

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Biológicas.



TESIS DOCTORAL

**Isoenzimas de láctico-deshidrogenasa : regulación
metabólica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Enrique Meléndez Hevia

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

SECCION DE BIOLOGICAS

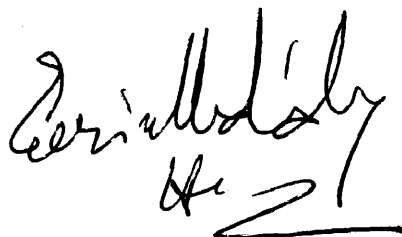
ISOENZIMAS DE LACTICO-DESHIDROGENASA
Regulación Metabólica

*MEMORIA que para optar al
grado de Doctor en Ciencias
Biológicas presenta
ENRIQUE MELENDEZ HEVIA
Madrid, noviembre 1972*

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor, Dr. D. Angel Martín Municio. A él va dirigido mi agradecimiento en primer lugar, por su valiosa y extensa ayuda en la realización experimental y en la interpretación de los resultados, así como por el interés que mostró desde el principio por este tema.

También deseo expresar mi gratitud a mis compañeros del Departamento de Bioquímica por la ayuda que me han prestado siempre que ha sido necesaria durante el desarrollo de este trabajo.

Madrid, noviembre, 1972

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angel Martín Municio', with a stylized flourish underneath.

INDICE GENERAL

PáginaINTRODUCCION

1. Regulación de las reacciones enzimáticas. Proyección biológica	1
1.1. Concepto de isoenzimas.....	1
1.2. Regulación enzimática y regulación por isoenzimas	2
Regulación de la biosíntesis de proteínas.....	3
Regulación de la actividad enzimática.....	4
Compartimentalización.....	5
Regulación por isoenzimas.....	7
Aspártico-kinasa.....	7
Biosíntesis de compuestos aromáticos.....	10
Isoenzimas y Filogenia.....	12
Otras isoenzimas.....	14
2. Láctico-deshidrogenasa (LDH)	
2.1. Actividad enzimática y situación metabólica.....	16
2.2. Heterogeneidad estructural. Isoenzimas de LDH....	20
Naturaleza de las isoenzimas de LDH.....	21
Estructura cuaternaria.....	23
Diferencias entre los monómeros A y B.....	23
Actividad del tetramero y recombinación de monó- meros.....	24
Microheterogeneidad.....	27
2.3. Estudios cinéticos	
Especificidad.....	29
Afinidad por sustratos.....	30
Inhibición por sustratos.....	32
Efecto de modificadores.....	37
Actividad con análogos de coenzimas.....	43
Efecto de la temperatura.....	46
2.4. Ontogenia y Filogenia.....	49
2.5. Patología.....	57

3. Introducción experimental	
3.1 Establecimiento de la heterogeneidad estructural del sistema enzimático LDH.....	60
3.2 Técnicas de revelado y valoración de isoenzimas....	60
Sales de Tetrazolio.....	60
Nitro-Blue-Tetrazolio.....	64
Fenazina-Metosulfato.....	64
Discusión de las técnicas de revelado de isoenzimas	
3.3 Técnicas de electroforesis para la separación de isoenzimas.....	66
Electroforesis en papel.....	67
Electroforesis en bloque de almidón.....	69
Electroforesis en Acetato de Celulosa.....	69
Electroforesis en gel de Agar.....	70
Electroforesis en gel de Almidón.....	71
Electroforesis en gel de Poliacrilamida.....	73
Otras técnicas para la separación de isoenzimas....	76
Discusión de las técnicas de separación de isoenzimas	76
Proyección de estas técnicas para el estudio de otras isoenzimas.....	78
<u>OBJETIVOS</u>	80
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
1. Reactivos	81
2. Animales de experimentación	
2.1. Especies.....	82
2.2. Dieta y condiciones de mantenimiento.....	82
2.3. Tratamiento.....	82
Gestación	83
Administración de Insulina	83
Toma de muestras	83
2.4. Extracción de órganos y tejidos	83
3. Electroforesis	
3.1. Composición del gel de Poliacrilamida	85
Efectos reguladores y estudios cinéticos	85
Microheterogeneidad	87
3.2. Desarrollo	87
3.3. Revelado	90
4. Valoración cuantitativa de la actividad de isoenzimas de LDH	93
5. Técnicas complementarias	95

	<u>Página</u>
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	
1. Microheterogeneidad de las isoenzimas de LDH	97
2. Estudios cinéticos de las isoenzimas de LDH	100
2.1. Cerebro de rata	100
2.2. Músculo esquelético de rata	120
2.3. Efecto del ATP sobre la cinética de LDH	
3. Efectos de distintos estados fisiológicos sobre las isoenzimas de LDH	142
4. Isoenzimas de LDH y desarrollo de órganos y tejidos	152
<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	156
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	158

I N T R C D U C C I O N

1. REGULACION DE LAS REACCIONES ENZIMATICAS. PROYECCION BIOLOGICA

1.1. CONCEPTO DE ISOENZIMAS

En los años 1950-52 se estableció la heterogeneidad estructural del sistema enzimático Láctico-Deshidrogenasa (LDH) en tejidos animales. Este descubrimiento introdujo el conocimiento de las isoenzimas. En la actualidad, la documentación existente sobre las mismas nos permite concretar el concepto de isoenzimas y determinar cuatro características implícitas en el mismo que, en la medida de nuestros conocimientos, se cumplen en todos los sistemas isoenzimáticos de los que se tiene suficiente información. Dichas características hacen referencia a las propiedades siguientes:

Actividad catalítica

El conjunto de isoenzimas pertenecientes al mismo sistema catalizan la misma transformación metabólica.

Heterogeneidad estructural

Las isoenzimas presentan entre sí una heterogeneidad estructural más o menos ostensible, que precisará de técnicas más o menos finas para ponerse de manifiesto. Asimismo, dicha heterogeneidad podrá tener mayor o menor alcance: desde una estructura primaria completamente distinta, hasta diferencias en pocos restos de aminoácidos. De todas estas posibilidades tiene especial importancia aquélla basada en la estructura cuaternaria del sistema enzimático.

Actividad específica

Cada una de las isoenzimas de un sistema presenta distinta actividad cuantitativa que se manifiesta en distintas afinidades por los sustratos, ligandos etc., así como en distinta velocidad de reacción.

Regulación metabólica

Si bien la actividad catalítica de un sistema isoenzimático se debe a la conjunción de efectos que ofrece la totalidad de las isoenzimas, su heterogeneidad estructural se manifiesta en la distinta actividad específica aludida antes. El resultado es que las isoenzimas de un mismo sistema manifestarán distintos efectos reguladores individuales cuando el medio contenga unas concentraciones determinadas de sustratos, cofactores, ligandos etc. La actividad total del sistema enzimático será la resultante de la actividad específica de cada isoenzima, con lo que así se obtiene una actividad catalítica diversamente controlada.

De acuerdo con esto podemos definir las isoenzimas como un conjunto de enzimas que, exhibiendo heterogeneidad estructural, poseen la misma actividad catalítica aunque con distinta actividad específica y comportando diferentes fenómenos de regulación metabólica.

1.2. REGULACION ENZIMATICA Y REGULACION POR ISOENZIMAS

El DNA codifica la información genética hasta la biosíntesis de proteínas y controla su propia función de transcripción. El modelo de Jacob y Monod (1961) pone de manifiesto este sistema de regulación mediante el cual los productos finales de una serie de reacciones enzimáticas reprimen la biosíntesis de las enzimas implicadas.

Por este sistema se controla la actividad del DNA a nivel de transcripción aunque no la actividad enzimática. Esta depende de otros mecanismos de regulación que ofrecen aspectos muy variados, entre ellos la retroinhibición.

Indudablemente, la retroinhibición constituye un mecanismo más efectivo de controlar las reacciones enzimáticas, si acaso, más rápido, pero en el entorno celular hay otros mecanismos de regulación de los que podemos enumerar algunos ejemplos. Veamos antes el alcance de los dos sistemas aludidos.

1.2.1. Regulación de la biosíntesis de proteínas

La regulación a este nivel ofrece dos aspectos: inducción y represión. La inducción de la biosíntesis de las proteínas se ejerce por un efecto alostérico del sustrato de la reacción enzimática, o del sustrato inicial de una serie de reacciones, sobre una proteína (de-represora) cuya biosíntesis codifica un gen regulador.

La represión de la biosíntesis de proteínas se ejerce por un efecto alostérico del producto final de una serie de reacciones metabólicas sobre una proteína represora. Esto origina el represor activo, el cual reprime la transcripción y se condiciona a muy corto plazo el bloqueo de la biosíntesis de todas las enzimas implicadas en la biosíntesis del producto final.

En principio, el sistema de control inducción-represión controla sólo la biosíntesis del mRNA. En el caso de la inducción, la biosíntesis del mRNA condiciona ya la biosíntesis inmediata de proteínas, pero en el caso de la represión, el bloqueo de la transcripción no es condición inmediata del bloqueo de la traducción. Esta está sujeta a la vida media de los mRNA. Sin embargo, en la práctica, el procedimiento es muy efectivo ya que se tienen datos suficientes que dan cuenta de que esta vida media es muy corta.

Puede concluirse, pues, que el control de la transcripción, en ambos casos, determina a muy corto plazo el control de la biosíntesis de proteínas.

No obstante, la represión de la biosíntesis de enzimas no detiene la actividad de las que estuvieran presentes. Para conseguir un control efectivo de esta actividad habría que considerar dos puntos.

1. La vida media de las enzimas; 2. Otros mecanismos de regulación que afecten directamente a la actividad enzimática.

Al contrario de lo que ocurre con los mRNA, la vida media de las enzimas es lo suficientemente larga como para que pueda ejercer un efecto considerable sobre la permanencia de su actividad. Hay que insistir, sin embargo, sobre la naturaleza de la otra posibilidad: la regulación de la actividad enzimática.

1.2.2. Regulación de la actividad enzimática

Este mecanismo de control se ejerce por cambios conformacionales en la estructura terciaria de enzimas que se presentan bajo niveles estructurales cuaternarios. Estos cambios, inducidos por efectos alostéricos tienen como consecuencia modificaciones en la actividad enzimática. Dichas alteraciones pueden ser positivas o negativas, según que la enzima se active o se inhiba por acción de un producto que provoca el cambio de conformación.

Hay diversos esquemas de regulación en el metabolismo que ilustran estos mecanismos. Como norma general, la acción reguladora se ejerce sobre una enzima que, o bien se activa por sustratos anteriores o bien se inhibe por el producto final de todo el proceso. El bloqueo de la primera reacción de la serie condiciona el bloqueo inmediato de todo el proceso, cualesquiera que sean los efectos reguladores que puedan ejercerse sobre el resto de las enzimas y un resultado contrario se tiene si se trata de activación.

En el metabolismo de hidratos de carbono (glicolisis-gluconeogénesis), en el ciclo tricarboxílico, lipogénesis, metabolismo de aminoácidos, bases púricas y pirimidínicas etc. existen abundantes ejemplos de este sistema de retroinhibición.

Es interesante hacer notar, y especialmente frente al caso que nos ocupa, cómo en el proceso glicolisis-ciclo tricarboxílico, el verdadero producto final, el ATP, actúa como inhibidor, lo que constituye norma general de control entre la relación biosíntesis-degradación.

Los niveles altos de ATP inhiben la degradación y activan la biosíntesis mientras que ocurre lo contrario con los niveles de ADP. La relación ATP/ADP mantiene el equilibrio entre biosíntesis y degradación lo que constituye, en realidad, una abstracción de todo el mecanismo regulador, aplicable a la mayoría de los procesos. En la figura siguiente se presenta un esquema metabólico que ilustra este sistema de regulación.

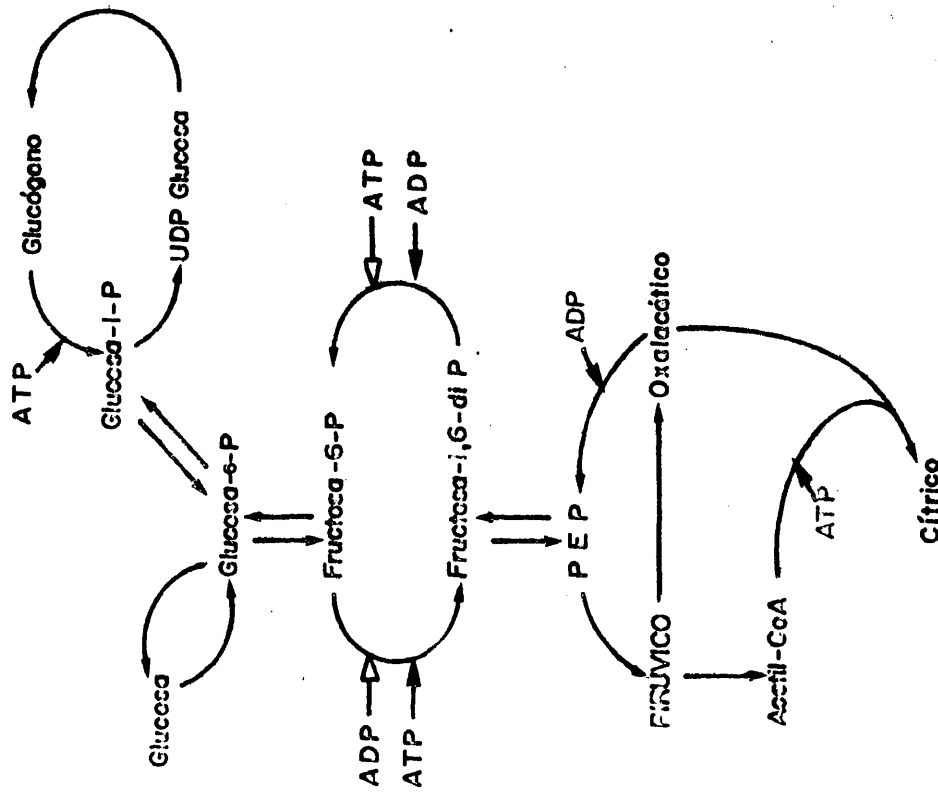
De igual forma, la relación NAD^+/NADH representa el dato informativo más preciso de las condiciones de aerobiosis del entorno celular. También esta relación gobierna varios procesos que pueden coincidir con los de biosíntesis-degradación señalados antes, o que pueden utilizarse para dirigir el metabolismo por rutas más apropiadas, de acuerdo con los niveles disponibles de estos cofactores. En la figura de la página siguiente se expone un esquema ilustrativo de este sistema de regulación.

En el caso del sistema enzimático que nos ocupa veremos cómo estos cofactores ejercen una acción de control sobre la actividad de la LDH que es, realmente, el mecanismo con que cuentan las células de vertebrados para adaptarse a condiciones anaerobias.

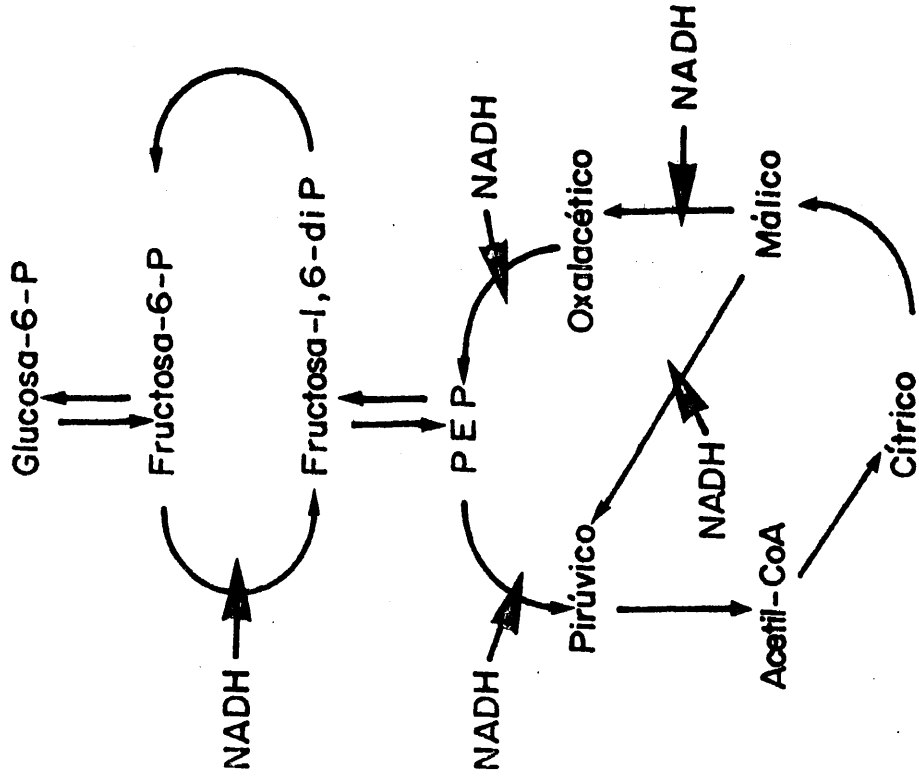
1.2.3. Efecto de las Biomembranas en la Regulación.

Compartimentalización

Para que transcurra la reacción enzimática no es suficiente que haya tenido lugar la biosíntesis de la enzima y tampoco que ésta se encuentre activada. Es necesario, asimismo, que no existan barreras de permeabilidad entre la enzima y los sustratos. Quizá el ejemplo más llamativo nos lo proporcionen los lisosomas, en el interior de los cuales se encuentran las enzimas digestivas separadas de los sustratos citoplásmicos por las membranas y que no pueden actuar sobre ellos hasta que se destruya esta barrera. Así se controla la autólisis celular, pero existen muchos más ejemplos, tanto a nivel de orgánulos como a nivel orgánico: las membranas mitocondriales constituyen sendas barreras de permeabilidad para determinados sustratos como el NADH,



Regulación de Glicólisis y Gluconeogénesis por ATP/ADP. El ATP inhibe el proceso de degradación y activa el de biosíntesis. El ADP actúa de forma contraria.



Esquema metabólico general de regulación metabólica por NADH. Este cofactor se comporta, generalmente, inhibiendo los procesos degradativos, aunque algunos de sus efectos pueden tener otros significados.

el oxalacético, el Acetil-CoA, los ácidos grasos... Algunos compuestos cuentan con un mecanismo específico de transformación para que sea posible su permeabilidad (las acil-carnitinas), otros carecen del mismo y han de ser transformados en otra sustancia permeable (el ácido málico); en este último caso, la enzima responsable del proceso controla la permeabilidad del sustrato aunque de forma indirecta.

A nivel orgánico, todos los procesos de secreción seguidos del transporte inmediato de dichas sustancias (hormonas etc.) constituyen ejemplos ilustrativos de este tipo de control en el cual una estirpe celular procede a la biosíntesis de una proteína o de un compuesto regulador y otra estirpe celular es la receptora del mismo, modificando su actividad al recibirlo mediante los sistemas de transporte.

1.2.4. Regulación por isoenzimas

La intervención de las isoenzimas en el control del metabolismo ha abierto nuevas perspectivas en las posibilidades de regulación con que cuenta la célula y ha contribuido a la comprensión de la existencia de los sistemas isoenzimáticos. Varios ejemplos clásicos se pueden aportar sobre este punto. Comentaremos dos de ellos: las tres Aspártico-Quinasas de Escherichia coli y las isoenzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos aromáticos.

Isoenzimas de Aspártico-Kinasa.-En Escherichia coli se han descrito tres Aspártico-Kinasas, denominadas respectivamente I, II y III. Este sistema isoenzimático cataliza la reacción de fosforilación en β del ácido aspártico. Se trata, en realidad, de una β -aspártico-Kinasa que cataliza la reacción



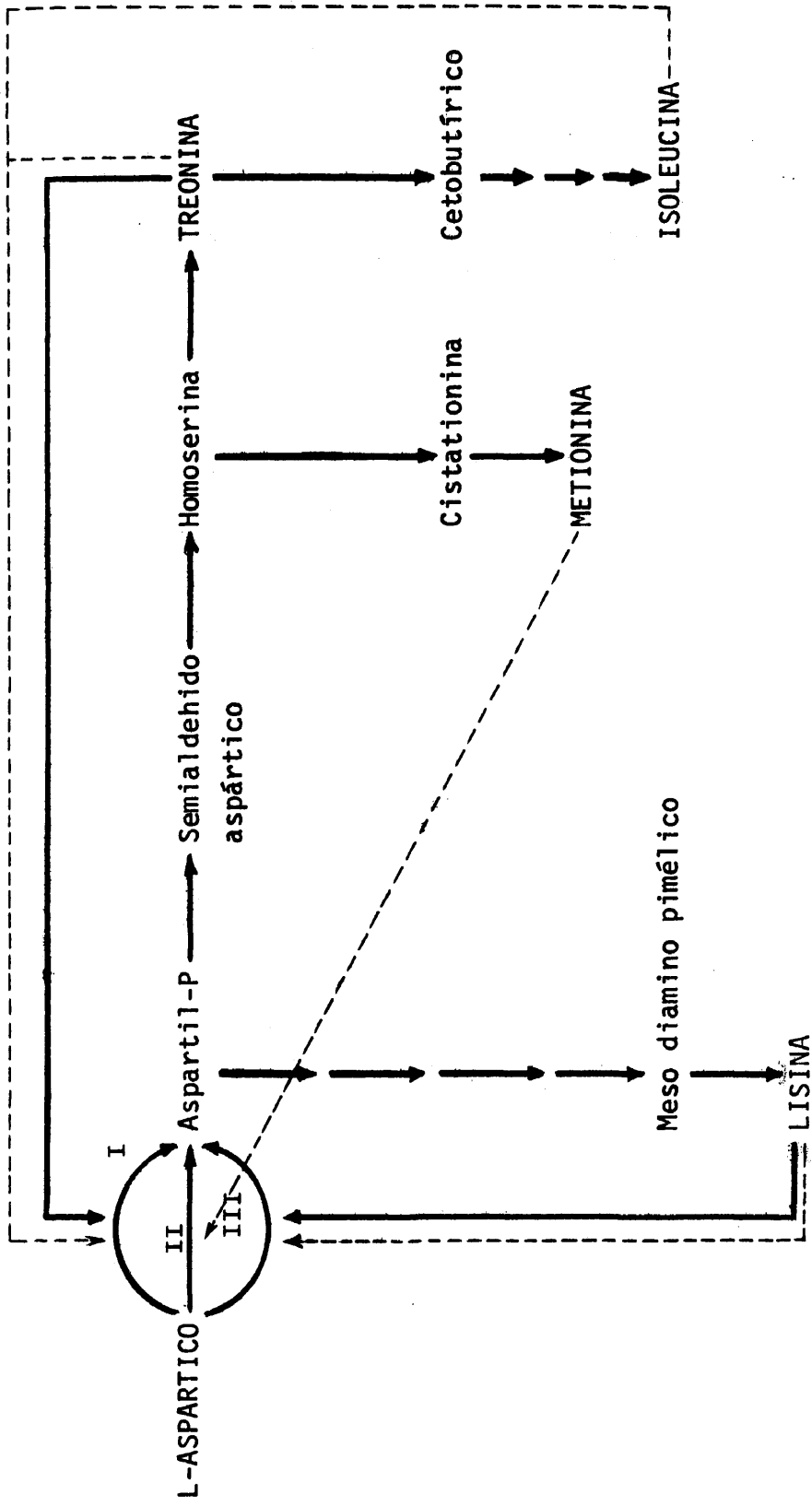
A continuación, el aspartil-P se reduce por NADPH para dar β -semialdehído-aspártico. Esta enzima, β -semialdehído-aspártico-deshidrogenasa no está sometida a regulación por retroinhibición, pero a partir de aquí se divergen dos rutas metabólicas: una que conduce

a la biosíntesis de Lisina por la vía del ácido diamino-pimélico y otra que conduce a la formación de Homoserina. Esta segunda ruta se bifurca a partir de aquí en otras dos: la primera rinde metionina y la segunda rinde sucesivamente Treonina e Isoleucina.

En la página siguiente se expone un esquema de estas vías de transformación metabólica, en E. coli así como los mecanismos de control a que están sometidas las enzimas implicadas. Lo interesante de este esquema metabólico, frente al caso que nos ocupa es el hecho significativo de que la actividad del primer sistema enzimático implicado en el conjunto de procesos, Aspártico-Kinasa, presente tres formas distintas; está, por tanto, constituido por tres isoenzimas que, como veremos a continuación, comportan distintos fenómenos de regulación. Nos hallamos, pues, ante un ejemplo muy ilustrativo de un control del metabolismo que se lleva a cabo mediante los distintos efectos reguladores que se ejercen sobre las isoenzimas.

De acuerdo con los datos de que se dispone en la actualidad, las tres isoenzimas manifiestan distintos efectos reguladores en cuanto a su biosíntesis. Así, la Aspártico-Kinasa I está reprimida en su biosíntesis por la acción conjunta de Treonina e Isoleucina (Cohen y Patte, 1963); la isoenzima II, por Metionina (Patte et al, 1967) y la isoenzima III por Lisina (Stadtman et al, 1961; Truffa-Bachi y Cohen, 1961; Cohen y Patte, 1963).

Pero además, en cuanto a la regulación de la actividad enzimática de cada una de estas tres isoenzimas, existen también distintos efectos reguladores; así, la isoenzima Aspártico-Kinasa-I se inhibe en presencia de Treonina, la isoenzima -III, en presencia de Lisina y la isoenzima -II no manifiesta efectos de inhibición alostérica. El resultado de todos estos fenómenos de control metabólico se puede imaginar observando el esquema de la página siguiente donde se representan ambos tipos de efectos reguladores.



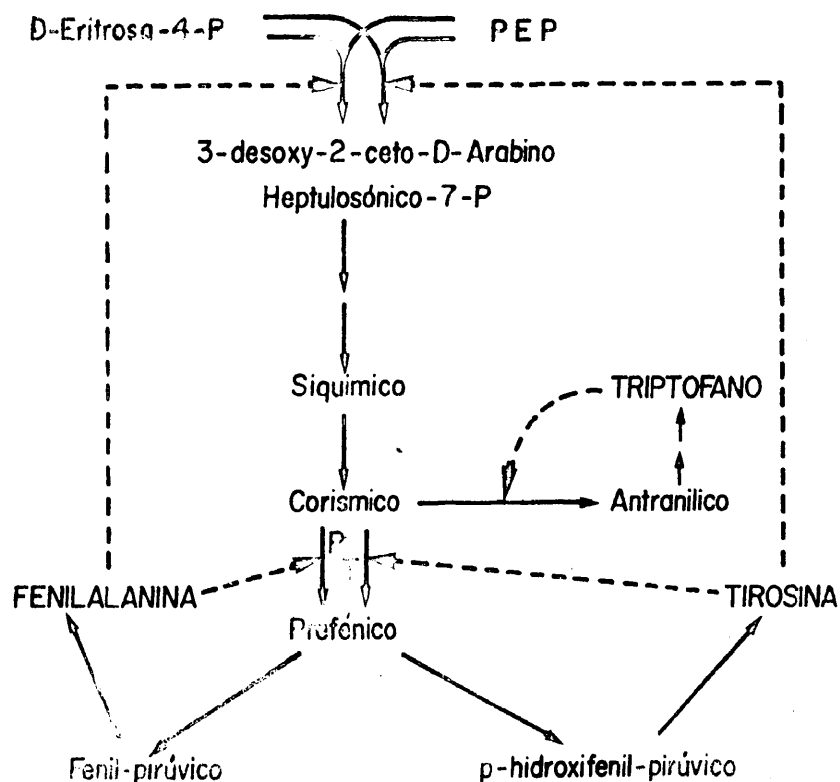
Regulación de la biosíntesis de Lisina, Metionina, Treonina e Isoleucina en E. coli.
 Las flechas de línea con trazo continuo indican inhibición de la actividad enzimática,
 y las de trazo discontinuo indican represión de la biosíntesis de las enzimas.

Biosíntesis de compuestos aromáticos.-La Biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Tirosina, Fenilalanina y Triptófano, especialmente) en Bacterias, que se inicia a partir del Fosfoenol-pirúvico (PEP) y de la D-Eritrosa-4-P, constituye también un ejemplo muy representativo de rutas metabólicas controladas mediante la intervención de sistemas isoenzimáticos. En la primera figura de la página siguiente se expone un esquema de estas rutas biosintéticas en las que dos de los sistemas enzimáticos implicados presentan distintas formas moleculares (isoenzimas).

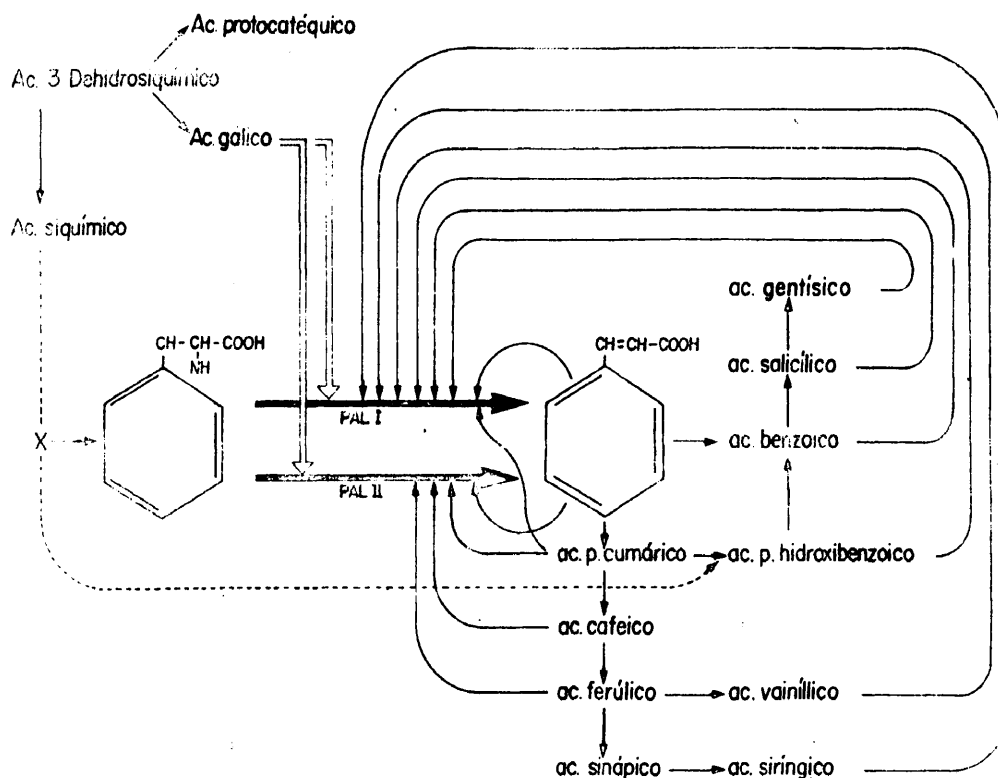
El primer sistema enzimático de toda la serie de reacciones, 3-Desoxi-D-Arabino-Heptulosónico-7-P-Sintetasa, consta de dos isoenzimas con distintos comportamientos reguladores. En efecto, una isoenzima se inhibe por la acción de Fenilalanina y la otra por la acción de Tirosina. Como puede comprenderse, observando el esquema aludido, la divergencia de rutas metabólicas que se establece a partir del ácido Prefénico y que va a resultar en la biosíntesis de Tirosina o Fenilalanina, tiene asimismo implicaciones distintas en el control de la primera reacción. (Doy y Brown, 1965).

Un hecho análogo ocurre con el sistema enzimático Corísmico-Mutasa, que comprende dos isoenzimas, P y T (Cotton y Gibson, 1965). Cada una de estas isoenzimas están sometidas igualmente a un control de tipo alostérico pero diferencial en cuanto a la acción de Fenilalanina y Tirosina, como está expuesto en la misma figura.

Continuando con este proceso metabólico de Biosíntesis de Compuestos aromáticos, es de notar una nueva intervención de las isoenzimas como mecanismo de regulación en la biosíntesis de los ácidos cinámicos y benzoicos. En las hojas de Quercus pedunculata Coexisten dos formas de Fenilalanina-Amoniaco-Liasa (PAL). Estas dos isoenzimas se distinguen por su pH óptimo de actividad y sobre todo, por sus propiedades alostéricas. Los productos finales de la reacción (ácidos cinámico y p-Cumárico) ejercen una retroinhibición sobre ambas isoenzimas pero una de ellas se muestra particularmente sensible a la acción inhibitoria de los ácidos benzoicos mientras que la otra



Regulación de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Las flechas puntadas indican inhibición por productos finales sobre la actividad enzimática.



Regulación de la biosíntesis de ácidos benzoicos y cinámicos. También en este caso la presencia de isoenzimas amplía las posibilidades de control.

lo es a la de los ácidos cinámicos (Boudet et al, 1971). En la segunda figura de la página anterior se presenta un esquema del proceso en el que se detallan los fenómenos reguladores de inhibición sobre cada una de las dos isoenzimas.

1.2.5. Isoenzimas y Filogenia

Las distribuciones isoenzimáticas se han utilizado con criterios filogenéticos en numerosas especies. Quizá la Láctico-Deshidrogenasa ha sido la enzima más estudiada en este sentido; de ello hablaremos más adelante, pero asimismo se han realizado estudios similares sobre otros sistemas tales como Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, otras deshidrogenasas, quinasas etc.

En lo que respecta a la Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-P-DH) Kamada y Hori (1970) han realizado un estudio suficientemente amplio como para poder sacar conclusiones importantes en cuanto a la distribución de sus isoenzimas en tejidos de una gran variedad de especies, desde levaduras hasta Mamíferos con varios representantes de cada grupo. Entre los resultados y las conclusiones de estos autores está el establecimiento de cuatro isoenzimas del sistema G-6-P-DH denominadas respectivamente I-A, I-B, II y III así como el establecimiento de sus respectivas afinidades por sustratos y distribución en la escala filogenética. Dichas isoenzimas ofrecen distinta afinidad por el sustrato y mientras que el tipo I es específica de la Glucosa-6-P, los tipos II y III lo son además de otros sustratos: la Galactosa-6-P y la desoxi-Glucosa-6-P, respectivamente. En cuanto a su distribución en los distintos grupos zoológicos, es de notar que las isoenzimas del tipo I se presentan en Invertebrados, donde no existen las restantes, mientras que en Vertebrados están presentes tan sólo las isoenzimas I-A, II y III. Puede observarse, por tanto, que aquellas isoenzimas realmente específicas de la Glucosa-6-P son más características de grupos zoológicos poco evolucionados mientras que en los demás, donde, por otra parte, coexisten más variedades, la reacción de deshidrogenación se puede llevar a cabo sobre un número mayor de sustratos.

En lo que respecta a estudios filogenéticos realizados sobre otros sistemas isoenzimáticos, los esquemas metabólicos discutidos anteriormente de la biosíntesis de aminoácidos derivados del aspártico y de los aminoácidos aromáticos, ha planteado un campo interesante en el que se pueden relacionar los distintos efectos reguladores (entre ellos, regulación por isoenzimas) con la escala filogenética.

La biosíntesis de Isoleucina, Treonina, Lisina y Metionina, aminoácidos que derivan del Aspártico está controlada, en Bacterias, en gran medida, a nivel del sistema enzimático Aspártico-Kinasa, pero en los distintos grupos de bacterias, esta regulación se realiza por diferentes mecanismos: en el grupo de bacterias entéricas, Escherichia coli y Salmonella typhimurium, está basada en distintos efectos de control sobre las isoenzimas, mientras que en las especies de Bacillus, a excepción de B. licheniformis, donde se ha descrito una retroinhibición secuencial, la regulación se ejerce por retroinhibición concertada. Asimismo, en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, la regulación en Escherichia y Salmonella se lleva a cabo por isoenzimas, mientras que en Bacillus hay un mecanismo dominante de retroinhibición secuencial y es realmente notable, que en dos grupos distintos de organismos, dos rutas independientes de biosíntesis exhiben mecanismos similares de control.

1.2.6. Otras isoenzimas

Después del descubrimiento de la heterogeneidad estructural de la Láctico-deshidrogenasa (LDH) se determinaron, análogamente, múltiples formas en otros sistemas enzimáticos. Además de las isoenzimas mencionadas anteriormente conviene llamar la atención sobre algunas que han tenido diversas proyecciones en cuanto a regulación del metabolismo, análisis clínicos, filogenia etc.

Málico-deshidrogenasa.-Vesell y Bearn (1958) establecieron la heterogeneidad estructural de este sistema enzimático mediante electroforesis en bloque de almidón de muestras de suero humano. Así, estos autores determinaron tres fracciones. Quizá una de las características más interesantes de la heterogeneidad de este sistema enzimático sea el hecho analizado por Wieland et al (1959) de la existencia de dos tipos de isoenzimas de Málico-deshidrogenasa, uno intramitocondrial y otro citoplásmico. La presencia de estos dos tipos de isoenzimas da cuenta de las rutas metabólicas del ácido oxalacético dentro y fuera de la mitocondria ya que el málico es permeable a sus membranas (Kaplan, 1961).

Isocítrico-deshidrogenasa.- Los tejidos de rata contienen tres o cuatro isoenzimas (Tsao, 1960; Bell y Baron, 1962). En tejidos humanos hay discrepancia en este punto. El análisis de estas isoenzimas en suero se ha utilizado con criterios diagnósticos, especialmente para el reconocimiento de enfermedades cardíacas (White, 1960) y hepáticas (Campbell y Moss, 1962).

Otras deshidrogenasas.-Se han realizado estudios sobre otros sistemas de este tipo. Así, la 6-Fosfo-Glucónico-deshidrogenasa (Fildes y Parr (1963); Glutámico-deshidrogenasa (Doherty, 1962). Kaplan (1963) ha revisado los estudios de otros autores sobre varias deshidrogenasas analizando las técnicas de separación y diversas proyecciones filogenéticas.

Transaminasas.-El sistema enzimático Glutámico-Oxalacético-Transaminasa (GOT) ha sido uno de los más estudiados. Su distribución isoenzimática en suero se ha utilizado extensamente con gran valor diag-

nóstico, especialmente en infartos de miocardio y en hepatitis (Wróblewski, 1957 y otros autores).

Las fosfatasas séricas (ácida y alcalina) también presentan heterogeneidad estructural; su estudio se ha llevado a cabo utilizando diversas técnicas cromatográficas y electroforéticas y también, en gran medida con finalidad diagnóstica. En cuanto a su distinta distribución en tejidos humanos, es de notar que existen diferencias cuantitativas y cualitativas, especialmente en lo que atañe a las fosfatasas alcalinas (Chiandussi et al, 1962).

También se ha determinado heterogeneidad estructural en otras enzimas tales como Aliesterasas (Augustinsson (1961), Colinesterasas (Ord y Thompson (1951), Arilesterasas (Augustinsson, 1958), Aminopeptidasas (Lawrence et al, 1960) etc.

0525049035

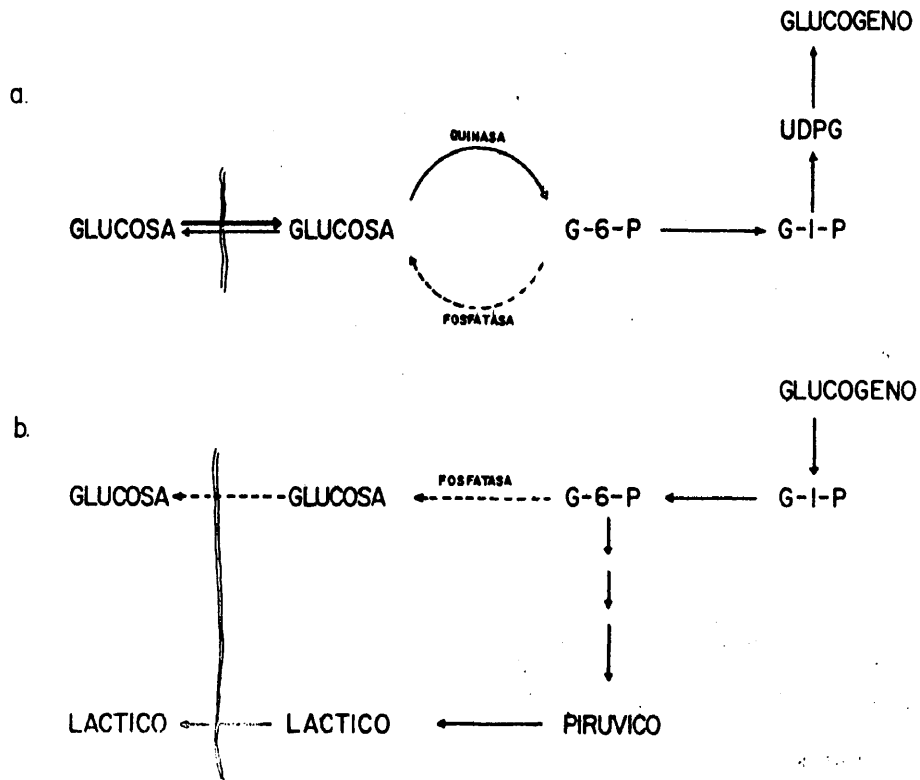
2. LACTICO-DESHIDROGENASA (LDH)

2.1. ACTIVIDAD ENZIMATICA Y SITUACION METABOLICA

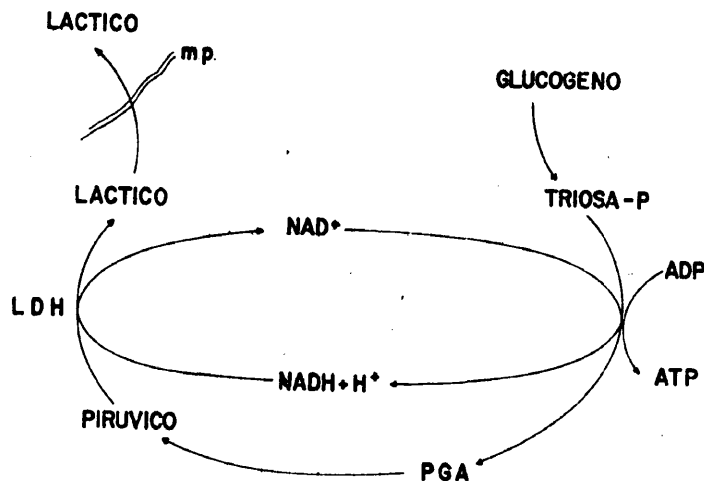
El sistema enzimático Láctico-Deshidrogenasa (L-lactato:NAD⁺ óxido-reductasa, EC 1.1.1.27), o más abreviadamente LDH, cataliza la transformación reversible L-láctico→pirúvico, utilizando el NAD⁺ como cofactor. Está ampliamente distribuido en animales, especialmente en Mamíferos, donde se halla presente en la mayoría de los órganos y tejidos. En la Cohorte Glires (Rodentia y Lagomorpha) abunda especialmente, por lo que quizá se ha estudiado esta enzima en ellos con mayor extensión.

Es preciso considerar la situación metabólica del sistema enzimático que nos ocupa para proceder al estudio de la influencia de su acción catalítica, así como los condicionamientos de su regulación. La transformación pirúvico-láctico corresponde a la etapa final de la glicolisis en el músculo estriado y otros tejidos. Esta reacción, acoplada con la deshidrogenación del gliceraldehido-3-fosfato permite la fosforilación del ADP a ATP aún cuando esté bloqueada la cadena respiratoria, en condiciones de hipoxia etc. Por esto, al proceso en general se le ha dado en llamar Glicolisis anaerobia. En la figura de la página siguiente se expone un esquema abreviado de este proceso metabólico.

Todo el proceso catabólico de la degradación del glucógeno está sometido a numerosas etapas de regulación que establecen un equilibrio entre glicolisis y gluconeogénesis. Las acciones reguladoras se realizan preferentemente sobre las quinasas y sobre las fosfatasas, pero hasta donde nos permite afirmar la documentación existente, al sistema LDH no se le atribuyen efectos reguladores específicos que puedan intervenir en el control general del proceso.



Dos momentos del metabolismo energético del músculo estriado,
 a) en reposo, glucogénesis. b) en ejercicio, glicólisis anaerobia, sobre la base de una cantidad de glucógeno acumulado anteriormente.



Esquema más detallado de la glicólisis anaerobia. La enzima Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa realiza su acción catalítica acoplada con la LDH, con lo que se mantienen los niveles de NAD

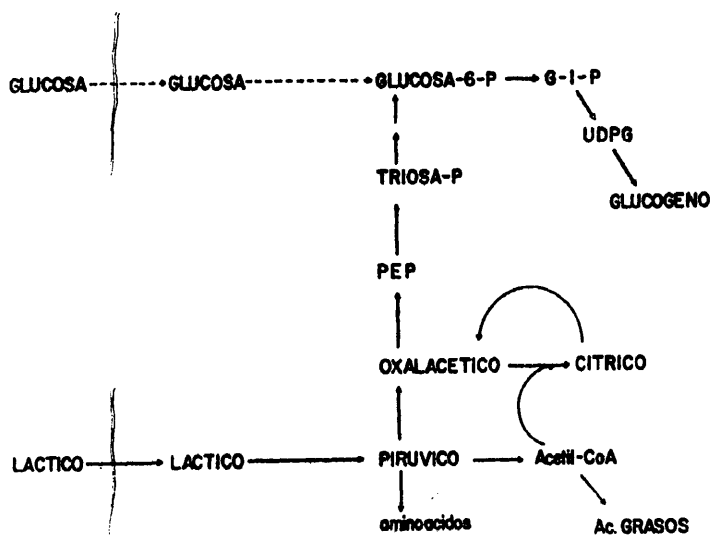
El ácido L-láctico, producto final de esta degradación, es, normalmente, excretado y transportado a otros tejidos donde puede utilizarse con distintos fines. En este punto, son de notar los conocimientos clásicos sobre la función del hígado cuyas células lo utilizan para proceder a la gluconeogénesis y las células del miocardio que lo utilizan como uno de los productos básicos del catabolismo. Pero además, el ácido L-láctico, puede utilizarse como punto de partida para la elaboración de otras sustancias tales como aminoácidos y ácidos grasos (véase la figura de la página siguiente).

Tenemos, por tanto, dos aspectos en la actividad catalítica del sistema LDH: la producción de ácido láctico y su consumo. Un hecho que merece señalarse en cuanto a la coordinación entre ambos procesos es el que tiene lugar entre hígado y músculo cuando éste realiza su formación a partir de glucógeno y aquél su utilización para la gluconeogénesis. El proceso constituye una de las partes del ciclo de Cori y se representa también en la página siguiente.

En este caso particular, las condiciones de regulación presentes en ambos tejidos son opuestas, y así, mientras que el músculo degrada glucógeno, el hígado lo biosintetiza y el sistema LDH cataliza en la fibra muscular la reacción en sentido pirúvico-láctico y en el hígado en sentido contrario.

