THORNE, C. J. R., GROSSMAN, L. I. y KAPLAN, N. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 193, 1963.
17. YAKULIS, W. I., GIBSON, C. W. y HELLER, P.: *Am. J. Clin. Path.*, **38**, 378, 1962.