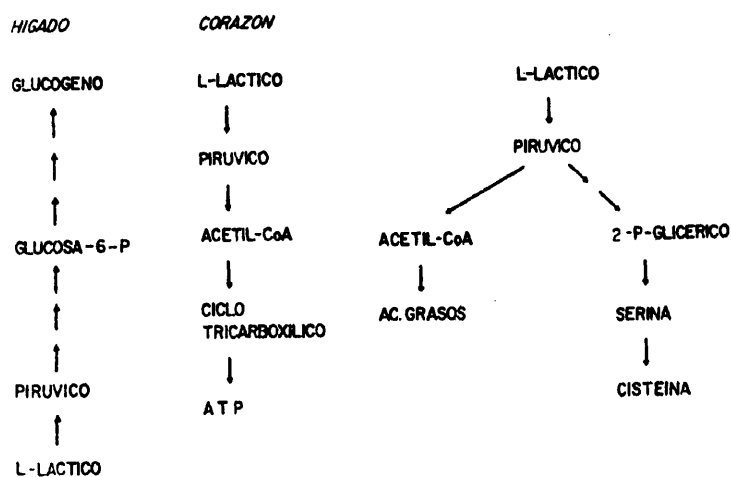
No obstante, después del ejercicio, el músculo esquelético procede a la degradación de cierta cantidad de ácido láctico endógeno con lo que se tiene entonces el esquema señalado antes para el miocardio, es decir, la LDH ejecuta su actividad catalítica en sentido contrario que unos minutos antes. Así tenemos que en este momento, las condiciones de regulación en la fibra muscular estriada cambian hasta tal punto que se invierte el sentido de la catálisis del sistema LDH.

Todos estos y muchos otros aspectos de la función metabólica de la LDH habría que considerar para comprender su total significado en el metabolismo y mucho se podría decir también acerca de los sustra-



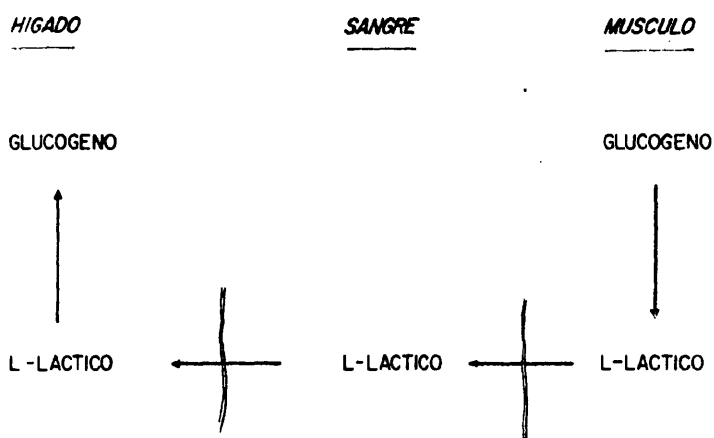
Diversas rutas metabólicas que puede seguir el ácido láctico.

Gluconeogénesis, integración en el Ciclo tricarboxílico, transformación en aminoácidos y biosíntesis de ácidos grasos.



Rutas más frecuentes del ácido láctico en determinados tejidos.

Hígado, gluconeogénesis
Miocardio, degradación
Adiposo, lipogénesis.



Un aspecto del Ciclo de Cori. Mientras que el músculo esquelético produce ácido láctico, el hígado procede a su consumo y la LDH cataliza la reacción en sentido inverso en cada uno de ambos órganos.

tos de la reacción, puesto que cuando esta enzima trabaja acoplada con la gliceraldehído-3-P-Deshidrogenasa, bien se podría considerar que el sustrato es el NADH, pues mediante la transformación de pirúvico en láctico se mantienen los niveles de NAD^+ y puede continuar la glicolisis en condiciones anaerobias.

2.2. HETEROGENEIDAD ESTRUCTURAL. ISOENZIMAS DE LDH

La heterogeneidad estructural del sistema enzimático Láctico-Deshidrogenasa se puso de manifiesto por Neilands (1952) y cinco años después, Wieland y Pfleiderer (1957) establecieron que la mayoría de los órganos de Mamíferos contienen cinco fracciones proteicas que exhiben actividad LDH (1)

A partir de entonces se investigó la posibilidad de que otros sistemas enzimáticos estuvieran compuestos también por varias isoenzimas. Enseguida se estableció análoga heterogeneidad estructural en otras deshidrogenasas (málico-deshidrogenasa, isocítrico-deshidrogenasa etc.) y posteriormente en transaminasas, fosfatasas aldolasas, quinasas etc.

Isoenzima	Composición de monómeros		Movilidad electroforética
	A-B	M-H	
LDH-5	A_4	M_4	cátodo
LDH-4	A_3B	M_3H	
LDH-3	A_2B_2	M_2H_2	
LDH-2	AB_3	MH_3	
LDH-1	B_4	H_4	ánodo

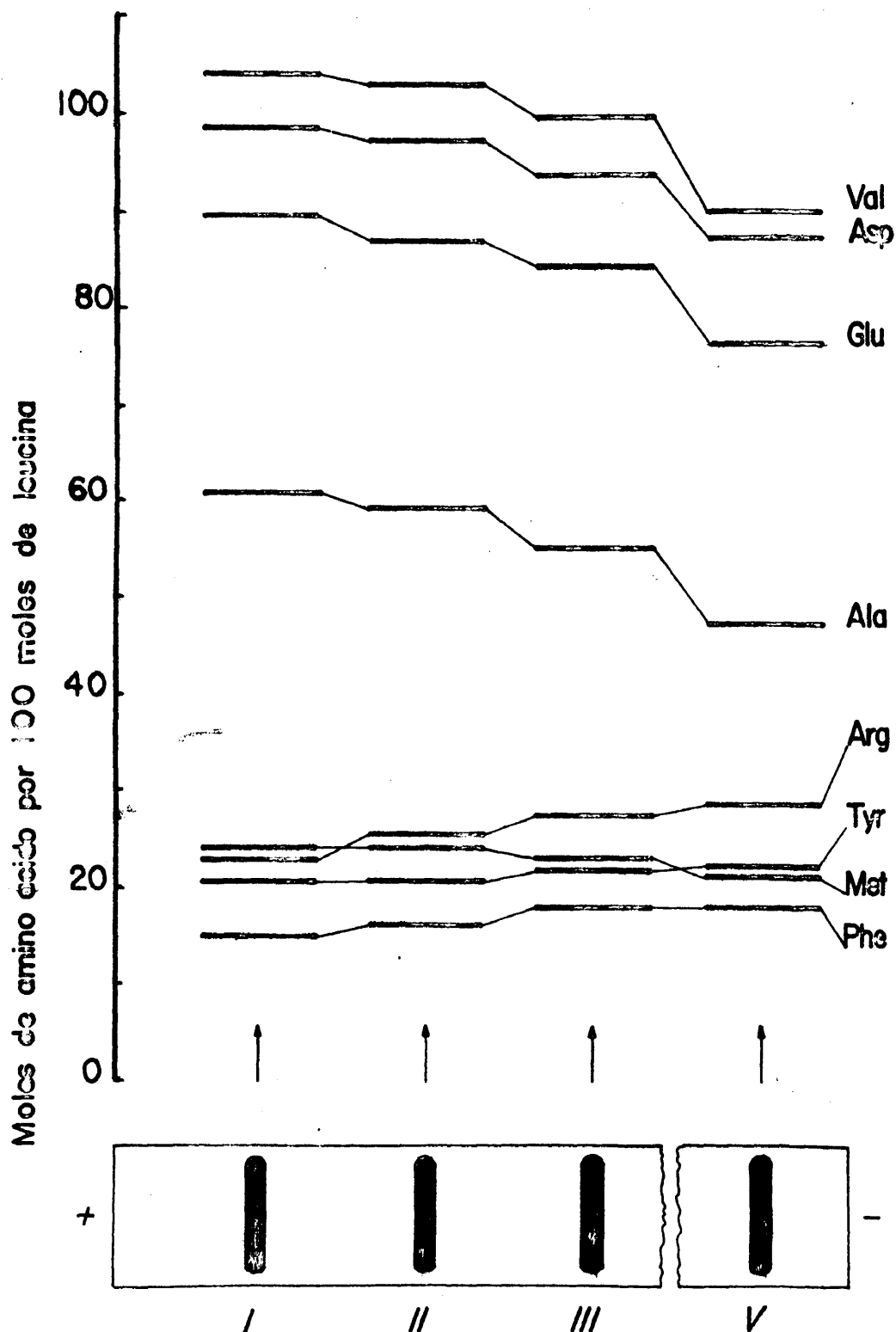
(1) A cada una de las cinco isoenzimas se acostumbra a asignar un número correlativo, de acuerdo con su movilidad electroforética anódica. Estos números se corresponden con la diferente composición en monómeros tal y como se detalla en la tabla donde se han expuesto las dos nomenclaturas (A-B y M-H con que se suele designar a los monómeros.

2.2.1. Naturaleza de las isoenzimas de LDH

En lo que respecta a la LDH, las investigaciones centradas en determinar la naturaleza de la heterogeneidad estructural tuvieron el siguiente desarrollo:

Raymond y Aurell (1962), después de separar las isoenzimas por electroforesis en gel de poliacrilamida hacen notar que dichas isoenzimas se distribuyen regularmente en los electroferogramas. Esto les hace concluir que debe existir una diferencia regular en la carga neta de cada una, lo que sugiere que la composición de aminoácidos de LDH-1 difiere de LDH-2 en igual magnitud que LDH-2 difiere de LDH-3 etc. Esta opinión está mantenida por las experiencias de Wieland, Pfleiderer y Rajewsky (1960): los péptidos que resultan de la digestión tróptica de muestras altamente purificadas de las cinco isoenzimas originan unos mapas que difieren de acuerdo con el origen de la isoenzima.

Wieland et al. (1960) observan una sorprendente similitud entre los mapas de péptidos de isoenzimas de LDH de corazón de buey y corazón de rata y establecen diferencias más pronunciadas entre los mapas de isoenzimas de músculo esquelético de rata y conejo. Por su parte, Wieland y Pfleiderer (1961) realizan hidrólisis más drásticas con HCl 6N seguidas de un análisis cuantitativo de aminoácidos y suministran evidencias de diferencias estructurales entre varias proteínas isoenzimáticas: La LDH-1 de corazón de rata, por ejemplo, contiene apreciablemente más aminoácidos ácidos (aspártico, 138 moles/mol de isoenzima) que la LDH-5 de músculo esquelético de rata (118 moles/mol). Asimismo, en cuatro isoenzimas humanas (LDH-1,-2,-3 y -5) hay diferencias llamativas en la composición de aminoácidos. Hay un incremento gradual en el contenido de lisina y arginina y un decrecimiento regular de aspártico y glutámico que, lógicamente, han de dar cuenta de las distintas movilidades electroforéticas tal y como está representado en la figura siguiente



Diferencias en los números de moléculas de ciertos aminoácidos por molécula de enzima en cuatro isoenzimas de LDH humanas. Wachsmuth et al., 1964.

2.2.2. Estructura cuaternaria

Poco se conoce hasta el presente sobre la secuencia de aminoácidos en las moléculas de isoenzimas de LDH, pero la demostración de que cada isoenzima es un tetrámero que puede ser disociado en cuatro monómeros, ha tenido extensas consecuencias que han ido más lejos de las consideraciones meramente estructurales.

Apella y Markert (1961), Cahn et al. (1962) y Markert y Apella (1963) han procedido a la disociación del tetrámero por tratamientos con urea 12 M y cloruro de guanidinio 5 M.

Se conoce que la relación estequiométrica enzima-coenzima es de 4 moles de NAD⁺ por mol de isoenzima y se ha demostrado que las cuatro subunidades B idénticas, producidas por la disociación de cada molécula de LDH-1, difieren de las subunidades A obtenidas de la disociación de LDH-5.

2.2.3. Diferencias entre los monómeros A y B

Los pesos moleculares de las subunidades A y B son ambos del orden de 35.000 y cada una de ellas contiene sólo una parte de la cantidad de lisina y arginina establecidas en la molécula total de las isoenzimas LDH-1 y -5 respectivamente (Cahn et al., 1962; Apella y Markert, 1962).

Se ha sugerido que cada una de las isoenzimas de movilidad intermedia es un compuesto híbrido resultante de la combinación de subunidades y ahora se han acumulado evidencias que mantienen esta teoría. En efecto, con ella se explican las distintas cargas y movilidades relativas de cada isoenzima. Markert (1963) ha confirmado los hallazgos de Wieland y Pflleiderer (1961) al mostrar que la composición de aminoácidos de LDH-3 es casi la media entre LDH-1 y LDH-5.

Wieland et al. (1964) han demostrado que una digestión triptica de LDH-2 de corazón y músculo esquelético de cerdo origina un mapa de péptidos casi idéntico al producido por una mezcla 3:1 de LDH-1 y -5.

Por otra parte, los estudios inmunoquímicos apoyan también este modelo (Cahn et al., 1962; Markert y Apella, 1963).

2.2.4. Actividad del tetramero y recombinación de monómeros

Si una preparación enzimática con actividad LDH se trata con urea a altas concentraciones (del orden de 12 M), pierde esta actividad al disociarse las subunidades que integran la estructura cuaternaria. Después del tratamiento con urea no es posible restaurar la actividad enzimática, ni aún después de una extracción de urea por diálisis o diluyéndola hasta una concentración inefectiva. Parece que la rotura de los enlaces de hidrógeno produce cambios irreversibles en la estructura secundaria y terciaria de los monómeros, que previenen su nueva recombinación para restaurar la enzima activa.

Sin embargo, Markert (1963) realizó un tratamiento más moderado para causar la disociación: cuando los tetrameros son congelados en NaCl 1 M y descongelados después de varias horas, ocurre la disociación que es acompañada por recombinación de los monómeros para formar isoenzimas activas. Aplicando este tratamiento a una mezcla de cantidades iguales de isoenzimas LDH-1 y -5 de corazón de buey, cuidadosamente purificadas, se observó la presencia de las cinco isoenzimas en proporciones, calculadas aproximadamente, de 1/4/6/4/1, según lo esperado si ocurriese una libre reasociación.

El mecanismo por el que ocurre la disociación y recombinación de monómeros de LDH durante la congelación y descongelación in vitro ha sido investigado por Chilson et al. (1965). La hibridación parece implicar cambios conformacionales que tienen lugar como un resultado de las concentraciones salinas y proteicas, ambas incrementadas, y posiblemente el decrecimiento del pH, según concluyen estos autores.

También describe Markert (1963) que durante estos experimentos hubo una pequeña pérdida de actividad enzimática y sugiere que los monómeros podrían poseer cierta actividad. Esta idea encuentra cierto apoyo en la observación de una isoenzima activa de peso molecular 72.000 (Millar, 1962) que podría ser un dímero. No obstante se carece de documentación suficiente que confirme la actividad catalítica de los monómeros, los cuales, hasta el presente, se consideran inactivos.

La naturaleza de sitios de la enzima implicados en la asociación de monómeros para originar el tetrámero activo ha sido investigada por diversos autores. Südi y Khan (1970) han realizado un tratamiento con Iodoacetamida antes y después de proceder a la disociación y han obtenido resultados interesantes en lo que respecta a los restos de aminoácidos implicados en las uniones entre monómeros. De acuerdo con los resultados de estos autores puede concluirse que el tratamiento con Iodoacetamida produce una inactivación rápida de la enzima si se procede a su congelación y descongelación simultáneamente (es decir, a su disociación y reasociación), pero dicha activación es considerablemente más lenta si los tetrámeros no son disociados.

De aquí puede concluirse fácilmente, que la Iodoacetamida actúa sobre restos de aminoácidos que se encuentran bloqueados cuando la enzima se encuentra en forma tetramérica, lo que da a entender que la unión entre monómeros puede estar mantenida por enlaces más firmes que puentes de hidrógeno.

Clausen y Hustrulid (1968) han analizado la influencia del NADH, como cofactor, y de otros posibles ligandos (ADP) sobre la reasociación de monómeros para reconstruir el tetrámero activo. Entre las conclusiones de estos autores merece destacarse la influencia que ejerce el NADH favoreciendo la reasociación y la recuperación de actividad de la LDH tetramérica. En la misma línea, Levi y Kaplan (1971) han analizado las propiedades catalíticas de la enzima nativa comparándolas con las de la enzima reasociada. Realmente, los resultados de estos análisis muestran que existen varias diferencias de índole diverso (distinto coeficiente de sedimentación, reactividad de grupos SH, resistencia a la temperatura, inhibición por sustratos etc.) pero si la reasociación ha tenido lugar en presencia de NADH, dichas diferencias se hacen mucho menos llamativas.

Finalmente, Saito (1972) después de realizar diversos ensayos de disociación, reasociación, hibridación etc. concluye que entre los monómeros existe una acción cooperativa para la actividad del tetrámero y propone un modelo de actividad dependiente de la estructura cuaternaria, en el que considera el tetrámero como un estado que resulta de la cooperación de dos dímeros activos.

Las cantidades relativas de los polipéptidos A y B en células de distintos tipos deben variar considerablemente pues es lógico esperar que un exceso de subunidades B origine una proporción preponderante de isoenzimas anódicas y viceversa. Por otra parte, esta teoría supone que todos los tejidos de una especie dotada con el sistema enzimático LDH contendrán probablemente las cinco isoenzimas, aunque en algunos casos las formas extremas (LDH-1 ó -5) podrían no estar presentes en concentraciones apreciables.

En este punto hay que hacer notar que este modelo de estructura cuaternaria ofrece dos posibilidades, la combinación estadística o no estadística de los monómeros para constituir el tetrámero. En el primer caso, establecidas unas cantidades determinadas de subunidades A y B en un sistema biológico, se obtendrían unas proporciones relativas de cada isoenzima estadísticamente distribuidas. El modelo de estructura cuaternaria no implica necesariamente esta posibilidad de libre asociación; sin embargo, de ser ésta cierta, el modelo constituiría una buena base estructural para la misma.

Se considera que la biosíntesis de las dos diferentes subunidades polipeptídicas, A y B, depende de la codificación de genes distintos por lo que las distribuciones de isoenzimas establecidas en distintos órganos o tejidos dependerían de las cantidades relativas de los polipéptidos A y B, controladas a su vez por las relativas actividades genéticas. (Markert y Ursprung, 1962; Cahn et al., 1962; Markert, 1963).

Se ha descrito la existencia de una sexta isoenzima (LDH-X) presente en testículo humano. Zinkham et al. (1963), con sus experimentos de disociación han demostrado que se podría ajustar también al modelo de la estructura cuaternaria, aunque habría que considerar la existencia de un tercer monómero, C. Hawtrey y Goldberg (1970), Battellino y Blanco (1970) y otros autores han procedido a una purificación parcial de la isoenzima LDH-X de testículo de diversas especies. Goldberg (1972) ha purificado y cristalizado esta isoenzima, de testículo de ratón para proceder seguidamente al análisis de su composición de aminoácidos. Estos resultados confirman la presencia de un tercer monómero, C, así como ponen de manifiesto la naturaleza heterotetramérica de la isoenzima LDH-X.

2.2.5. Microheterogeneidad

Se considera clásicamente como cinco el número de isoenzimas de LDH presentes en órganos de Mamíferos, a excepción de la sexta isoenzima de testículo y esperma (Zinkham et al, 1963). No obstante, con posterioridad han aparecido nuevas isoenzimas supernumerarias cuya existencia se puede observar a través de las descripciones de los trabajos de numerosos autores. No hay acuerdo sobre el origen ni la localización de dichas isoenzimas ni se ha descrito una técnica apropiada que las ponga de manifiesto con reproducibilidad.

Como se discutirá más adelante, al considerar las relaciones entre isoenzimas de LDH y Ontogenia, Philip y Vesell (1962) haciendo estudios sobre los cambios que se producen en el valor relativo de la isoenzima LDH-1 en embrión de pollo, concluyen que esta isoenzima es la más abundante en hígado músculo y corazón, pero en hígado está acompañada por dos nuevas bandas, de baja actividad que migran con mayor rapidez hacia el ánodo. Nebel y Conklin (1964) señalan duplicidad en la isoenzima LDH-5 y sus resultados, en cuanto a la distribución de isoenzimas en embrión de pollo, no están de acuerdo con los de Philip y Vesell. Croisielle (1964) describe también dos bandas adicionales a la isoenzima LDH-1. Estas isoenzimas supernumerarias desaparecen antes del nacimiento.

Muchos otros autores han llamado también la atención sobre estas isoenzimas supernumerarias. Koen y Goodman (1969) recogen estas observaciones y proponen una base genética de dos loci que codificarían cada una de las dos cadenas polipeptídicas A y B, siendo los heterocigotos quienes manifestarían isoenzimas duplicadas. Esta hipótesis, sin embargo, no cuenta con el apoyo general, quizá porque tampoco están de acuerdo los autores sobre las características de esta microheterogeneidad, las cuales se pueden considerar a muy distintos niveles.

Falta por determinar, por ejemplo, cuáles son las isoenzimas que manifiestan esta diversidad de formas que nos parece oportuno denominar Microheterogeneidad. Asimismo, tampoco hay acuerdo en la relación que puede existir entre la presencia de la misma y el desarrollo embrionario, y lo que quizá puede constituir un notable obstáculo en su

investigación: la necesidad de una técnica apropiada que determine la microheterogeneidad donde realmente ésta existe. Quizá haya sido éste uno de los factores determinantes del desacuerdo, y hay que hacer notar que, en este sentido, no se han descrito técnicas especiales con un objetivo directamente encaminado a resolver este extremo.

2.3. ESTUDIOS CINETICOS

2.3.1. Especificidad

Los estudios clásicos realizados sobre el sistema enzimático LDH de Mamíferos han mostrado que la enzima es específica para el ácido L-láctico (Meyerhof y Lohmann, 1926). Sin embargo, Ottolenghi y Denstedt (1958) comunicaron que esta enzima, extraída de eritrocitos de conejo, podía actuar igualmente sobre las formas D y L. Estas observaciones no han podido ser confirmadas aunque Plagemann et al. (1960) trataron de hacerlo; estos últimos autores concluyen que la forma D no inhibe y sugieren que los resultados obtenidos con las formas DL deben ser interpretados en términos de la forma L exclusivamente.

Por otra parte, varios investigadores han estudiado la amplitud de la especificidad de este sistema enzimático; así, Green y Brosteaux (1936) comunican que el ácido α -hidroxibutírico se comporta como un sustrato efectivo para la actividad catalítica de la LDH. Estos mismos autores amplían sus resultados a otros posibles sustratos y concluyen que hay más α -hidroxiácidos sobre los que la LDH puede actuar de igual forma.

En efecto, desde que se conoció la existencia de las isoenzimas, Allen (1961) ha utilizado el ácido α -hidroxicaproico y α -hidroxivalérico en los estudios de isoenzimas de LDH.

En la reacción inversa hay similar especificidad por el sustrato. Meister (1950) comparó varias series de α -ceto y α - γ -dicetoácidos como sustratos para la LDH cristalina obtenida de corazón de buey y estableció que sólo el pirúvico y el α -cetobutírico eran reducidos en presencia de NADH, aunque mantenía la observación de que algunos dicetoácidos reaccionan con lentitud.

2.3.2. Afinidad por sustratos

Desde que se obtuvo la enzima aislada se han publicado numerosos resultados sobre los valores de K_m , pero la diferencia de la pureza de las preparaciones, así como la que existe en las distintas condiciones experimentales, hace muy difícil la comparación directa de estos resultados; algunos de ellos se exponen en la tabla siguiente, pero hay que tener en cuenta que algunos se refieren a la enzima total y otros a isoenzimas cristalinas cuyo criterio de pureza en muchos casos suele ser la mayor abundancia en la distribución isoenzimática característica de un órgano.

Valores de K_m determinados para algunas de las isoenzimas de LDH

<u>órgano</u>	<u>isoenzima predominante</u>	<u>sustrato</u>	<u>concentración de coenzima $10^{-4} M$</u>	<u>K_m mM</u>	<u>referencia</u>
corazón humano	LDH-1	pirúvico	0.43-1.7	0.12	(1)
"	"	láctico	4.76	4.4	"
"	"	"	2,38	8.0	"
"	"	"	0.95	16.5	"
hígado humano	LDH-5	"	0.44	28.2	(2)
"	"	"	0.88	25.6	"
"	"	"	1.75	22.3	"
"	"	"	3.50	19.6	"
corazón de buey	LDH-1	pirúvico	0.48	0.14	(3)
"	"	láctico	2.60	110.0	"
suero humano	LDH-1,2 y 3	pirúvico	30.0	0.12	(4)
testículo de ratón,	LDH-X	pirúvico	1.5	0.06	(5)
"	LDH-1	"	"	0.09	"
"	LDH-5	"	"	0.22	"

Referencias. 1. Nisselbaum y Bodanski (1961); 2. Gibson et al. (1953)
 3. Winer y Schwert (1958); 4. Bacchi et al. (1970)
 5. Goldberg (1972).

Algo, aunque poco, puede concluirse de todos estos resultados. Las isoenzimas más anódicas (LDH-1 y -2) muestran valores más bajos de K_m , o lo que es lo mismo, mayor afinidad por el sustrato, que las más catódicas (LDH-5 y -4). Esta observación se ha visto confirmada por varios autores (Battellino et al., 1968). Esto debe entenderse como una conclusión fraccionaria de cinética comparada entre isoenzimas anódicas y catódicas, pero más bien desde un punto de vista cuantitativo. Con la tabla de resultados expuesta en la página anterior en la que hay numerosos valores de K_m para enzimas LDH de diversa procedencia no se puede realizar un estudio comparativo completo que relacione los distintos valores de K_m que corresponden a cada isoenzima en un mismo sistema biológico.

Además, como muchos de estos resultados se han obtenido a partir de extractos enzimáticos impurificados, no se pueden considerar como estudios cinéticos precisos ya que en el mismo extracto pueden existir ciertas sustancias que actúen como modificadores de la velocidad de reacción con mayor o menor especificidad.

Varios autores han investigado la influencia de la concentración de la enzima sobre sus propiedades estructurales y funcionales, utilizando diversas técnicas. Yagil (1964) señaló una proporcionalidad entre la concentración de enzima y la actividad por encima de 50 $\mu\text{g/ml}$ y un decrecimiento específico de actividad por debajo de esta concentración. Por otra parte, Bernfeld et al. (1965) y Kurganow et al. (1968) han descrito un fuerte descenso de actividad a concentraciones de LDH inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ que atribuyen a la disociación del tetrámero activo en monómeros o dímeros inactivos. Yoshida (1967), sin embargo, ha descrito una inactivación de LDH por dilución de la enzima a pH neutro sin que tuviera lugar la disociación.

La realización de estudios cinéticos de LDH, comparando la afinidad por sustratos y la variabilidad de las constantes cinéticas, ha contribuido a esclarecer la dependencia que tiene la actividad de la concentración de enzima. Sawula y Suzuki (1970) han analizado esta influencia realizando estudios cinéticos comparados a varias concentraciones de enzima y observan que a concentraciones bajas de LDH se

desvía la cinética de la típica de Michaelis-Menten con respecto al pirúvico.

Simultáneamente, Wurster y Hess realizan un estudio cinético comparado a un rango de concentración de LDH de 10^{-5} a 10^{-10} M. Estos autores encuentran una proporcionalidad en el comportamiento cinético de la enzima en el rango de concentraciones de 10^{-6} a 2×10^{-9} M. Dentro de este rango hay proporcionalidad entre actividad y concentración y las constantes cinéticas obtenidas (K_m para pirúvico y NADH) no ofrecen diferencias apreciables; sin embargo, a concentraciones de enzima inferiores a 2×10^{-9} M aprecian una inhibición significativa, y a concentraciones mayores de 10^{-6} M, una activación, aunque débil. Estos autores concluyen que a concentraciones de LDH superiores a 2×10^{-9} M la enzima se encuentra constituyendo un tetramero (Wurster y Hess, 1970). Sin embargo estos resultados contrastan con los obtenidos por Griffin y Criddle (1970).

Quizá la discrepancia entre todos estos resultados y sus interpretaciones se deba a la distinta procedencia de las preparaciones enzimáticas utilizadas por cada uno de estos autores; ello podría dar cuenta de una heterogeneidad en la distribución isoenzimática en muestras obtenidas de organismos con distintos condicionamientos adaptativos.

2.3.3. Inhibición por sustratos

El sistema enzimático LDH se ha considerado clásicamente como uno de los más característicos que manifiestan una clara inhibición por el sustrato; la observación del alto efecto inhibitor del pirúvico sobre su acción catalítica se ha visto confirmada por diversos autores.

Después del descubrimiento de las isoenzimas, Plagemann et al. (1960) utilizaron el efecto inhibitor del pirúvico a altas concentraciones para realizar un estudio comparativo en cuanto al comportamiento de las isoenzimas LDH-1 y -5 en este sentido. De dicho estudio, estos autores extraen importantes conclusiones sobre los distin-

tos efectos inhibidores que el pirúvico ejerce sobre la actividad de ambas isoenzimas y utilizan dichos resultados para determinar sus proporciones relativas en una mezcla de ambas. Así, concluyeron que a pH 7.0, una concentración de pirúvico 1.2 mM permitía la expresión óptima de la actividad de la isoenzima LDH-5 humana pero permitía tan sólo un 70% de la actividad óptima de la isoenzima LDH-1; al contrario, una concentración de pirúvico de 0.15 mM permitía la expresión óptima de la actividad de la isoenzima LDH-1 y sólo un 70% para LDH-5. Con isoenzimas de conejo se obtienen resultados similares y si las velocidades de reacción a esta concentración de sustrato se denominan V_1 y V_2 respectivamente, se establece que las isoenzimas LDH-2, -3 y -4 tienen valores de V_1/V_2 intermedios entre las isoenzimas LDH-1 y -5, como está expuesto en la tabla siguiente.

Tejido	Isoenzima predominante	V_1/V_2
Corazón	LDH-1, -2	0.38
Eritrocitos	LDH-1, -2	0.44
Riñón	LDH-1, -2	0.41
Hígado	LDH-4, -5	1.5
Músculo esquelético	LDH-5	2,3

(Los valores de esta tabla han sido obtenidos por Plagemann et al., 1960)

Cuando la proporción V_1/V_2 se representa logarítmicamente frente a la composición relativa de unas series de mezclas de LDH-1 y -5, se establece una relación directa entre ambas y los valores calculados concuerdan claramente con los observados. El valor práctico de la relación V_1/V_2 está disminuido en cierto modo por el hecho de que esta relación tiende a incrementar debido a la conservación de la muestra, proceso que es acelerado por la adición de tripsina.

Desde un punto de vista de regulación metabólica, quizá la conclusión más importante que se puede extraer de los experimentos de Plagemann et al. (1960) es que la isoenzima LDH-1 se inhibe a altas

concentraciones de pirúvico, mientras que la isoenzima LDH-5 se inhibe a altas concentraciones de láctico. Esta diferencia cualitativa en cuanto a la inhibición por uno de estos dos sustratos pone de manifiesto, una vez más, los distintos comportamientos cinéticos de las isoenzimas anódicas y catódicas, es decir, su distinta actividad específica, lo que como veremos a continuación, adquiere gran importancia en el control de las reacciones metabólicas. Vemos pues que ambas isoenzimas (LDH-1 y -5) van a estar sometidas a distintos fenómenos reguladores que dan cuenta de los distintos comportamientos fisiológicos de diversos órganos y de las distintas posibilidades adaptativas de diversos animales.

Puesto que el pirúvico inhibe fuertemente la actividad catalítica de la isoenzima LDH-1 es de esperar que, si es éste compuesto el resultado de la reacción, se consuma rápidamente por la ruta hacia Acetil-CoA y Ciclo Tricarboxílico, y de igual forma, la degradación glicolítica del glucógeno continuaría en el mismo sentido, ya que la presencia de concentraciones más o menos elevadas de pirúvico inhibirían la actividad del sistema enzimático LDH en tejidos ricos en la isoenzima LDH-1, tal como es, por ejemplo, el músculo cardíaco. No obstante, en este tipo de tejidos, la reacción podría transcurrir perfectamente en sentido contrario (láctico-pirúvico) siempre que el producto resultante de la misma fuese inmediatamente introducido en la ruta hacia Acetil-CoA como se ha indicado más arriba.

La isoenzima LDH-5, al contrario, exhibe su actividad catalítica con mayor eficacia cuando está expuesta a concentraciones de pirúvico que inhiben a la isoenzima LDH-1; el pirúvico sólo inhibe su actividad a concentraciones excesivas, como ocurre con multitud de sistemas enzimáticos; este hecho no es otro que la clásica inhibición por el sustrato que posiblemente tiene poco significado metabólico en un estado fisiológico normal y quizá sólo sería motivo de discusión para el caso de condiciones patológicas.

Así pues, los tejidos ricos en LDH-5, como es el músculo esquelético, podrían efectuar una rápida transformación del pirúvico en

láctico, lo que en sí constituye indudablemente la base metabólica del mantenimiento de las concentraciones de NAD^+ cuando sus células realizan el proceso glicolítico con gran intensidad. Al considerar este aspecto, hay que tener en cuenta que la actividad catalítica del sistema LDH en este sentido se manifiesta de dos formas: por una parte se elimina el ácido pirúvico del medio celular y por otra se recupera el NAD^+ que se había reducido en la deshidrogenación del gliceraldehído-3-P (véase la figura de la página 17). Vemos pues, cómo este esquema metabólico, comentado al principio de esta memoria, encuentra en los resultados cinéticos una base muy apropiada.

En cuanto a los aspectos adaptativos que manifiestan algunos órganos en relación a este esquema de comportamiento isoenzimático de LDH, hay que llamar la atención sobre ciertos músculos esqueléticos tales como el soleus que exhiben distribuciones de isoenzimas similares a las del corazón; tales músculos constan, principalmente, de fibras rojas, cuyas propiedades fisiológicas conciernen a la postura y soporte y que permanecen en una contracción casi permanente, lo que en términos metabólicos supone una actividad glicolítica y respiratoria similares a las del miocardio (Dawson et al., 1964).

La inhibición de la LDH por los sustratos se ha aplicado a la investigación de las actividades de las dos isoenzimas LDH-1 y -5 en músculo de pechuga de aves con relación a sus hábitos de vuelo. Wilson et al. (1963) extraen importantes conclusiones sobre la adaptación de estos animales, relacionando las distribuciones isoenzimáticas del sistema LDH con el resultado de su acción metabólica total con la capacidad de vuelo en orden a la fatiga inducida por el ácido láctico.

Así, estos autores demuestran que la distribución isoenzimática de LDH en el músculo de pechuga del faisán y gallina doméstica, es del mismo orden que el descrito clásicamente para el músculo esquelético de Mamíferos, con predominio de la isoenzima LDH-5; se trata de animales con vuelo ocasional y propensos a la acumulación de ácido láctico en sus fibras musculares lo que indica propensión a la fatiga cuando son forzados a volar. Otras aves, tales como el Colibrí y el Estornino que, normalmente emplean mucho tiempo en volar, tienen una

distribución isoenzimática en músculo de pechuga del mismo tipo que la clásica del corazón de Mamíferos (predominio de LDH-1). Como la actividad de este sistema enzimático se inhibe en estos animales por el pirúvico, nunca se llega a producir en dichas fibras musculares una acumulación de ácido láctico y el músculo no se fatiga.

Sin embargo, en determinados casos, la inhibición del sistema enzimático LDH por el sustrato se ha atribuido a la concentración de enzima utilizada en la valoración. Wuntch et al. (1970) comunicaron este efecto y la observación de que el mismo desaparece cuando la concentración de enzima utilizada en el ensayo se ajusta al nivel en que ésta se encuentra en las células.

Por su parte, Kaplan et al. (1968) han confirmado los resultados de Plagemann et al. (1960) al mostrar que el exceso de pirúvico inhibe la actividad catalítica de la isoenzima LDH-1 (B_4). Kaplan y sus colaboradores atribuyen la diferencia de inhibición por el sustrato que se manifiesta entre las isoenzimas LDH-1 y -5 como una de las bases de los distintos comportamientos metabólicos llevados a cabo por ambos tipos de isoenzimas (anódicas y catódicas).

Posteriormente, Everse et al. (1970) han comunicado datos que sugieren que la inhibición por el sustrato es una característica de la naturaleza de las isoenzimas, incluso cuando la concentración de enzima es elevada.

La inhibición específica por el sustrato (láctico o pirúvico) de las isoenzimas LDH-5 (A_4) y LDH-1 (B_4) respectivamente es un hecho, y hay muchos resultados que lo confirman. Como se verá más adelante, esta diferencia de inhibición tiene amplio alcance en cuanto a la regulación del metabolismo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

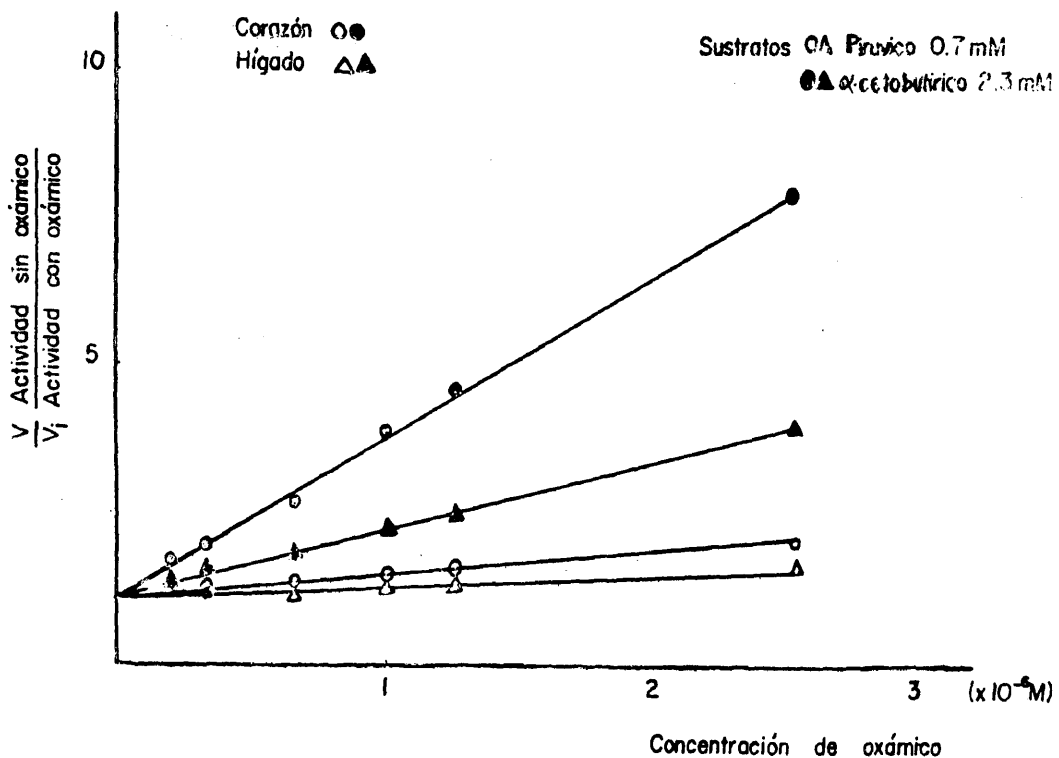
2.3.4. Efecto de modificadores

Los reactivos que bloquean los grupos -SH, como es el p-Cloro-mercuri-benzoato, fueron los primeros descritos como inhibidores de la actividad enzimática de la Láctico-Deshidrogenasa (Pfleiderer y Jeckel, 1957; Wieland et al., 1959). Estos autores establecieron también que el sulfito inhibe igualmente la actividad catalítica de esta enzima, aunque de modo preferente, sobre las isoenzimas anódicas (Bonavita y Guaneri, 1962). Estos tratamientos, que se refieren a efectos inhibidores de reactivos que inhiben los grupos tiólicos libres, corresponden al comienzo de la investigación en este sentido. Posteriormente se analizó el mecanismo de inhibición por compuestos que podían interferir competitivamente con el sustrato.

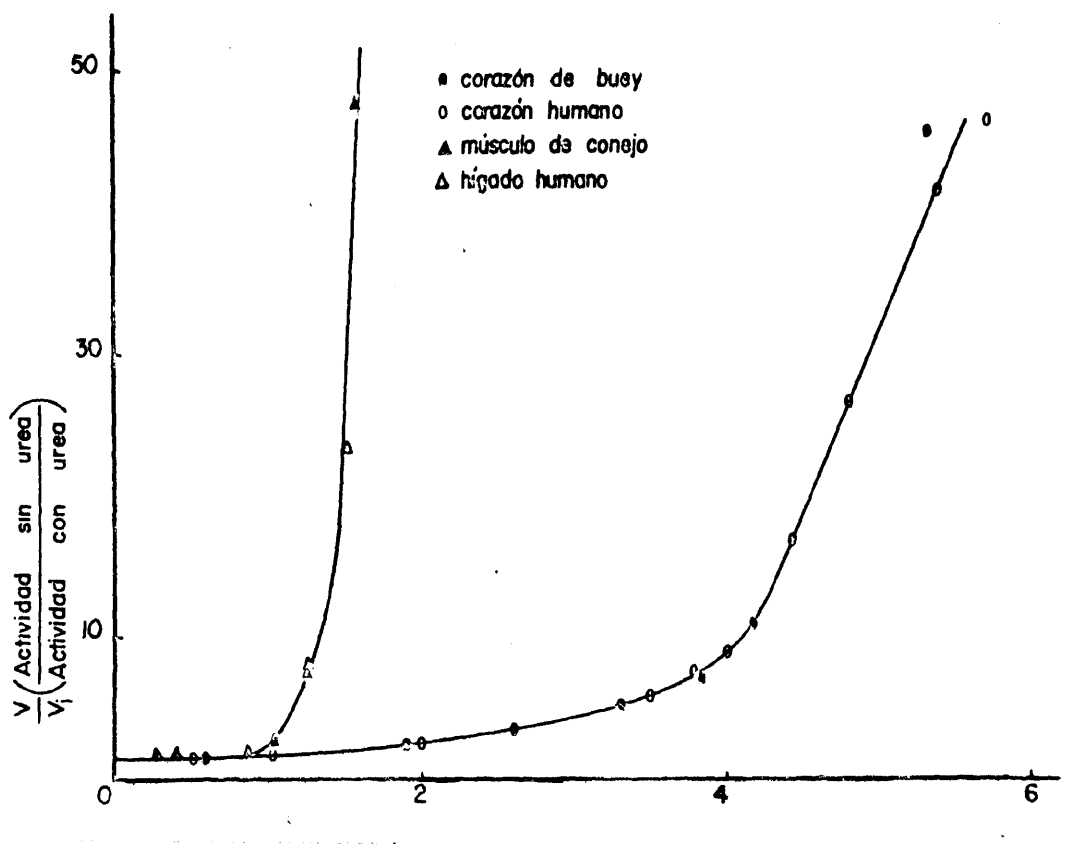
Novoa et al. (1959) establecieron que si la reacción tiene lugar con pirúvico como sustrato, la enzima se inhibe de forma competitiva por la presencia de ácido oxámico y de forma no competitiva por el ácido oxálico. Esta observación se vio confirmada posteriormente por los estudios de Plummer y Wilkinson (1961, 1963) que la ampliaron a la enzima extraída de diversos órganos humanos. Las actividades del sistema enzimático procedente de hígado y corazón humano, de acuerdo con el incremento de la concentración de ácido oxámico, se representan en la figura de la página siguiente, para la construcción de la cual se han utilizado el ácido pirúvico y α -ceto-butírico como sustratos. Los efectos inhibidores vienen representados por la relación v/v_i , donde v es la actividad en ausencia del inhibidor y v_i la actividad en su presencia. Puede observarse que la reducción del ácido α -ceto-butírico está inhibida hasta una extensión mayor que la del pirúvico.

En el caso comentado, el sustrato más débilmente unido a la enzima (el ácido α -ceto-butírico) parece ser el desplazado del centro activo de la enzima por el oxámico con mayor facilidad. Al contrario, el oxálico inhibe la reducción de ambos sustratos en igual medida.

Puede concluirse que el inhibidor competitivo (el oxámico) ejerce distinta influencia, de acuerdo con la afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que el inhibidor no competitivo (el oxálico) ejerce idénticos efectos sobre ambos.



Efecto del oxámico sobre la actividad de LDH de corazón humano e hígado. (Plummer y Wilkinson, 1963).



Inhibición de la actividad de LDH de varios tejidos por urea (Withycombe, Plummer y Wilkinson, 1965).

Los extractos enzimáticos de miocardio, donde predominan las isoenzimas anódicas (LDH-1 y -2), manifiestan mayor sensibilidad a la acción de los inhibidores que los que proceden de tejidos ricos en isoenzimas catódicas (LDH-4 y -5), como es el hígado. Emerson et al. (1964) han establecido una relación entre la movilidad electroforética de las isoenzimas de LDH y las constantes recíprocas de inhibición por ácido oxálico.

La urea, a altas concentraciones, disocia las subunidades que constituyen los niveles estructurales cuaternarios de las isoenzimas de LDH. Este efecto ha sido ya mencionado con ocasión de los experimentos encaminados a establecer la relación entre actividad enzimática y estructura cuaternaria del sistema isoenzimático LDH, pero, independientemente, esta misma sustancia, a bajas concentraciones, se comporta como un inhibidor competitivo de su actividad catalítica y se puede utilizar de igual forma que el oxálico para diferenciar la presencia de isoenzimas anódicas y catódicas en una mezcla; no obstante, su efecto no es igual al del oxálico ya que inhibe preferentemente a las isoenzimas catódicas (Richterich et al., 1962; Plummer, Wilkinson y Withycombe, 1963).

Cuando se utiliza el ácido pirúvico como sustrato se observan dos efectos completamente distintos al representar los valores de v/v_i frente a las concentraciones de urea. Este efecto se puede observar en la segunda figura de la página anterior, donde se ve que el incremento en la concentración de urea trae consigo un primer incremento ligero en el grado de inhibición hasta una concentración crítica, la cual varía de acuerdo con la composición de la isoenzima. En este punto, como se ve en la misma figura, tiene lugar una inflexión aguda de la curva, después de la cual la inhibición es, prácticamente, completa. (Withycombe et al., 1965).

La diferencia de las concentraciones de urea necesarias para alcanzar el punto crítico en cada isoenzima hace que este tratamiento pueda hacer posible determinar qué tipo de isoenzimas predomina en una muestra determinada.

Cuando se estudia el proceso con ácido α -ceto-butírico como sustrato se obtienen resultados similares y también cuando la reacción transcurre en el sentido contrario, es decir, láctico-pirúvico.

La isoenzima LDH-X de testículo y esperma humanos se comporta como la LDH-1 en cuanto a su inhibición por ácido oxálico y urea.

Ciertos compuestos relacionados con la urea ejercen también inhibición diferencial sobre las distintas isoenzimas; en este sentido se ha ensayado, por ejemplo, con el ácido hidantoico, pero el compuesto más potente de esta serie es la Metil-urea (Withycombe et al., 1965) Ninguna de estas sustancias, sin embargo, parece ofrecer ventajas sobre la urea como un inhibidor diferencial.

La acción de los disolventes orgánicos sobre la precipitación de proteínas o inhibición de su actividad enzimática se ha estudiado también en el caso que nos ocupa. Warburton et al. (1963) han descrito que la incorporación de cloroformo en la mezcla de reacción impone la especificidad diagnóstica de la LDH sérica. Por otra parte, se ha descrito que este disolvente inhibe la enzima de eritrocitos en una gran extensión, de igual forma que la del suero de pacientes con enfermedades hepáticas y cardíacas. Esta observación está contrapuesta con las opiniones más recientes sobre la estructura de las isoenzimas. La anomalía está relacionada con los efectos del cloroformo sobre la precipitación de proteínas y con la concentración de proteínas en los hemolizados. (La precipitación de las proteínas séricas con acetona permite mantener a las isoenzimas LDH-1 y -2 en solución y en forma activa. Esta observación ha motivado que Latner y Turner (1963) sugiriesen que se podría utilizar como un sistema de diagnóstico para el infarto de miocardio. Las relaciones existentes entre la Patología molecular y la distribución de isoenzimas de LDH en suero, así como la utilización de ésta para el diagnóstico de diversas enfermedades, se discutirán más adelante.

Bollette y Schoffeniels (1969) han estudiado la acción de iones inorgánicos sobre la actividad de LDH en Crustáceos en el sentido pirúvico-láctico. Dichos autores concluyen que a altas concentraciones de pirúvico (10^{-2} M) el NaCl realiza un efecto inhibitorio, lo que está de acuerdo con Schoffeniels (1968). Además estos autores, en la discusión de sus resultados explican que posiblemente la inhibición por pirúvico de la isoenzima LDH-1 puede ser, una inhibición debida a la presencia de NaCl cuando es alta la concentración de sustrato. Los resultados obtenidos les ponen de manifiesto que dicha inhibición ocurre en las preparaciones enzimáticas obtenidas de extractos de órganos tales como corazón y nervios, pero no tiene lugar en músculo abdominal, órgano que sólo contiene la isoenzima LDH-5, lo que demuestra que dicha isoenzima no se inhibe por NaCl a altas concentraciones de pirúvico. El resto de los órganos analizados contienen el resto de las isoenzimas. Estos resultados confirman la inhibición de la isoenzima LDH-1 pero plantean la discusión de si es el mismo sustrato el que actúa como inhibidor a altas concentraciones, o si son dichos niveles quienes posibilitan la inhibición por otras sustancias

D'Auzac y Jacob (1967) mostraron la naturaleza alostérica de LDH de látex de Hevea brasiliensis y su inhibición por ATP. En una comunicación posterior (Jacob y d'Auzac, 1968) estos autores describen el efecto de inhibidor alostérico de la L-alanina sobre el mismo sistema enzimático cuando se realiza un estudio cinético en sentido pirúvico-láctico y pH 6. Sin embargo, a pH 7 la LDH manifiesta una cinética típicamente mikeliana y la alanina no ejerce dicho efecto.

Bacchi et al (1970) han estudiado el efecto de la concentración de cisteína sobre las propiedades catalíticas de la LDH; sus resultados ponen de manifiesto que dicho aminoácido activa a este sistema enzimático hasta una concentración de 5 mM de cisteína (35% de activación), mientras que por encima de esta concentración se comporta como inhibidor. Realizando un tratamiento análogo, pero con α -cetobutírico como sustrato, la cisteína se comporta como inhibidor.

Lé John (1971) ha llevado a cabo un estudio bastante completo sobre la influencia de varios nucleótidos en la actividad catalítica del sistema enzimático LDH. Haciendo estudios cinéticos de la LDH extraída de hongos, en presencia de GTP, GDP, ITP y ATP, este autor determina que todos los nucleótidos expuestos, en pequeñas concentraciones, actúan como inhibidores de la LDH, cuando la reacción transcurre en sentido pirúvico-láctico; de ellos, el GTP es quien presenta mayor actividad inhibidora y es ésta de naturaleza alostérica, así como la del GDP. Por otra parte, la acción de ITP y ATP corresponde a una inhibición competitiva. De estos resultados, Lé John extrae importantes conclusiones presentando una base fisiológica para la regulación de esta enzima: el GTP, presumiblemente, modula la actividad enzimática para regular el flujo de pirúvico vía oxalacético y P-enol-pirúvico cuando hay una demanda en el metabolismo gluconeogénico y asimismo, este autor deduce que el NAD^+ o NADH deben unirse a la enzima antes que el láctico o pirúvico.

La acción de hormonas sobre la actividad catalítica del sistema enzimático LDH ha sido poco estudiada. Patterson y Masters (1970) han analizado los cambios de actividad que se producen en la LDH durante el ciclo estral de la rata. Entre sus resultados, algunos de los cuales serán también discutidos más adelante, conviene destacar aquí el efecto de la Progesterona. Esta hormona produce un ligero incremento en la actividad total de LDH y un incremento más notable en la actividad enzimática de la trompa de Fallopio, siete días después de la administración (metestro).

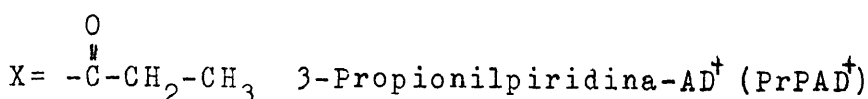
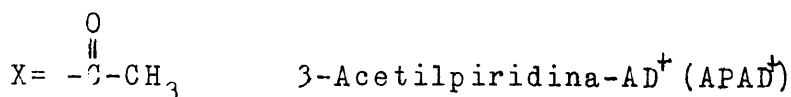
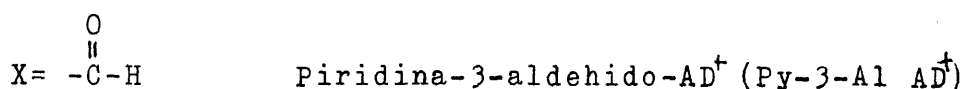
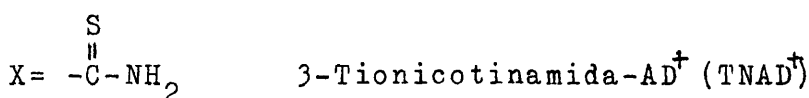
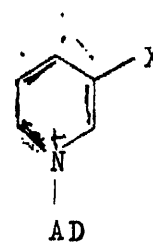
No obstante, algunos de los estudios realizados sobre la actividad de LDH en distintas condiciones fisiológicas o en distintos estadios del desarrollo podrían también interpretarse como efectos hormonales, más o menos indirectamente. Así ocurre, por ejemplo, con el artículo de Clark y Yochim (1971) que se comenta más adelante.

Conviene llamar la atención sobre el hecho de que la mayoría de los trabajos realizados para investigar el efecto de modificadores fisiológicos sobre la actividad catalítica de la LDH están hechos en la enzima total. Falta, pues, un estudio comparado sobre el distinto comportamiento de cada isoenzima.

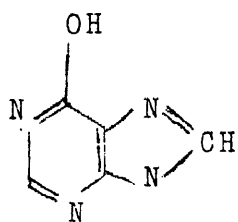
2.3.5. Actividad con análogos de coenzimas

El grupo de Kaplan ha preparado varios compuestos, análogos químicos del NAD (Kaplan et al, 1960). En la tabla siguiente se presentan algunos ejemplos de estas sustancias que se han utilizado extensamente para el estudio de deshidrogenasas dependientes de NAD y NADP (Kaplan y Ciotti, 1961).

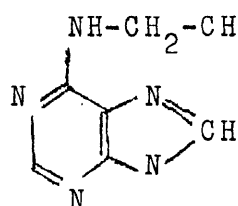
Sustituyentes en el anillo de piridina



Sustituyentes en el anillo de purina



Nicotinamida-Hipoxantina dinucleotido (NHXD[†])



Nicotinamida-6-(2-hidroxietyl)purina dinucleotido (N6HEPD[†])

La determinación de las actividades relativas de las isoenzimas de LDH con APAD⁺ y TNAD⁺ da como resultado diferencias entre los extractos de músculo cardíaco y esquelético de varios mamíferos (Kaplan et al, 1960). Algunos de los resultados de estos autores señalan que en una misma especie, la actividad LDH de distintos tejidos se corresponde claramente con su composición isoenzimática; los órganos y tejidos con predominio de isoenzimas anódicas dan valores más bajos de actividad que los órganos con mayor proporción de isoenzimas catódicas.

En algún caso se observa mayor afinidad por el análogo que por la coenzima y en algunos casos hay una marcada diferencia entre los efectos de la coenzima y de su análogo sobre la afinidad por el sustrato. En efecto, existen diferencias apreciables entre las curvas de Michaelis para L-láctico con corazón de buey y de langosta, cuando se utilizan NAD⁺ y APAD⁺ como coenzimas; la enzima de corazón de buey muestra muy poca actividad con el análogo de la coenzima (APAD⁺) mientras que la enzima de corazón de langosta manifiesta poca actividad con NAD⁺. Al contrario, el extracto de corazón de buey y de corazón de langosta muestran gran actividad con NAD⁺ y APAD⁺ respectivamente.

La LDH extraída de músculo esquelético de otros crustáceos y de ciertos anélidos muestra también una actividad mayor con APAD⁺ que con NAD⁺ y la enzima de la mayoría de los quelicerados presenta mayor actividad con NHXDH que con NADH.

Dennis y Kaplan (1960) han mostrado que aunque las dos LDH estereoespecíficas de Lactobacillus plantarum no se pueden separar con facilidad por electroforesis o cromatografía en columna, se pueden reconocer en orden a sus distintas actividades con análogos de NAD. Así se tiene que la enzima activa sobre la forma D(-) puede utilizar el NHXD mientras que la que actúa sobre la forma L(+) es completamente inactiva con este análogo.

Cahn et al (1962) han extendido estos estudios determinando relaciones de actividad para la reducción de TNAD⁺ y APAD⁺ con láctico por extractos de músculo cardíaco o esquelético de una variedad de especies.

Las actividades específicas de las isoenzimas de LDH se reflejan en las respectivas facultades para utilizar los análogos de la coenzima. Según los resultados de Kaplan (1963) existe una progresión similar en las actividades específicas de las cinco isoenzimas con NHXDH y NADH, obtenidas de músculo esquelético de buey. Hay una concordancia bien clara entre los resultados obtenidos y los valores predichos de las proporciones de actividad con estos dos cofactores para las isoenzimas de pollo. Las dos tablas siguientes resumen estos resultados.

1. Proporciones de actividad de isoenzimas de LDH con NHXDH y NADH como coenzimas. (Cahn et al, 1962).

<u>Isoenzima</u>	<u>Músculo esquelético de buey</u>	<u>Corazón de buey</u>
LDH-1	2.78	2.50
LDH-2	1.83	1.74
LDH-3	1.23	1.29
LDH-4	0.70	0.78
LDH-5	0.53	-

2. Proporciones de actividades de LDH de pollo con NHXDH y NADH como coenzimas. (Kaplan, 1963)

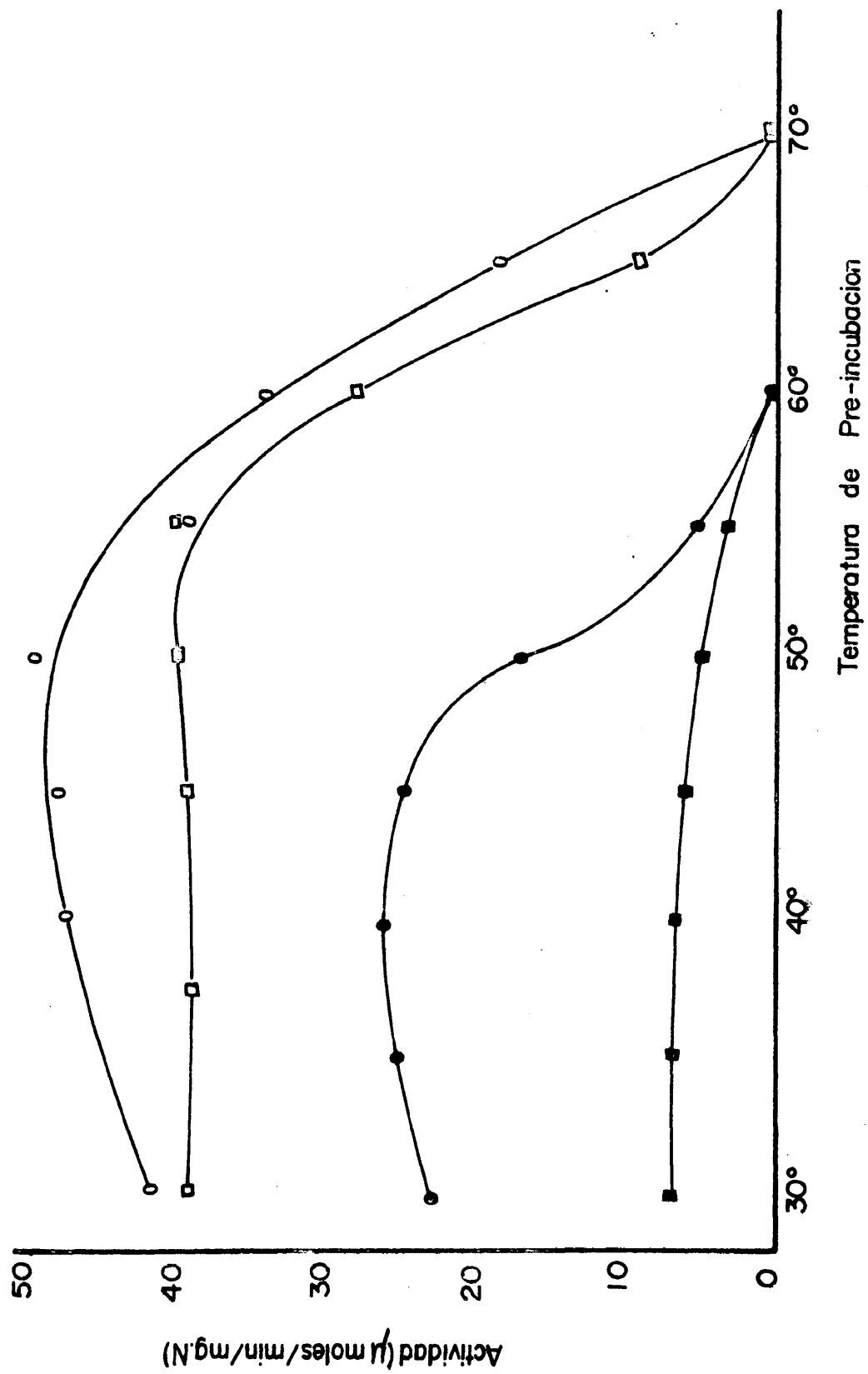
<u>Isoenzima</u>	<u>Proporción (NHXDH/NADH)</u>	
	<u>hallada</u>	<u>predicha</u>
LDH-1	3.22	-
LDH-2	2.50	2.54
LDH-3	1.98	1.86
LDH-4	0.99	1.18
LDH-5	0.50	-

2.3.6. Efecto de la temperatura

La recuperación de la actividad de las isoenzimas catódicas (LDH-4 y -5) después de la separación electroforética es menos completa que la de las isoenzimas anódicas (LDH-1 y -2); esto constituye una observación clásica y se refleja en que las isoenzimas catódicas son más lábiles que las anódicas cuando se exponen a elevadas temperaturas. Los resultados de Plummer y Wilkinson (1963), representados en la figura de la página siguiente muestran el efecto de una preincubación a varias temperaturas durante 30 minutos, sobre las actividades en la reducción de pirúvico y α -cetobutírico por extractos de corazón e hígado humanos, antes de determinar su actividad enzimática a 25°C. La preincubación a temperaturas inferiores a 50°C tiene poco efecto sobre la actividad enzimática. A altas temperaturas la LDH de hígado, en la que predominan las isoenzimas catódicas, es apreciablemente menos estable que la de corazón, donde hay un claro predominio de las anódicas. A 60°C la enzima hepática ha perdido completamente su actividad mientras que la cardíaca conserva un 75% de su actividad. Sin embargo, es interesante hacer notar que cada extracto pierde su facultad de reducir al pirúvico y al α -cetobutírico a la misma temperatura.

Hill (1958) observó que las isoenzimas LDH-1, -2 y -3 de suero humano presentan un decrecimiento progresivo de estabilidad cuando se exponen a temperaturas elevadas y sugiere que la presencia de proteínas séricas, especialmente albúmina, puede ejercer un efecto estabilizador. Sin embargo, Plagemann et al (1961) fracasaron en la búsqueda de alguna evidencia de estos efectos protectores y establecieron que la isoenzima LDH-5 se inactiva completamente por calentamiento a 53°C durante seis minutos, mientras que la isoenzima LDH-1 mantiene su actividad completa, incluso después de 40 minutos a esta temperatura.

Varios investigadores han utilizado la diferencia de sensibilidad a temperaturas elevadas que exhiben las distintas isoenzimas, para establecer sus cantidades relativas en una mezcla. (Kreutzer y Fennis, 1964)



Efecto de una pre-incubación sobre la actividad de LDH de extractos de hígado y corazón. (Plummer y Wilkinson, 1963).

Südi (1970) ha llevado a cabo un estudio cinético de la protección de LDH por sustratos contra la inactivación por calor. Entre los resultados obtenidos por este autor es de destacar la dependencia establecida entre concentración de sustrato y poder de protección contra la inactivación a altas temperaturas. Südi realizó sus experimentos con NAD y NADH como cofactores, pirúvico y láctico como sustratos y oxámico y oxálico como análogos de sustratos. El ensayo de diversas concentraciones de sustratos y cofactores al investigar el grado de protección de cada sustancia sobre la actividad enzimática puso de manifiesto que cuando en el medio de incubación están presentes ambos, sustrato y cofactor, la protección contra inactivación por calor es mucho más efectiva y se realiza a concentraciones más bajas.

En cuanto a la utilización de la distinta sensibilidad de las isoenzimas de LDH a los cambios de temperatura para estudios zoológicos, Aleksasuk (1971) ha relacionado las distribuciones isoenzimáticas de LDH de varios reptiles con los cambios de temperatura a que están sometidos. De acuerdo con las concentraciones de sustratos que influyen en la actividad enzimática por variaciones de temperatura y de acuerdo con las temperaturas de inactivación para la LDH de las especies estudiadas, Aleksasuk establece las bases de una compensación instantánea del calor en reptiles mediante su distribución isoenzimática.

2.4. ONTOGENIA Y FILOGENIA

La distribución de isoenzimas de LDH en tejidos embrionarios o jóvenes no siempre es igual a la que existe en adultos. La primera observación en este sentido se debe a Markert y Møller (1959) quienes detectaron un mayor número de componentes en corazón de embrión de cerdo que en el de adulto. Estos autores sugieren que las diferencias entre la distribución del adulto y del embrión pueden ser debidas a diferencias en la población celular. Puesto que los cambios observados en la población celular durante el desarrollo no parecen ser suficientemente grandes como para dar cuenta de tal posibilidad, es preferible considerar la distribución de isoenzimas en un tejido como un parámetro del estado de diferenciación de sus células. Hay varios experimentos que apoyan esta opinión.

Flexner et al. (1960) señalan diferencias entre isoenzimas de LDH de cerebro de ratón adulto y recién-nacido, mediante resultados obtenidos por Cromatografía en DEAE-Celulosa, y entre los esquemas electroforéticos de enzimas de hígado de cobayo adulto y recién-nacido. Por otra parte, Kaplan y Ciotti (1961) comunican que las isoenzimas de rata adulta y recién-nacida difieren en su capacidad para reducir a los análogos de Coenzimas.

Los cambios en las actividades relativas de isoenzimas de riñón de ratón durante el desarrollo han sido establecidos por Markert (1962). Este autor establece que las distribuciones observadas un día antes y después del nacimiento son similares. La mayor actividad corresponde a las isoenzimas catódicas, pero sobre un período de tres a cuatro semanas hay un rápido cambio gradual hacia la distribución del adulto en el que predominan las anódicas.

En las distribuciones isoenzimáticas de otros tejidos tienen lugar cambios similares, pero las proporciones del cambio varían considerablemente: mientras que en el riñón, la distribución establecida a los tres días de vida es esencialmente la misma que en el adulto, el desarrollo completo de la distribución isoenzimática característica del es-

tómago requiere alrededor de tres semanas; las isoenzimas de la lengua permanecen estables en la distribución embrionaria a esta edad.

En músculo esquelético de esta misma especie, la isoenzima LDH-5 predomina en la forma embrionaria, pero existen cantidades apreciables de las otras isoenzimas que, según Markert (1963), no se detectan con facilidad en el adulto. En el ratón, la isoenzima embrionaria más abundante en todos los tejidos es LDH-5, pero en otras especies, incluyendo el pollo y el hombre, predominan otras isoenzimas en el embrión.

Con ayuda de una técnica complementaria de fijación, Cahn et al. (1962) observan que la LDH de músculo torácico de embrión de pollo de seis días es idéntica a la de corazón de pollo adulto, mientras que la LDH de ocho días es idéntica a la enzima de músculo esquelético adulto. Estos autores demuestran que el cambio más llamativo ocurre durante el tiempo de incubación de la pollada.

Estas conclusiones fueron confirmadas por estudios de precipitación con anti-LDH de músculo de pollo y por estudios con análogos de Coenzimas. Estos autores interpretaron sus descubrimientos indicando que los tejidos embrionarios de pollo dependen del metabolismo aeróbico del piruvato y su punto de conexión con que el ácido L-láctico es tóxico al comienzo del desarrollo embrionario (Grabowski, 1961).

Philip y Vesell (1962) compararon las distribuciones isoenzimáticas obtenidas por electroforesis en gel de almidón, de tejidos embrionarios de pollo a varios estados del desarrollo deduciendo análogos resultados; establecen que, inmediatamente después de la fertilización LDH-1 es la isoenzima más abundante en hígado, músculo y corazón; LDH-2 y -3 están presentes en bajas cantidades, pero en hígado, LDH-1 está acompañada por dos bandas, de baja actividad y ligeramente más anódicas.

Durante el desarrollo hay una transferencia gradual de actividad de las isoenzimas anódicas a las catódicas y se detectan cantidades apreciables de LDH-4 y -5 en hígado y músculo de adulto. Sin embargo, en corazón ocurren pocos cambios en la distribución de isoenzimas.

Nebel y Conklin (1964) han declarado distintos hallazgos: establecen que las isoenzimas LDH-3 y -4 son las primeras que aparecen en la mayoría de los tejidos embrionarios de pollo.

Como comenta Wilkinson (1965), la discrepancia puede ser debida en parte a la diferencia en el número de isoenzimas, puesto que ambos grupos describen más de cinco isoenzimas o bandas de actividad: Nebel y Conklin señalan duplicidad en LDH-5, mientras que Philip y Vesell refieren bandas adicionales en LDH-1.

Lindsay (1963) también está en desacuerdo con Philip y Vesell y con Cahn (1962) al señalar una desviación de las isoenzimas catódicas a las anódicas durante el desarrollo. En tejidos de pollo se han descrito dos bandas anódicas adicionales a LDH-1, por Croisille (1964), quien también establece dos bandas iguales más rápidas (bandas E), en hígado y riñón embrionarios de pollo. Estas bandas E, sin embargo, desaparecen antes del nacimiento.

Los tejidos de pollo pierden su distribución isoenzimática característica después del cultivo de tejidos in vitro o sobre una membrana corio-alantoica (Philip y Vesell, 1962; Nebel y Conklin, 1964). El músculo, la piel, el corazón y el hígado muestran un decrecimiento en las fracciones anódicas y este descubrimiento se interpreta como indicativo de un retorno a la distribución al azar en tejidos inmaduros (Nebel y Conklin, 1964).

Sin embargo, en corazón de rata, los cambios que tienen lugar durante el desarrollo se parecen a los que ocurren en el ratón: LDH-5 aparece en primer lugar (Kaplan y Ciotti, 1961; Fine et al., 1962) pero enseguida, después del nacimiento, la isoenzima LDH-1 reemplaza a LDH-5 y llega a ser la forma más predominante.

Durante el desarrollo del cerebro se han observado cambios similares. Este órgano requiere 50-60 días para adquirir la distribución isoenzimática del adulto (Bonavita et al., 1962).

Los embriones humanos contienen las cinco isoenzimas de LDH. La más abundante de ellas es LDH-3, pero durante el desarrollo las pro-

porciones de LDH-1 y -5 se incrementan tanto que, incluso después del nacimiento aparecen las distribuciones normales de isoenzimas en los tejidos.

Las proporciones relativas de varias isoenzimas en músculo esquelético embrionario, miocardio y músculo esofágico, están absolutamente ajustadas a la distribución binomial ideal esperada como resultado de la asociación al azar de monómeros A y B, y Wachsmuth (1964) ha mostrado que la distribución isoenzimática permanece constante durante la fase mitótica del desarrollo del músculo cardíaco humano, pero durante la fase post-mitótica (amitótica) hay un incremento gradual en las proporciones relativas de LDH-1 y -2.

La variación en las distribuciones isoenzimáticas del sistema LDH que tienen lugar durante el desarrollo embrionario de Anfibios han sido estudiados por diversos autores. Entre ellos, Balek y Snow (1967) han realizado un estudio comparando los cambios que se producen en este sentido, durante el desarrollo embrionario de dos especies de Ambystoma. Estos autores comentan en la discusión de sus resultados que en embrión de rata, ratón y buey predominan las isoenzimas catódicas y durante el desarrollo aparecen las anódicas; en embrión de pollo, los cambios son opuestos y en estos anfibios los cambios son del tipo de los que tienen lugar en aves, es decir, predominio de las anódicas apareciendo las catódicas durante el desarrollo. Esto confirmaría la relación filogenética entre anfibios y aves, pero como ellos mismos comentan, el significado evolutivo de estos cambios no está claro, particularmente a la vista del trabajo de Salthe (1965) y de Salthe y Kaplan (1966) quienes, sobre las bases de estudios cinéticos e inmunológicos indican que las isoenzimas de LDH de especies que presentan cierta relación adaptativa, parecen estar íntimamente relacionadas. Habría que determinar cuáles de los tejidos embrionarios son los más implicados en los cambios de la distribución isoenzimática.

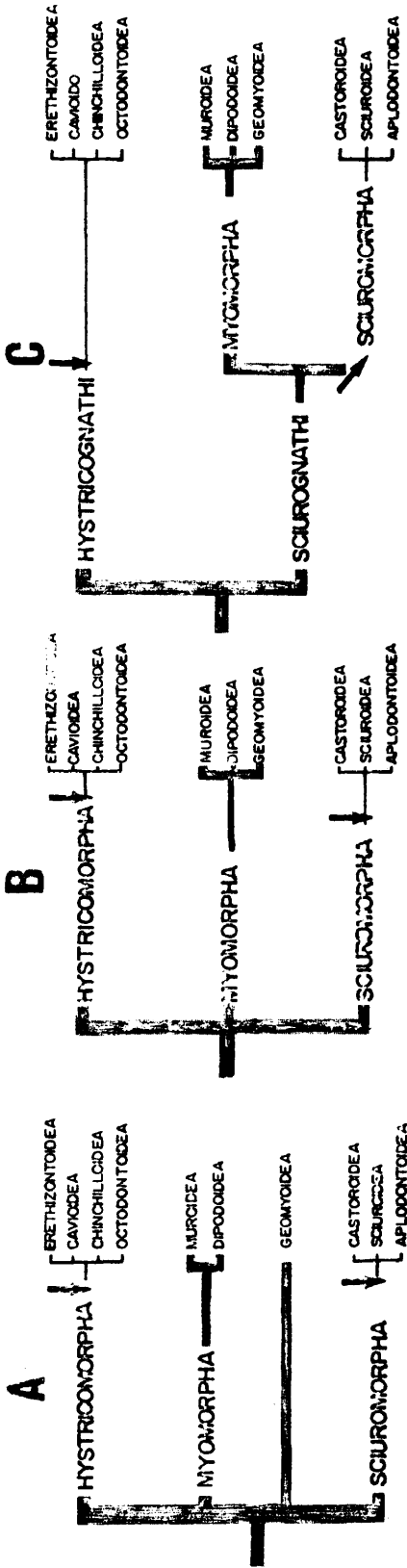
Baur y Pattie (1968) han establecido las bases del control genético para la biosíntesis de las cadenas polipeptídicas A y B en Roedores con vistas a una proyección filogenética en este grupo de Mamíferos.

Los resultados de estos autores determinan que los grupos de Roedores Myomorpha y Geomyoidea no biosintetizan la subunidad B del sistema enzimático LDH, y este carácter tiene interesantes consecuencias taxonómicas tal y como se representa en el esquema de la página siguiente.

Goodman et al. (1969) han estudiado los cambios que se producen en la distribución isoenzimática del sistema LDH en regiones cerebrales de Primates en relación a la ordenación filogenética. Los resultados obtenidos por estos autores indican que en los grupos primitivos (Lorisoidea) predominan las isoenzimas del tipo A (catódicas) mientras que en los grupos más evolucionados (Ceboidea) predominan las isoenzimas de tipo B (anódicas); esta predominancia se hace mayor en los Catarrinos, en los cuales, el neocórtex presenta la mayor proporción de isoenzimas anódicas.

Blackshaw y Elkington (1970) han estudiado los cambios que se producen en la distribución de las isoenzimas de LDH y G-6-PDH durante el desarrollo de testículos de rata; así, establecen que en la rata inmadura, sobre los 20 y 30 días de edad hay un incremento en la actividad de LDH en el tejido tubular e intersticial, y un incremento en la actividad de G-6-PDH sólo en las células intersticiales. Por otra parte, las isoenzimas LDH-X aparecen entre 20 y 30 días de edad, hecho que relacionan estos autores con el incremento en actividad que presenta el epitelio tubular seminífero. Simultáneamente hay un incremento lineal en el diámetro del túbulo seminífero hasta los 60 días, después de los cuales, ya no crece.

También se han realizado estudios onto-filogenéticos en Crustáceos (Schoffeniels, 1970); en peces (Whitt y Maeda, 1970). Boulekbache et al. (1970) han estudiado la distribución de las isoenzimas de LDH durante los primeros estadios del desarrollo del huevo de trucha y han obtenido resultados que plantean una estrecha relación entre las proporciones de isoenzimas anódicas y catódicas con las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis respectivamente. Estos autores establecen que el sistema enzimático LDH controla la relación entre glicolisis y respiración. La actividad de la LDH disminuye bruscamente después de



↓ Mutación de LDH AB⁻ a LDH AB⁺
 * Mutación de LDH AB⁺ a LDH AB⁻

Modelos de filogenia de roedores de acuerdo con la capacidad de biosíntesis del monómero B, de LDH. (Baur y Pattie, 1968)

la fecundación y aumenta en el curso de la gastrulación y de la neurulación. En cuanto a la distribución isoenzimática, en los distintos estados del desarrollo, huevo no fecundado, mórula, blástula y gástrula, está siempre presente la isoenzima LDH-5 (A_4), aunque en el estado de Gástrula o en Epibolia coexiste con la isoenzima LDH-1 (B_4). Estos resultados llevan a estos autores a concluir que desde antes de la fecundación hasta la Gastrulación, las células embrionarias realizan la Glicolisis anaerobia, del mismo tipo que la que se lleva a cabo en el músculo estriado mientras que después de la Gastrulación aparece una isoenzima más propicia para llevar a cabo una utilización del ácido láctico del mismo tipo que como ocurre en el miocardio. La presencia simultánea de dos isoenzimas indica posibilidades de regulación del metabolismo ya que ambos tipos de rutas metabólicas se podrían llevar a efecto.

Tanto de las conclusiones de estos autores como de los resultados discutidos en el apartado anterior de esta memoria (Estudios cinéticos) se puede concluir que la relación entre isoenzimas anódicas (de tipo B) y catódicas (de tipo A) de LDH constituye un rasgo de posibilidades metabólicas para el control de producción de ácido láctico o de su consumo. Por otra parte, las isoenzimas anódicas que ejercen su actividad catalítica con láctico como sustrato son características de estados aeróbicos mientras que a las catódicas les sucede lo contrario. Esta heterogeneidad en la población isoenzimática del sistema LDH puede poner de manifiesto relaciones filogenéticas entre distintos grupos zoológicos pero también es posible que distribuciones isoenzimáticas análogas no correspondan a animales relacionados filogenéticamente sino a especies con análogos condicionamientos adaptativos. Por ello, los resultados obtenidos en este sentido deben interpretarse con cuidado.

Burlington y Sampson (1968) han analizado los cambios que se producen en la distribución de estas isoenzimas durante la hibernación de Mamíferos. Entre sus resultados hacen notar que hay un incremento en la biosíntesis de las subunidades de tipo A (isoenzimas catódicas) en el miocardio; durante ese período decrece la actividad respiratoria y por tanto, aumenta la glicolisis anaerobia, lo que pone de manifiesto

que las distribuciones isoenzimáticas "características" de ciertos órganos están, de hecho, sometidas a diversas fluctuaciones de acuerdo con el estado de anaerobiosis. Dichas fluctuaciones, a nuestro entender, deben interpretarse como respuesta adaptativa a unas condiciones ambientales.

Yochim y Clark han estudiado la variación de actividad LDH durante el ciclo estral y establecen una relación entre la disponibilidad de oxígeno y la biosíntesis de subunidades A y B. (Clark y Yochim, 1971)

Yochim y Clark (1971) determinan que la actividad enzimática propia del endometrio durante el estro, declina durante el diestro. Las subunidades A que dan cuenta del 90% de la actividad en el estro y metaestro, declinan a un 82% durante el diestro. En miometrio, sin embargo, no se manifiesta una fluctuación marcada. El músculo uterino contiene, significativamente, menos actividad enzimática que el endometrio.

Aún no se han hecho estudios filogenéticos completos que puedan aclarar si el rasgo de la distribución isoenzimática del sistema LDH puede realmente constituir un dato valioso en este sentido. Como se ha visto, dicho estudio, tendría que comprender, asimismo, el análisis de los cambios que tienen lugar durante el desarrollo embrionario y durante los distintos ciclos fisiológicos (ciclo estral, ciclo de hibernación etc.). Sin embargo, se han llevado a cabo estudios comparados en Vertebrados (Serban y Cotariu, 1968) y el citado antes de Baur y Pattie (1968).

2.5. PATOLOGIA

Las variaciones que se producen en la distribución isoenzimática de LDH característica de algunos órganos en distintas condiciones fisiológicas hacen posible que la obtención de esquemas isoenzimáticos de pacientes se pueda utilizar con valor diagnóstico para diversas afecciones patológicas. La valoración de la LDH sérica fue introducida en el diagnóstico enzimológico en los años 1954-57 pero se observó enseguida que la elevación de su actividad se presentaba en una amplia variedad de estados patológicos tales como cardíacos, hepáticos, malignos, hematológicos musculares y renales. Esta falta de especificidad desplazó temporalmente el test LDH como sistema de diagnóstico, por otros procedimientos enzimáticos, pero el descubrimiento de su heterogeneidad lo restituyó enseguida.

La mayor parte de los primeros trabajos sobre isoenzimas de LDH se llevaron a cabo en los laboratorios clínicos y, consecuentemente, se establecieron determinados cambios cualitativos y cuantitativos en la distribución de las isoenzimas séricas de LDH como características de disfunciones específicas.

En la actualidad, los trabajos encaminados a determinar las distribuciones específicas de las isoenzimas de LDH en suero para cada enfermedad ocupan una gran extensión en el contexto general de las investigaciones sobre el sistema enzimático LDH. En este campo se han logrado hallazgos muy importantes, en especial para afecciones cardíacas, hepáticas y cancerosas.

No obstante, conviene señalar que la mayoría de las valoraciones, como ya se ha expuesto, se realizan sobre el suero de los pacientes y que en la actualidad no hay acuerdo general sobre el significado de las isoenzimas en el plasma sanguíneo. Parece aceptarse últimamente que las isoenzimas de suero proceden de tejidos en fase de necrosis; a esta conclusión puede llegarse al relacionar el órgano enfermo con las isoenzimas más abundantes en la sangre, pero no hay pruebas concluyentes. Sin embargo, la utilización de la distribución isoenzimática en suero se utiliza con profusión en los laboratorios clínicos y bien es cierto que con bastante éxito.

Las afecciones cardíacas son quizá las que permiten un diagnóstico más exacto a partir del análisis de isoenzimas de LDH en suero. Las afecciones cardíacas se caracterizan en este sentido por una elevación de las isoenzimas anódicas en suero. El infarto de miocardio, quizá la más estudiada, ofrece aspectos muy característicos y distintos según su estado de desarrollo, lo que permite seguir su curso en pacientes mediante tomas sucesivas de suero. En el curso de las primeras 40 horas se nota una elevación de las isoenzimas LDH-1 y -2, manteniéndose la segunda superior a la primera, como en el estado normal. A partir de entonces, la isoenzima LDH-1 se eleva por encima de LDH-2. Este es el cuadro típico de esta enfermedad y se mantiene durante 8-12 días según la gravedad del caso. Después hay una disminución progresiva de estas dos isoenzimas aunque el retorno es lento. La disminución de la isoenzima LDH-1 por debajo de la -2 constituye una buena prueba de curación, o al menos de estabilización (Bajolle et al, 1968).

Las enfermedades del hígado no son tan características, quizá por la gran variedad de afecciones que pueden originarse en este órgano; es norma general de todas ellas la elevación en suero de las isoenzimas catódicas de LDH y quizá el caso más característico esté en las hepatitis, con elevación notable de las isoenzimas LDH-4 y -5 (Elliott y Wilkinson, 1963).

Las afecciones cancerosas presentan un rasgo muy característico en este sentido, hay una gran elevación de la actividad de LDH total que se refleja en una elevación general de las cinco isoenzimas, en donde se suele mantener su distribución normal (Wieme et al, 1968). Sin embargo, el análisis de la distribución isoenzimática de LDH en los tejidos neoplásicos presenta una clara elevación de las isoenzimas catódicas, especialmente de LDH-5 (Langvad, 1968 a y b; Elliot y Wilkinson, 1963).

Además, las isoenzimas de LDH sérica se han utilizado para el diagnóstico de enfermedades musculares (Elliott y Wilkinson, 1963; Prochazka et al, 1969; Bajolle et al, 1968 y otros autores).

Ultimamente, además, se han extendido estos estudios a la determinación de afecciones en numerosos órganos tales como pulmón, estómago, riñón etc. En el artículo de Roman (1969) se presenta una revisión de estos métodos.

Finalmente, en referencia a las relaciones entre actividad de LDH y patología hay que mencionar la comunicación de Kitamura et al (1971) de un caso con completa deficiencia de la subunidad B (o H) de Láctico-deshidrogenasa. Los análisis realizados en sus familiares revelaron que en ellos había una baja proporción de isoenzimas anódicas (con predominio del monómero B), por lo que estos autores concluyen que tal deficiencia es hereditaria.

3. INTRODUCCION EXPERIMENTAL

3.1. ESTABLECIMIENTO DE LA HETEROGENEIDAD ESTRUCTURAL DEL SISTEMA ENZIMATICO LACTICO-DESHIDROGENASA

En 1952 Neilands demuestra la actividad enzimática de dos formas de LDH previamente separadas por Meister (1950). A partir de entonces, otros autores dirigen sus investigaciones en el mismo sentido y así, Vesell y Bearn (1957) determinan tres isoenzimas separadas mediante la técnica de Electroforesis en bloque de almidón. Sayre y Hill (1957) obtienen resultados similares por Electroforesis en papel y Cromatografía en gradiente de elución. Finalmente, Wieland y Pfleiderer (1957) establecen que la mayoría de los órganos de Mamíferos contienen cinco fracciones proteicas que exhiben actividad LDH.

3.2. TECNICAS DE REVELADO Y VALORACION DE ISOENZIMAS

Wieme (1959) estableció el término Enzimo-electroforesis para denominar la técnica basada en la detección de las isoenzimas in situ sobre el soporte electroforético; es el primero que realiza una separación de isoenzimas por electroforesis y que, a continuación, revela las bandas de actividad sobre el mismo soporte. Para realizar la valoración de esta forma, este autor prepara un segundo gel de agar que contiene pirúvico y NADH en tampón barbital a pH 8,4 y fuerza iónica conveniente; superpone ambos geles, que tienen forma de plancha, y mediante un espectrofotómetro ajustado a 340 nm hace sucesivos barridos. Así obtiene valores de la cinética de reacción propia de cada isoenzima.

3.2.1. Sales de Tetrazolio

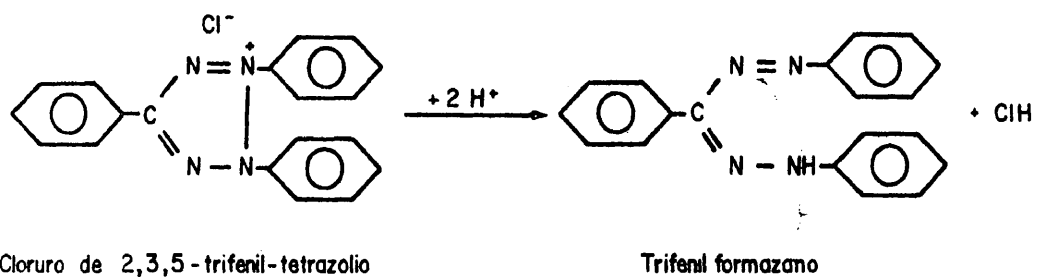
Los derivados de Tetrazolio se han utilizado extensamente en el estudio de reacciones redox. Su empleo comenzó en las técnicas

histoquímicas y tests de fertilidad de semillas etc. Los derivados del Tetrazolio precipitan al ser reducidos dando un Formazano derivado, intensamente coloreado y que además precipita poniendo de manifiesto la reacción, cuya velocidad puede medirse por técnicas espectrofotométricas. El primer derivado de Tetrazolio que se utilizó fue el Cloruro de 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio (Kun y Abood, 1949) que al reducirse da el Trifenil-Formazano (véase la figura de la página siguiente).

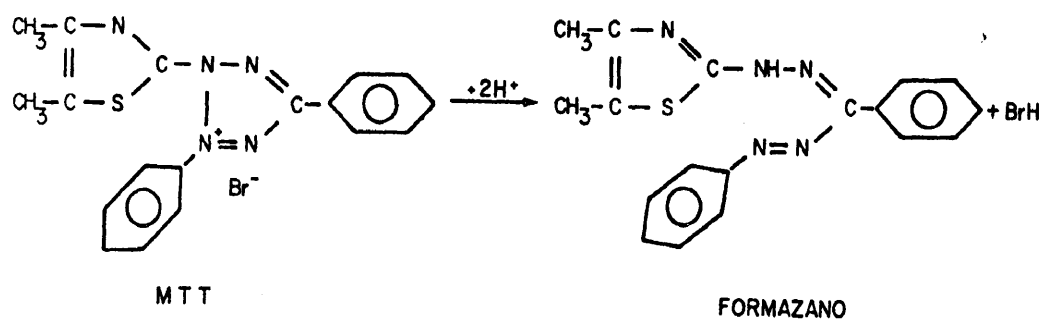
Posteriormente se utilizó el Bromuro de 2,5-Difenil-3-(4,5-Dimetil-Tiazol-2-) -Tetrazolio (MTT). Este compuesto es un derivado más sensible y su estructura está expuesta también en la página siguiente.

Estos colorantes, utilizados inicialmente en técnicas histoquímicas se aplicaron al revelado de las isoenzimas de LDH en el soporte electroforético después de la separación de las fracciones. La primera aplicación en este sentido se debe a Markert y Möller (1959). Estos autores incluyeron en la solución de revelado Ácido láctico, Hidrazina, NAD^+ , Diaforasa, Azul de Metileno y el derivado de Tetrazolio (MTT). El Azul de Metileno actúa como intermediario ajustando el potencial redox entre el NADH y el MTT. La Diaforasa es necesaria para catalizar la reducción del Azul de metileno por el NADH y la hidrazina precipita el pirúvico que resulta de la reacción. El soporte electroforético se sumerge en esta solución y tiene lugar toda la serie de reacciones precipitando el Formazano-derivado sobre el mismo con lo que se ponen de manifiesto las isoenzimas. El conjunto de reacciones se representa en la figura inferior de la página 63. Estos autores realizaron la separación electroforética de isoenzimas de LDH en gel de agar. Es de notar, que al precipitar el Formazano-derivado sobre el gel se pone de manifiesto la actividad enzimática tal y como se venía haciendo al introducir los cortes histológicos en una solución de revelado similar. En este caso las bandas de Formazano indican la presencia de isoenzimas separadas en el gel, y la intensidad de las mismas refleja la actividad enzimática.

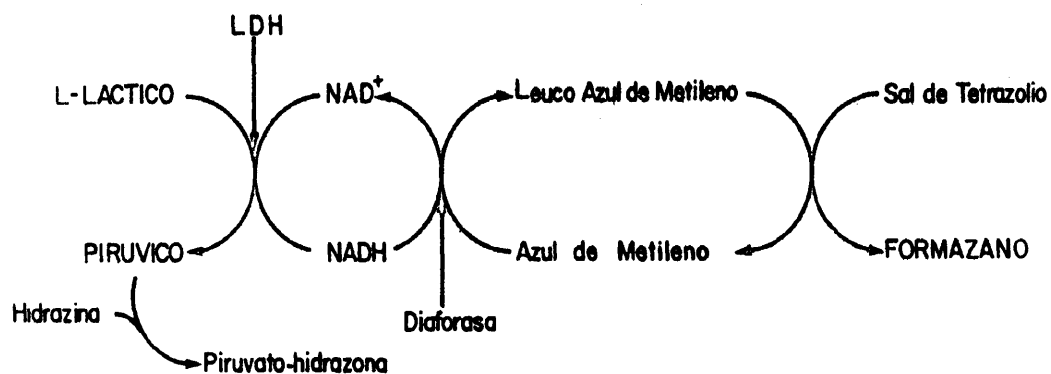
Con este experimento de Markert y Möller se abrió un amplio campo de investigación, en lo que respecta a la actividad de las isoenzimas, pues como se verá más adelante, la técnica se ha modificado para aplicarla a otros sistemas isoenzimáticos.



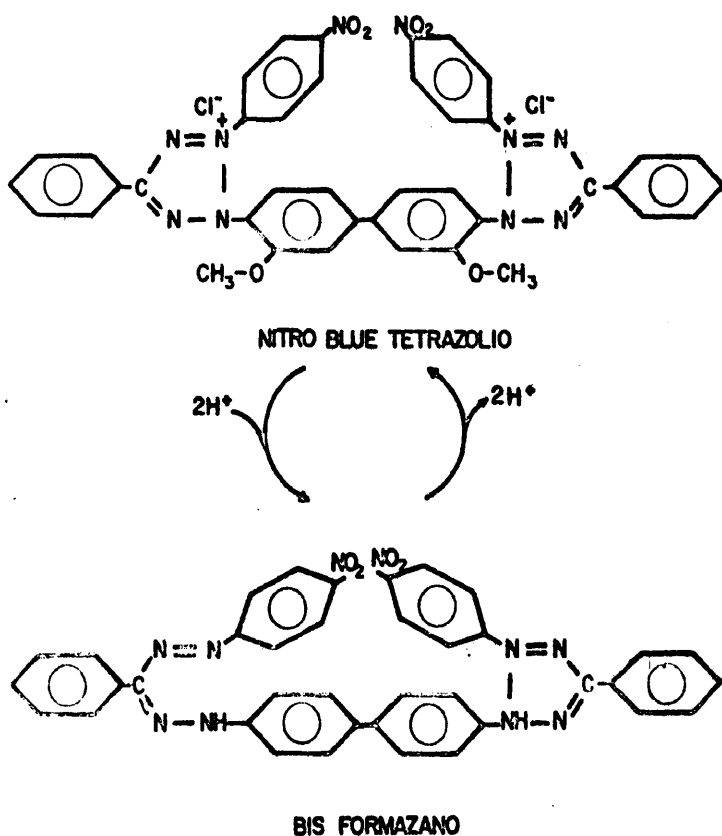
Reducción del Cloruro de trifenil-tetrazolio



Reducción del MTT



Método utilizado por Markert y Møller (1959) para determinar la actividad enzimática de las isoenzimas de LDH.



Reducción del NBT y esquema de su estructura, así como la del formazano-derivado.

3.2.2. Nitro-Blue-Tetrazolio (NBT)

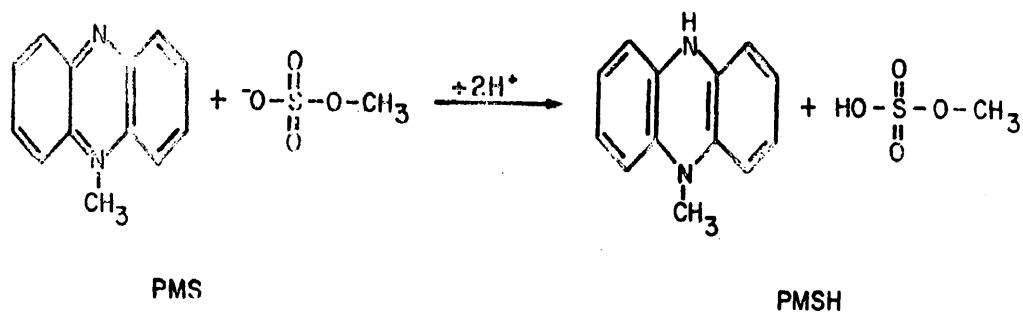
Este derivado de Tetrazolio (dicloruro de ditetrazolio) fue descrito por Tsou et al. (1956) y propuesto y utilizado para el caso que nos ocupa por diversos autores. Es el Dicloruro de 2,2'-di-p-Nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenilén)-Tetrazolio.

Tiene el inconveniente de que se disuelve mal, pero esto apenas es problema, dada la baja concentración a que se utiliza. En cambio, es extraordinariamente sensible. Después de su utilización, prácticamente no se han vuelto a utilizar los colorantes anteriormente descritos pues la sensibilidad del NBT hace que la tinción de las isoenzimas de Deshidrogenasas sea una técnica con tanta resolución como la propia electroforesis. De otra forma, dos bandas muy próximas en el gel podrían parecer una única, difusa. Por otra parte, la sensibilidad de este colorante hace que la tinción sea muy rápida lo que hace posible su utilización para estudios cinéticos, como se verá más adelante. Asimismo, esta propiedad favorece la limpieza del método pues se puede controlar mejor el tiempo de revelado y se detectan bandas con muy poca actividad. En la página anterior se representa su estructura y la del Formazano-derivado que se origina mediante su reducción.

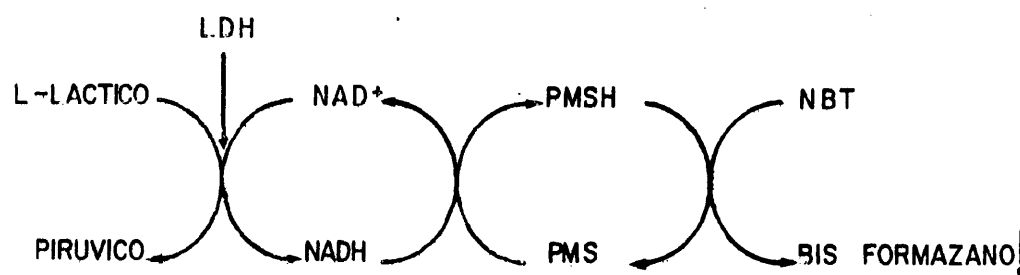
3.2.3. Fenazina-Metosulfato (PMS)

El Metoxi-Sulfato de N-metil-Fenazinio se utilizó por primera vez por Dickens y McIlwain (1938) como portador de electrones en el ajuste de potenciales redox y se aplicó a la técnica de revelado de isoenzimas por Dewey y Conklin (1960) quienes lo emplearon para valorar isoenzimas de LDH.

Estos dos últimos autores explican que la Fenazina-Metosulfato (PMS) sustituye al Azul de Metileno y tiene la ventaja de que no es necesario añadir la Diaforasa; corrigen, así, la técnica descrita por Markert y Møller (1959) y su procedimiento, que se detalla en la figura de la página siguiente, así como también la estructura de la PMS, se ha venido utilizando desde entonces sin que se haya introducido ninguna variante esencial.



Estructura de la Fenacina-metosulfato (PMS) y del compuesto que resulta de su reducción.



Método de Dewey y Conklin (1960) para analizar la actividad enzimática de las isoenzimas de LDH sobre el soporte de la electroforesis.

Dewey y Conklin (1960) realizaron la electroforesis sobre gel de almidón utilizando riñón de rata como material biológico. La técnica fue inmediatamente confirmada por diversos autores hasta el punto de que las técnicas histoquímicas se ajustaron también a este mecanismo de tinción obteniéndose unos resultados más precisos. La PMS se utiliza simultáneamente con el NBT y no es necesario añadir Hidrazina pues el pirúvico que resulta no interfiere en la reacción.

3.2.4. Discusión de las técnicas de revelado de isoenzimas

Como puede verse, por lo dicho hasta el momento, estas técnicas de revelado no se pueden utilizar para determinar la cantidad de cada isoenzima presente en la muestra que se aplica en la electroforesis. La intensidad del color de cada banda, que se obtiene con un densitómetro, haciendo un barrido del gel, indica la actividad enzimática, la cual es función de la cantidad de isoenzima presente en la muestra, pero también de su actividad específica que, como ha quedado establecido antes, no es la misma para todas las isoenzimas.

Sin embargo, puesto que este procedimiento nos proporciona directamente la actividad enzimática, puede utilizarse para realizar estudios cinéticos de velocidad de reacción, determinación de K_m etc.

La extrapolación de actividad enzimática a cantidad de cada isoenzima sólo podría hacerse por aproximación, determinando unas condiciones "standar" de revelado que, a ser posible, habrán de ser fijadas con posterioridad a un estudio de cinética comparada de isoenzimas. De dicho estudio habría que extraer las condiciones en las que las diferencias de actividad específica se manifiestan lo menos posible y en tales condiciones hacer la extrapolación, siempre aproximada, de actividad-cantidad de isoenzima. Al discutir los resultados de los estudios cinéticos volveremos sobre este punto.

3.3. TECNICAS DE ELECTROFORESIS PARA LA SEPARACION DE ISOENZIMAS

Dentro de este apartado podríamos distinguir entre técnicas analíticas y preparativas. Las primeras han recibido mayor atención al principio del desarrollo de estas investigaciones, por lo que a ellas dedicaremos atención inicial.

El desarrollo de las técnicas de Electroforesis de zona para la separación de proteínas de suero durante la década de 1945-55 ha puesto a estos procedimientos en condiciones de utilizarse para la separación de isoenzimas, una vez que su existencia se haya reconocido, e incluso ha permitido determinar una heterogeneidad estructural en sistemas enzimáticos que se suponían homogéneos. La Electroforesis en papel se ha utilizado extensamente en Bioquímica clínica para el estudio de anomalías en la distribución de proteínas séricas y esta técnica fue una de las primeras que se utilizaron en la separación de isoenzimas.

Sin embargo, en años recientes ha aparecido una gran variedad de métodos electroforéticos, especialmente en lo que se refiere al soporte utilizado para el desarrollo: bloque de almidón, acetato de celulosa, gel de agar, gel de almidón y gel de poliacrilamida.

La mayoría de estas técnicas electroforéticas establecen un pH alcalino entre 8 y 9 en el soporte, con lo que las proteínas migran hacia el ánodo. La distinta carga eléctrica de las proteínas será responsable de su distinta movilidad electroforética, pero no es éste el único factor determinante de la misma ya que, según la constitución y las características del soporte, el tamaño molecular puede influir notablemente.

El tamaño de poro del retículo del soporte, la concentración del monómero que polimeriza (dureza del gel), la fuerza iónica, el pH, la diferencia de potencial, la temperatura etc. son factores que condicionan la movilidad total de cada proteína durante la electroforesis. De igual forma, la geometría del aparato tiene especial importancia, por lo que no es de extrañar la enorme cantidad de diseños de aparatos que se están describiendo constantemente.

3.3.1. Electroforesis en papel

La valoración de LDH total en suero constituyó durante algunos años un método de diagnóstico muy apreciado para diversas enfermedades, pero desde el descubrimiento de su heterogeneidad estructural, la distribución isoenzimática en el suero adquirió mayor importancia, qui-

zá debido a que fue el primer sistema en el que se descubrieron las isoenzimas. Por ello, los comienzos de su investigación se extendieron en los laboratorios clínicos. Así, los estudios de la distribución de proteínas en suero se ampliaron al estudio de las isoenzimas de LDH. La Electroforesis en papel ha sido la técnica más utilizada durante el principio.

Esta técnica puede realizarse con desarrollo horizontal o vertical, aunque quizá la primera modalidad se prefiere por motivos teóricos. En ambos tipos de aparatos, los bordes del papel se disponen sumergidos en cámaras de tampón donde también están sumergidos los electrodos. Se suele utilizar papel Whatman nº1 para objetivos analíticos y la naturaleza y concentración de las soluciones tampón varían según la naturaleza de las isoenzimas.

La muestra, que contiene la mezcla de isoenzimas (suero, fracción soluble de un homogeneizado etc.) se aplica en el extremo catódico del papel impregnado en una solución tampón a un pH alcalino y se establece una diferencia de potencial de unos 10 V/cm. La Electroforesis de alto voltaje en papel no es aplicable para la separación de isoenzimas, ya que produce excesivo calor y las enzimas se desnaturalizan.

Para obtener una buena separación de las bandas de isoenzimas, la Electroforesis en papel se mantiene durante varias horas (el tiempo depende, en este caso del voltaje aplicado, en gran medida) pero como es difícil de refrigerar, conviene aplicar una diferencia de potencial reducida y así, la separación puede durar toda la noche.

Utilizando papel Whatman nº1 la cantidad de muestra que se puede aplicar es limitada y la técnica sólo puede utilizarse con fines analíticos. Para fines preparativos hay descrita una técnica de Electroforesis continuada (Haugaard y Kroner, 1948; Grassmann y Hanning, 1950; Durrum, 1958). El fundamento de dicha técnica es una aplicación constante de muestra en un extremo del papel y el avance de las proteínas en dos direcciones: por movilidad electroforética en sentido horizontal y por gravedad en sentido vertical. El procedimiento no es muy exacto pero se ha utilizado por varios autores.

3.3.2. Electroforesis en bloques de almidón

La utilización de granos de almidón de patata como soporte electroforético para la separación de proteínas fue introducida por Kunkel y Glater (1952) y su primera aplicación a la investigación de isoenzimas corresponde a Vesell y Bearn (1957) quienes separaron isoenzimas de LDH y MDH de suero humano. Después se utilizó la misma técnica para la separación de fosfatasa alcalinas de suero, hígado y hueso (Keiding, 1953; Rosenberg, 1959).

El almidón extraído de la patata por homogeneización y centrifugación, se lava con agua y los granos son suspendidos y equilibrados con un tampón al pH conveniente; seguidamente se extraen por decantación y los granos húmedos se comprimen sobre un molde con láminas de cristal. Todas las dimensiones de las piezas del aparato pueden variar dentro de amplios límites, de acuerdo con el volumen de solución enzimática que se desee aplicar. Los bordes del bloque se adhieren a un papel de filtro que se dobla para que penetren en unos reservorios con tampón, donde están los electrodos. Se suele utilizar un tampón a pH alcalino, por lo que, al igual que en la electroforesis en papel, la muestra se aplica en el extremo catódico y las proteínas migran hacia el ánodo. Después de transcurrida la electroforesis, el bloque contenido en el molde se sumerge en la solución de revelado, o tan sólo una tira longitudinal del mismo. Así se ponen de manifiesto las zonas de actividad enzimática y en este último caso, las proteínas correspondientes se pueden eluir del resto del bloque (modalidad preparativa) localizándolas al enfrentarse con él la tira teñida.

3.3.3. Electroforesis en Acetato de Celulosa

Las membranas de Acetato de celulosa tienen varias ventajas sobre el papel, como soporte de la electroforesis de zona, puesto que se reduce mucho la adsorción de las proteínas y en el caso concreto de la separación analítica de proteínas séricas, la "cola" de la albúmina se elimina prácticamente (Kohn, 1957). Estas membranas son químicamente homogéneas y se pueden transparentar, con lo cual las bandas de pro-

teínas teñidas se pueden medir por técnicas de Densitometría. Además, el tiempo necesario para la separación es más corto. El hecho de que este soporte procurase mejor resolución de las proteínas de suero que los que se habían utilizado hasta entonces ha sido, sin duda, la razón por la que dicha técnica se haya utilizado con gran extensión en investigación clínica y análisis clínicos de rutina. La ampliación de su empleo al análisis de isoenzimas de LDH se llevó a cabo simultáneamente por diversos autores (Wieland et al., 1959; Pfleiderer y Wachsmuth, 1961). Además se ha utilizado también para la investigación de otras isoenzimas. (Smith y Rutenburg, 1963; Meade y Rosalki, 1964).

3.3.4. Electroforesis en gel de Agar

Gordon, Keil y Sebasta (1949) fueron los primeros en describir una separación de proteínas por electroforesis en gel de agar y la primera aplicación de esta técnica a la separación de isoenzimas se debe a Wieme (1959). Wieme aplicó este procedimiento a la separación de isoenzimas de LDH y SDH de tejidos de rata y LDH de suero humano. Otros autores la utilizaron también (Vuylsteek y Wieme, 1958; Ressler y Moy, 1959; Lowenthal, Van Sande y Karcher, 1961) y esta técnica se ha utilizado en especial para la resolución de fosfatasas ácidas y alcalinas y esterases.

Wieme recomienda utilizar Difco Special Agar-Noble para la preparación de los geles, pero otros autores (por ejemplo, Bodman, 1960) dicen que otros grados de agar son igualmente satisfactorios, aunque bien es cierto que el agar desionizado durante algún tiempo, no forma buenos geles.

La técnica, en su concepción, es relativamente sencilla; se prepara una disolución de agar al 1% aproximadamente en una solución tampón caliente que al enfriarse forma un gel de consistencia satisfactoria. Para la separación de proteínas es recomendable incorporar azida sódica al 0,5% para evitar la contaminación bacteriana ya que este soporte tiene el inconveniente de ser un excelente medio de cultivo. De todas formas, la azida no debe usarse en el estudio de isoenzimas pues es un potente inhibidor de actividad para algunas.

El tampón utilizado suele ser Barbital a un pH 8.4 o Glicocola a pH 8.7 etc. El gel se funde y se vierte sobre un portaobjetos o sobre planchas de vidrio más grandes, mantenidas horizontalmente; con él se produce una capa homogénea de unos 2 mm de espesor que cubre completamente la lámina de vidrio. La solución enzimática (unos 5 μ l) se aplica en una hendidura de 1 mm de profundidad que se practica transversalmente sobre un extremo del gel. También se puede aplicar la muestra en un papel que a continuación se superpone sobre el gel; quince minutos después la mayoría del volumen enzimático ha difundido al interior del gel y se extrae el papel con cuidado. La conexión del gel con las cámaras del tampón, donde están los electrodos, se suele hacer con papeles, como en el caso del bloque de almidón. El frente de migración se puede establecer con Azul de Bromofenol. La lámina de vidrio con el gel se coloca en un aparato que puede estar refrigerado con una fracción de hidrocarburos ligeros de la destilación del petróleo.

3.3.5. Electroforesis en gel de Almidón

Esta técnica se ha utilizado ampliamente para el estudio de isoenzimas y otros tipos de proteínas, desde su introducción por Smithies (1955) y ha sido una de las técnicas de Electroforesis que más ha contribuido al estudio de isoenzimas, aunque en la actualidad ha sido notablemente desplazada por la Electroforesis en gel de Poliacrilamida.

La modificación que esta técnica introduce sobre las descritas anteriormente es la utilización de un gel de almidón como soporte de la Electroforesis. Este soporte es conveniente, sobre todo, para técnicas analíticas y tiene la ventaja de que permite su extensión hacia el campo de las técnicas preparativas.

El almidón "soluble" (parcialmente hidrolizado) de patata, obtenido comercialmente, se suspende en una solución tampón en una proporción que oscila entre el 10 y el 15%. La mezcla se calienta con agitación vigorosa hasta que se forma un líquido viscoso traslúcido. Se detiene entonces el calentamiento y se reduce la presión hasta que la mezcla hierva; esto asegura la extracción de las burbujas de aire

~~que esta se haya conseguido se desconecta la succión de la~~
trompa de vacío y el líquido se vierte en unas bandejas, en cantidad suficiente como para que se forme un menisco que rebase el borde de las mismas. Este exceso se comprime con una lámina de vidrio mientras el gel está blando aún. Así se obtiene un gel homogéneo con una superficie plana y libre de burbujas.

El tampón utilizado suele ser borato a pH 8.4 pero de igual forma se puede utilizar un fosfato o un acetato. La naturaleza del tampón contenido en el gel ejerce poca influencia sobre la separación de las bandas pero influye más notablemente la fuerza iónica del mismo. Así, con tampones de baja fuerza iónica, la isoenzima LDH-5 tiende a migrar hacia el ánodo, mientras que con tampones de alta fuerza iónica migra claramente hacia el cátodo (Ressler et al., 1963). Estos autores atribuyen este efecto a la asociación de la isoenzima con sustancias aniónicas presentes en el medio, ya que el incremento en la concentración de almidón en el gel aumenta el efecto de baja fuerza iónica en los tampones; sin embargo, si se realiza una electroforesis preliminar (conocida como "Pre-Electroforesis") del gel, antes de aplicar la muestra, se elimina este efecto. Con los geles de Agar ocurre un efecto análogo.

Se han ensayado sistemas discontinuos de tampón colocando soluciones distintas en los recipientes de los electrodos y en la preparación del gel (Poulik, 1957). Este autor aconseja este procedimiento para eliminar el efecto de baja fuerza iónica sobre las distintas movibilidades absolutas de la isoenzima LDH-5 y de otras proteínas. La naturaleza y pH de los distintos tampones se determinaría con arreglo a la experiencia, en cada caso.

La muestra se aplica en una ranura transversal, angosta, en el extremo catódico del gel, de igual forma que en la Electroforesis en Agar. Así se difunde poco y se mejora la resolución. Por otra parte, utilizando una concentración de almidón relativamente alta, se obtiene un tamaño de poro muy apropiado para que entre en juego un tamizado molecular que contribuye a aumentar la resolución. Tendríamos

entonces el hecho de que el gel no es ya el soporte clásico de la Electroforesis de Zona, que evita la difusión, sino que participa en la separación de proteínas de carga neta parecida y distinto tamaño molecular. Este efecto, como veremos más adelante, se pone claramente de manifiesto en la Electroforesis en gel de Poliacrilamida.

En la Electroforesis en gel de Almidón, la conexión de los bordes del gel con los electrodos se establece mediante papeles de filtro como ya se ha descrito anteriormente para otras modalidades. Las bandejas que contienen el gel están colocadas horizontalmente en un aparato de dimensiones apropiadas y la Electroforesis dura unas dos horas. Esta es la técnica de Electroforesis horizontal. La misma técnica con desarrollo vertical está descrita por Smithies (1959) y también ha sido utilizada, aunque menos, por diversos autores para la separación de isoenzimas.

Como dijimos antes, la Electroforesis en gel de Almidón se puede aplicar con fines preparativos. En efecto, varios autores han descrito y utilizado dicha técnica en este sentido con buenos resultados. El gel de Almidón tiene la ventaja de que después de transcurrida la Electroforesis permite una buena elución de las proteínas separadas y como proporciona una gran resolución y buena reproducibilidad se puede teñir una tira longitudinal, enfrentarla con el resto del gel y eluir de este último las fracciones deseadas.

3.3.6. Electroforesis en gel de Poliacrilamida

La Electroforesis en gel de Poliacrilamida fue introducida por Ornstein y Davis (1959) y Raymond y Weintraub (1959) y en el momento actual hay establecidas una gran variedad de técnicas tomando como base las originales de estos autores. Estas técnicas se han utilizado con una gran extensión para la separación de isoenzimas, tanto de LDH como de otros sistemas y asimismo, para la separación de otras proteínas (mitocondriales, séricas etc.) y como un criterio altamente riguroso de pureza para una proteína aislada.

La técnica original de Ornstein y Davis (1959) denominada Disc-Electroforesis por estos autores (Electroforesis de disco o Electro-

foresis discontinua) presenta dos tipos de modificaciones sobre las descritas anteriormente. Por una parte introduce la poliacrilamida como soporte de la electroforesis y por otra establece, en su concepción original, dos discontinuidades de pH en el gel y una discontinuidad de reticulación. La poliacrilamida constituye un soporte muy efectivo para el desarrollo. Por una parte, es un medio totalmente transparente lo que permite una determinación precisa de las bandas por métodos espectrofotométricos y por otra, su preparación es posible en un rango amplio de dureza, reticulación y pH; de esta forma la técnica puede aplicarse a la separación de proteínas difícil o imposible de conseguir con otras técnicas.

El establecimiento de las discontinuidades de pH y reticulación en el gel trae consigo que en determinadas condiciones (utilizando un tampón en la cámara superior de glicocola-tris a pH 8.3) se cumpla la ecuación de Kohlrausch. La primera discontinuidad de pH, entre el tampón de la cámara superior, donde está el cátodo y el gel superior (discontinuidad de pH, de 8.3 a 6.7) hace que las proteínas penetren en este gel a gran velocidad, aunque una vez en él avanzan con lentitud, dado el pH próximo a la neutralidad. Así se consigue una de las grandes ventajas de esta técnica, todas las proteínas incluidas en la muestra se concentran en una banda de un grosor mínimo. Este gel suele ser muy reticulado aunque de poca dureza, circunstancias que favorecen la poca movilidad de las proteínas y que, por tanto, contribuyen a concentrarlas.

La segunda discontinuidad de pH se establece entre el gel superior y el gel inferior. Así como el primero suele tener poca longitud, el segundo, que es el verdadero soporte del desarrollo de la electroforesis, tiene una longitud que oscila entre 50 y 200 mm. Las proteínas llegan a la línea de separación de estos dos geles totalmente concentradas. En este momento comienza propiamente el desarrollo y en todas las moléculas de proteína al mismo tiempo, con lo que se consigue una resolución mucho mayor que con otras técnicas, basada en la nitidez de las bandas y evitándose solapamientos. El pH del gel inferior se suele ajustar a 8.9 mediante un

tampón tris-HCl. Este pH resulta adecuado para la resolución de una gran variedad de proteínas de suero, isoenzimas de LDH y otras proteínas, pero se puede variar en un rango muy amplio, de acuerdo con la muestra que se pretenda analizar. La composición del gel que hemos descrito, corresponde a la original de Davis (1964) y la teoría de su desarrollo ha sido discutida por Ornstein (1964).

El gel se prepara mezclando una solución de Acrilamida y Bisacrilamida (N,N', Metilén-diacrilamida) con una solución tampón y con pequeñas cantidades de catalizadores (Persulfato amónico, TEMED -N,N,N',N'; Tetrametilén-etilén-diamina-, Riboflavina). El porcentaje final de Acrilamida en el gel da la dureza del mismo, que para la separación de isoenzimas de LDH suele estar comprendido entre el 5 y 7.5%. La proporción entre Acrilamida y Bisacrilamida da la reticulación del gel, que suele ser 39/1 en el gel inferior y 6/1 en el gel superior. El sistema de polimerización puede ser de dos tipos, por fotopolimerización (con Riboflavina en el gel) o catiónico (con persulfato amónico).

La solución, libre de burbujas de aire, se vierte en unos tubos de vidrio o plástico, cerrados por su parte inferior. En ellos tiene lugar la polimerización, después de la cual se prepara el gel superior que se vierte sobre el borde del gel inferior y se opera de igual forma. Terminado este proceso, los geles están preparados, se colocan en un aparato adecuado (Davis, 1964) y se procede a desarrollar la electroforesis después de aplicar la muestra encima del gel superior o incluida en un tercer gel (gel de muestra).

Una vez transcurrida la electroforesis, que suele durar entre una hora y tres horas, según la naturaleza de la muestra y la composición del gel, se procede a sacar estos de los tubos y a introducirlos en una solución de tinte, cuya composición es muy variable, según las proteínas que se deseen observar.

Esta técnica se ha utilizado con fines preparativos por diversos autores, entre ellos Strauch (1971), Duesberg y Rueckert (1965), Lewis y Clark (1963) y Jovin et al. (1964).

3.3.7. Otras técnicas para la separación de isoenzimas

La Cromatografía en columna, en DEAE-celulosa y en Carboximetil-celulosa, introducidas por Sober y Peterson (1956, 1958) se han utilizado también para la separación de isoenzimas de LDH (Hess, 1958; Hess y Walter, 1960) y para la separación de isoenzimas de Leucina-amino-peptidasa de suero en enfermedades hepáticas (Dioguardi etal., 1961).

Moore y Angeletti (1961) han llevado a cabo la separación de isoenzimas de fosfatasas, Glucosa-6-P-DH y 6-P-glucónico-DH mediante Cromatografía en gradiente de elución sobre DEAE-celulosa.

La técnica de filtración en gel (Porath y Flodin, 1959) se ha utilizado también para la separación de isoenzimas. Wilding (1963) ha investigado por este procedimiento la heterogeneidad de la amilasa de suero y orina. Wieland y Determann (1962) han utilizado el DEAE-Sephadex para la separación de isoenzimas de LDH, así como otros autores.

La mayoría de estas técnicas, no electroforéticas se han utilizado siempre con fines preparativos. Por ello, no es de extrañar que su utilización haya sido más restringida que la de las técnicas descritas anteriormente. No obstante, como se discute después, las técnicas cromatográficas no han de entenderse, en este sentido, como competitivas de las electroforéticas sino complementarias unas de otras, especialmente en lo que se refiere a la purificación de las isoenzimas.

3.3.8. Discusión de las técnicas de separación de isoenzimas

Como se puede apreciar, por lo expuesto hasta el momento, hay una gran variedad de técnicas que pueden hacer posible la determinación de una heterogeneidad estructural en un sistema enzimático o en una proteína que se suponían homogéneos y proceder a su posterior estudio. Si tenemos en cuenta que la separación de isoenzimas puede hacerse con dos tipos de objetivos, preparativos y analíticos, nos parece más adecuado utilizar la electroforesis para la

segunda finalidad pues permite la aplicación rápida de múltiples muestras, iguales o distintas y el reconocimiento de las fracciones es sencillo, como ya se ha discutido anteriormente.

En cuanto a la gran variedad de técnicas de Electroforesis de zona que se han descrito hasta el momento, es indudable que la Electroforesis en gel de Poliacrilamida es la que permite mayor variabilidad de condiciones y, por tanto, la que mejor puede adaptarse a cada problema. Si añadimos a esto su magnífica resolución y la circunstancia de que el gel es perfectamente transparente, con lo que se puede densitometrar con gran corrección, se comprenderá lo extendida que se encuentra esta técnica en la actualidad. La Electroforesis en papel, acetato de celulosa y bloque de almidón presentan el inconveniente de que no evitan la difusión de las bandas. El densitometrado de las mismas es defectuoso en muchos casos y la aplicación de la muestra no es lo suficientemente homogénea. La Electroforesis en gel de almidón presenta también estos inconvenientes, aunque más reducidos pero el densitometrado no se puede llevar a cabo con extrema limpieza pues el soporte no es transparente. La primera ventaja que ofrece la Electroforesis en gel de Poliacrilamida, a nuestro juicio es la sencillez en la aplicación de la muestra acompañada de la concentración homogénea de la misma; permite además variar el pH y la reticulación del medio de desarrollo pudiendo establecerse múltiples discontinuidades de uno u otro tipo a lo largo del gel con lo que se pueden analizar proteínas en un rango muy amplio de peso molecular, carga neta etc. Baste señalar algunas de las modalidades descritas corrigiendo el método original de Ornstein y Davis (1959), para la separación y el estudio de diversas proteínas.

Aplicación de la Electroforesis en gel de Poliacrilamida a la determinación de pesos moleculares de proteínas. (Weber y Osborn, 1969). Determinación de las fracciones de histonas (Johns, 1967). Separación de lipoproteínas de suero (Pratt y Dangerfield, 1969). Separación de proteínas mediante "Isoelectric focusing" (Svensson, 1962; Vesterberg y Svensson, 1966).

Las técnicas preparativas, si bien en su concepción teórica serían muy similares a las analíticas, en lo que respecta a la separación de proteínas, no es menos cierto que su realización práctica presenta varias dificultades sobre la base de problemas técnicos, especialmente en lo que se refiere al sistema de elución de fracciones. Un problema general de todos los aparatos de electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida descritos hasta el momento, es la reducida cantidad de muestra que permiten aplicar (40-80 mg de proteína total como máximo) ya que de utilizarse una columna demasiado gruesa la refrigeración de la misma no sería efectiva. Si coordinamos esta circunstancia con la alta resolución que proporciona esta técnica, llegaremos a la conclusión de que su utilización más idónea está exclusivamente en la purificación de proteínas, para lo cual, indiscutiblemente es una técnica sumamente efectiva. Esta consideración debe entenderse comentando los procedimientos de Electroforesis de disco tal y como fueron diseñados inicialmente por Ornstein y Davis (1959) aunque adaptados a técnicas preparativas. Por todo ello hay que señalar que la utilización de estas técnicas electroforéticas para aislar proteínas debe constituir uno de los pasos, quizá el último, de un proceso de purificación, que precisará utilizar otras técnicas con anterioridad (precipitación con sulfato amónico, cromatografía etc.).

3.3.9. Proyección de estas técnicas para el estudio de otras isoenzimas

El método de revelado de isoenzimas de LDH introducido por Markert y Møller (1959) y perfeccionado por Dewey y Conklin (1960) que está representado en la figura de la página 65, fue modificado por diversos autores para proceder al estudio de otras isoenzimas; sustituyendo el ácido láctico por el sustrato adecuado, la técnica se puede emplear para la determinación de otras deshidrogenasas. Así se han estudiado las Mállico-deshidrogenasas (Tsao, 1960, en gel de almidón), Isocítrico-deshidrogenasas cambiando, además el NAD^+

por NADP⁺ (Vignais y Vignais, 1961; Kaplan, 1963), Glucosa-6-P-des-hidrogenasa (Tsao, 1960) etc.

Además, acoplando la reacción de deshidrogenación con otro sistema, esta técnica se puede extender al estudio de otro tipo de isoenzimas, tales como aspártico-amino-transferasas (Boyde y Latner, 1961).

Otros sistemas enzimáticos, como son las esterasas se han investigado con técnicas distintas, en este caso con el procedimiento de Nachlas y Seligman (1949) para su utilización en histoquímica y modificado después por Gomori (1952).

O B J E T I V O S

A la vista de la importancia reguladora, en general, de las isoenzimas y de las posibles incidencias particulares de cofactores y hormonas sobre cada una de ellas, se plantea en esta investigación:

1. Un estudio cinético general, comparado de las cinco isoenzimas de Láctico-deshidrogenasa (LDH).
2. Un estudio de la influencia que sobre la cinética individual de cada isoenzima de LDH ejercen distintos tipos de factores.
3. Un estudio comparado de estas influencias en sistemas isoenzimáticos de LDH procedentes de distintos órganos y tejidos.
4. Un estudio de los efectos que sobre los sistemas isoenzimáticos de LDH ejercen diferentes estados fisiológicos.
5. Un estudio de las características de microheterogeneidad del sistema isoenzimático LDH y su interpretación funcional.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1. REACTIVOS

Acido Láctico, de BDH, AnalaR. Solución comercial DL al 88%. A partir de este líquido se prepara una disolución 1 M de Lactato sódico neutralizándolo con NaOH hasta alcanzar un pH de 7.4

Nicotin-amida-Adenina-Dinucleotido (NAD⁺), de Sigma, grado III. Se conservó a -30°C y se disolvió siempre en el momento de su utilización.

Nitro-Blue-Tetrazolio (NBT), de Sigma. Conservado a 3-6°C, y disuelto siempre en el momento de su utilización, alejado de la luz.

Fenazina-Metosulfato (PMS), de Sigma. Conservado y disuelto en igualdad de condiciones que el NBT.

Adenosina-Tri-Fosfato (ATP), de Sigma. Conservado y disuelto en igualdad de condiciones que el NAD⁺.

Acrilamida, de Koch-Light, pura.

Bisacrilamida (N,N'-Metilén-Diacrilamida), de Koch-Light, pura.

Riboflavina, de Koch-Light, pura.

TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-Etilén-Diamina), de Koch-Light, purísimo.

Reactivo de Fenoles, de Folin-Ciocalteau de Merck.

Amido-Schwartz (negro Amido), de Fluka.

Los demás reactivos son puros, de Merck.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

2.1. ESPECIES

Ratas. Epimys rattus L., variedad albina.

Conejos. Oryctolagus cuniculus L., raza neozelandesa.

2.2. DIETA Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO

Las ratas se mantuvieron en jaulas de plástico transparente con iluminación homogénea, en grupos de tres a cuatro por jaula. Los conejos, todos hembras, se mantuvieron en jaulas individuales. Todos los animales se mantuvieron en una habitación con humedad controlada y cuya temperatura se ajustó a 18-20°C.

2.3. TRATAMIENTO

Las ratas no recibieron ningún tratamiento especial. Las conejas se dividieron en cuatro grupos de cuatro animales cada uno, según se detalla en la tabla siguiente.

<u>Grupo nº</u>	<u>Tratamiento</u>
1	Control total
2	Control-Insulina
3	Control-Gestante
4	Gestante-Insulina

Gestación

Los animales correspondientes a los grupos 3 y 4 se cubrieron ventiocho días antes de la extracción de órganos, con un error de ± 24 horas.

Administración de Insulina

Los animales correspondientes a los grupos 2 y 4 recibieron inyecciones subcutáneas de Insulina (libre de Glucagón) en cantidades crecientes de acuerdo con la fecha del desarrollo de la experiencia. Las inyecciones son diarias y se administran de la forma siguiente; Diecisiete días antes de la fecha en que se han de cubrir los animales de los grupos 3 y 4, 0.3 unidades; una semana antes de esta fecha, se interrumpe el tratamiento. Después de cubiertos dichos animales, se reanuda el tratamiento incrementando la cantidad de Insulina (0,5 unidades durante diez días), y a partir de entonces se vuelve a incrementar el tratamiento (0,75 unidades de Insulina hasta el día de la muerte y extracción de órganos).

Toma de muestras

A lo largo de toda la experiencia se toman sucesivas muestras de sangre, cada tres días. Estas extracciones sólo se interrumpen diez días antes del cruzamiento y diez días después del mismo.

2.4. EXTRACCION DE ORGANOS Y TEJIDOS

Un día antes de los veintinueve que dura la gestación se mataron todos los animales mediante inyección intravenosa de aire y de ellos se extrajo el cerebro, hígado, endometrio y tejido adiposo, éste último de varias zonas: peri-renal, intestinal y subcutáneo. Los fetos fueron extraídos practicando la Cesárea en las conejas gestantes y de ellos se extrajo hígado y cerebro.

A excepción del tejido adiposo, que se homogeneizó inmediatamente después de su extracción, los demás órganos y tejidos se lavaron previamente en NaCl 0.14 M a 3-6°C antes de proceder a la homogeneización.

Las ratas y los fetos se mataron siempre por decapitación.

La extracción del Endometrio ofrece mayor dificultad que la del resto de los órganos y tejidos; se realiza ésta rascando con una espátula en la pared interna del útero. La espátula debe ser de teflón para evitar dañar al músculo liso y contaminar la muestra. El músculo estriado que se extrae de rata para estudios cinéticos es siempre el Sartorio.

Inmediatamente después de la extracción y lavado de los órganos y tejidos se procedió a su homogeneización en proporciones 1/3 (peso/volumen) en sacarosa 0.25 M. De acuerdo con la naturaleza de cada tejido se utilizó un procedimiento para llevarla a cabo: el tejido adiposo, cerebro, hígado y endometrio se homogeneizó en un Potter de vidrio con émbolo de vidrio esmerilado terminado en punta cónica y el músculo estriado se homogeneizó en un Omni-Mixer de la Casa Sorvall, homogeneizador de aspas, a 180 revoluciones.

El homogeneizado se centrifugó a 30.000g utilizando una Centrifuga Sorvall con rotor SS-34, durante diez minutos, a temperatura 0-3°C. El tiempo desde la muerte del animal hasta la obtención del sobrenadante de la centrifugación no excedió a 30 minutos y durante su transcurso, los tejidos se mantuvieron siempre a baja temperatura (3-6°C). El sobrenadante se utilizó irmediatamente para el estudio de las isoenzimas de J.D.E.

3. ELECTROFORESIS

3.1. COMPOSICION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Sobre la técnica de electroforesis descrita por Davis (1964) hemos introducido una variante que contribuye a mejorar la resolución del método. La muestra se diluye en sacarosa 40%, en proporciones 1/4 (v/v) y se aplica directamente sobre el gel superior, en lugar de mezclarla con acrilamida; de esta forma, la zona superior, donde está la mezcla de proteínas que se van a separar tiene una conductividad muy baja por lo que migran a poca velocidad, a medida que la glicocola del tampón de la cámara superior va penetrando en la zona de la sacarosa. Avanzando todas, con el frente de glicocola se van concentrando ya en esta zona y llegan al gel superior concentradas. Con ello se mejora el efecto de la discontinuidad de pH y reticulación comentado anteriormente y se obtiene una elevada resolución.

De acuerdo con el objetivo de cada experimento, se prepararon geles de dos tipos, para el estudio de la regulación y cinética de las isoenzimas de LDH y para el análisis de la microheterogeneidad de estas isoenzimas. Ambos se prepararon en tubos de 5 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 100 ó 120 mm de longitud. Durante la polimerización, los tubos están tapados por el extremo inferior con gomas y dispuestos en gradillas, verticalmente.

3.1.1. Efectos reguladores y estudios cinéticos

El gel inferior tiene una longitud de 70 mm y el superior unos 2.5 mm (50 μ l). Los geles se preparan según se describe a continuación GEL INFERIOR (7.5% de Acrilamida).

Solución 1 (monómero)	Acrilamida	28 g
	Bisacrilamida	0.75 g
	H ₂ O tridestilada, hasta ..	100 ml
Solución 2 (Tampón-TEMED)	Tris	3 M, pH 8.9 ajustado con HCl
	Temed	0.23%

Solución 3. Persulfato amónico 0.14% (preparada en el momento de su utilización).

Todas estas soluciones se prepararon con agua tridestilada y se mantuvieron a 3-6°C. Para preparar el gel inferior estas soluciones se mezclan en proporción Monómero/Tampón-TEMED/agua tridestilada/persulfato, 2/1/1/4 (en volumen). De la mezcla resultante se extraen las burbujas de aire reduciendo la presión y agitando vigorosamente. Inmediatamente el gel se deposita en los tubos y encima de la superficie se añade una pequeña cantidad de agua para evitar que se forme menisco al polimerizar. El agua debe añadirse con cuidado para no agitar la superficie del gel. La polimerización completa dura unos veinte minutos; una vez terminada ésta, se extrae el agua y se prepara el gel superior de acuerdo con la siguiente tabla.

GEL SUPERIOR

Solución 4. (Monómero)	Acrilamida	10 g
	Bisacrilamida	2,5 g
	H ₂ O hasta	100 ml

Solución 5. (Tampón-TEMED)	Tris	0.48 M , pH 6.7
	TEMED	0.46%

(el pH se ajusta con HCl. La concentración final de Tris es 0.48 M).

Solución 6. Riboflavina 4 mg/100 ml

Todos estos reactivos se preparan, igualmente con agua tridestilada. El gel superior se prepara mezclando estas soluciones en proporciones Monómero/Tampón-TEMED/Riboflavina, 2/1/1 (en volumen). La mezcla resultante se diluye al 50% en volumen, con sacarosa 40%. Este gel se prepara en la oscuridad para evitar que polimerice. De él se añaden 50 µl a cada tubo, sobre la superficie del gel inferior y los tubos se exponen a luz fluorescente. La polimerización dura unos minutos. Terminada ésta, los tubos se disponen en la Cuba de Electroforesis.

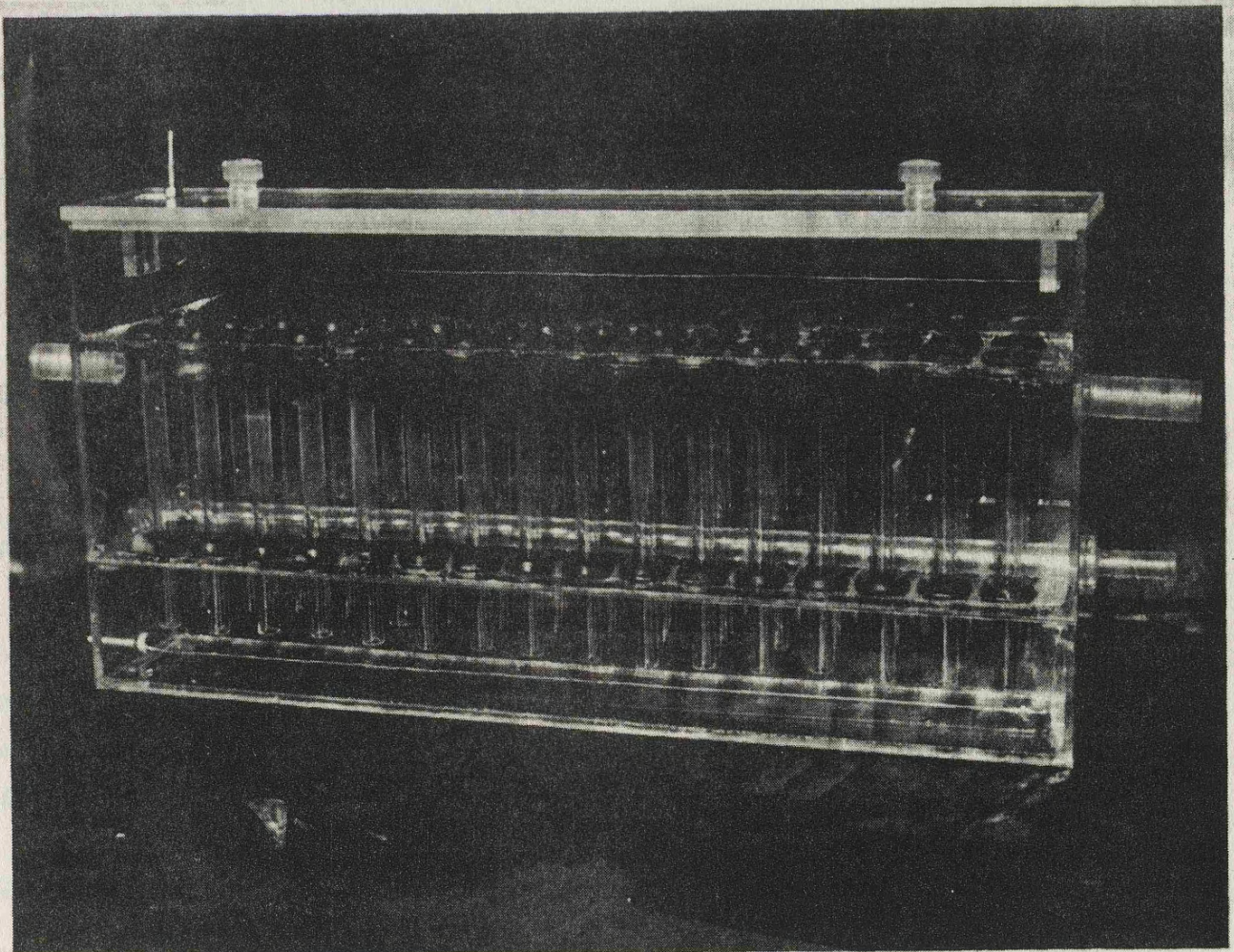
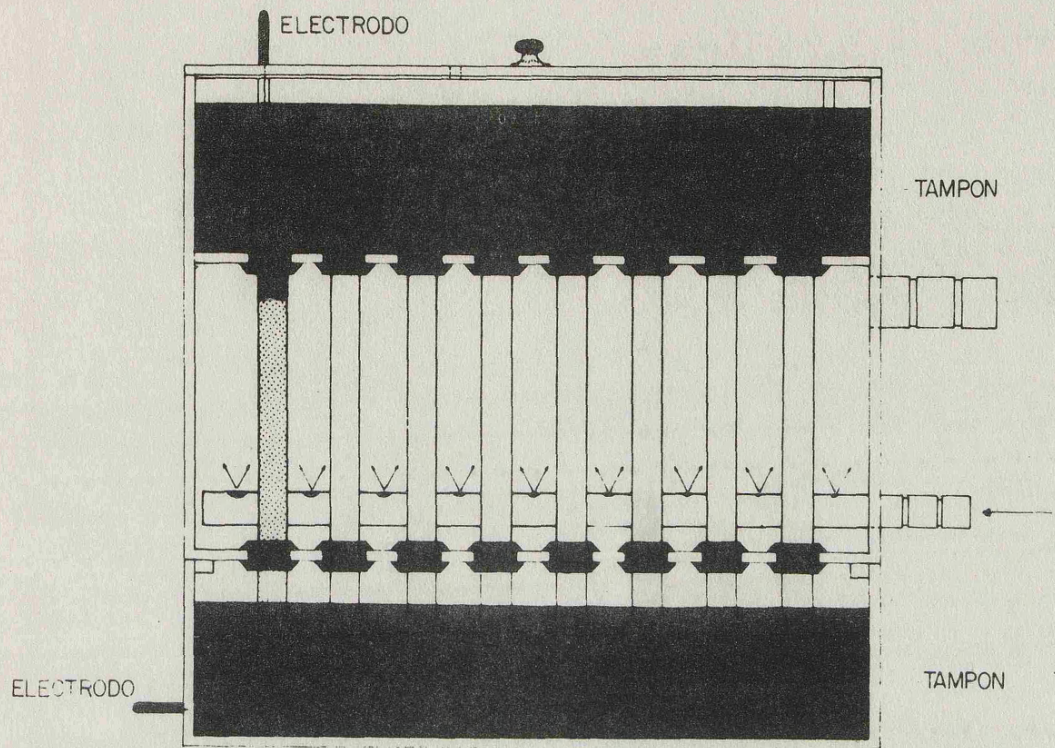
3.1.2. Microheterogeneidad

Los geles para realizar este tipo de estudios tienen, básicamente, la composición del gel inferior detallado antes, aunque difieren de él en que la columna es más larga (100 mm), por lo que se utilizan tubos de 120 mm de longitud, y a lo largo de ella se establece un gradiente de pH desde 4.5 hasta 8.9, correspondiendo el pH más ácido al extremo inferior del gel. El gradiente es discontinuo y se realiza preparando diez geles cuyos pH respectivos son 4.5/5.0/5.5/6.0/6.5/7.0/7.5/8.0/8.5/8.9. La composición de todos es la misma que la descrita anteriormente para el gel inferior; sólo difieren en el pH, cuya variación se consigue añadiendo mayor cantidad de HCl en la solución 2, pero manteniendo la concentración de Tris 3 M. Cada uno de estos geles tiene una longitud de 10 mm y encima del último no se añade gel superior.

3.2. DESARROLLO

La cuba para Electroforesis en Gel de Poliacrilamida descrita por Davis (1964) y expendida en el mercado por diversas casas comerciales tal y como él la diseñó, o con ligeras modificaciones, presenta el inconveniente, a nuestro juicio, de ser incómoda de manejar y no contener un sistema de refrigeración efectivo. Su manejo engorroso, especialmente al aplicar la muestra, se pone bien de manifiesto cuando se tienen que desarrollar muchos geles en un tiempo limitado. El sistema de refrigeración inadecuado (se refrigeran los tubos que contienen los geles a través de una refrigeración previa del tampón de la cámara inferior) plantea inconvenientes cuando se proyecta analizar la actividad enzimática de una muestra, después de desarrollada la electroforesis. Estas son las razones que nos han llevado a diseñar una cuba de electroforesis que solucione estos dos extremos.

El aparato que se describe está representado en la figura de la página siguiente; consta de tres piezas. La primera constituye la cámara del tampón inferior y lleva incorporado el electrodo inferior (un hilo de platino central en toda su longitud con el borne en un extremo.



Esquema y fotografía de la cubeta para electroforesis en gel de poliacrilamida descrita en el texto, con capacidad para dieciséis o treinta y dos gels.

Sobre esta pieza se encaja la segunda: un cuerpo que contiene la cámara de refrigeración y la cámara del tampón superior; los tubos que contienen los geles se encajan en este cuerpo sujetos por cilindros de goma en los dos extremos. Así, la corriente de agua de refrigeración está en contacto directo con los mismos y es más efectivo el mantenimiento de una temperatura baja. La longitud de los tubos que se pueden desarrollar en esta cámara oscila entre 8 y 15 cm; dispuestos en el aparato forman dos filas de ocho y equidistan de los dos electrodos.

La tercera pieza es la tapa de la cámara superior, la cual lleva acoplado el electrodo que quedará sumergido en el tampón cuando esté montada la cubeta.

Dadas las dimensiones del aparato, la aplicación de la muestra es realmente cómoda y rápida, lo que permite obtener series amplias de geles homogéneos en tiempo limitado. Las distancias de los tubos a los electrodos son lo suficientemente pequeñas como para que el desarrollo de la electroforesis dure muy poco tiempo. En una hora se obtiene una separación correcta de proteínas de suero y en tres horas una separación completa de las cinco isoenzimas de LDH.

Tomando como base el modelo descrito (que permite desarrollar dieciseis geles simultáneamente) hemos construido otro de análogas características con capacidad para treinta y dos geles. Su utilización es muy conveniente, en especial, para estudios cinéticos.

Composición del tampón

El tampón que se incluye en las cámaras de los electrodos está compuesto por Glicocola 0.037 M y Tris, ajustado a pH 8.3. Se suele preparar una Solución Stock, diez veces más concentrada y diluirla en el momento de su utilización. La solución que se incluye en ambas cámaras (superior e inferior) tiene la misma composición.

Aplicación de la muestra

La muestra se diluye al 20% en sacarosa 40% y de esta mezcla se aplican 50 μ l sobre la superficie superior de cada gel y después

se añade Tampón Glicocola-Tris hasta completar el volumen del tubo procurando que no se mezcle éste con la muestra. La cámara del tampón superior se llena con el mismo tampón hasta que quede sumergido el electrodo y si se desea, se añaden 5 ml de Azul de Bromofenol 1mg/100ml para marcar el frente de migración.

Condiciones de desarrollo

Al comenzar la electroforesis se gradúa el voltaje de forma que la Intensidad de la corriente sea de 1.5 mA por tubo, y 15 minutos después se corrige esta intensidad a 2.5 mA por tubo. El ánodo corresponde siempre a la cubeta inferior y el cátodo a la superior. Las proteínas migran hacia el ánodo y el tiempo de desarrollo oscila alrededor de tres horas.

Las electroforesis proyectadas para el estudio de la Microheterogeneidad de las Isoenzimas de LDH llevan un tiempo de desarrollo más largo que oscila entre 18 y 20 horas debido a la poca movilidad de las bandas a pH próximos a sus puntos isoeléctricos.

3.3. REVELADO

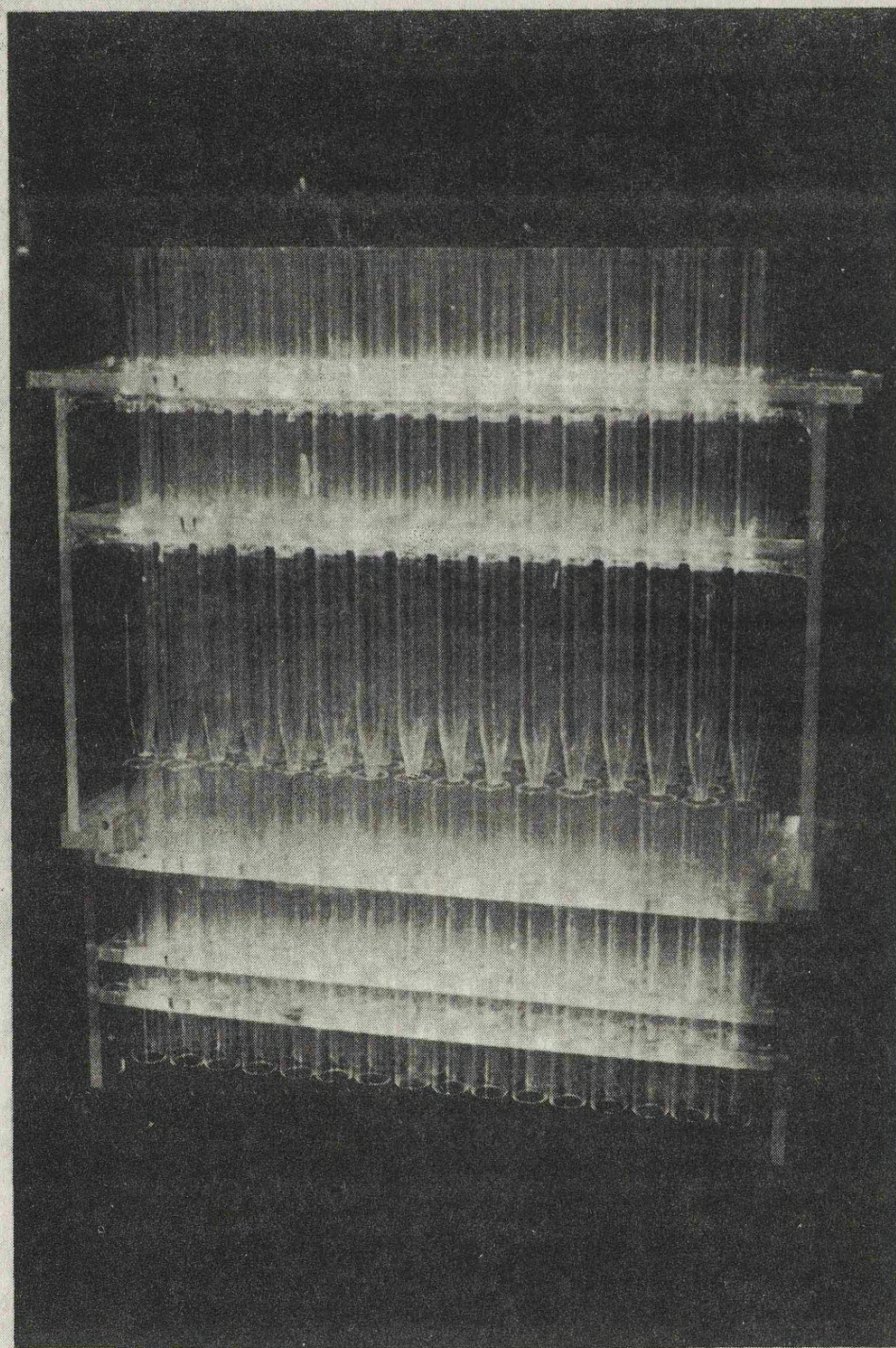
Una vez terminada la electroforesis, los geles se sacan de los tubos inyectando agua destilada fría a presión entre la pared del tubo y el borde del gel, procurando no dañarlo. Los geles se sumergen en agua destilada y después de lavarlos se introducen en la solución de revelado, cuya composición es variable, de acuerdo con el objetivo del experimento. Para obtener esquemas de distribuciones de actividad isoenzimática, así como para poner de manifiesto la Microheterogeneidad de las isoenzimas de LDH se preparó una solución de incubación (o revelado) basada en el método descrito por Dewey y Conklin (1960) aunque con ciertas modificaciones en lo que atañe a la concentración de los reactivos: L-lactato sódico, 0.015 M; NAD^+ 4 mM; MgCl_2 , 0.227 mM; NaCl, 4.54 mM; NBT, 0.3 mM; PMS, 0.015 mM; en Tampón Fosfato potásico 0.09 M a pH 7.4. Los geles fueron incubados a 37°C durante 12 minutos y a continuación lavados abundantemente con agua destilada fría y finalmente fijados con ácido acético 7.5%.

En los estudios cinéticos de isoenzimas realizados sobre los geles se utilizó la misma solución de revelado excepto en lo que atañe a las concentraciones de L-lactato y NAD^+ que se determinaron de acuerdo con el experimento, en un rango de 0.5 a 4 mM para NAD^+ y 5 a 40 mM para L-lactato.

El tiempo de incubación se determinó en estos experimentos entre 8 y 14 minutos, según el experimento, pero siempre el mismo para todos los geles de una misma tanda. Como para la realización de este tipo de estudios es crítico el tiempo de incubación, y especialmente lo es que el tiempo de incubación sea el mismo para todos los geles, se diseñó y se construyó un Multiaplicador, aparato que permite la aplicación simultánea de 64 mezclas de incubación distintas en 64 geles, así como la extracción de la misma y el lavado simultáneos.

Un esquema del Multiaplicador se presenta en la página siguiente. Consta de un soporte que contiene 64 pipetas, las cuales, tapadas por su parte inferior, se pueden llenar con las respectivas mezclas de incubación. Entonces se tapan todas por su parte superior con tapones de goma en los que hay introducidos unos anillos metálicos, a través de los cuales se insertan varillas de acero inoxidable. Con las pipetas cargadas y cerradas por arriba, el soporte se ajusta sobre una gradilla que contiene 64 tubos, en cada uno de los cuales hay un gel. Normalmente, todos los geles son iguales en su composición, todos han sido aplicados con la misma muestra y con idéntico volumen de la misma, y en todos ha transcurrido la electroforesis en las mismas condiciones. El soporte de las pipetas ajusta sobre esta gradilla de tal forma que al levantar las varillas de acero, todas las pipetas descargan su contenido sobre el tubo que contiene el gel respectivo. En ese momento comienza el tiempo de incubación.

La reacción se detiene colocándose una malla de metacrilato sobre el borde superior de los tubos y volcando el contenido de los mismos. Entonces, los tubos se abren por el extremo inferior de igual forma que se hizo antes con las pipetas y se sustituyen los tapones por otra malla de metacrilato. A través de los tubos, abiertos por ambos



Fotografía del multiaplicador descrito en el texto, con capacidad para aplicar la mezcla de incubación simultáneamente en 64 tubos, que contienen los geles.

lados, pero contenidos sus extremos por las mallas de metacrilato, se hace pasar una corriente de agua destilada fría durante 5-10 minutos, para eliminar los residuos de la solución de revelado y finalmente, los geles se introducen en ácido acético 7.5% para fijar las bandas, conservándolos a 3-6°C y en la oscuridad hasta el momento de proceder al Densitometrado para la valoración cuantitativa de la actividad de isoenzimas.

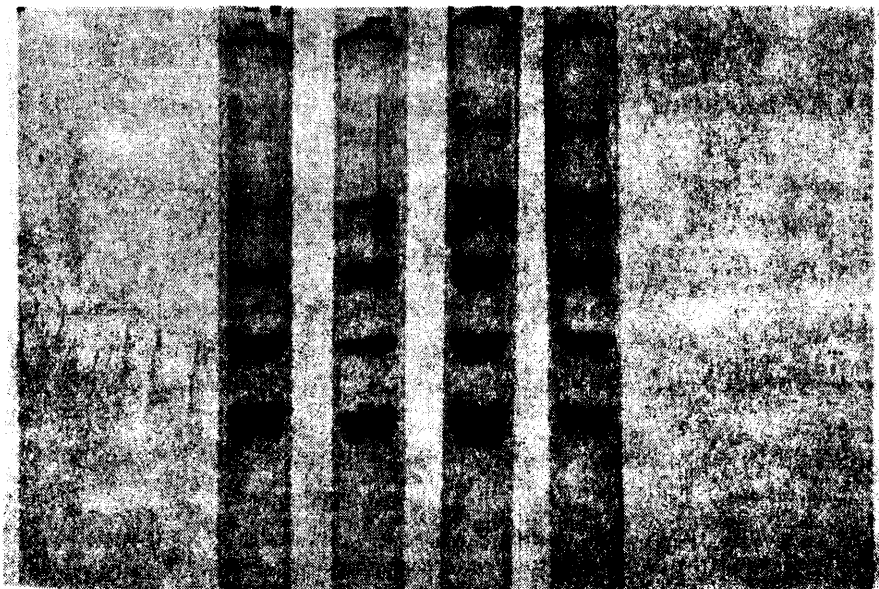
La incubación se realiza siempre en baño de agua a 37°C y en la oscuridad.

Los experimentos encaminados a determinar las influencias reguladoras del ATP sobre la cinética de reacción de las isoenzimas se llevaron a cabo utilizando también el multiaplicador. En este caso, los geles, antes de ser sumergidos en la solución de revelado, se incubaron en una solución que contiene $MgCl_2$, NaCl, y Tampón Fosfato potásico en concentraciones iguales a las descritas anteriormente, pero con ATP a distintas concentraciones, en el rango de durante diez minutos, a 37°C, operando después con ellos como ya se ha indicado. En la página siguiente se exponen algunas fotografías de geles revelados, donde pueden verse las cinco isoenzimas de LDH, así como una serie de geles que corresponde a estudios cinéticos; en ella puede observarse la distinta intensidad de las bandas, en cada isoenzima de LDH.

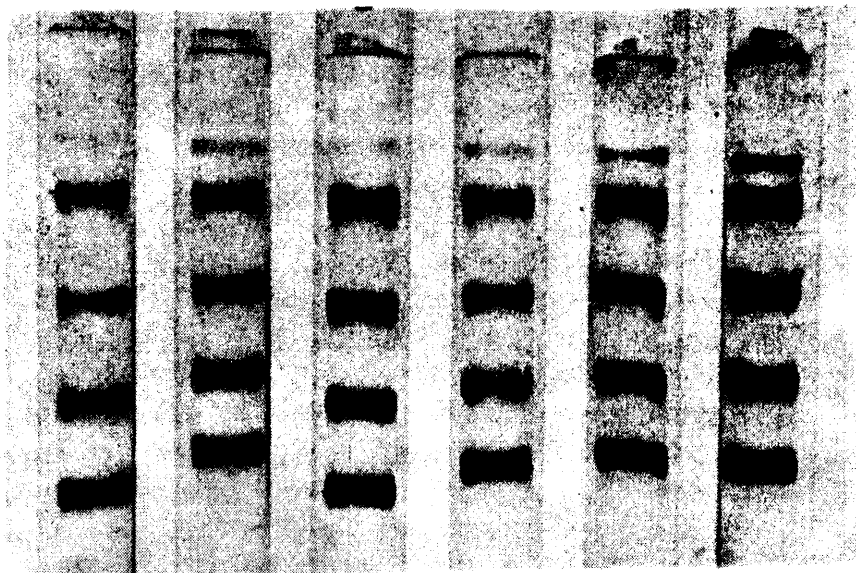
4. VALORACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE ISOENZIMAS DE LDH

La determinación cuantitativa de la actividad de cada isoenzima de LDH se llevó a cabo con un Microdensitómetro Canalco, modelo G, equipado con un computador para el registro automático de las áreas de los picos, así como para la obtención de los porcentajes de las mismas en el total.

El Microdensitómetro está equipado con un filtro de 560 nm para determinar la Absorbancia del formazano-derivado que resulta de la reducción del azul de tetrazolio. Las áreas de los picos que se obtienen corresponden a la actividad de cada isoenzima de LDH. En los



Fotografías de cuatro geles, revelados para detectar la actividad de las isoenzimas de LDH, separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida.



Fotografía de una serie de geles que corresponden a un estudio cinético de las isoenzimas de LDH de cerebro de rata. Según las concentraciones de sustratos cada banda aparece teñida con distinta actividad.

experimentos encaminados a determinar esquemas de distribución isoenzimática se calculó el porcentaje de las áreas de cada isoenzima frente al total de las cinco. Estos valores son los que están expuestos en el apartado 3 del capítulo de resultados (pág. 142 y sig.). En los experimentos que corresponden a estudios cinéticos se tomó el área absoluta de cada pico como la velocidad inicial de cada isoenzima a las concentraciones correspondientes de sustratos y cofactores. Sobre estos valores se construyeron las gráficas que se presentan en el capítulo de resultados (apartado 2, pág. 100 y sig.).

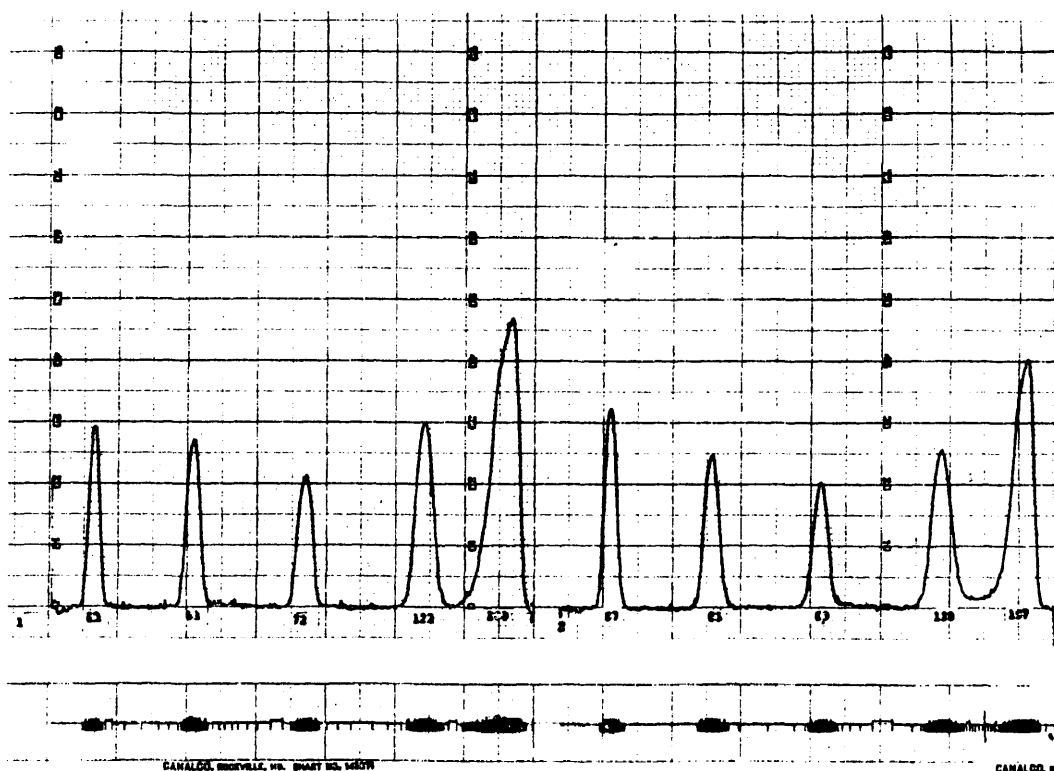
El Microdensitómetro se puede ajustar a tres rangos de absorban-
cia, 0-0.3/0-1.0/0-3.0, lo que posibilita la lectura de bandas muy
intensas o apenas imperceptibles, y permite una medición muy apropiada
de las distintas actividades específicas cuando se hacen estudios ci-
néticos. Además, este aparato permite ampliar la señal en numerosos pun-
tos, graduar las rendijas de entrada y salida etc. y proceder a la in-
tegración de las áreas de los picos en el registro y mediante el compu-
tador, con circuitos integrados. El barrido sucesivo de los mismos ge-
les modificando todas estas condiciones nos ha permitido considerar que
el error de lectura es del orden de 0.5 sobre el valor del área. Hay
que hacer notar, sin embargo, que todos los puntos que se ofrecen en
una misma gráfica donde se comparan valores absolutos de velocidad de
reacción (figuras 2.1 a 2.6 y 2.9 a 2.13) se han obtenido ajustando el
Microdensitómetro en unas condiciones fijas para cada una de ellas.
En la figura de la página siguiente se presentan algunos de los densi-
togramas obtenidos.

5. TECNICAS COMPLEMENTARIAS

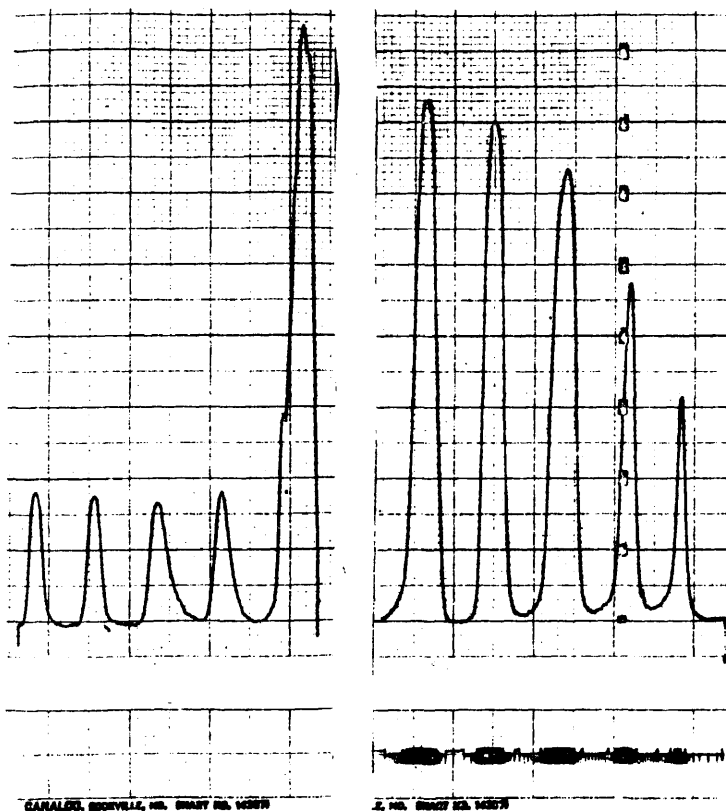
Valoración de proteínas.-La valoración de proteínas se llevó a cabo en
cada experimento, siempre en el sobrenadante de la centrifugación uti-
lizando el método de Lowry et al (1951).

Valoración de LDH total.-Esta valoración se hizo siguiendo el método
original de Wroblewski y La Due (1957).

Tinción de proteínas totales en los geles.-Con objeto de determinar
las fracciones proteicas más abundantes en una muestra, se procedió,
en algunos casos, a utilizar esta técnica utilizando Amido Schwarz al
0.5% en acético 7% durante 16 horas. El desteñido se hace en horizontal
con una intensidad de 10-15 mA.



Fotografía de dos densitogramas correspondientes a dos geles donde se han separado las cinco isoenzimas de LDH, de músculo estriado de rata. Los valores de las áreas de los picos correspondientes se utilizan para calcular constantes cinéticas. Obsérvese cómo varían sus valores relativos. Ambos densitogramas corresponden a geles en los que se ha aplicado la misma muestra, pero han sido revelados con distintas concentraciones de sustratos. El pico mayor, a la derecha en cada caso, corresponde a la isoenzima LDH-5.



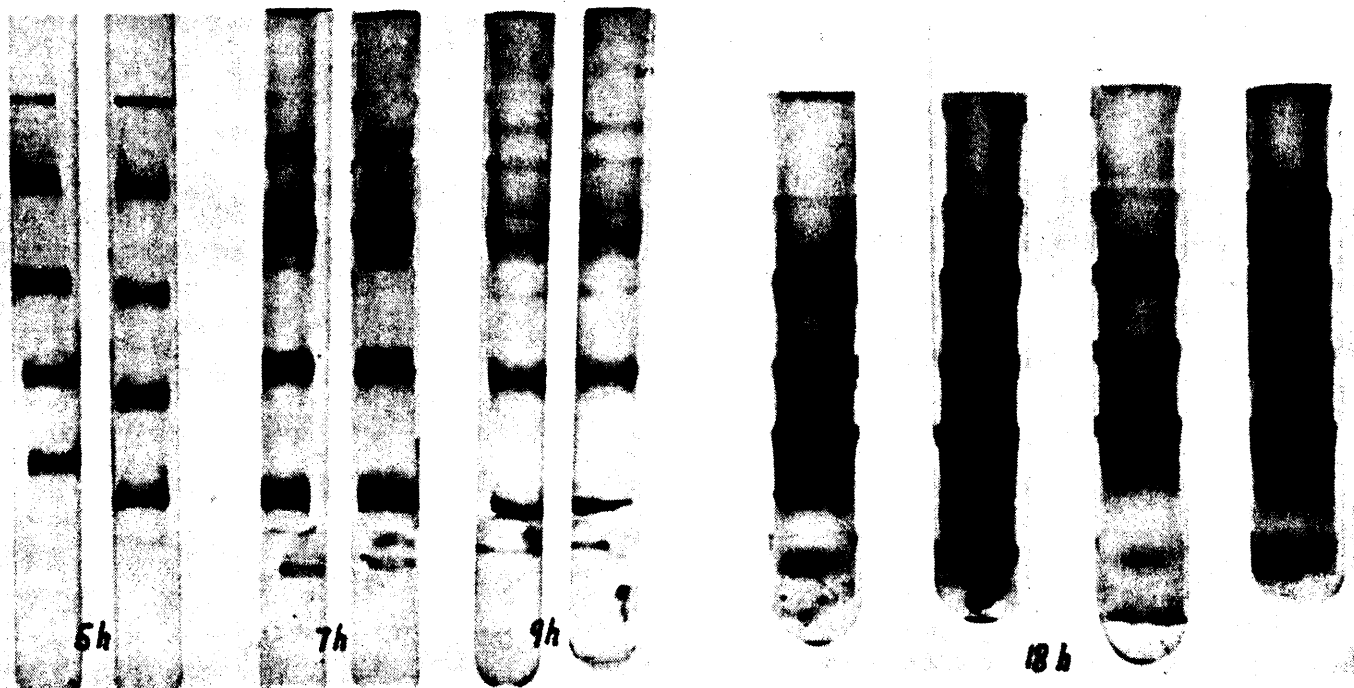
Fotografías de dos densitogramas, obtenidos de dos geles donde se habían separado las cinco isoenzimas de LDH. A la izquierda, músculo estriado de rata. La diferencia que se puede apreciar, comparándolo con los de arriba, se debe también a que se ha incubado con distintas concentraciones de sustratos. A la derecha, cerebro de rata. Siempre, la isoenzima de la izquierda es LDH-1 y la de la derecha LDH-5

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

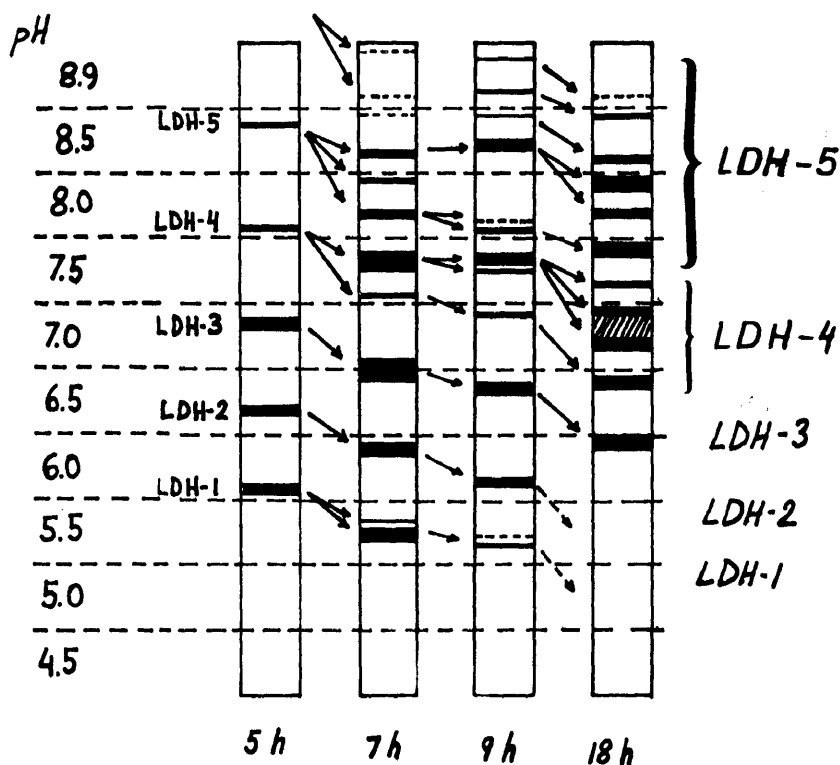
1. MICROHETEROGENEIDAD DE ISOENZIMAS DE LDH

Al concebir el gel de desarrollo con un gradiente discontinuo de pH, según está descrito en la página 87, consideramos que dos o más proteínas ligeramente distintas en su estructura y, por tanto, con puntos isoeléctricos muy próximos, sólo manifestarían diferencias de movilidad a pH muy cercano a los mismos. Al transcurrir la electroforesis, las cinco isoenzimas de LDH correrían a distinta velocidad pero cada una de ellas, al llegar a la zona del gel donde el pH es próximo a su punto isoeléctrico iría perdiendo velocidad y en el caso de estar constituida por varias fracciones ligeramente distintas, éstas comenzarían a manifestar diferencias de movilidad, hasta el punto de quedar detenida una de ellas y continuar avanzando, aunque lentamente, las demás.

En efecto, mediante esta técnica se pudo poner de manifiesto que dentro de lo que se ha venido considerando como una isoenzima de LDH existe una microheterogeneidad estructural. La electroforesis se mantuvo durante un total de veinte horas de desarrollo habiendo aplicado un extracto de cerebro de rata. A las cinco horas del comienzo se sacaron dos geles de la cubeta y se revelaron para poner de manifiesto las isoenzimas de LDH. Cada columna presentaba tan sólo cinco isoenzimas. Dos horas después se sacaron otros dos y se revelaron de igual forma; en ellos, se pudo comprobar que las isoenzimas habían avanzado más y algunas se presentaban desdobladas en varias "sub-bandas". Dos horas más tarde se volvieron a sacar dos geles en los que, después de revelados se pudieron observar cinco regiones con actividad LDH y en cada una de ellas varias bandas que totalizaban 12-14 isoenzimas. En la página siguiente se muestra un esquema y una fotografía de dichos geles.



Fotografías de varios geles, preparados como se explica en la página 87, en los que se ha aplicado un extracto de cerebro de rata y se han realizado electroforesis con distintas horas de desarrollo, según se detalla en cada serie. Así se consigue poner de manifiesto la microheterogeneidad del sistema LDH, después de revelarlos por el método específico de este sistema enzimático.



Esquemas que ponen de manifiesto la microheterogeneidad del sistema enzimático LDH, obtenidos de los geles cuyas fotografías se exponen arriba. Las flechas que van de uno a otro explican el desdoblamiento de las bandas, y permiten localizar el origen de las sub-bandas, haciendo posible un estudio más completo de la microheterogeneidad

Al discutir estos resultados hemos de llamar la atención en la técnica utilizada. El gradiente de pH proporciona un medio adecuado para la resolución de sub-bandas y el distinto tiempo de desarrollo de la electroforesis en cada gel o serie de geles permite conocer las isoenzimas que presentan microheterogeneidad, así como la extensión de la misma. Siguiendo el transcurso de la electroforesis en las fotografías y esquemas de la página anterior se puede observar cómo, a medida que transcurre el tiempo de desarrollo, cada isoenzima exhibe diferentes esquemas de heterogeneidad. Las flechas que van de un esquema a otro indican estas relaciones.

Como se comentó en la introducción, Koen y Goodman (1969) dan una interpretación genética a este hecho, pero otros autores suponen un mecanismo distinto. Así, Levitzki (1972) supone que las sub-bandas pueden originarse por la forma de interaccionar los monómeros para dar el tetrámero. Se pueden dar, sin embargo, otras explicaciones, como es, que un mismo monómero manifieste ciertas diferencias en su estructura primaria, como pueden ser acetilaciones en grupos NH_2 , bloqueo de de grupos SH etc. Así no habría tan sólo un monómero A, sino A_1 , A_2 , A_3 etc. y su interacción con B, o con B_1 , B_2 , etc. daría un amplio conjunto de isoenzimas ligeramente distintas en su estructura, aunque susceptibles de ser separadas con técnicas analíticas capaces de mostrar una elevada resolución, como la utilizada en este caso.

Por otra parte, estudios de este mismo tipo realizados en hígado y músculo estriado han señalado que estos esquemas de microheterogeneidad del sistema enzimático LDH son distintos en los tres órganos. Estas diferencias podrían explicar los distintos efectos reguladores que sobre las isoenzimas pueden ejercer determinados cofactores o ligandos, como NAD^+ , ATP etc.

2. ESTUDIOS CINÉTICOS DE LAS ISOENZIMAS DE LDH

2.1. CEREBRO DE RATA

Al analizar la cinética de reacción de las isoenzimas de LDH tomando el ácido L-láctico como sustrato de concentración variable en el rango de 2.5 a 20 mM y a una concentración constante de NAD^+ (0.75 mM) se han obtenido valores de velocidades iniciales para las cinco isoenzimas de LDH, los cuales se exponen en las tablas siguientes.

La tabla 2.1 contiene los valores correspondientes a las isoenzimas LDH-1 a LDH-4 de acuerdo con la concentración de L-láctico. La tabla 2.2 contiene las inversas respectivas de los resultados de la tabla anterior. La tabla 2.3 contiene los resultados correspondientes a las isoenzimas LDH-4 y -5 obtenidas en otro experimento y la tabla 2.4 las inversas de estos valores. Mediante los resultados expuestos en estas tablas se ha procedido a representar conjuntamente las cinéticas de las cinco isoenzimas (figura 2.1).

TABLA 2.1

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por cada una de las isoenzimas de LDH.
(Concentración de NAD^+ , 0.75 mM).

Concentración de L-láctico mM	Velocidad Isoenzimas de LDH			
	1	2	3	4
2.5	65	47		
4.0	85	65	45	
5.0	105	74	54	38
7.5	123	90	73	47
10.0	132	105	80	55
20.0	166	133	107	77

TABLA 2.2

Inversas de las velocidades de reacción expuestas en la tabla anterior correspondientes a las inversas de concentraciones de L-láctico.

1/Concentración de L-láctico	1/velocidad X 10 ⁻³ Isoenzimas de LDH			
	1	2	3	4
400	15.3	21.2		
250	11.7	15.3	22.2	
200	9.5	13.5	18.5	26.3
133	8.1	11.1	13.6	21.2
100	7.5	9.5	12.5	18.1
50	6.0	7.5	9.3	12.8

TABLA 2.3

Velocidades iniciales de la reacción láctico pirúvico catalizada por las isoenzimas LDH-4 y -5.
Concentración de NAD⁺. 0.75 mM

Concentración de L-láctico mM	Velocidad Isoenzimas de LDH	
	4	5
5	39	6
10	58	10
20	64	15

TABLA 2.4

Inversas de las velocidades de reacción expuestas en la tabla anterior correspondientes a las inversas de concentraciones de L-láctico.

1/Concentración de L- láctico	1/velocidad. Isoenzimas	
	LDH-4	LDH-5
200	25.6	166.6
100	17.2	100.0
50	15.6	66.6

Al representar gráficamente estos valores por el método de Lineweaver-Burk se obtiene el diagrama expuesto en la página siguiente (figura 2.1) en el que las cinco líneas, una correspondiente a cada isoenzima de LDH, se cortan en un punto, a la izquierda del eje de ordenadas, v^{-1} . De dicha representación se pueden extraer los valores de K_m que corresponden a cada isoenzima; estos valores están expuestos en la tabla 2.5.

TABLA 2.5

Valores de K_m correspondientes a cada una de las cinco isoenzimas de LDH, obtenidos a partir de la gráfica 2.1. (Concentración de NAD^+ , 0.75 mM).

Isoenzima	K_m (Conc. de L-láctico mM)
LDH-1 (B_4)	5.2
LDH-2 (AB_3)	7.4
LDH-3 (A_2B_2)	9.5
LDH-4 (A_3B)	13.3
LDH-5 (A_4)	21.0

Las isoenzimas LDH-1 y LDH-5 muestran la máxima y mínima afinidad por L-láctico respectivamente, de acuerdo con lo que hay descrito en la bibliografía (ver página 30), y los valores de K_m de estas dos isoenzimas son muy similares a los descritos por Battelino *et al.* (1968).

No obstante, los resultados expuestos en la figura 2.1 son difíciles de interpretar; téngase en cuenta que en la bibliografía no hay datos de cinética comparada de las cinco isoenzimas de LDH. Esta representación es característica de una mezcla de inhibición competitiva y no competitiva, pero ello sería si se tratase de una única enzima con una cinética variable a distintas concentraciones de inhibidor. Hay que considerar en este caso, que se trata de cinco isoen-

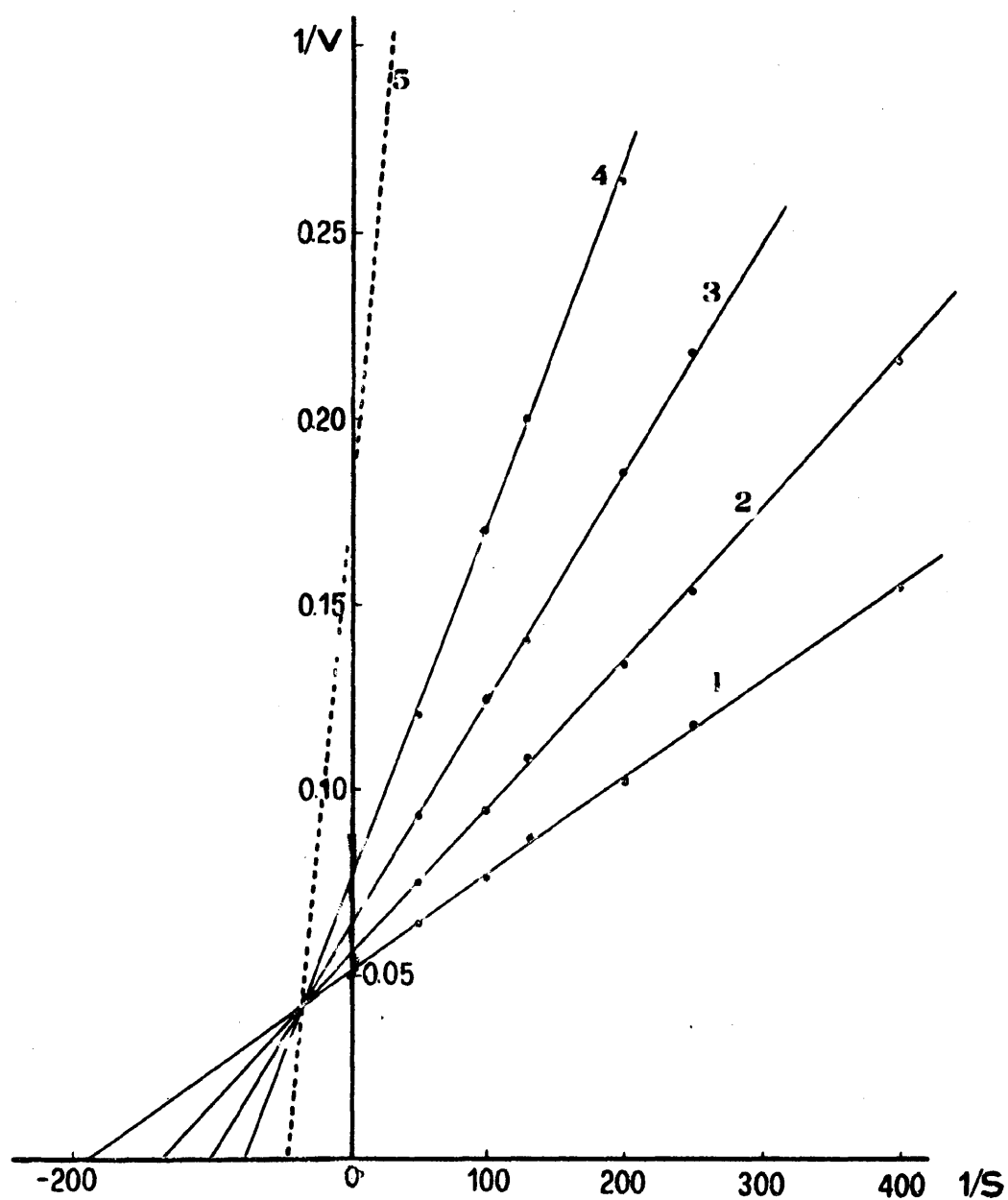


Figura 2.1

Cinética general de las cinco isoenzimas de LDH de cerebro de rata. Los valores de actividad que corresponden a cada isoenzima se han obtenido a una misma concentración de NAD (0.75 mM). Los valores correspondientes a la isoenzima LDH-5 (-----) se han calculado aparte, como se indica en el texto.

zimas que posiblemente coexisten a distintas concentraciones. Esta diferencia de concentración debe reflejarse, lógicamente, en una representación donde se exponen las velocidades de reacción de cada una. Quizá de aquí se podría concluir que existe una competencia entre las cinco isoenzimas por el sustrato cuando actúan las cinco conjuntamente pero aún serían necesarios más datos para discutir adecuadamente estos resultados.

Con objeto de analizar el efecto de la concentración de NAD^+ sobre la cinética de las cinco isoenzimas de LDH hemos realizado experimentos en esta línea tomando el L-láctico como el sustrato de concentración variable, en el rango de 5 a 40 mM y a distintas concentraciones de NAD^+ , en el rango de 0.5 a 4 mM. Así se han obtenido resultados de velocidades iniciales correspondientes a estas variables para cada una de las cinco isoenzimas de LDH. En las cinco tablas siguientes (2.6 a 2.10) se exponen estos resultados.

TABLA 2.6

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-1 (B4) de cerebro de rata.

<u>Molaridad</u> <u>L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/velocidad</u>	<u>Concentración</u> <u>NAD^+ mM</u>
0.02	50	186	0.00535	0.75
0.01	100	153	0.00650	"
0.005	200	114	0.00870	"
0.02	50	200	0.00500	1.0
0.0125	80	186	0.00540	"
0.01	100	174	0.00574	"
0.005	200	136	0.00735	"
0.04	25	232	0.00431	2.5
0.02	50	230	0.00434	"
0.0125	80	232	0.00431	"
0.01	100	236	0.00424	"
0.005	200	207	0.00483	"
0.0025	400	186	0.00535	"

TABLA 2.7

Velocidades iniciales de la reacción láctico pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-2 (AB₃) de cerebro de rata.

<u>Molaridad L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/velocidad</u>	<u>Concentración de NAD⁺, mM</u>
0.02	50	232	0.00431	0.625
0.0125	80	200	0.00500	"
0.01	100	180	0.00555	"
0.0066	150	150	0.00666	"
0.02	50	214	0.00471	1.0
0.0125	80	174	0.00574	"
0.01	100	162	0.00617	"
0.005	200	116	0.00862	"
0.01	100	152	0.00658	2.5
0.0066	150	122	0.00820	"
0.02	50	204	0.00490	"
0.02	50	192	0.00520	4.0
0.0125	80	157	0.00637	"
0.01	100	140	0.00714	"

TABLA 2.8

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-3 (A_2B_2) de cerebro de rata

<u>Molaridad L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/velocidad</u>	<u>Concentración de NAD^+, mM</u>
0.02	50	240	0.00416	0.5
0.0125	80	202	0.00495	"
0.01	100	199	0.00502	"
0.005	200	138	0.00724	"
0.02	50	220	0.00454	0.625
0.0125	80	174	0.00574	"
0.005	200	113	0.00884	"
0.02	50	181	0.00552	1.0
0.0125	80	151	0.00662	"
0.01	100	133	0.00751	"
0.02	50	144	0.00694	2.5
0.0125	80	112	0.00892	"
0.02	50	125	0.00800	4.0
0.0125	80	91	0.01090	"

TABLA 2.9

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-4 (A₃B) de cerebro de rata.

<u>Molaridad L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/velocidad</u>	<u>Concentración de NAD⁺, mM</u>
0.02	50	210	0.00476	0.5
0.0125	80	176	0.00568	"
0.01	100	167	0.00598	"
0.005	200	125	0.00800	"
0.02	50	157	0.00637	0.625
0.0125	80	143	0.00699	"
0.01	100	120	0.00833	"
0.005	200	77	0.01290	"
0.04	25	180	0.00555	1.0
0.02	50	133	0.00751	"
0.0125	80	128	0.00925	"
0.01	100	90	0.0111	"
0.04	25	130	0.00769	2.5
0.02	50	88	0.0113	"

TABLA 2.10

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-5 (A_4) de cerebro de rata

<u>Molaridad L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/velocidad</u>	<u>Concentración de NAD^+, mM</u>
0.02	50	45	0.0222	0.5
0.0125	80	42	0.0238	"
0.01	100	35	0.0285	"
0.02	50	34	0.0294	0.625
0.0125	80	28	0.0357	"
0.01	100	24	0.0416	"
0.02	50	28	0.0357	0.75
0.0125	80	22	0.0454	"
0.01	100	18	0.0555	"

Haciendo una representación de Lineweaver-Burk de los resultados expuestos en las tablas 2.6 a 2.10 se obtienen cinco gráficas que describen el comportamiento cinético de cada una de las cinco isoenzimas de Láctico-deshidrogenasa para L-láctico como sustrato, de acuerdo con la concentración de NAD^+ . Estas representaciones están expuestas en las figuras 2.2 a 2.6, en las páginas siguientes.

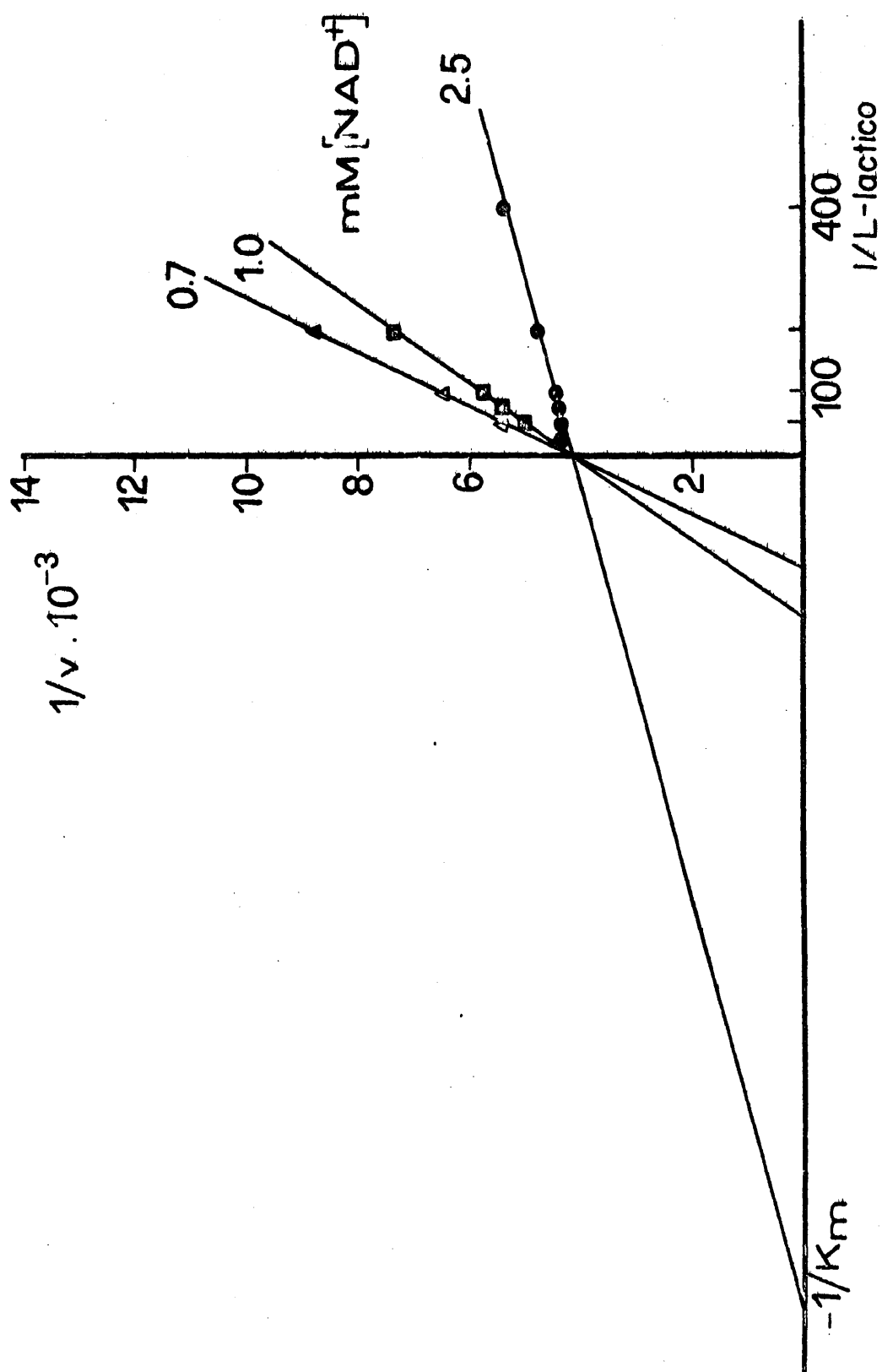


Figura 2.2

Cinética de la isoenzima LDH-1 de cerebro de rata. $1/v$ frente a $1/L\text{-lactico}$, a varias concentraciones de NAD^+

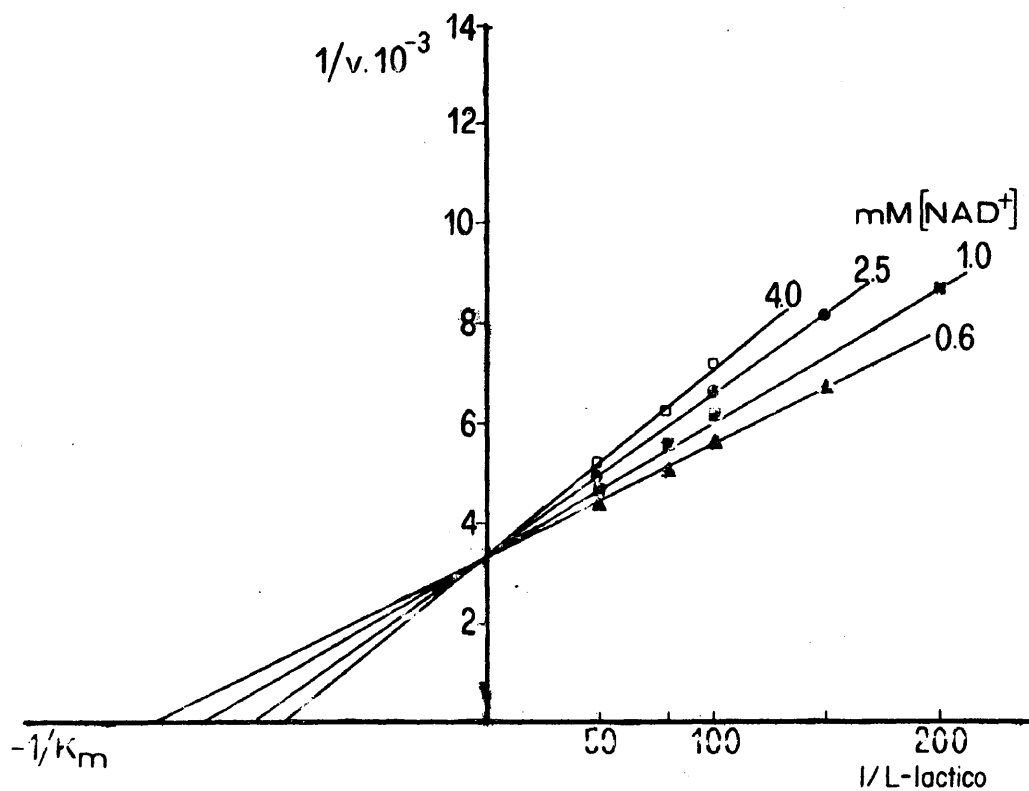


Figura 2.3

Cinética de la isoenzima LDH-2 de cerebro de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico a diferentes concentraciones de NAD^+

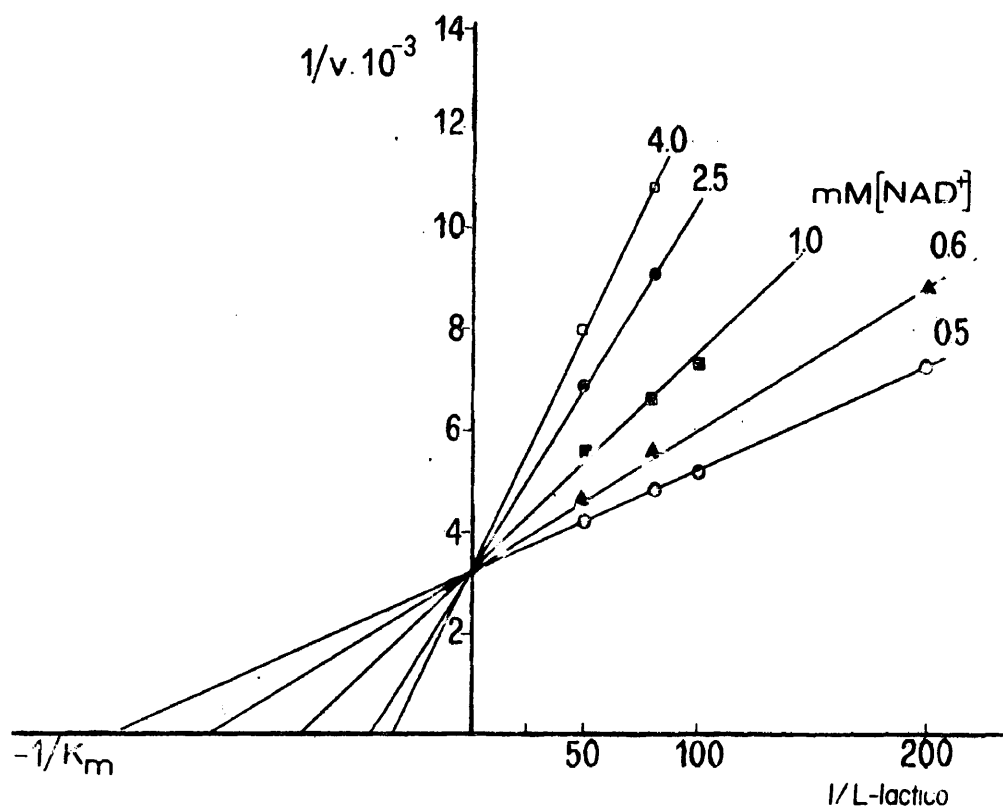


Figura 2.4

Cinética de la isoenzima LDH-3 de cerebro de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico, a diferentes concentraciones de NAD^+

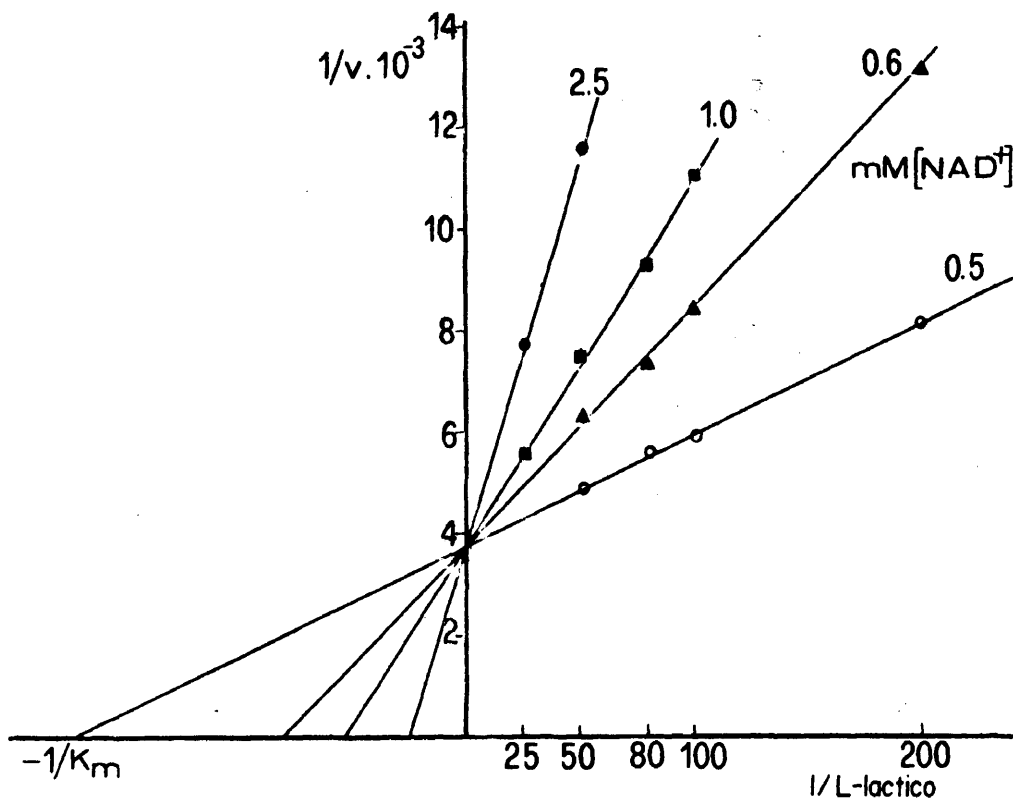


Figura 2.5

Cinética de la isoenzima LDH-4 de cerebro de rata. $1/v$ frente a $1/L\text{-lactico}$, a distintas concentraciones de NAD^+

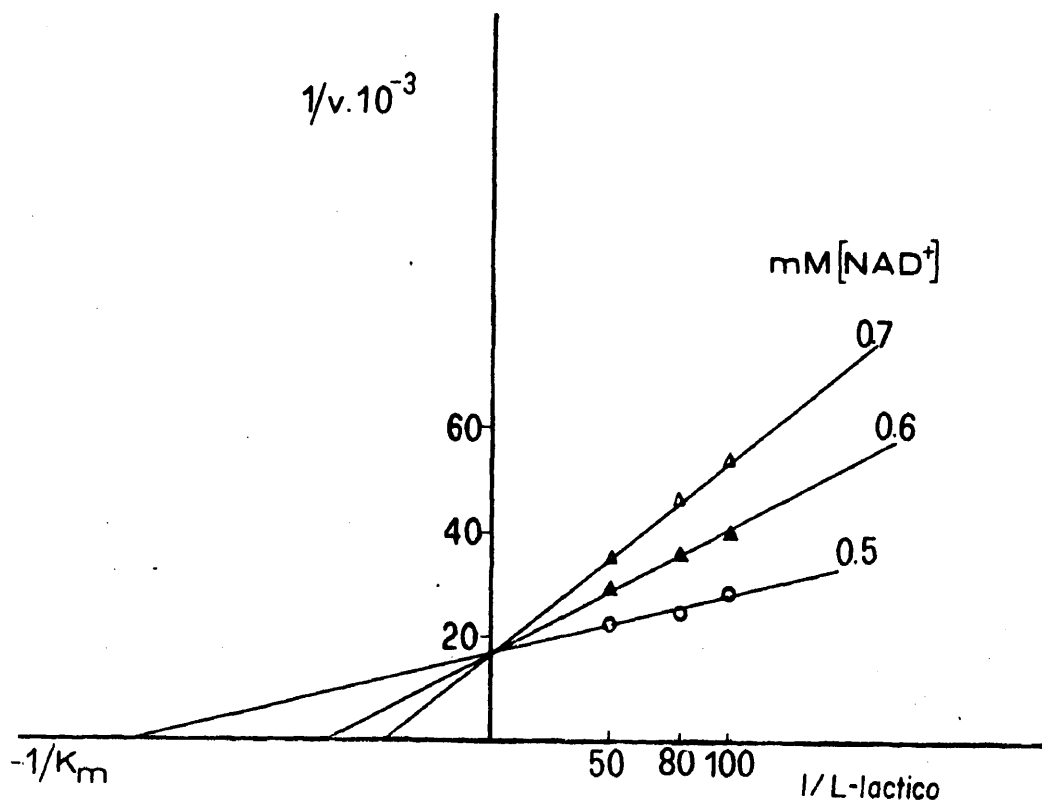


Figura 2.6

Cinética de la isoenzima LDH-5 de cerebro de rata. $1/v$ frente a $1/L\text{-lactico}$, a distintas concentraciones de NAD^+

La cinética de las cinco isoenzimas de LDH, representada en las gráficas 2.2 a 2.6, pone de manifiesto una inhibición competitiva de NAD^+ sobre L-láctico en las isoenzimas LDH-2,-3,-4 y -5 y activación por NAD^+ en la isoenzima LDH-1.

En efecto, las rectas correspondientes a cada concentración de NAD^+ para una isoenzima determinada, se cortan en el eje de ordenadas, lo que indica inhibición competitiva para aquellas isoenzimas en las que concentraciones crecientes de NAD^+ produzcan valores de K_m más altos. Al contrario, el caso de que concentraciones crecientes de NAD^+ originen valores más bajos de K_m corresponde a enzimas que actúan sobre dos sustratos y donde la presencia de uno a concentración alta incrementa la afinidad de la enzima por el otro.

Si consideramos una cualquiera de las cinco isoenzimas, observamos que el valor de K_m varía de acuerdo con las concentraciones de NAD^+ . Estos valores de K_m , para cada isoenzima y para cada concentración de NAD^+ pueden ser extraídos de las gráficas 2.2 a 2.6. La tabla 2.11, de doble entrada, describe la variación de los valores de K_m de acuerdo con la variación de la concentración de NAD^+ para cada una de las cinco isoenzimas de LDH.

TABLA 2.11

Valores de K_m (L-láctico M) de las cinco isoenzimas de LDH a diferentes concentraciones de NAD^+

<u>NAD^+ mM</u>	<u>LDH-1</u>	<u>LDH-2</u>	<u>LDH-3</u>	<u>LDH-4</u>	<u>LDH-5</u>
4.00		0.0111	0.0294		
2.50	0.0007	0.0096	0.0222	0.0384	
1.00	0.0037	0.0079	0.0133	0.0192	
0.75	0.0053	0.0074	0.0095	0.0133	0.0210
0.62		0.0070	0.0088	0.0125	0.0142
0.50			0.0064	0.0059	0.0066

A la vista de las cinco representaciones anteriores y de la tabla, se observa que en la isoenzima LDH-1 los valores de K_m aumentan al disminuir la concentración de NAD^+ mientras que en las isoenzimas LDH-2, -3, -4, y -5 los valores de K_m disminuyen al disminuir esta concentración. Si hacemos variar la concentración de NAD^+ de 0.5 a 4 mM se obtiene, para cada isoenzima, un campo de variación del valor de K_m cuya mayor o menor amplitud describe la variabilidad del valor de K_m para cada isoenzima. Esta variabilidad es máxima para la isoenzima LDH-5 y mínima para la isoenzima LDH-2; pero obsérvese que en el caso de la isoenzima LDH-1 un crecimiento de concentración de NAD^+ induce una disminución en el valor de K_m mientras que en las restantes isoenzimas sucede todo lo contrario. Esta última observación se refleja en la figura 2.7, en el signo de las pendientes de las rectas correspondientes a las cinco isoenzimas.

Si observamos, por ejemplo, la figura 2.2, se aprecia a primera vista que la disminución del valor de K_m no es proporcional al aumento de la concentración de NAD^+ y puede hacerse una observación análoga en las figuras 2.3 a 2.6. Hemos comprobado de un modo inductivo que la variación del valor de K_m es proporcional a la variación del logaritmo de la concentración de NAD^+ . Efectivamente, representando en escala semilogarítmica las concentraciones de NAD^+ frente a los valores de K_m para L-láctico obtenemos una recta para cada isoenzima. Las cinco rectas así obtenidas se cortan en un punto experimental, $[NAD^+] = 0.5$ mM (figura 2.7).

En cada una de las rectas representadas en esta figura, el signo de la tangente indica el sentido de la variación del valor de K_m inducida por la variación de la concentración de NAD^+ en el rango de 0.5 a 4.0 mM.

Las tangentes positivas (isoenzimas LDH-2, -3, -4 y -5) indican que el aumento de la concentración de NAD^+ provoca un aumento en los valores de K_m . Esta relación es logarítmica y se tiene, por tanto, la siguiente ecuación general,

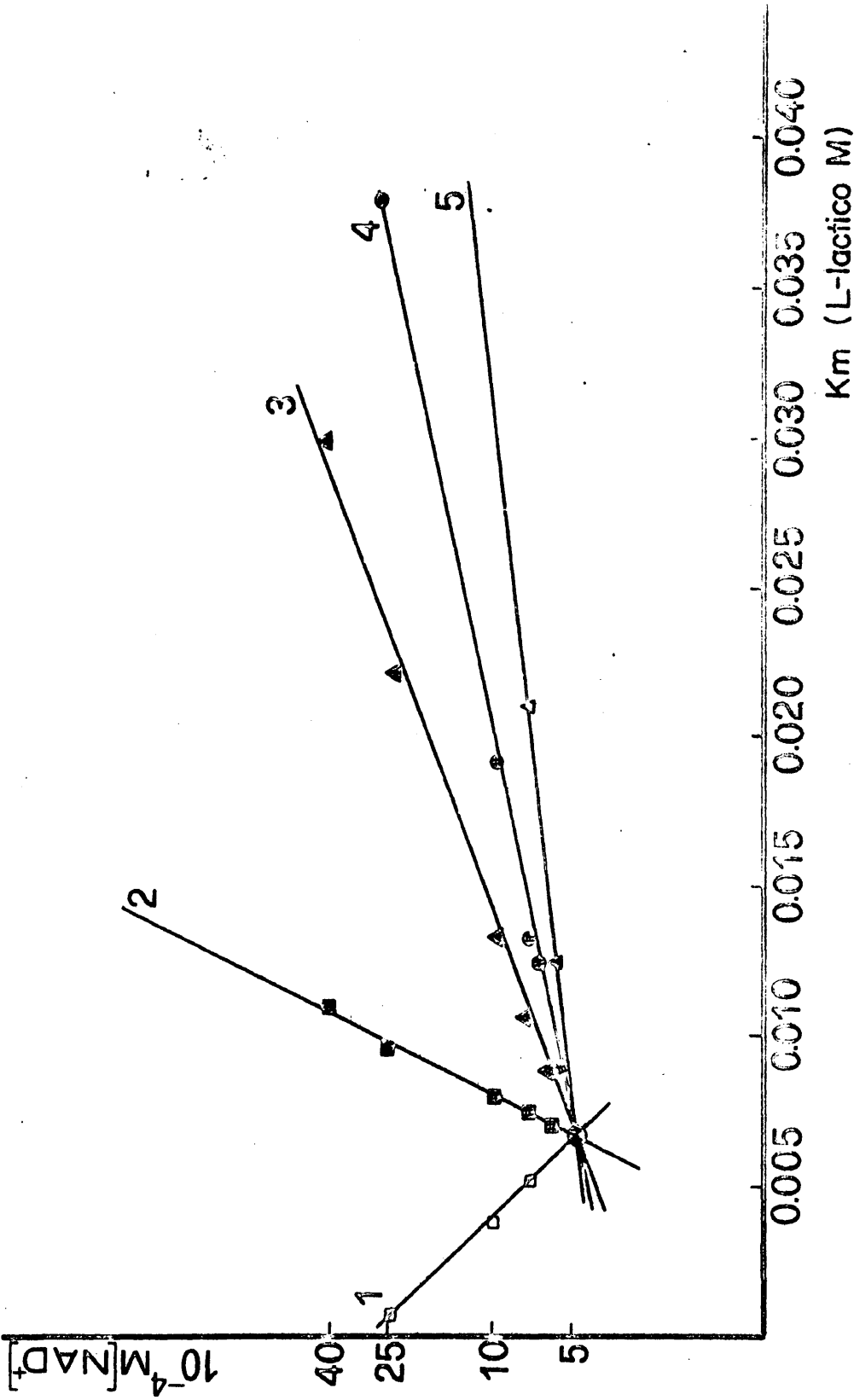


Figura 2.7

Representación semilogarítmica de las concentraciones de NAD^+ y los valores de K_m (L-láctico M) para las cinco isoenzimas de LDH de cerebro de rata. El punto de intersección es un punto experimental. Representa una concentración de NAD^+ para la cual, las cinco isoenzimas exhiben el mismo valor de K_m

$$\log [NAD^+] = \text{tg}\alpha K_m + \log NAD_0 \quad (1)$$

En donde $\text{tg}\alpha$ representa la pendiente de la recta y $\log NAD_0$ es la ordenada en el origen, es decir, NAD_0 es la concentración de NAD^+ para la cual el valor de K_m es igual a cero y, por tanto, la velocidad de reacción catalizada por la isoenzima es infinito.

K_m es la concentración de sustrato (L-láctico) necesaria para producir la velocidad semimáxima de reacción y una variación en la concentración de NAD^+ produce una variación de K_m . De aquí que pueda definirse la inhibición como la amplitud del intervalo de variación de K_m producida por la variación de concentración de NAD^+ en un intervalo determinado.

Dicha inhibición es el cociente entre la amplitud del intervalo de variación de K_m y el correspondiente intervalo de variación de la concentración de NAD^+ ; en otras palabras, la inhibición que manifiesta una isoenzima es $1/\text{tg}\alpha$, siendo la pendiente de la recta correspondiente a dicha isoenzima en la figura 2.7.

Puede observarse que la inhibición (tal como acaba de ser definida) que corresponde a la isoenzima LDH-1 es negativa. Esto significa que una variación creciente en la concentración de NAD^+ produce una disminución en el valor de K_m ; este es el hecho ya conocido de que la isoenzima LDH-1 se activa por NAD^+ . Para las restantes isoenzimas el valor de $1/\text{tg}\alpha$ es positivo, es decir, se inhiben por NAD^+ .

Observemos ahora que la isoenzima LDH-1 que no se inhibe por NAD^+ sino que se activa, carece en su estructura del monómero A; sin embargo, en las isoenzimas LDH-2 a -5 el número de monómeros A contenido en la estructura de cada una crece simultáneamente con la inhibición por NAD^+ . Se trata de representar gráficamente en una escala adecuada, la relación entre el número de monómeros A y $1/\text{tg}\alpha$ con objeto de buscar una relación matemática, es decir, relacionar la inhibición de cada isoenzima con su correspondiente estructura.

Inductivamente hemos comprobado que si representamos $\log 1/\text{tg}\alpha$ frente al logaritmo del número de monómeros A, para las isoenzimas LDH-2, -3, -4 y 55, obtenemos así cuatro puntos situados sobre una recta (ver figura 2.8, en la página 118).

Los valores de tg se han obtenido a partir de la figura 2.7. La tabla 2.12 describe estos valores correspondientes a cada isoenzima, así como el número de monómeros A (n_A) presentes en la estructura de cada una.

TABLA 2.12

Valores de tg y de $1/\text{tg}$ correspondientes a cada isoenzima de LDH en cerebro de rata.

<u>isoenzima</u>	<u>n_A</u>	<u>$\text{tg}\alpha$</u>	<u>$1/\text{tg}\alpha$</u> (i)
LDH-1	0	-2.20	-0.45
LDH-2	1	4.20	0.24
LDH-3	2	0.85	1.17
LDH-4	3	0.43	2.32
LDH-5	4	0.22	4.54

Se tiene, por tanto, que

$$\log i = \text{tg}\beta \cdot \log n_A + \log i_1 \quad (2)$$

en donde i es la inhibición que ejerce el NAD^+ sobre cada isoenzima, $\text{tg}\beta$ es la pendiente de la recta de la figura 2.8, n_A es el número de monómeros A que contiene la isoenzima, $\log i_1$ es la ordenada en el origen, es decir, i_1 es la inhibición producida por NAD^+ cuando $n_A = 1$.

La pendiente de esta recta, tg determina la relación que existe entre el logaritmo de la inhibición por NAD^+ y el número de monómeros A. Podemos considerar, pues que $\text{tg}\beta$ es la inhibición por monómero A.

Como la inhibición por NAD (i) es $1/\text{tg}\alpha$, podemos escribir la ecuación (1) de la página 115 así:

$$\log [NAD^+] = \frac{1}{i} K_m + \log NAD_0^+$$

de donde $\frac{1}{i} = \frac{\log NAD^+ - \log NAD_0^+}{K_m}$ y, por tanto,

$$i = \frac{K_m}{\log NAD^+ - \log NAD_0^+} \quad ; \text{ tomando logaritmos, resulta}$$

$$\log i = \log \frac{K_m}{\log NAD^+ - \log NAD_0^+} \quad , \text{ y de acuerdo con la ecuación (2), de la página anterior,}$$

$$\log \frac{K_m}{\log NAD^+ - \log NAD_0^+} = \text{tg}\beta \log n_A + \log i_1$$

en donde NAD_0^+ es un valor constante para cada isoenzima,

n_A (número de monómeros A), también lo es,

$\text{tg}\beta$ es un valor constante para el monómero A

$\log i_1$ es igualmente, un valor constante para el monómero A.

Puede concluirse, pues, que hay una relación lineal entre el logaritmo de la inhibición por NAD y el logaritmo del número de monómeros A. Esta velocidad de crecimiento viene dada por la pendiente de la recta y dado que este crecimiento de la inhibición en función del número de monómeros A es logarítmico, cabe pensar que hay una cooperatividad entre los monómeros A que forman parte de una isoenzima, respecto al crecimiento de la inhibición por NAD.

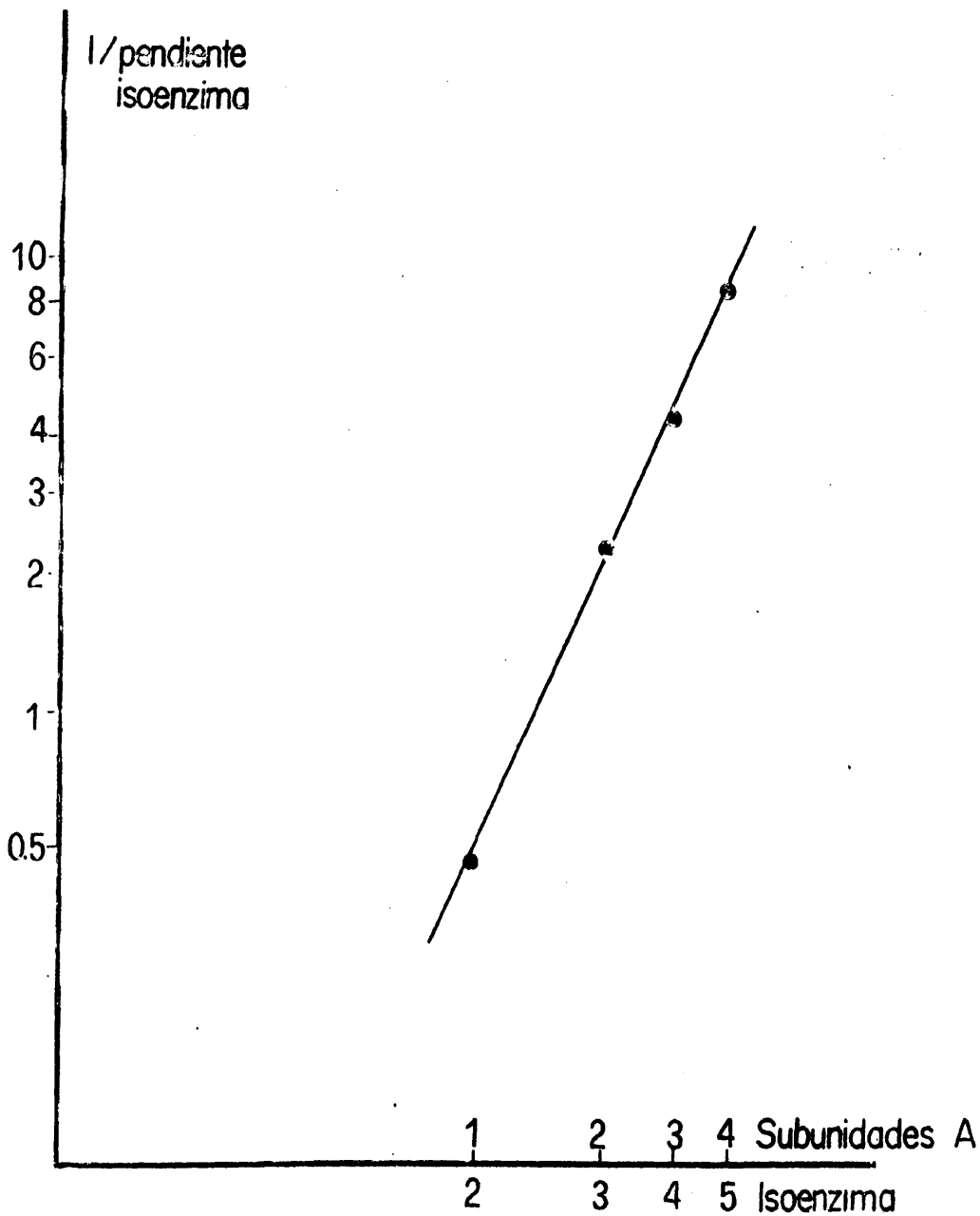


Figura 2.8

Representación logarítmica de 1/pendiente de cada isoenzima (calculada de la figura 2.7) en función del número de cadenas polipeptídicas A en las isoenzimas LDH-2, -3, -4 y -5.

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un mecanismo mediante el cual, la concentración de NAD^+ controla la actividad de las cinco isoenzimas de LDH en cerebro. La existencia de isoenzimas tiene sentido al participar en la regulación del metabolismo y puesto que cada una de ellas tiene distinta actividad específica, la actividad total del sistema LDH vendrá dada por su conjunto, teniendo en cuenta que las cinco están presentes en distintas concentraciones. La figura 2.7 representa la influencia del NAD^+ sobre la afinidad de cada una por el ácido L-láctico y en ella puede verse que a medida que aumenta esta concentración, más se manifiestan estas actividades específicas. Así, a una concentración de NAD^+ 0.5 mM, las cinco isoenzimas presentan el mismo valor de K_m , lo que quiere decir que las cinco realizan su acción catalítica con igual afinidad por el sustrato y que, por tanto, no se manifiesta su acción reguladora.

Pero al aumentar la concentración de NAD^+ se patentizan más las actividades específicas de cada una con lo que tienen significado las distintas concentraciones de cada isoenzima en este sistema biológico. De esta forma, la concentración de NAD^+ no sólo influye en la afinidad de cada una por el sustrato sino que es un factor que establece el control de la actividad de LDH mediante las isoenzimas.

Es necesario hacer otra observación. Si las isoenzimas de LDH, procedentes de un extracto de cerebro se revelan a concentraciones muy altas de NAD^+ se puede llegar a inhibir las isoenzimas catódicas que son las que más se inhiben por este cofactor. En todo caso, se obtendría una distribución isoenzimática que no se ajustaría a la realidad y no sería justificable extrapolar actividad a cantidad de isoenzima. Sólo incubando los geles a la concentración de NAD^+ para la cual, las cinco isoenzimas manifiestan el mismo valor de K_m se podría extrapolar. Esta concentración (0.5 mM en el órgano estudiado) nos parece adecuado denominarla punto de isoconcentración.

2.2. MUSCULO ESQUELETICO DE RATA

Procediendo de un modo análogo al descrito anteriormente para el cerebro y con objeto de analizar el efecto de la concentración de NAD^+ sobre la cinética de las cinco isoenzimas de LDH de músculo estriado, hemos experimentado en esta línea tomando el ácido L-láctico como sustrato de concentración variable, en el rango de 5 a 40 mM y a distintas concentraciones de NAD^+ , en el rango de 0.5 a 4 mM. Así hemos obtenido resultados de velocidades iniciales correspondientes a estas variables, para cada una de las cinco isoenzimas de LDH. En las cinco tablas siguientes (2.13 a 2.17) se exponen estos resultados.

Representando los valores descritos en estas tablas, por el método de Lineweaver-Burk, se obtienen cinco gráficas, donde se pone de manifiesto el comportamiento cinético de cada una de las cinco isoenzimas de Láctico-deshidrogenasa, para L-láctico como sustrato, según la concentración de NAD^+ . (figuras 2.9 a 2.13)

Estas gráficas ponen de manifiesto una inhibición competitiva de NAD^+ sobre L-láctico en la isoenzima LDH-5 y una activación por NAD^+ para las isoenzimas LDH-1, -2, -3 y -4.

De igual forma que ocurría en las gráficas anteriores, correspondientes al cerebro, las rectas relativas a distintas concentraciones de NAD^+ para cada isoenzima se cortan en el eje de ordenadas (v^{-1}).

TABLA 2.13

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-1 (B_4) de músculo estriado de rata

<u>Molaridad</u> <u>L-láctico</u>	<u>l/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/v</u> 10^{-3}	<u>Concentración</u> <u>de NAD⁺ mM</u>
0.04	25	92	10.8	0.5
0.02	50	70	14.3	"
0.04	25	97	10.3	0.625
0.02	50	74	13.5	"
0.0125	80	60	16.6	"
0.04	25	105	9.5	1.0
0.02	50	82	12.1	"
0.0125	80	68	14.7	"
0.01	100	60	16.6	"
0.04	25	117	8.5	2.5
0.02	50	107	9.5	"
0.0125	80	90	11.1	"
0.01	100	80	12.5	"
0.005	200	57	17.5	"
0.04	25	128	7.8	4.0
0.02	50	117	8.5	"
0.0125	80	108	9.2	"
0.01	100	100	10.0	"
0.005	200	80	12.5	"

TABLA 2.14

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico
catalizada por la isoenzima LDH-2 (AB₃)
de músculo estriado de rata

<u>Molaridad</u> <u>L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/v</u> 10 ⁻³	<u>Concentración</u> <u>de NAD⁺ mM</u>
0.04	25	125	8.0	0.5
0.02	50	100	10.0	"
0.0125	80	81	12.3	"
0.01	100	73	13.6	"
0.04	25	126	7.9	0.625
0.02	50	105	9.5	"
0.0125	80	85	11.7	"
0.01	100	76	13.1	"
0.04	25	132	7.5	1.0
0.02	50	112	8.9	"
0.0125	80	95	10.5	"
0.01	100	86	11.6	"
0.04	25	145	6.9	2.5
0.02	50	127	7.8	"
0.0125	80	112	8.9	"
0.01	100	104	9.6	"
0.005	200	77	12.9	"
0.04	25	147	6.8	4.0
0.02	50	136	7.3	"
0.0125	80	122	8.2	"
0.01	100	118	8.5	"
0.005	200	92	10.8	"

TABLA 2.15

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico
 catalizada por la isoenzima LDH-3 (A₂B₂)
 de músculo estriado de rata

<u>Molaridad</u> <u>L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/v</u> 10 ⁻³	<u>Concentración</u> <u>de NAD⁺ mM</u>
0.04	25	120	8.3	0.5
0.02	50	104	9.6	"
0.0125	80	90	11.1	"
0.01	100	81	12.3	"
0.04	25	121	8.2	0.625
0.02	50	106	9.4	"
0.0125	80	92	10.8	"
0.01	100	82	12.1	"
0.005	200	58	17.2	"
0.04	25	128	7.8	1.0
0.02	50	113	8.8	"
0.0125	80	95	10.5	"
0.01	100	89	11.2	"
0.005	200	63	15.8	"
0.04	25	131	7.6	2.5
0.02	50	120	8.3	"
0.0125	80	105	9.5	"
0.01	100	102	9.8	"
0.005	200	75	13.3	"
0.04	25	135	7.4	4.0
0.02	50	126	7.9	"
0.0125	80	114	8.7	"
0.01	100	105	9.5	"
0.005	200	83	12.0	"

TABLA 2.16

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-4 (A₃B) de músculo estriado de rata

<u>Molaridad L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/v 10⁻³</u>	<u>Concentración de NAD⁺ mM</u>
0.04	25	172	5.8	0.5
0.02	50	150	6.6	"
0.0125	80	133	7.5	"
0.01	100	124	8.0	"
0.005	200	90	11.1	"
0.04	25	170	5.8	0.625
0.02	50	150	6.6	"
0.0125	80	134	7.4	"
0.01	100	126	7.9	"
0.005	200	93	10.7	"
0.04	25	175	5.7	1.0
0.02	50	156	6.4	"
0.0125	80	138	7.2	"
0.01	100	131	7.6	"
0.005	200	98	10.2	"
0.04	25	180	5.5	2.5
0.02	50	163	6.1	"
0.0125	80	145	6.9	"
0.01	100	135	7.4	"
0.005	200	103	9.7	"
0.04	25	180	5.5	4.0
0.02	50	164	6.1	"
0.0125	80	148	6.7	"
0.01	100	140	7.1	"
0.005	200	109	9.2	"

TABLA 2.17

Velocidades iniciales de la reacción láctico-pirúvico catalizada por la isoenzima LDH-5 (A_4) de músculo estriado de rata

<u>Molaridad L-láctico</u>	<u>1/L-láctico</u>	<u>velocidad</u>	<u>1/v 10^{-3}</u>	<u>Concentración de NAD^+ mM</u>
0.04	25	181	5.5	0.5
0.02	50	178	5.6	"
0.0125	80	173	5.7	"
0.005	200	151	6.6	"
0.04	25	178	5.6	0.625
0.02	50	175	5.7	"
0.0125	80	166	6.0	"
0.005	200	142	7.0	"
0.04	25	176	5.7	1.0
0.02	50	169	5.9	"
0.0125	80	160	6.2	"
0.01	100	150	6.6	"
0.005	200	131	7.6	"
0.02	50	161	6.0	2.5
0.0125	80	147	6.8	"
0.01	100	142	7.0	"
0.005	200	114	8.8	"
0.02	50	158	6.3	4.0
0.0125	80	143	7.0	"
0.01	100	133	7.5	"
0.005	200	104	9.6	"

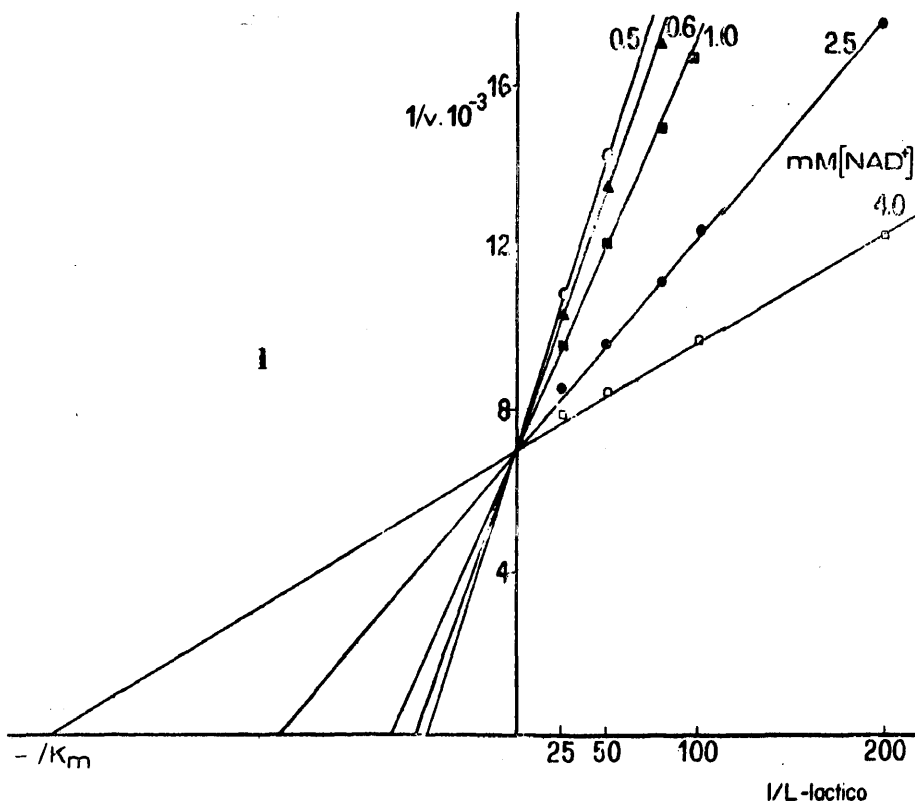


Figura 2.9

Cinética de la isoenzima LDH-1 de músculo estriado de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico, a varias concentraciones de NAD^+

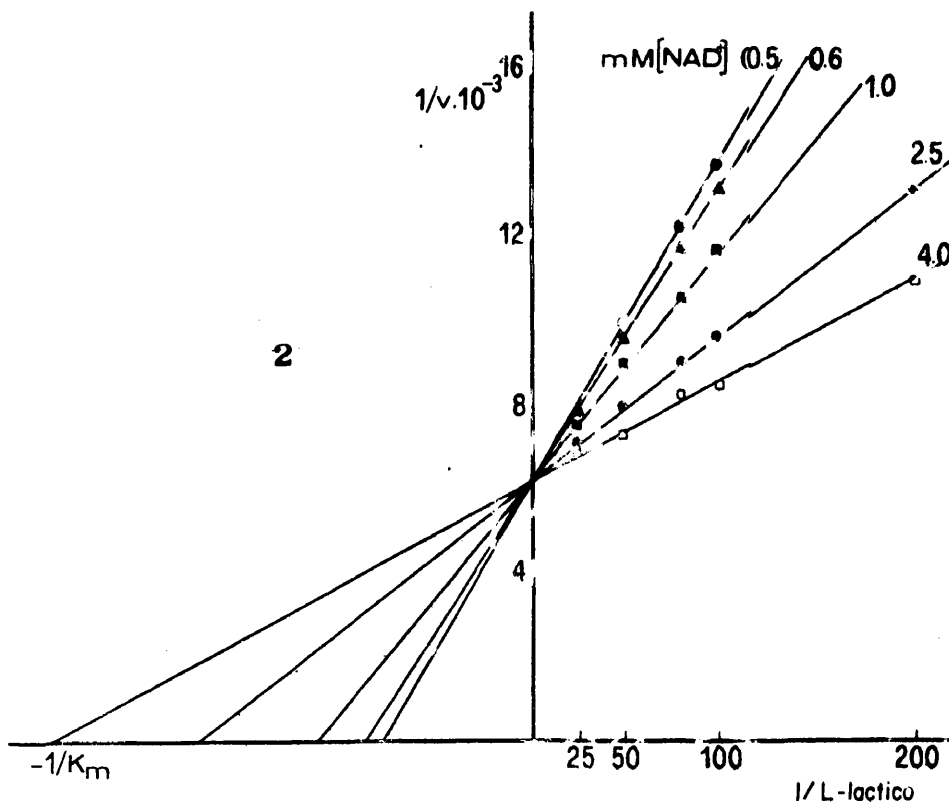


Figura 2.10

Cinética de la isoenzima LDH-2 de músculo estriado de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico, a varias concentraciones de NAD^+

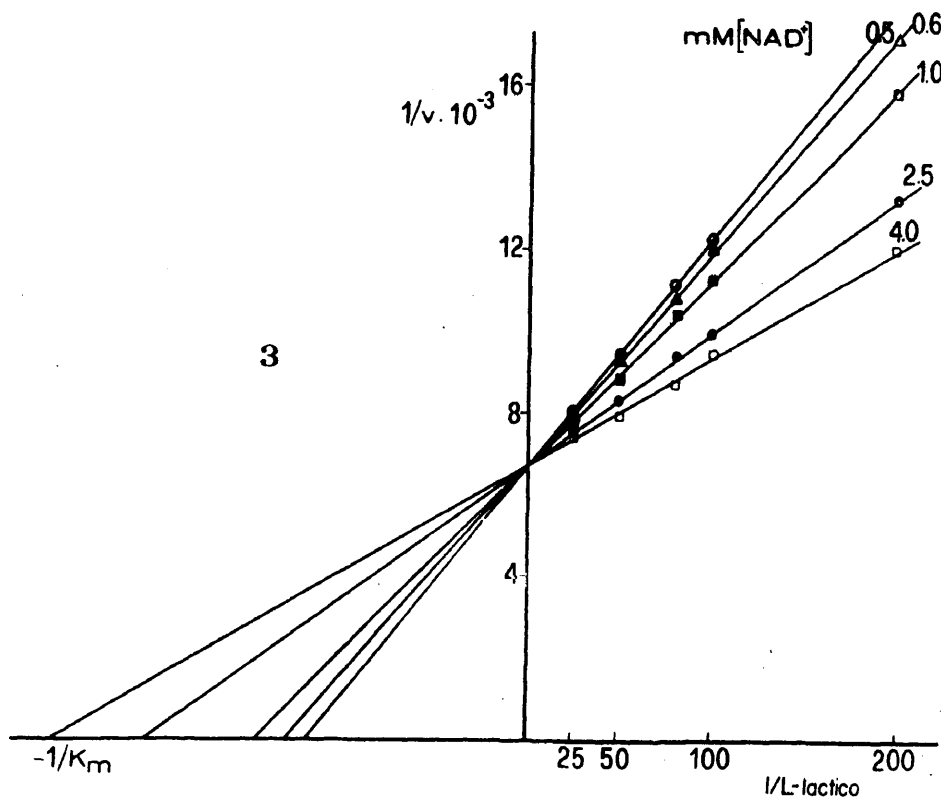


Figura 2.11

Cinética de la isoenzima LDH-3 de músculo estriado de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico, a varias concentraciones de NAD^+

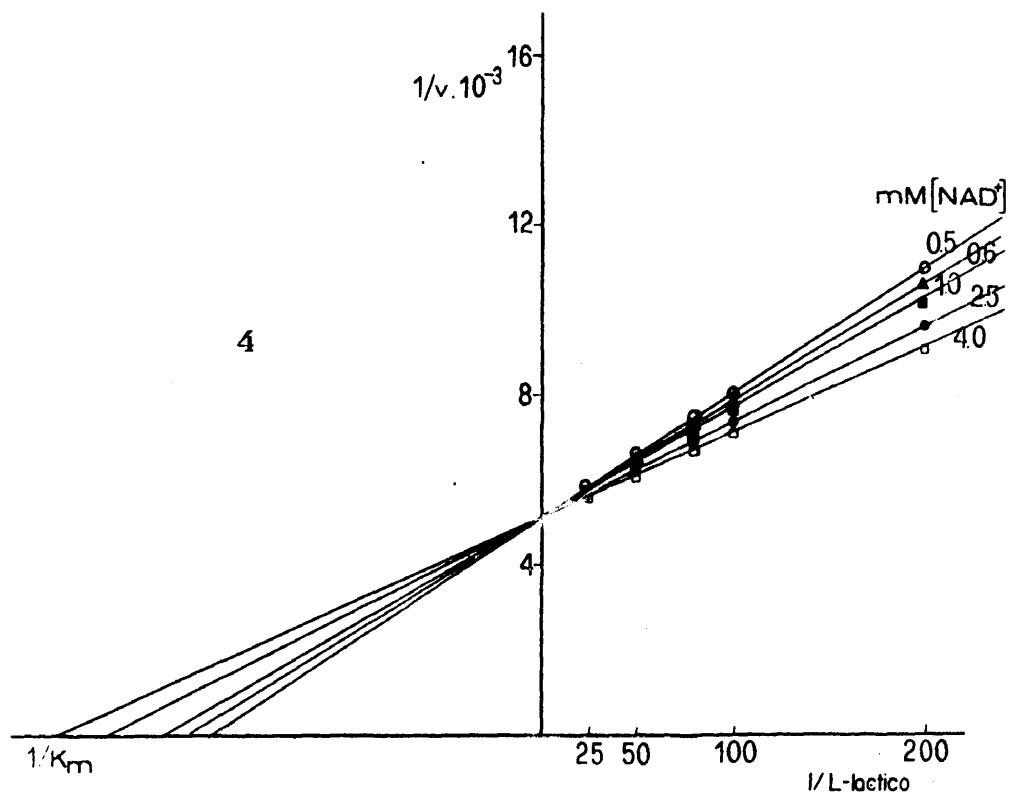
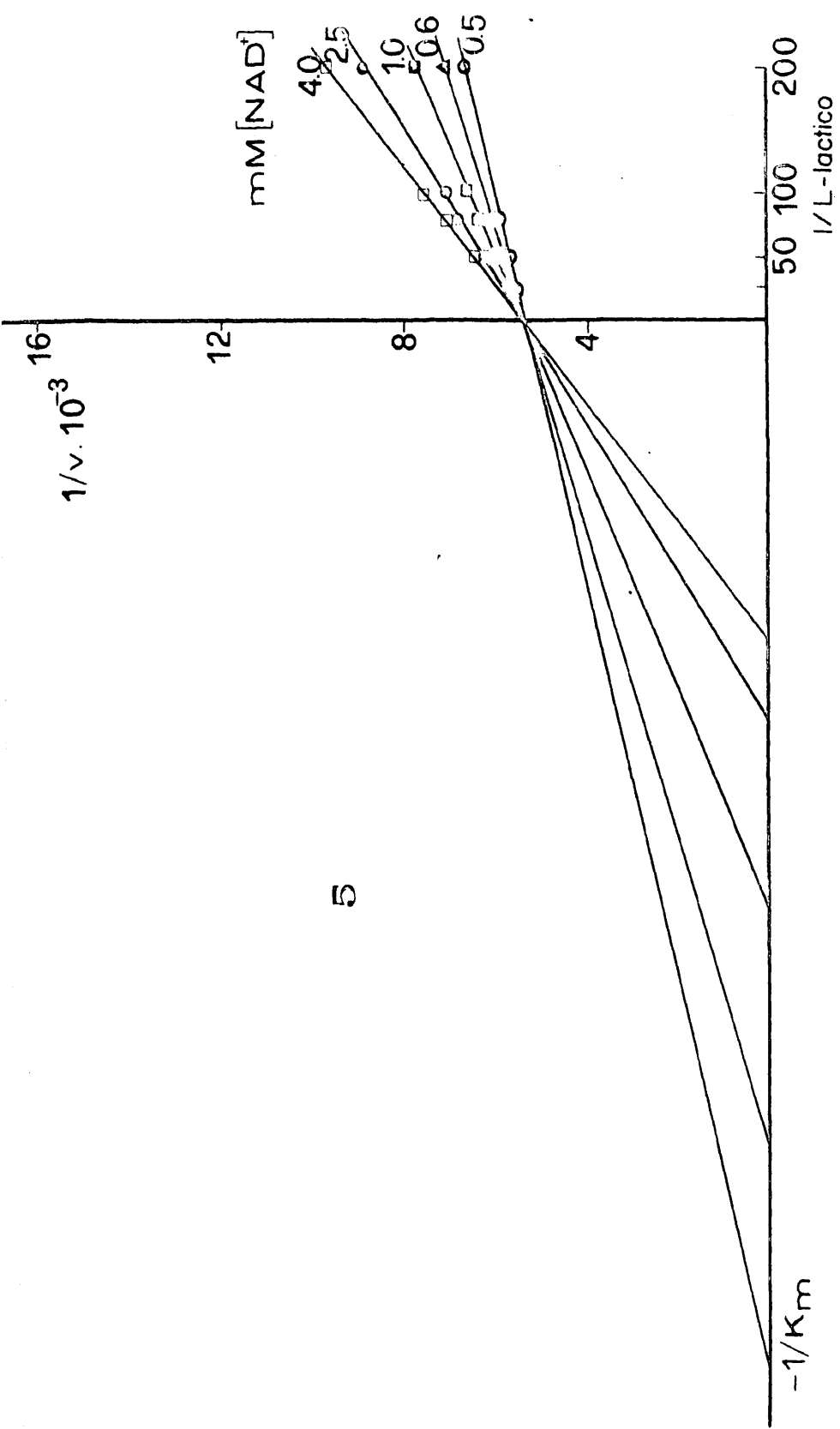


Figura 2.12

Cinética de la isoenzima LDH-4 de músculo estriado de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico, a varias concentraciones de NAD^+



Figura, 2.13

Cinética de la isoenzima LDH-5 de músculo estriado de rata. $1/v$ frente a $1/L$ -láctico, a diferentes concentraciones de NAD^+

5

Haciendo una observación análoga a la comentada anteriormente para el cerebro, se puede advertir, a la vista de las cinco últimas gráficas, que en cualquiera de las cinco isoenzimas el valor de K_m varía de acuerdo con las concentraciones de NAD^+ . Estos valores de K_m , para cada isoenzima y para cada concentración de NAD^+ pueden ser extraídos de dichas gráficas. La tabla 2.18, de doble entrada, describe la variación de los valores de K_m , de acuerdo con la concentración de NAD^+ , para cada una de las cinco isoenzimas de LDH.

TABLA 2.18

Valores de K_m (L-láctico M) de las cinco isoenzimas de LDH a diferentes concentraciones de NAD^+

NAD^+ mM	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
4.00	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039
2.50	0.0076	0.0055	0.0048	0.0043	0.0031
1.00	0.0145	0.0095	0.0067	0.0050	0.0021
0.62	0.0182	0.0112	0.0077	0.0054	0.0015
0.50	0.0205	0.0121	0.0081	0.0056	0.0012

Las cinco representaciones anteriores y la tabla última ponen de manifiesto que en la isoenzima LDH-5 los valores de K_m disminuyen al disminuir la concentración de NAD^+ , mientras que en las isoenzimas LDH-1, -2, -3 y -4 dichos valores aumentan al disminuir la concentración de NAD^+ ; esto constituye la primera diferencia observada entre el comportamiento cinético de las cinco isoenzimas de LDH entre músculo y cerebro. En el caso del músculo estriado, si hacemos variar la concentración de NAD^+ de 0.5 a 4 mM se obtiene también, para cada isoenzima, un campo de variación del valor de K_m cuya mayor o menor amplitud describe la variabilidad de este valor para cada isoenzima de LDH; y si en cerebro esta variabilidad era máxima

para la isoenzima LDH-5 y mínima para la isoenzima LDH-2, en músculo estriado es máxima para la isoenzima LDH-1 y mínima para la isoenzima LDH-4, pero en este caso puede observarse que en la isoenzima LDH-5, un incremento en la concentración de NAD^+ induce un aumento del valor de K_m mientras que en las restantes isoenzimas sucede todo lo contrario. La distinta variabilidad de los valores de K_m inducida por la variación de la concentración de NAD^+ y el distinto comportamiento cinético, cualitativo, de las isoenzimas LDH-2, -3 y -4, son las siguientes observaciones que debemos hacer al discutir la cinética comparada de las cinco isoenzimas de LDH de cerebro y músculo estriado.

Observando cualquiera de las cinco últimas gráficas se aprecia que la variación del valor de K_m no es proporcional al aumento de la concentración de NAD^+ . También en este caso hemos comprobado de un modo inductivo que la variación del valor de K_m es proporcional a la variación del logaritmo de la concentración de NAD^+ . Efectivamente, representando en escala semilogarítmica las concentraciones de NAD^+ frente a los valores de K_m para L-láctico obtenemos una recta para cada isoenzima, de igual forma que se procedió anteriormente para el cerebro. También en este caso las cinco rectas así obtenidas se cortan en un punto experimental, $[\text{NAD}^+] = 4 \text{ mM}$ tal y como está representado en la página siguiente (figura 2.14).

En cada una de las rectas representadas en esta figura, el signo de la tangente indica el sentido de la variación del valor de K_m inducida por la variación de la concentración de NAD^+ en el rango de 0.5 a 4.0 mM. Esta observación es análoga a la hecha anteriormente sobre la figura 2.7, si bien los resultados son distintos.

En este caso, en efecto, sólo la recta correspondiente a la isoenzima LDH-5 tiene tangente positiva; es decir, en dicha isoenzima, el aumento de la concentración de NAD^+ provoca un aumento en el valor de K_m , o lo que es lo mismo, un descenso de su afinidad para el ácido L-láctico. En las restantes isoenzimas (LDH-1 a -4) sucede lo contrario. De acuerdo con la gráfica 2.14, se tiene la siguiente ecuación general.

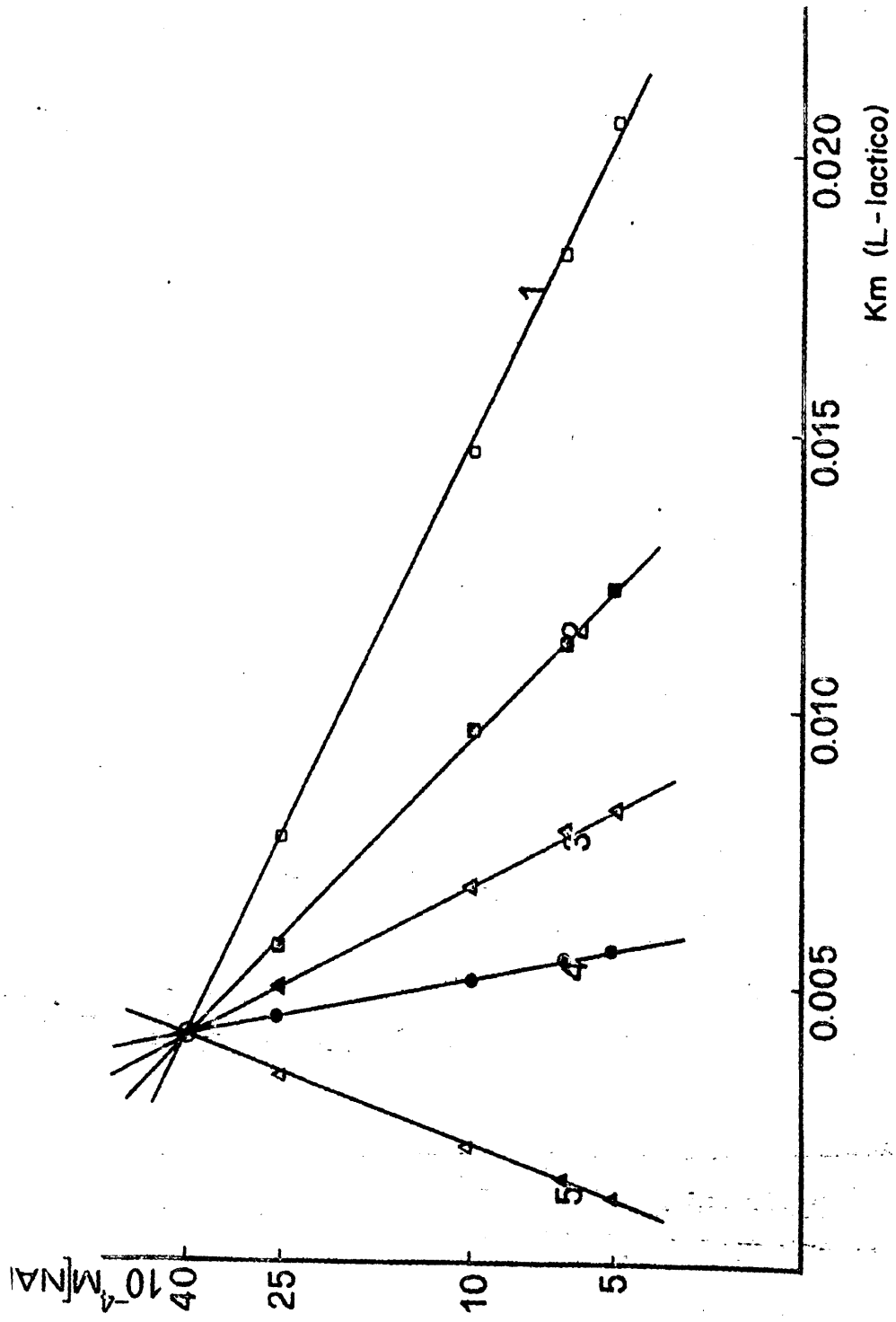


Figura 2.14

Representación semilogarítmica de las concentraciones de NAD^+ y los valores correspondientes de K_m para cada isoenzima de LDH de músculo estriado de rata. El punto de intersección es un punto experimental. A esta concentración de NAD^+ , las cinco isoenzimas exhiben la misma afinidad para el L-láctico.

$$\log [NAD^+] = \text{tg}\alpha \cdot K_m + \log NAD_0^+ \quad (3)$$

En donde, análogamente a la ecuación descrita en la página 115 $\text{tg}\alpha$ representa la pendiente de la recta y $\log NAD_0^+$ es la ordenada en el origen, es decir, NAD_0^+ es la concentración de NAD^+ para la cual el valor de K_m es igual a cero y, por tanto, la velocidad de reacción catalizada por la isoenzima es infinito.

Como se ha discutido anteriormente (pág. 115) el signo de las tangentes de estas rectas indica el efecto regulador del NAD^+ sobre la acción catalítica de cada isoenzima de LDH y éste es tal, que si la tangente es positiva hay inhibición, mientras que si es negativa hay activación.

En este caso se puede observar (fig. 2.14) que las tangentes de las rectas correspondientes a las isoenzimas LDH-1, -2, -3 y -4 tienen signo negativo, mientras que la tangente de la recta correspondiente a la isoenzima LDH-5 tiene signo positivo. De acuerdo con el concepto de inhibición y activación discutido en la página 115, se pone de manifiesto en músculo estriado un efecto activador por NAD^+ sobre las isoenzimas LDH-1 a -4.

En músculo estriado, de forma similar a los resultados descritos antes para el cerebro, hay una isoenzima que manifiesta un distinto comportamiento frente a la variación de concentraciones de NAD^+ . Esta isoenzima, en cerebro es LDH-1 y en músculo estriado, LDH-5. En cerebro, la isoenzima LDH-1 se activa y el resto de las isoenzimas se inhiben por NAD^+ . En músculo estriado, la isoenzima LDH-5 se inhibe y el resto de las isoenzimas se activan por NAD^+ .

En este caso, observemos que la isoenzima LDH-5 carece en su estructura del monómero B; sin embargo, en las isoenzimas LDH-1 a -4 el número de monómeros B contenido en la estructura de cada una crece simultáneamente con la activación por NAD^+ . Se trata, pues, de representar gráficamente en una escala adecuada, la relación entre el número de monómeros B y $-1/\text{tg}\alpha$ con objeto de buscar una relación matemática, al

igual que se hizo anteriormente para el cerebro. Con ello relacionaremos la activación de cada isoenzima con su correspondiente estructura.

Los valores de tg se pueden extraer de la figura 2.14. De ahí se han calculado sus inversas que se dan en la tabla 2.19.

TABLA 2.19

Valores de $-tg\alpha$ y de $-1/tg\alpha$ correspondientes a cada isoenzima de LDH

<u>Isoenzima</u>	<u>n_B</u>	<u>$-tg\alpha$</u>	<u>$-1/tg\alpha$</u>
LDH-1	4	0.51	1.96
LDH-2	3	1.04	0.97
LDH-3	2	2.08	0.50
LDH-4	1	6.25	0.14
LDH-5	0	-3.00	-0.33

De forma análoga a la descrita anteriormente para el cerebro, representando el logaritmo de los valores absolutos de $-1/tg\alpha$ frente al logaritmo del número de monómeros B, para las isoenzimas LDH-1 a -4 obtenemos cuatro puntos situados sobre una recta (ver figura 2.15, página siguiente).

Se tiene, por tanto, que

$$\log a = tg\beta \log n_B + \log a_1 \quad (4)$$

en donde a es la activación que ejerce el NAD^+ sobre cada isoenzima, $tg\beta$ es la pendiente de la recta de la figura 2.15, n_B es el número de monómeros B que contiene la isoenzima y $\log a_1$ es la ordenada en el origen, es decir, a_1 es la activación por NAD^+ cuando $n_A = 1$.

Operando de un modo análogo al efectuado anteriormente para el cerebro, sustituiremos a por $-1/tg\alpha$ en la ecuación (3) de la página 132 con lo que ésta quedará,

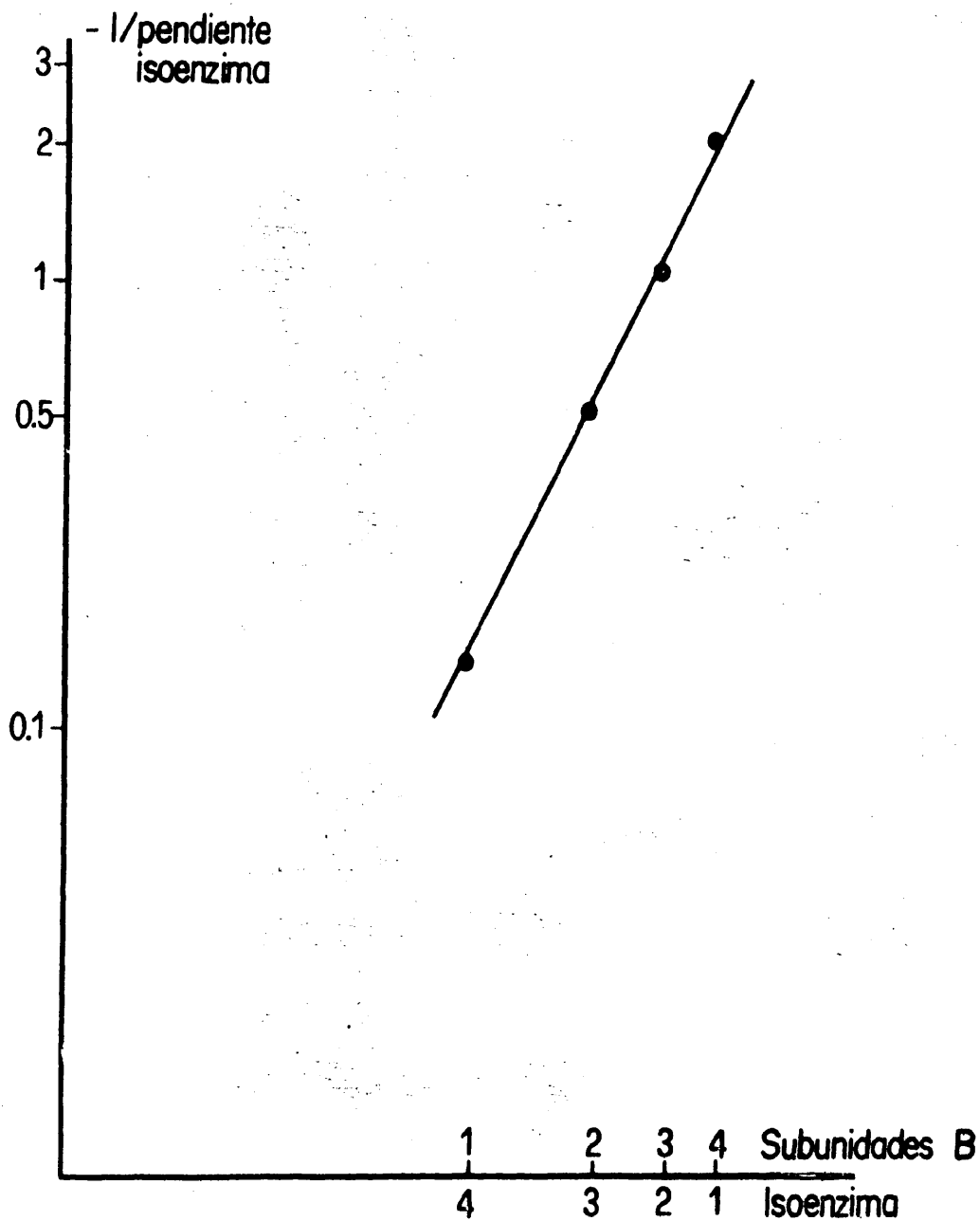


Figura 2.15

Representación logarítmica enfrentando $1/\text{pendiente}$ (valores absolutos, obtenidos a partir de la gráfica anterior) con el número de cadenas polipeptídicas B de las isoenzimas LDH-1, -2, -3, y -4 de músculo estriado de rata.

$$\log [NAD^+] = \frac{1}{a} K_m + \log NAD_0$$

$$\frac{1}{a} = \frac{\log [NAD^+] - \log NAD_0}{K_m}$$

$$a = \frac{K_m}{\log [NAD^+] - \log NAD_0}$$

$$\log a = \log \frac{K_m}{\log [NAD^+] - \log NAD_0}$$

y de acuerdo con la ecuación (4) de la página 133 resulta

$$\log \frac{K_m}{\log [NAD^+] - \log NAD_0} = \text{tg} \beta \cdot \log n_B + \log a_1$$

en donde, de forma similar a la ecuación final de la página 117 resultan cuatro constantes, NAD_0^+ es un valor constante para cada isoenzima; $\text{tg} \beta$ es un valor constante para el monómero B; n_B , el número de monómeros B de cada isoenzima y $\log a_1$, valor constante para el monómero B.

De igual forma que se discutió antes para el cerebro, hay que llamar la atención sobre el hecho de que el crecimiento de la activación por NAD^+ en músculo esquelético está en proporción logarítmica con el número de monómeros B que contienen las isoenzimas LDH-5 a -5, lo que induce a pensar que también en este caso debe existir una cooperatividad entre los monómeros.

También en músculo estriado las cinco isoenzimas de LDH manifiestan un punto de isoconcentración para NAD^+ (4.0 mM), y la figura 2.14 expresa el efecto regulador del NAD^+ sobre cada una de ellas y sobre el conjunto de las cinco.

A una concentración alta de NAD^+ (4.0 mM) no se manifiesta la regulación por isoenzimas en músculo estriado, pero a medida que los niveles de este cofactor van descendiendo (por ejemplo, por excesivo ejercicio y glicolisis anaerobia) se van destacando las distintas actividades específicas de las cinco isoenzimas con lo que este sistema de regulación se hace más efectivo.

La figura 2.16, en la página siguiente muestra el efecto del NAD^+ sobre la cinética de las isoenzimas de LDH, comparativamente en cerebro y músculo estriado. Esta figura se ha construido a partir de las gráficas 2.7 y 2.14, desplazando los ejes de coordenadas para hacer coincidir ambos puntos de isoconcentración. En ella podemos hacer dos tipos de observaciones:

1. El monómero A se inhibe por NAD^+ y el monómero B se activa, pero en cerebro tan sólo se pone de manifiesto la inhibición sobre A mientras que en músculo se lleva a cabo la activación sobre B.

2. El control del sistema isoenzimático Láctico-deshidrogenasa por NAD^+ se realiza sobre las isoenzimas en cerebro y músculo estriado, pero en cerebro éste control es más eficaz a altas concentraciones de NAD^+ y en músculo estriado a bajas concentraciones del cofactor.

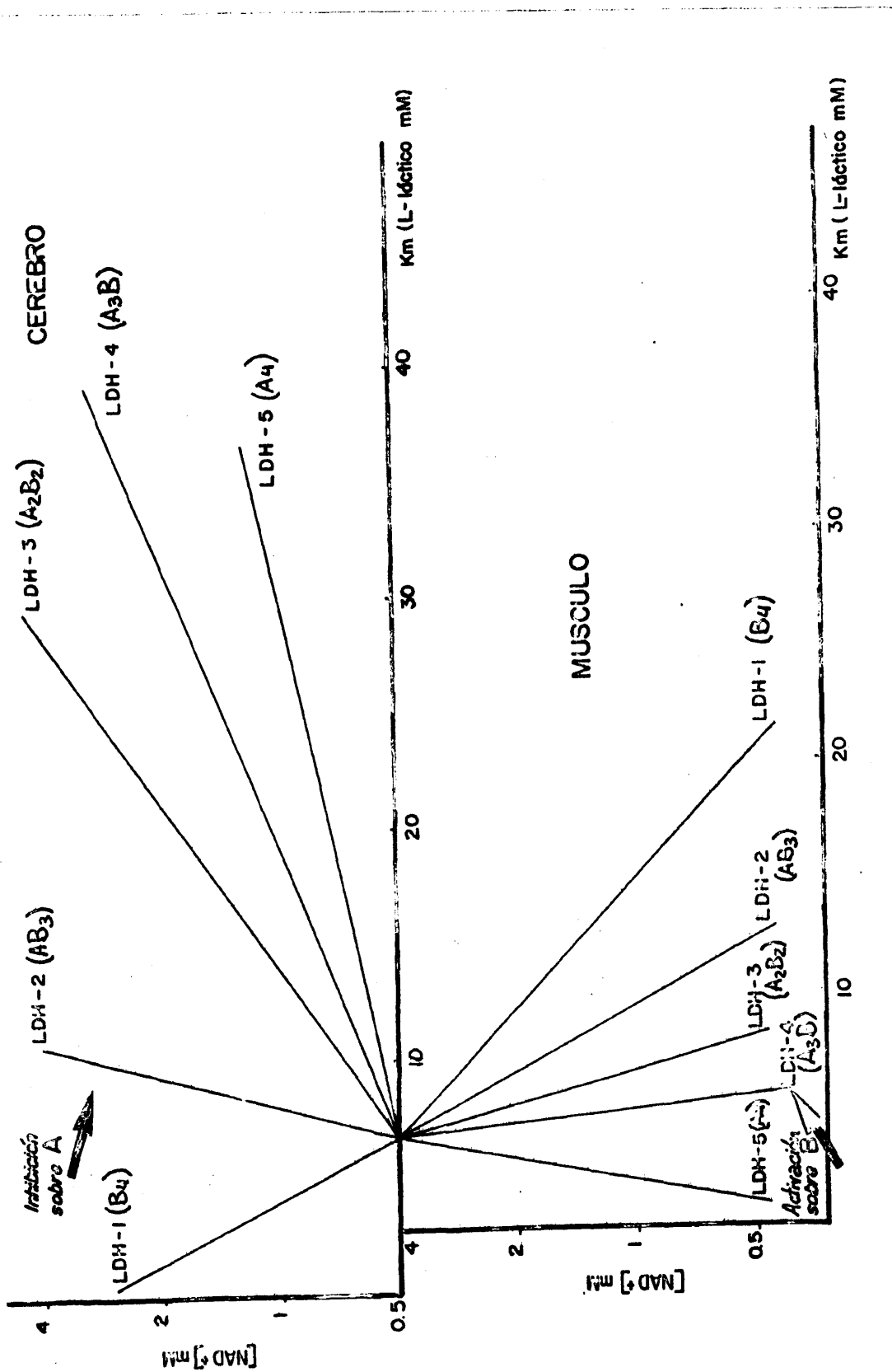


Figura 2.16.-Efecto de la concentración de NAD⁺ sobre la afinidad de cada isoenzima de LDH por el L-láctico, en cerebro y músculo estriado de rata. En cerebro se pone de manifiesto una inhibición sobre el monómero A y en músculo estriado una activación sobre el monómero B. La gráfica se ha construido a partir de las representadas en las figuras 2.7 y 2.14, haciendo un desplazamiento de coordenadas, de tal forma que coincidan los puntos respectivos de isocoordinación.

2.3 EFECTO DEL ATP SOBRE LA CINÉTICA DE ISOENZIMAS DE LDH

Incubando la enzima con ATP antes de ponerla en presencia del sustrato, se han observado efectos modificadores sobre la cinética de reacción, especialmente sobre la variación de K_m inducida por variación de la concentración de NAD^+ .

Este efecto se ha estudiado tan sólo en la isoenzima LDH-1 de cerebro de rata, que como se recordará (pág. 112) se activa por NAD^+ . La representación de la inversa de la velocidad inicial frente a la inversa de la concentración del sustrato para calcular los valores de K_m , a distintas concentraciones de NAD^+ es similar a la expuesta en la página 109. En la tabla siguiente se describen los valores de K_m que corresponden a cada concentración de NAD^+ , en presencia y ausencia de ATP.

TABLA 2.20

Valores de K_m para la isoenzima LDH-1 de cerebro de rata, a varias concentraciones de NAD^+ , en presencia y ausencia de ATP

NAD^+ mM	K_m (L-láctico mM)	
	sin ATP	ATP 0.5 mM
4.0		3.1
2.5	0.7	4.7
1.0	3.7	9.2
0.75	5.3	
0.5		18.5

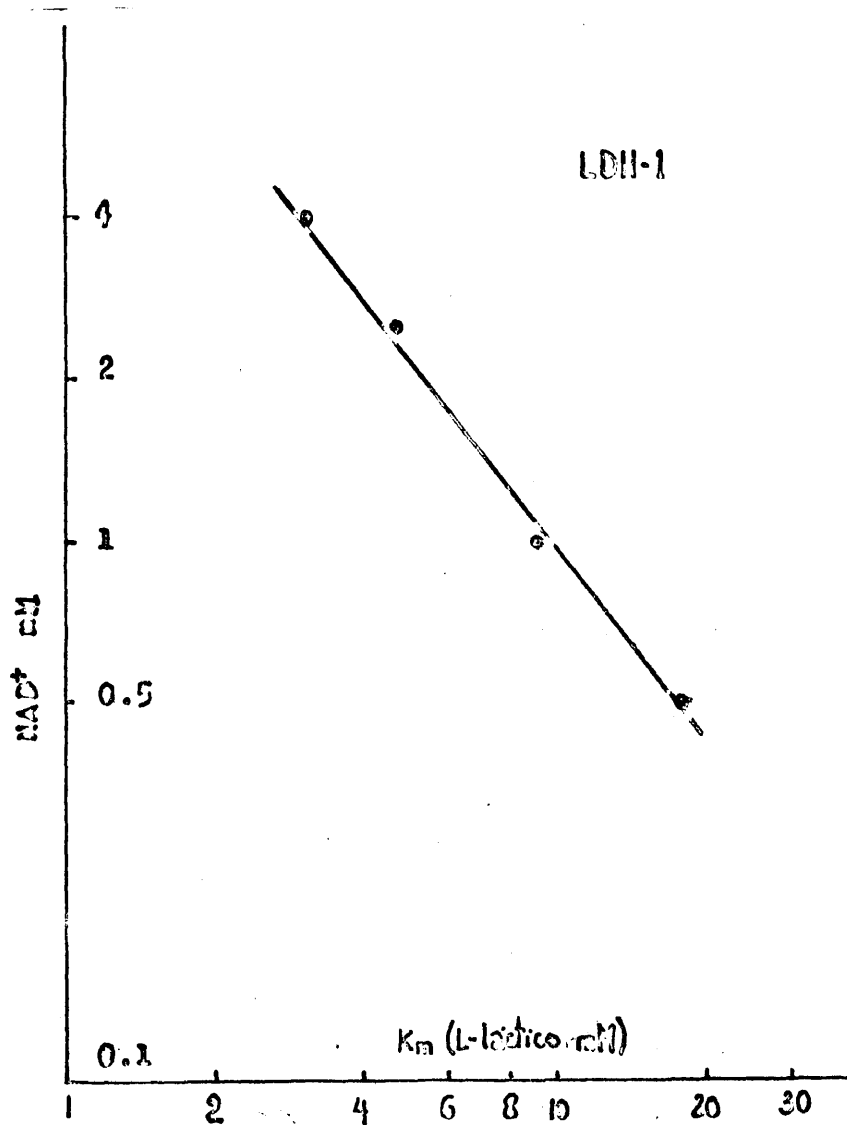


Figura 2.17

Efecto del NAD^+ sobre la cinética de la isoenzima LDH-1 de cerebro de rata, en presencia de ATP 0.5 mM. La relación semilogarítmica, característica, representada en la figura 2.7 se hace logarítmica en presencia de ATP. En estas condiciones, la isoenzima LDH-1 se activa, igualmente por NAD^+ .

A la vista de los valores calculados de K_m , en presencia y ausencia de ATP, parece poder concluirse que este nucleotido produce un aumento en el valor de K_m , lo que puede apreciarse observando la tabla de la página 138.

Como se recordará, en ausencia de ATP, los valores de K_m de la isoenzima LDH-1 son proporcionales al logaritmo de la concentración de NAD. Los valores de K_m obtenidos para esta isoenzima en presencia de ATP no mantienen esta relación. En la figura de la página anterior se han representado estos resultados en escala logarítmica; así, la ecuación (1) de la página 115, que describe la influencia del NAD sobre la cinética de las isoenzimas de LDH de cerebro de rata, en ausencia de ATP, sufre una modificación en su presencia, resultando,

$$\log [NAD^+] = \text{tg}\alpha \cdot \log K_m + \log NAD_0^+$$

en donde los parámetros $\text{tg}\alpha$, y $\log NAD_0^+$ son similares a los descritos en la página 115.

Hay que concluir, pues, que el ATP modifica la variación del valor de K_m para la isoenzima LDH-1 haciendo logarítmica la relación entre concentración de NAD^+ y K_m .

En este caso, como ya se discutió anteriormente, $-1/\text{tg}\alpha$ es la activación producida por NAD^+ sobre esta isoenzima. La presencia de ATP no ha modificado el efecto cualitativo del NAD^+ sobre la cinética de esta isoenzima, aunque ha corregido la relación.

Discusión general de los estudios cinéticos

Todos los resultados obtenidos demuestran algunos aspectos de la regulación por isoenzimas. Hemos considerado en este estudio la influencia de la concentración de NAD^+ y la influencia del ATP sobre la cinética de las isoenzimas de LDH. Así estos resultados aportan

un nuevo enfoque al esquema general de regulación metabólica por isoenzimas comentado en la introducción de esta memoria.

La Láctico-deshidrogenasa es esencial para llevar a cabo un metabolismo anaerobio en Mamíferos y los niveles de NAD^+ constituyen en el entorno celular un dato informativo importante sobre estas condiciones de oxigenación. Es lógico, por tanto, que sean estos niveles los más directamente implicados en la regulación de la actividad catalítica de este sistema enzimático; pero teniendo en cuenta que la LDH está formada por varias isoenzimas y que la acción reguladora del NAD^+ se realiza de distinta forma sobre cada una de ellas, el metabolismo anaerobio se ha de llevar a efecto como una resultante de sus distintas actividades específicas y de la concentración de cada una en las células. Teniendo en cuenta los resultados expuestos puede concluirse que el sentido de la reacción catalizada por la LDH se puede invertir (láctico-pirúvico a pirúvico-láctico) mediante una biosíntesis de uno de los monómeros A o B (con el consiguiente predominio de isoenzimas catódicas o anódicas respectivamente) o bien al variar los niveles de NAD^+ en el citoplasma. Los resultados que se exponen a continuación indican cómo, en determinadas condiciones fisiológicas se altera la distribución de isoenzimas de LDH característica de ciertos órganos y tejidos.

3. EFFECTOS DE DISTINTOS ESTADOS FISIOLÓGICOS SOBRE LAS ISOENZIMAS DE LACTICO-DESHIDROGENASA

Además de examinar las condiciones que influyen sobre las distribuciones de isoenzimas de LDH, hemos investigado los valores base para hígado, cerebro, tejido adiposo y endometrio en un grupo control de cinco conejos hembras. Como se ha indicado anteriormente (pág. 82) se ha analizado en estos animales la influencia particular y simultánea de insulina y gestación sobre las distribuciones isoenzimáticas del sistema LDH en hígado, cerebro y tejido adiposo y el efecto de la gestación sobre el endometrio.

En la tabla 3.1 se exponen los valores que corresponden a cada isoenzima de LDH en la distribución del hígado, controles y con diversos tratamientos. Los valores de esta tabla están representados en la figura 3.1 (pág. siguiente). Asimismo están expuestos y representados los valores que corresponden a los fetos.

TABLA 3.1

Valores relativos de actividad de las cinco isoenzimas de LDH en hígado de conejos sometidos a diversos tratamientos.

	<u>Isoenzimas de LDH</u>				
	<u>LDH-1</u>	<u>LDH-2</u>	<u>LDH-3</u>	<u>LDH-4</u>	<u>LDH-5</u>
<u>Conejos adultos</u>					
Controles	12.9	24.5	40.9	15.7	5.0
- con Insulina	3.7	4.2	29.0	41.4	21.6
- Gestantes	7.3	9.7	36.8	40.0	6.0
Gestantes-Insulina	4.2	13.1	27.7	30.4	24.5
<u>Fetos</u>					
Procedentes de					
Control-Gestante	4.0	8.7	36.5	38.5	11.7
Gestante-Insulina	23.6	26.8	32.2	15.4	1.5

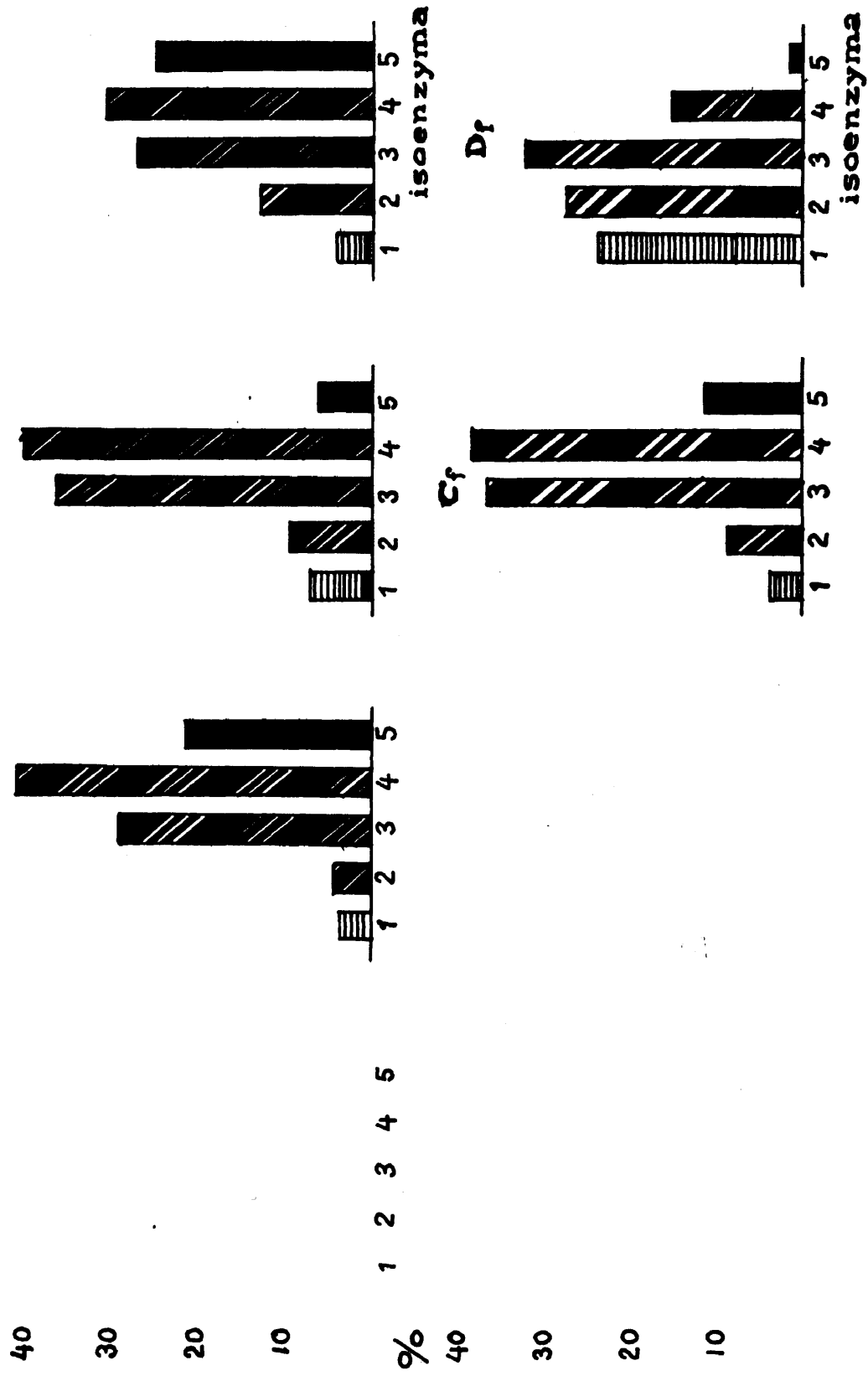


Figura 3.1.- Distribución de isoenzimas de LDH en hígado de conejos. A, controles; B, tratados con insulina; C, gestantes; D, gestantes tratados con insulina; Cf, fetos correspondientes al grupo C; Df, fetos correspondientes al grupo D.

Como puede verse en la figura de la página anterior, la isoenzima dominante en el hígado de conejos-control es LDH-3 (fig. 3.1A) pero esta distribución se modifica con ambos tipos de condicionamientos fisiológicos, tratamiento con insulina (fig. 3.1B) y gestación (fig. 3.1C). La distribución isoenzimática del hígado bajo la influencia hormonal se caracteriza por el predominio de LDH-4, exhibiendo también un claro incremento de LDH-5. Puede concluirse, pues, que la insulina afecta a la distribución de subunidades de isoenzimas de LDH incrementando la proporción de cadenas A, lo que debe alterar la proporción del metabolismo pirúvico-láctico.

La gestación (fig. 3.1C) ejerce sobre la distribución isoenzimática del hígado materno un efecto similar al de la insulina, un claro incremento de LDH-4.

En el feto, la distribución isoenzimática del hígado (fig. 3.1C_f) es muy similar a la del hígado materno (fig. 3.1C), donde predominan las isoenzimas LDH-4 y LDH-3, de acuerdo con los datos establecidos por Karlson y Palmer (1971) en hígado de mamíferos en desarrollo.

La administración de insulina a conejas gestantes (fig. 3.1D) induce cambios en la distribución isoenzimática que se asemejan a los registrados en el hígado de conejas gestantes o tratadas con insulina. La subida significativa de la isoenzima LDH-5 y el mismo efecto en LDH-4 es un resultado análogo al descrito en conejos no gestantes tratados con insulina (fig. 3.1B). Sin embargo, esta influencia hormonal llevada a cabo sobre la distribución isoenzimática del hígado materno no aparece en la distribución del hígado fetal, en el que se puede apreciar una clara desviación hacia la actividad de las isoenzimas LDH-1 y -2, en cuya estructura predominan las cadenas B (fig. 3.1D_f). Se puede apreciar esta última observación comparando dicha distribución con el control correspondiente (fig. 3.1C_f).

Hay que considerar, pues, en lo que respecta a la distribución isoenzimática de LDH del hígado, que hay notables diferencias entre feto y adulto y que ambos esquemas de distribución se alteran en las distintas condiciones fisiológicas estudiadas.

En cerebro se han investigado las mismas condiciones fisiológicas para fetos y adultos. La tabla 3.2 describe los resultados obtenidos, que están representados en la figura 3.2, en la página siguiente.

TABLA 3.2

Valores relativos de actividad de las cinco isoenzimas de LDH en cerebro de conejos sometidos a diversos tratamientos

	<u>Isoenzimas de LDH</u>				
	<u>LDH-1</u>	<u>LDH-2</u>	<u>LDH-3</u>	<u>LDH-4</u>	<u>LDH-5</u>
<u>Conejos adultos</u>					
Controles	37.0	21.8	26.5	14.5	tr
- con Insulina	33.1	25.3	24.6	15.7	1.2
- Gestantes	33.6	23.0	25.8	16.2	1.1
Gestantes-Insulina	28.9	21.7	26.5	20.0	2.7
<u>Fetos procedentes de</u>					
Control-Gestantes	18.5	26.5	30.4	24.4	tr
Gestantes-Insulina	15.8	20.0	34.3	25.1	0.7

La distribución isoenzimática del cerebro control está expuesta en la figura 3.2A, donde puede verse una presencia pronunciada de la isoenzima LDH-1, lo que, como ya se discutió en la introducción, constituye un rasgo característico de órganos y tejidos esencialmente aeróbicos.

La gestación (fig. 3.2C) y la administración de insulina (fig. 3.2B) así como la presencia simultánea de ambas condiciones (fig. 3.2D) no inducen cambios significativos en la distribución de isoenzimas de LDH de cerebro de conejo.

En contraste con la similitud que existe entre las distribuciones de isoenzimas de LDH de hígado materno y fetal, la distribución fetal en cerebro es diferente a la del cerebro materno. En el feto está in-

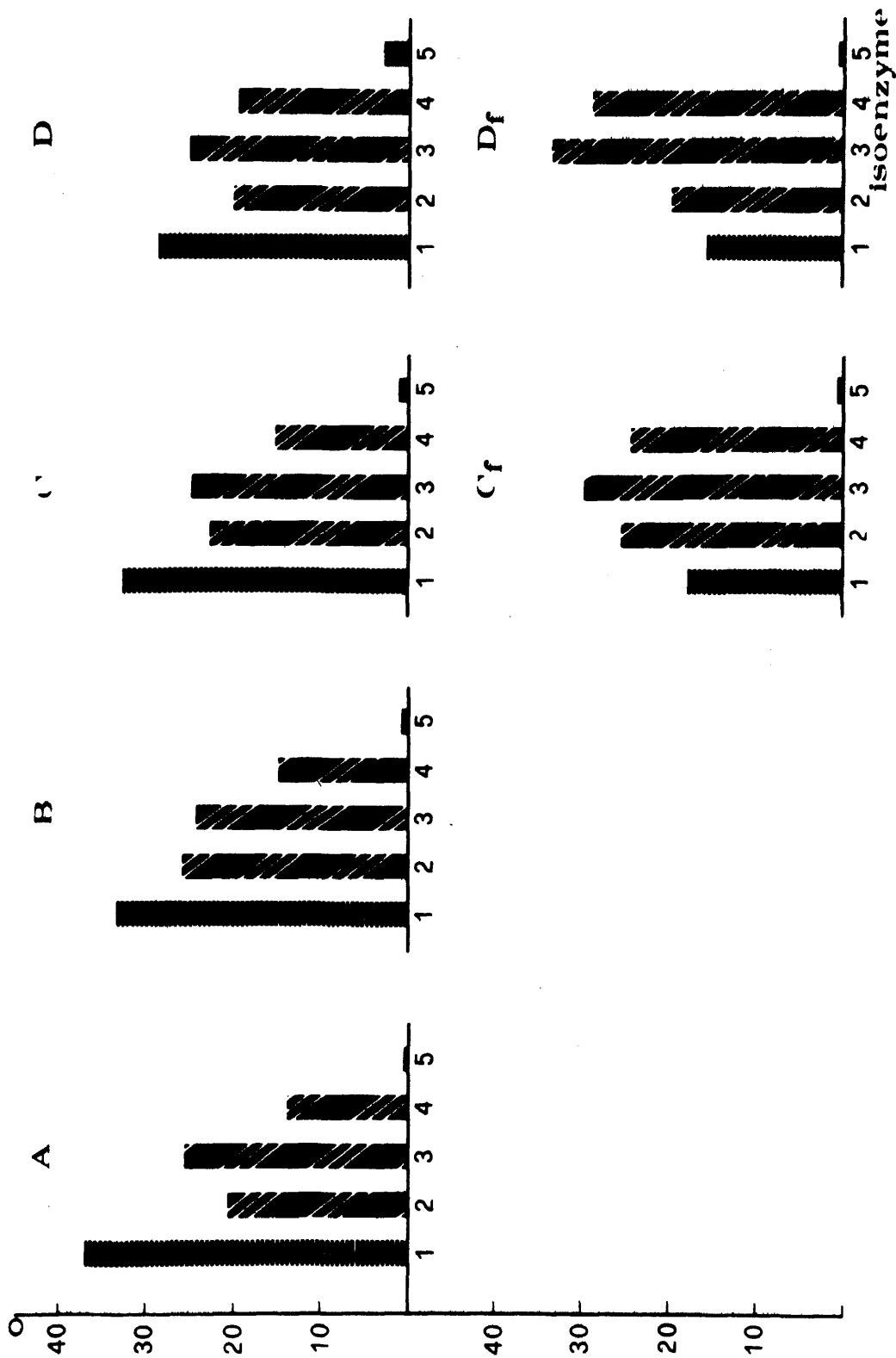


Figura 3.2.- Distribución de isoenzimas de LDH en cerebro de conejos. A, controles; B, tratados con insulina; C, gestantes; D, gestantes tratados con insulina; Cf, fetos correspondientes al grupo C; Df, fetos correspondientes al grupo D.

crementada la contribución de la isoenzima LDH-4 (fig. 3.2C_f) y simultáneamente a esta elevación hay una clara disminución de la isoenzima LDH-1. Análogamente, la administración de insulina induce cambios notables en la distribución isoenzimática del feto (fig. 3.2D_f), del mismo orden que los registrados anteriormente, elevación de LDH-4 y disminución de LDH-1 y -2.

La figura 3.3 muestra las distribuciones isoenzimáticas de LDH de tejido adiposo, control (fig. 3.3A), tratado con insulina (fig. 3.3B) gestante (fig. 3.3C) y gestante tratado con insulina (fig. 3.3D). El esquema de la distribución isoenzimática de LDH de los conejos control exhibe una alta proporción de la isoenzima LDH-3, pero este esquema cambia claramente bajo condiciones de gestación y administración de insulina; en ambas situaciones hay una marcada elevación en las proporciones de las isoenzimas LDH-1 y -2 y se puede observar una desviación en la isoenzima dominante, de LDH-3 a LDH-2.

La comparación de los cambios inducidos por cada una de las condiciones, gestación o administración de insulina, sobre la distribución de isoenzimas de LDH de hígado, cerebro y tejido adiposo, pone de manifiesto la existencia de diferentes efectos; así, la variación en la dominancia tiene lugar de LDH-3 a LDH-4 en hígado y de LDH-3 a LDH-2 en tejido adiposo, mientras que la distribución isoenzimática en cerebro no resulta influida por ninguna de estas condiciones.

En el adulto, las células del cerebro son postmitóticas, esto es, no se dividen después de un cierto período de crecimiento del animal. De acuerdo con este hecho, el tratamiento con insulina no altera la distribución de las isoenzimas de LDH en cerebro de conejos adultos y la gestación tampoco altera este esquema. Sin embargo, los niveles de la isoenzima LDH-1 (B₄) en cerebro embrionario (figs. 3.2C_f y 3.2D_f) son más bajos que los del cerebro materno, lo que significa que durante el desarrollo tiene lugar un incremento de subunidades B en el cerebro, de acuerdo con los resultados obtenidos por Singh y Kanungo (1968) quienes han comunicado una proporción más alta de subunidades B en adultos.

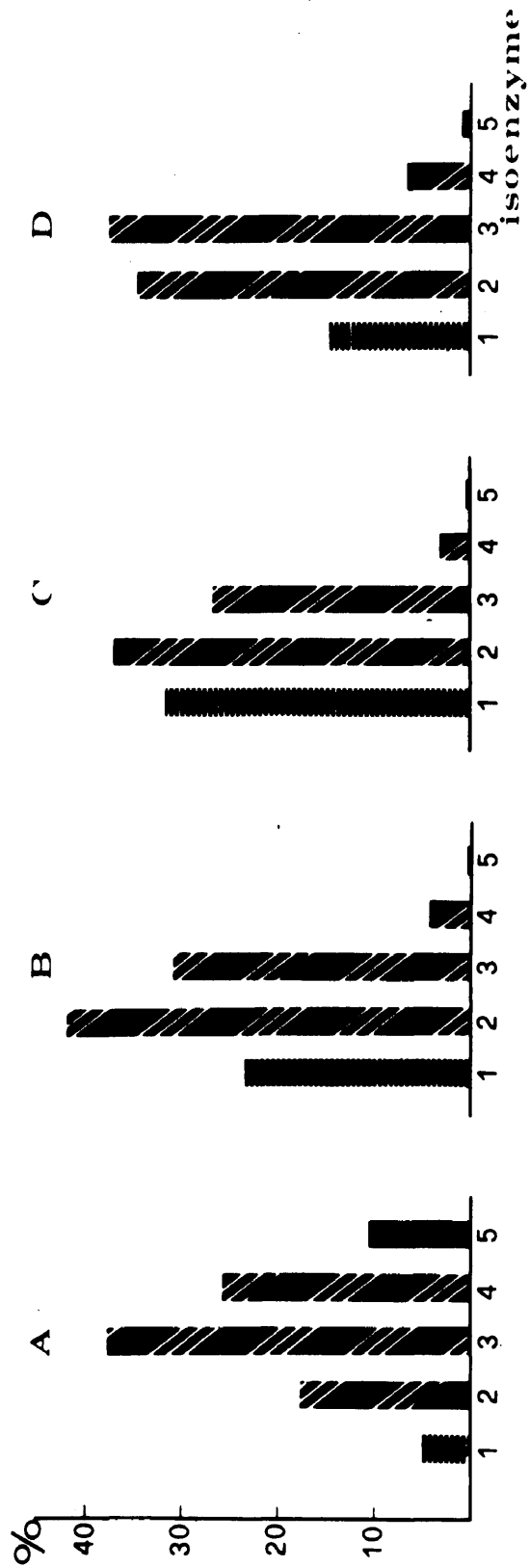


Figura 3.3.- Distribución de isoenzimas de LDH en tejido adiposo de conejos. A, controles; B, tratados con insulina; C, gestantes; D, gestantes tratados con insulina.

Por otra parte, el hígado y el tejido adiposo representan tejidos premitóticos y la gestación y administración de insulina alteran las distribuciones de isoenzimas de LDH en estos tejidos. La tabla 3.3 describe los valores de actividad LDH correspondientes a cada isoenzima en tejido adiposo, representados en la figura 3.3.

TABLA 3.3

Valores relativos de actividad de las cinco isoenzimas de LDH en tejido adiposo de conejos sometidos a diversos tratamientos

	<u>Isoenzimas de LDH</u>				
	<u>LDH-1</u>	<u>LDH-2</u>	<u>LDH-3</u>	<u>LDH-4</u>	<u>LDH-5</u>
<u>Conejos adultos</u>					
Controles	5.1	18.2	38.1	26.7	11.6
- con Insulina	23.0	42.3	30.4	4.2	tr
- Gestantes	32.4	37.2	27.3	2.9	tr
Gestantes-Insulina	17.2	34.8	37.3	6.5	4.0

Sin embargo, hay diferencias pronunciadas entre las distribuciones de isoenzimas de hígado y tejido adiposo bajo gestación y tratamiento con insulina; la desviación en la dominancia tiene lugar en ambos a partir de un esquema inicial con un nivel similar de la isoenzima LDH-3, pero estas distintas condiciones fisiológicas inducen dos esquemas muy diferentes, caracterizados por la alta proporción de subunidades B en el tejido adiposo y de subunidades A en el hígado, lo que puede concluirse al observar cómo la respuesta del tejido adiposo consiste en una desviación hacia el incremento de isoenzimas anódicas mientras que la del hígado supone una desviación en sentido contrario.

Se tiene, por tanto, que la gestación y la administración de insulina inducen cambio en la capacidad metabólica de ambos tejidos, para llevar a cabo la transformación pirúvico-láctico, pero en distinto sentido. Bajo estas circunstancias se incrementa la capacidad del

tejido adiposo para trabajar en condiciones aeróbicas, ya que se incrementan los niveles de las isoenzimas anódicas (propias del monómero B). De acuerdo con los resultados de diversos autores, discutidos al principio de esta memoria (Plagemann et al., 1960 y otros, ver página 32 y siguientes), las isoenzimas anódicas realizan su acción catalítica con mayor eficacia en sentido láctico-pirúvico. Por otra parte, los resultados que hemos obtenido en esta línea y que han sido discutidos anteriormente, nos ponen de manifiesto el efecto regulador del NAD sobre la actividad de las isoenzimas de LDH, de tal forma que el monómero B se activa por NAD mientras que el monómero A se inhibe.

Todo ello da a entender que la actividad catalítica del sistema isoenzimático LDH será más efectiva realizando la transformación en sentido láctico-pirúvico en aquellos tejidos donde predominen las isoenzimas anódicas, y más efectivo en sentido pirúvico-láctico, en tejidos con predominio de isoenzimas catódicas.

La desviación que presenta el hígado bajo el efecto de la insulina, hacia un predominio de subunidades A, le permite catalizar la reacción con más efectividad en sentido pirúvico-láctico, mientras que la desviación que manifiesta el tejido adiposo, en las mismas condiciones, hacia un predominio de subunidades B, le permite catalizar la reacción con mayor efectividad en sentido láctico-pirúvico. Estos hechos son capaces de influir en las secuencias glicolítica y gluconeogénica de ambos tejidos.

La acción de la insulina sobre la biosíntesis del glucógeno en el hígado ha constituido durante mucho tiempo materia de controversia, y la actividad glucógenolítica de esta hormona se ha atribuido a un efecto secundario de la hipoglucemia, a través del glucagón o adrenalina (Berthet et al., 1956).

En esta relación, el efecto total de la deficiencia de insulina facilitando la gluconeogénesis hepática y renal ha sido atribuido a cambios en la etapa inicial de la ruta de los ácidos dicarboxílicos, en la descarboxilación del oxalacético a fosfoenol-pirúvico y en la reducción de triosa-fosfatos (Krebs et al., 1965); (Krebs et al., 1966; Krebs, 1963).

Sin embargo, la desviación hacia el predominio de subunidades A en las isoenzimas de LDH, que trae consigo un incremento de láctico en las células hepáticas, condiciona la inmediata salida del mismo al torrente sanguíneo, de donde puede ser utilizado por tejidos aeróbicos (cerebro, corazón). Esto puede ser indicativo de una clara contribución al decremento de la gluconeogénesis hepática inducido por insulina.

En el tejido adiposo, la administración de insulina induce una elevación de subunidades B. El sistema isoenzimático Láctico-deshidrogenasa puede realizar su acción catalítica más efectivamente en sentido láctico-pirúvico y de ahí se puede concluir que este tejido utilizará el ácido láctico del torrente circulatorio para su posterior transformación en otras sustancias. Las células de este tejido tendrán así un suministro de ácido pirúvico, pero la ausencia en las mismas de las enzimas fructosa-1,6-difosfatasa y glucosa-6-fosfatasa hace que no puedan realizar la secuencia gluconeogénica. Hay que concluir, pues, que las transformaciones que se efectúen sobre el ácido pirúvico le conducirán hacia otras rutas metabólicas, posiblemente favoreciendo la presencia de sustratos adecuados para la lipogénesis. Así, los experimentos descritos ofrecen un nuevo soporte para el concepto del control hormonal de la actividad de la actividad enzimática. Por otra parte, los esquemas de actividad determinados en hígado y tejido adiposo durante la gestación se pueden describir como muy similares a los que se obtienen bajo la influencia de insulina.

Isoenzimas de LDH y desarrollo de órganos y tejidos

También se ha analizado la actividad de las isoenzimas de LDH en el endometrio de conejas gestantes y no gestantes. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 3.4 y están representados en la figura 3.4, en la página siguiente. En la figura 3.5 se exponen las fotografías de dos geles de este experimento.

TABLA 3.4

Valores relativos de actividad de las cinco isoenzimas de LDH en endometrio de conejas gestantes y no gestantes

<u>Conejas</u>	<u>Isoenzimas de LDH</u>					
		<u>LDH-1</u>	<u>LDH-2</u>	<u>LDH-3</u>	<u>LDH-4</u>	<u>LDH-5</u>
no gestantes		28.6	22.5	30.3	16.9	1.4
gestantes		18.5	14.1	26.6	19.8	20.2

Estos resultados muestran claramente que la gestación produce una desviación en la actividad de las isoenzimas de LDH en endometrio. En los animales control (no gestantes; figura 3.4A) predominan las isoenzimas anódicas anódicas en el endometrio, mientras que en gestantes hay un claro predominio de las catódicas, que se manifiesta especialmente en el incremento de LDH-5, cuya actividad sube casi un 20%.

Como se ha expuesto anteriormente (pág. 49-52), varios autores han estudiado la relación entre la distribución de isoenzimas de LDH en un órgano y su desarrollo. El predominio de isoenzimas catódicas durante el mismo ha sido descrito por Markert (1962), Nebel y Conklin (1964), Cahn et al. (1962), Philip y Vesell (1962) y Lindsay (1963), entre otros. La discrepancia señalada antes entre algunos de estos autores, se refiere especialmente al cambio de actividad durante el desarrollo, pero todos ellos están de acuerdo en el predominio de isoenzimas catódicas en algunas de las fases del mismo. Otros experimentos están de acuerdo con este hecho; Wachsmuth (1964) ha identificado la fase mitótica del

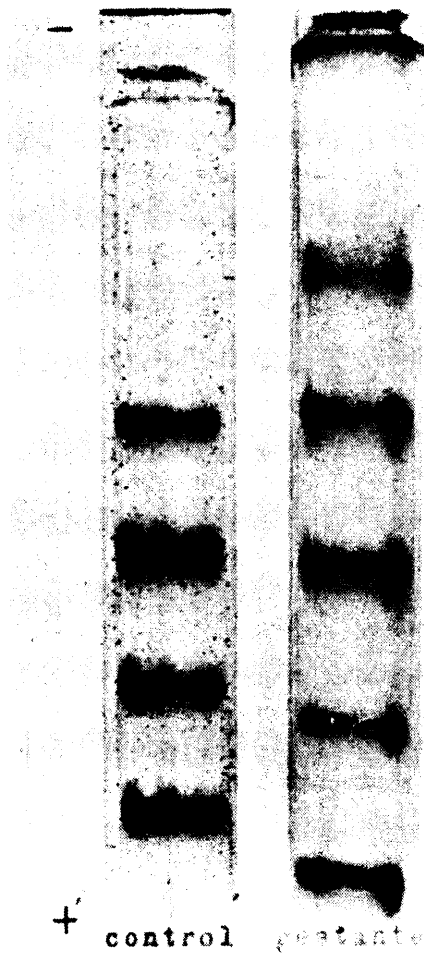
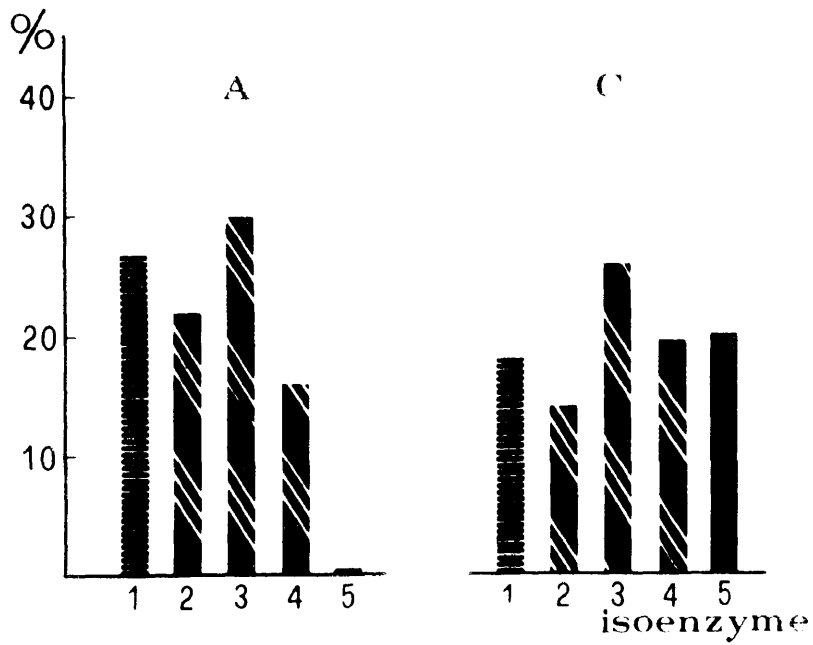


Figura 3.4

Esquema de la distribución de isoenzimas de LDH en endometrio de conejos.

A, controles; C, gestantes.

Abajo, fotografía de dos de los gels correspondientes, donde se puede apreciar el cambio que produce la gestación en la actividad de la isoenzima LDH-5.

miocardio humano, con una distribución binomial de las isoenzimas de LDH, para un 50% de actividad en cada uno de los monómeros A y B; en la fase post-mitótica, sin embargo, hay un predominio de las isoenzimas LDH-1 y -2. Esta diferencia de distribución ha sido descrita también por Kaplan y Ciotti (1961 ⁺) y Fine et al. (1962). Además, Philip y Vesell (1962) y Nebel y Conklin (1964) han comprobado que en los tejidos que manifiestan un predominio de isoenzimas anódicas en el adulto, o en la fase post-mitótica (entre ellos, el miocardio), se pierde su distribución característica al cultivarlos "in vitro", condiciones en las que, como describen Hararay y Farley (1960), las células del miocardio retornan a una fase mitótica. En estas condiciones, Philip y Vesell (1962) y Nebel y Conklin (1964) han descrito que dichas células pierden su distribución isoenzimática característica y hay un claro predominio de LDH-5.

Comparando los resultados descritos en las páginas 145-147, de cerebro adulto y embrionario, puede observarse que en adultos hay un claro predominio de LDH-1, mientras que en los fetos próximos ya al nacimiento hay una desviación hacia las isoenzimas catódicas. Dichos resultados están de acuerdo con los referidos más arriba y con los de Bonavita et al. (1962) que se refieren a este órgano en concreto.

Además, los resultados expuestos en las páginas 142-144 de hígado de animales adultos y embrionarios confirman nuevamente esta observación. El hígado de organismos adultos controles (figura 3.1A) muestra un predominio de la isoenzima LDH-3 y presenta bajos niveles de LDH-4 y -5, pero el hígado de fetos control (fig. 3.1C_f) presenta una clara desviación hacia las isoenzimas catódicas, con un predominio de LDH-4 y niveles más altos de LDH-5 que el control; al contrario, las isoenzimas anódicas, LDH-1 y -2 se encuentran en una proporción muy baja.

La relación entre predominio de isoenzimas catódicas en un órgano y división celular o desarrollo del mismo, parece contar ya con numerosas pruebas, pero no son estas las únicas. El estudio de la distribución de isoenzimas de LDH en células neoplásicas extiende esta relación aún más. Elliot y Wilkinson (1963) y Langvad (1968, a y b) han descrito un

predominio de estas isoenzimas de LDH, y especialmente de LDH-5 en células neoplásicas.

Los experimentos llevados a cabo en endometrio, donde la isoenzima LDH-5 aumenta su actividad en un 20% bajo condiciones de gestación (fig. 3.4), suponen un cambio, prácticamente cualitativo en la distribución isoenzimática de este tejido, que da un nuevo soporte a la observación discutida, los tejidos en desarrollo, o en fase mitótica manifiestan un incremento en la actividad de las isoenzimas catódicas de LDH.

De acuerdo con las consideraciones hechas anteriormente sobre los resultados obtenidos en los estudios cinéticos, y de acuerdo con la distinta actividad de isoenzimas anódicas y catódicas para realizar su acción catalítica en distintas condiciones metabólicas, especialmente, su actividad frente a la concentración de NAD^+ , hemos de concluir que en los tejidos en desarrollo, o en fase mitótica, predomina un metabolismo anaerobio.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este trabajo ha consistido en un estudio de la cinética comparada de isoenzimas de LDH, de cerebro y músculo esquelético de rata; un estudio de la microheterogeneidad de estas isoenzimas y un estudio de la influencia de determinadas condiciones fisiológicas (administración de insulina y gestación) sobre la distribución de isoenzimas de LDH en hígado, tejido adiposo y endometrio. A continuación se resumen los resultados obtenidos.

1. Mediante técnicas analíticas de elevada resolución es posible poner de manifiesto la microheterogeneidad del sistema enzimático LDH, de tal forma que cada una de las cinco isoenzimas aparece formada, a su vez por varias fracciones. Estas fracciones que componen cada isoenzima, podrían estar implicadas en los distintos fenómenos reguladores que se ejercen sobre ellas.

2. El NAD^+ ejerce una influencia reguladora sobre la actividad catalítica de las isoenzimas de LDH, de tal forma, que el logaritmo de la concentración de NAD^+ es proporcional a los correspondientes valores de K_m .

3. Esta influencia reguladora es distinta en cerebro y músculo estriado. En cerebro de rata, la isoenzima LDH-1 se activa por NAD^+ , mientras que las restantes isoenzimas se inhiben y esta inhibición está relacionada logarítmicamente con el número de monómeros A que contienen dichas isoenzimas.

4. En músculo esquelético de rata, la isoenzima LDH-5 se inhibe por NAD^+ , mientras que las restantes isoenzimas se activan. Esta activación está relacionada logarítmicamente con el número de monómeros B que contienen dichas isoenzimas.

5. Puede concluirse, pues, que el monómero A se inhibe por NAD y que el monómero B se activa por NAD^+ . En cerebro, tan sólo se pone de manifiesto la inhibición por NAD^+ sobre A, y en músculo esquelético, la activación por NAD^+ sobre B.

6. En presencia de ATP 0.5 mM, la relación entre concentración de NAD^+ y K_m para L-láctico, que era semilogarítmica en su ausencia, se hace logarítmica, pero esta sustancia no altera esencialmente el sentido de la influencia del NAD^+ sobre la cinética de las isoenzimas.

7. La gestación y administración de insulina producen en el hígado de conejos un aumento en la actividad de las isoenzimas catódicas, lo que se interpreta como un incremento en la producción de ácido láctico por este órgano en dichas condiciones.

8. Las mismas condiciones producen en el tejido adiposo un resultado contrario, es decir, aumento de la actividad de isoenzimas anódicas, lo que se interpreta como un incremento en la utilización de ácido láctico en este tejido, para la obtención de sustratos adecuados para la lipogénesis.

9. En condiciones de gestación, aumenta en gran medida la actividad de las isoenzimas catódicas en el endometrio. Este hecho aporta un nuevo dato a la relación que parece existir entre mitosis y condiciones anaerobias.

10. Los esquemas de distribución isoenzimática del sistema LDH obtenidos en tejidos embrionarios confirman la relación señalada anteriormente.

B I B L I O G R A F I A

- Aleksiuk, M. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.* 40B, 671
- Allen, J.M. (1961), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94, 937
- Apella, E. y Markert, C.L. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 6, 171
- Augustinsson, K.B. (1958) *Nature*, 181, 1786
- Augustinsson, K.B. (1961) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94, 844
- Bacchi, C.J., Ciaccio, E.I., O'Connell, K.M. y Hutner, S.H. (1970) *J. Bacteriol.* 102, 826
- Bajolle, F., Deville, A. y Borel, J.P. (1968) *Rev. Franç. Etudes clin. et Biol.* 13, 93
- Balek, R.W. y Snow, J. (1967) *Life Sci.* 6, 2587
- Batellino, L.J. y Blanco, A. (1970), *J. Exp. Zool.* 174, 173
- Batellino, L.J., Ramos Jaime, F. y Blanco, A. (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 518
- Baur, E.W. y Pattie, D.L. (1968), *Nature*, 218, 341
- Bell, J.L. y Baron, D.N. (1962), *Biochem. J.* 82, 5P
- Bernfeld, P., Berkeley, B.J. y Bieber, R.E. (1965), *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 31
- Berthet, J., Jacques, P., Hers, H.G. y de Duve, C. (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 190
- Blackshaw, A.W. Elkington, J.S.H. (1970) *J. Reprod. Fert.* 22, 69
- Bodman
- Bollette-Dugailly, S. y Schoffeniels, E. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.* 77, 493, (1969)
- Bonavita, V., y Guanieri, R. (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, 59, 634
- Bonavita, V., Ponte, F. y Amore, G. (1962), *Nature*, 196, 576
- Boudet, A., Ranjeva, R. y Gadal, P. (1971), *Phytochemistry*, 10, 997
- Boulekbache, , Rosenberg, A.-J. y Joly, C. (1970), *C.R. Acad. Sc. Paris*, 271, 2414
- Boyde, T.R.C. y Latner, A.L. (1961), *Biochem. J.* 82, 51P
- Burlington, R.F. y Sampson, J.H. (1968), *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 185

- Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L. y Zwilling, E. (1962), *Science*, 136, 962
- Campbell, D.M. y Moss, D.W. (1962) *Proc. Assoc. clin. Biochem.* 2, 10
- Chiandussi, L., Greene, S.F. y Sherlock, S. (1962) *Clin. Sci.* 22, 425
- Chilson, C.A., Costello, L.A. y Kaplan, N.O. (1965), *Biochemistry*, 4, 271
- Clark, S.W. y Yochim, J.M. (1971) *Biol. Reprod.* 5, 152
- Clausen, J. y Hustrulid, R. (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 167, 281
- Cohen, G.N. y Patte, J.C. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 513
- Cotton, R.G.H. y Gibson, F. (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 100, 76
- Croisille, Y. (1964) *C.R. Acad. Sci. Paris.* 258, 2214
- D'Auzac, J. y Jacob, J.L. (1967) *C.R. Acad. Sci. Paris*, 264D, 2007
- Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404
- Dewey, M.M. y Conklin, J.L. (1960), *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* 105, 492
- Dawson, D.M., Goodfriend, T.L. y Kaplan, N.O. *J. Biol. Chem.* 239, 130 (1964)
- Dawson, D.M., Goodfriend, T.L. y Kaplan, N.O. (1964+), *Science*, 143, 929
- Dennis, D. y Kaplan, N.O. (1960), *J. Biol. Chem.* 235, 810
- Dewey y Conklin (1960) ver cuatro líneas más arriba.
- Dickens, F. y McIlwain, H. (1938), *Biochem. J.* 32, 1615
- Dioguardi, N., Agostoni, A., Fiorelli, G., Tittobello, A., Cirila, E. y Schweizer, M. (1961), *Enzimol. Biol. clin.* 1, 204
- Doherty, M.D. (1962), *Federation Proc.* 21, 57
- Doy, C.H. y Brown, K.D. (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 104, 377
- Duesberg, P.H. y Rueckert, R.R. (1965) *Anal. Biochem.*, USA, 11, 342
- Durrum, E.L. (1958), en "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", por Block, R.J., Durrum, E.L. y Zweig, G. New York: Academic Press, p.487
- Elliot, B.A. y Wilkinson, J.H. (1963), *Clin. Sci.* 24, 343
- Emerson, P.M., Wilkinson, J.H. y Withycombe, W.A. (1964) *Nature*, 202, 1337
- Everse, J., Berger, R.L. y Kaplan, N.O. *Science*, 169, 1236 (1970)
- Fildes, R.A. y Parr, C.W. (1963), *Nature*, 200, 890
- Fine, I.H., Kaplan, N.O. y White, S. (1962), *Federation Proc.* 21, 409
- Flexner, L.B., Flexner, J.B., Roberts, R.B. y De la Haba, G. (1960), *Develop. Biol.* 2, 313

- Gibson, D.M., Davisson, E.O., Bachhawat, B.K., Ray, B.R. y Vestling, C.S. (1953), *J. Biol. Chem.* 203, 397
- Goldberg, E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 2044
- Gomori, G. (1952), *Microscopic Histochemistry*, Chicago Univ. Press, p.211
- Goodman, M., Syner, F.N., Stimson, C.W. y Rankin, J.J. (1969) *Brain Res.* 14, 447
- Gordon, A.H., Keil, B. y Sebesta, K. (1949) *Nature*, 164, 498
- Grabowski, C.T. (1961), *Science*, 134, 1359
- Grassmann, W. y Hanning, K. (1950) *Naturwiss.* 37, 397
- Green, D.E. y Brosteaux, J. (1936) *Biochem. J.* 30, 1489
- Griffin, J.H. y Cridle, R.S. (1970) *Biochemistry, Wash.* 9, 1195
- Haugaard, G. y Kroner, T.D. (1948), *J. Amer. chem. Soc.* 70, 2135
- Hawtrey, C.O. y Goldberg, E. (1970), *J. Exp. Zool.* 174, 451
- Hararay, I. y Farley, B. (1960), *Science*, 131, 1674
- Hess, B. (1958), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75, 292
- Hess, B. y Walter, S.I. (1960), *Klin. Wschr.* 38, 1080
- Hill, B.R. (1958), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75, 304
- Jacob, J.L. y D'Auzac, J. (1968) *Biochemistry, Wash.* 9, 1195
- Jacob, F. y Monod, J. (1961), *J. Mol. Biol.* 3, 318
- Johns, E.W. (1967), *Biochem. J.* 104, 78
- Jovin, T., Chrambach, A., Naughton, M.A. (1964), *Anal. Biochem.* 9, 351
- Kamada, T. y Hori, S.H. (1970), *Japan J. Genetics*, 45, 319
- Kaplan, N.O. (1961), en "Mechanism of Action of Steroid Hormones" ed. Vिलlee, C.A. y Engel, A.A., Oxford: Pergamon Press, p.247
- Kaplan, N.O. (1963), *Bact. Rev.* 27, 155
- Kaplan, N.O. y Ciotti, M.M. (1961a) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94, 701
- Kaplan y Ciotti (1961b) *Biochim. Biophys. Acta*, 49, 425
- Kaplan, N.O., Ciotti, M.M., Hamolski, M. y Bieber, R.E. (1960) *Science*, 131, 39
- Kaplan, N.O., Everse, J. Admiral, J. (1968) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151, 400
- Karlson, P. y Palmer, L.S. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.* 38B, 299
- Keiding, N.R. (1959), *Scand. J. clin. lab. Invest.* 11, 106
- Kitamura, M., Iijima, N., Hashimoto, F. y Hiratsuka, A. (1971), *Clin. Chim. Acta*, 34, 419
- Koen, A.L. y Goodman, M. (1969), *Biochem. Genet.* 3, 595
- Kohn, J. (1957), *Biochem. J.* 65, 9
- Krebs, H.A. (1963) en "Advances in Enzyme Regulation", ed. Weber, G. Pergamon Press, p.385

- Krebs, H.A., Hems, R., Weidemann, M.J. y Speake, R.N. (1966), *Biochem.J.* 101, 242
- Krebs, H.A., Speake, R.N. y Hems, R., *Biochem.J.* (1965), 94, 713
- Kreutzer, H.H. y Fennis, W.H.S. (1964), *Clin.Chim.Acta*, 9, 64
- Kun, E. y Abood, L.G. (1949), *Science*, 109, 144
- Kunkel, H.G. y Slater, R.J. (1952), *Proc.Soc.exp.Biol.N.Y.* 80, 42
- Kurganow, B.J., Surin, S.A. y Sugrobova, N.P. (1968), *Molekulyarnaya Biologiya*, 2, 180
- Langvad, E. (1968a), *Int.J.Cancer*, 3, 17
- Langvad, E. (1968b), *Europ.J.Cancer*, 4, 107
- Latner, A.L. y Turner, D.M. (1963), *Lancet*, i, 1293
- Lawrence, S.H., Melnick, P.J. y Weimer, H.E. (1960), *Proc.Soc.exp.Biol.N.Y.* 105, 572
- Lé John, H.B. (1971), *J.Biol.Chem.* 216, 2116
- Levi, A.S. y Kaplan, N.O. (1971), *J.Biol.Chem.* 237, 2135
- Levitzki, A. (1972) *FEBS letters*, 24, 301
- Lewis, U.J. y Clark, M.O. (1963), *Anal.Biochem.* 6, 303
- Lindsay, D.T. (1963), *J.exp.Zool.* 152, 75
- Lowenthal, A., Van Sande, M. y Karcher, D. (1961), *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 94, 988
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951), *J.Biol.Chem.* 193, 265
- Markert, C.L. (1962) "Hereditary, Developmental and Immunologic Aspects of Kidney Disease" ed. Metcoff, J., Evanston: Northwestern Univ. Press, p.54
- Markert, C.L. (1963) "Cytodifferential and Macromolecular Synthesis, New York: Academic Press, p.65
- Markert, C.L. (1963), *Science*, 140, 1329
- Markert, C.L. y Apella, E. (1963) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 103, 915
- Markert, C.L. y Møller, F. (1959), *Proc.Nat.Acad.Sci.Wash.* 45, 753
- Markert, C.L. y Ursprung, H. (1962), *Devellop.Biol.* 5, 363
- Meade, B.W. y Rosalki, S.B. (1964), *J.clin.Path.* 17, 61
- Meister, A. (1950), *J.Biol.Chem.* 237, 2135
- Meyerhof, O. y Lohmann, K. (1926), *Biochem.Z.* 171, 421

- Millar, D.B.S. (1962), J.Biol.Chem, 237, 2135
- Moore, B.W. y Angeletti, P.U. (1961), Ann.N.Y.Acad.Sci. 94, 659
- Nachlas, M.M. y Seligman, A.M. (1949), J.nat.Cancer Inst. 9, 415
- Nebel, E.J. y Conklin, J.L. (1964), Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 115, 532
- Neilads, J.B. (1952), J.Biol.Chem. 199, 373
- Nisselbaum, J.S. y Bodansky, O. (1961), J.Biol.Chem. 236, 323
- Novoa, W.B., Winer, A.D., Glaid, A.J. y Schwert, G.W. (1959), J.Biol.Chem. 234, 1143
- Ord, M.G. y Thompson, R.H.S. (1951), Biochem.J. 49, 191
- Ornstein, L. (1964), Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321
- Ornstein y Davis, B.J. (1959) "Disc Electrophoresis", Distillation Products Industries (Division of Eastman Kodak Co.).
- Ottolenghi, P. y Densted, O.F. (1958) Canad.J.Biochem.Physiol. 36, 1075
- Patte, J.C., Le Bras, G. y Cohen, G.N. (1967), Biochim.Biophys.Acta, 136, 245
- Patterson, C. y Masters, C.J. (1970), FEBS letters, 12, 69
- Pfleiderer, G. y Jeckel, D. (1957) Biochem.Z. 329, 370
- Pfleiderer, G. y Wachsmuth, E.D. (1961), Biochem.Z. 334, 185
- Philip, J. y Vesell, E.S. (1962), Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 110, 582
- Plagemann, P.G.W., Gregory, K.F. y Wróblewski, F. (1960), J.Biol.Chem. 235, 2288
- Plagemann, P.G.W., Gregory, K.F. y Wroblewski, F. (1961), Biochem.Z. 334, 37
- Plummer, D.T. y Wilkinson, J.H. (1961) Biochem.J. 81, 38P
- Plummer, D.T., y Wilkinson, J.H. (1963), Biochem.J. 87, 423
- Plummer, D.T., Wilkinson, J.H. y Withycombe, W.A. (1963), Biochem.J. 89, 49P
- Porath, J. y Flodin, P. (1959), Nature, 183, 1657
- Poulik, M.D. (1957), Nature, 180, 1477
- Pratt, J.J. y Dangerfield, W.G. (1969), Clin.Chim.Acta, 23, 189
- Prochazka, B., Qureshi, M.A. y Matty, A.J. (1970) Diabetologia, 6, 493
- Raymond, S. y Aurell, B. (1962), Science, 138, 152
- Raymond, S. y Weintraub, L. (1959), Science, 130, 711
- Ressler, N. y Moy, T. (1959), Clin.Chim.Acta, 4, 901
- Ressler, N., Schulz, J. y Joseph, R.R. (1963). J.lab.clin.Med. 62, 571
- Richterich, R., Locker, J., Zuppinger, K. y Rossi, E. (1962), Schweiz.med. Wschr. 92, 919

- Roman, (1969), *Enzymologia. Acta Biocatalitica*, 36, 189
- Rongstad, R. y Katz, J. (1970), *Biochem.J.* 116, 483
- Rosenberg, I.N. (1959), *J.clin.Invest.* 38, 630
- Saito, M (1972) *Biochim.Biophys.Acta*, 258, 17
- Salthe, S.N., y Kaplan, N.O. (1966) *Evolution*, 20, 603
- Salthe, S.N. (1965), *Comp.Biochem.Physiol.* 16, 393
- Sawula, R.V. y Suzuki, I. (1970), *Biochem.Biophys.Res.Comun.* 40, 1096
- Sayre, F.W. y Hill, B.R. (1957), *Proc.Soc.exp.Biol.N.Y.* 96, 695
- Schoffeniels, E. (1968)
- Schoffeniels, E. (1970), *Arch.Intn.Physiol.Bioch.* 78, 135
- Serban, M. y Cotariu, D. (1968), *Rev.roum.Bioch.* 78, 135
- Singh, S.N. y Kanungo, M.S. (1968), *J.Biol.Chem.* 243, 4526
- Smith, E.E. y Rutenberg, A.M. (1963), *Nature*, 197, 800
- Smithies, O. (1955), *Biochem.J.* 71, 585
- Sober, H.A. y Peterson, E.A. (1956), *J.Amer.chem.Soc.* 78, 751
- Sober, H.A. y Peterson, E.A. (1958), *Federation Proc.* 17, 1116
- Stadtman, E.R., Cohen, G.N., Le Bras, G. y De Robichon-Szulmajster, H. (1961)
J.Biol.Chem. 236, 2033
- Strauch, L. (1971), *Ann.Biol.Clin.* 29, 229
- Südi, J. (1970), *Biochim.Biophys.Acta*, 212, 213
- Südi, J. y Khan, M.G. (1970), *FEBS letters*, 6, 253
- Svenson, H. (1962), *Arch.Biochem.Biophys.Suppl.* 1, 132
- Truffa-Bacchi, P. y Cohen, G.N. (1961), *Biochim.Biophys.Acta*, 113, 531
- Tsao, M.U. (1960), *Arch.Biochem.* 90, 234
- Tsou, K.C., Cheng, C.S., Nachlas, M.M. y Seligman, A.M. (1956) *J.Amer.chem. Soc.* 78, 6139
- Versterberg, O. y Svenson, H. (1966), *Acta Chem.Scand.* 20, 820
- Vesell, E.S. y Bearn, A.G. (1957), *Proc.Soc.exp.Biol.N.Y.* 94, 96
- Vesell, E.S. y Bearn, A.G. (1958), *J.Clin.Invest.* 37, 672
- Vignais, P.V. y Vignais, P.M. (1961), *Biochim.Biophys.Acta*, 47, 515
- Vuylsteek, K. y Wieme, R.J. (1958), *Belg.Tijds.Geneesk.* 14, 750
- Wachsmuth, E.D. (1964)
- Wachsmuth, E.D., Pfeleiderer, G y Wieland, T. (1964), *Biochem.Z*, 340, 80

- Weber, K. y Osborn, M. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 4406
- White, L.P. (1960), en "Enzymes in Health and Disease", ed. Greenberg, D. M. y Harper, H.A., Springfield, Ill.: Thomas, p.349
- Wilkinson, J.H. (1965). "Isoenzymes" E.&F.N. Spon Ltd. London, p.69
- Whitt, G.S. y Maeda, F.S. (1970), *Biochem. Genet.* 4, 727
- Wieland, T. y Determann, H. (1962), *Experientia*, 18, 431
- Wieland, T. y Georgopoulos, D., Kampe, H y Wachsmuth, E.D. (1964), *Biochem. Z.* 340, 483
- Wieland, T. y Pfleiderer, G. (1957), *Biochem. Z.* 329, 112
- Wieland, T. y Pfleiderer, G. (1961), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94, 691
- Wieland, T., Pfleiderer, G., Haupt, I. y Wörner, W. (1959), *Biochem. Z.* 331, 103
- Wieland, T., Pfleiderer, G. y Ortanderl, F. (1959), *Biochem. Z.* 331, 103
- Wieland, T., Pfleiderer, G. y Rajewsky, K. (1960), *Naturforsch.* 15b, 434
- Wieme, R.J., (1959) "Studies on agar-gel Electrophoresis", Brussels: Arscia
- Wieme, R.J., Van Hove, W.Z. y Van der Straeten, M.E. (1968), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151, 213
- Warburton, F.G., Smith, D. y Laing, G.S. (1963) *Nature*, 198, 386
- Wilding, P. (1963) *Clin. Chim. Acta*, 8, 918
- Wilson, A.C., Cahn, R.D. y Kaplan, N.O. (1963), *Nature*, 197, 331
- Winer, A.D. y Schwert, G.W. (1958), *J. Biol. Chem.* 231, 1065
- Withycombe, W.A., Plummer, D.T. y Wilkinson, J.H. (1965), *Biochem. J.* 94, 384
- Wroblewski, F. (1957), en "Hepatitis Frontiers" (Ford Foundation Symposium, ed. Hartman, F.W. Logripo, G.A., Mateer, J.G. y Barron, J.), Boston, Mass.: Little Brown, p.447
- Wroblewski, F. y La Due, J.S. (1955), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 90, 210
- Wuntch, T.W., Chen, R.F. y Vesell, E.S. (1970) *Science*, 167, 63
- Wurster, B. y Hess, B. (1970), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351, 869
- Yagil, G. (1964), *Israel, J. Chem.* 2, 313
- Yochim, J.M. y Clark, S.W. (1971), *Biol. Reprod.* 5, 146
- Yoshida, A. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 147, 39
- Zinkham, W.H., Blanco, A. y Kupchyk, L. (1963), *Science*, 142, 1303