

## EFFECTO DE LA N-(3-CARBOXI-4- HIDROXI-FENIL) MALEIMIDA SOBRE LAS ISOENZIMAS DE LA LDH DE RATON

*Esther Uhthoff Brito\**  
*Lorena Rodríguez Páez\**  
*Ma. Isabel Baeza Ramírez\*\*+*  
*Carlos Wong Ramírez\*\*+*

### INTRODUCCION

La deshidrogenasa láctica (LDH) es una enzima que desempeña un papel muy importante en el metabolismo de carbohidratos. Se encuentra en casi todos los tejidos de vertebrados y muchos otros organismos. Esta enzima fue cristalizada y purificada por Straub en 1940.<sup>1</sup>

El peso molecular de la enzima es aproximadamente de 140 000<sup>2</sup> y se ha demostrado que exhibe cinco diferentes formas moleculares llamadas isoenzimas, las cuales fueron separadas e identificadas por Markert y Moller en 1959<sup>3</sup> mediante electroforesis en gel de almidón.<sup>3</sup>

Las isoenzimas de la LDH son tetrámeros formados por combinaciones posibles de sólo dos cadenas polipeptídicas, Markert<sup>4</sup> designó a estas dos subunidades polipeptídicas con las letras *A* y *B* respectivamente e indicó que el número máximo de tetrámeros que podía formarse sería cinco, lo cual estaba de acuerdo con la observación general de que en la mayoría de estos extractos de tejidos sometidos a electroforesis se habían podido observar cinco bandas con actividad de deshidrogenasa láctica, que corresponden a las isoenzimas de la LDH que se

numeran como LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub>, LDH<sub>4</sub> y LDH<sub>5</sub> de acuerdo con su movilidad en el campo eléctrico, comenzando por la fracción más cercana al ánodo.<sup>5</sup>

Lo anterior se confirmó cuando Markert<sup>6</sup> logró la síntesis de las cinco isoenzimas mediante la disociación y recombinación de los polipéptidos que forman los tetrámeros *AAAA* y *BBBB*.

Los polipéptidos *A* y *B* difieren en su composición de aminoácidos<sup>2</sup> y por medio de estudios inmunoquímicos se ha comprobado que son antigénicamente diferentes<sup>7</sup> y se sintetizan en la célula por genes diferentes.

En estudios posteriores<sup>7</sup> se observó que la LDH<sub>5</sub> (*A*<sub>4</sub>) predominaba en músculos y la LDH<sub>1</sub> (*B*<sub>4</sub>) en corazón, se propuso entonces otra nomenclatura: denominar *M* (de *muscle*) a los polipéptidos de la LDH de músculo y *h* (de *heart*) a los polipéptidos de LDH de corazón; con esto quedaría *H*<sub>4</sub> para la LDH<sub>1</sub> de corazón y *M*<sub>4</sub> para la LDH<sub>5</sub> de músculo y las restantes serían híbridos de estas dos isoenzimas.

Estudiando los zimogramas de diferentes tejidos, Blanco y Zinkham, en 1963,<sup>8</sup> encontraron una sexta isoenzima de la LDH que aparece exclusivamente en testículo maduro de algunos mamíferos y aves, la designaron con el nombre de deshidrogenasa láctica *X*, que también es un tetrámero<sup>9</sup> compuesto por un polipéptido *C*, el cual está codificado por un gene diferente a los que codifican la síntesis de los polipéptidos

\*Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

+Becario de la DEDICT-COFAA del I.P.N.

*A* y *B*. En algunos animales se han encontrado varias LDH <sub>$\lambda$</sub> , así por ejemplo, en rata hay dos y en toro tres.<sup>25</sup> En todos los mamíferos estudiados, en los que se encuentra LDH <sub>$\lambda$</sub> , se ha visto que esta isoenzima aparece simultáneamente con la actividad sexual.

La LDH juega papel muy importante en la regulación del metabolismo celular. Para que la oxidación anaeróbica de los carbohidratos (glucólisis) se lleve a cabo, se requiere la presencia de diversas enzimas, algunas de las cuales necesitan de coenzimas como el NAD<sup>+</sup> para poder actuar. Como en cualquier célula las reservas de NAD<sup>+</sup> son limitadas, podría pensarse que la glucólisis cesaría tan pronto como todo el NAD<sup>+</sup> se agotara, y únicamente continuaría si existiera un mecanismo de reoxidación del NADH + H<sup>+</sup> para dar lugar al NAD<sup>+</sup>. En el tejido muscular esta reoxidación se produce cuando el piruvato, en presencia de la LDH, se reduce a lactato. Por tanto, puede decirse que el objeto de esta reacción es proveer a la célula de NAD<sup>+</sup> (en forma oxidada) para que pueda efectuarse la glucólisis de manera continua. Sin embargo, en el citoplasma existen además de la LDH otras dos enzimas que utilizan también el NAD<sup>+</sup> como coenzima y por tanto funcionan como sistemas reoxidantes del NADH + H<sup>+</sup>; dichas enzimas son la dihidroxiacetona fosfato deshidrogenasa (o glicerol fosfato deshidrogenasa) (DAPD) y la  $\alpha$  = hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD).<sup>10</sup>

Si por algún mecanismo en un tejido normal se lograra inhibir la actividad de la LDH, estas dos últimas enzimas se encargarían del mecanismo de reoxidación del NADH.

Las isoenzimas de la LDH intervienen en forma importante en la regulación del metabolismo de carbohidratos, ya que de acuerdo con el tipo de LDH presente en un tejido, habrá acumulación o consumo del ácido pirúvico. Gracias a los estudios de Plagemann y cols.<sup>11</sup> y Kaplan y cols.<sup>12</sup> sobre la cinética de las isoenzimas de la deshidrogenasa láctica, se encontró que la LDH<sub>1</sub> es inhibida por concentraciones de sustrato (piruvato) que no afectan notablemente la actividad de la LDH<sub>5</sub>; se piensa por ello que la LDH<sub>1</sub> no permite una abundante producción de lactato, sino que favorece la completa oxidación de la glucosa al inducir la utilización

del piruvato acumulado por la vía del ciclo de Krebs; por tanto, estas diferencias cinéticas entre la LDH<sub>1</sub> y la LDH<sub>5</sub> tienen gran importancia fisiológica.

La cantidad relativa de las diferentes isoenzimas en los tejidos celulares está de acuerdo con los requerimientos metabólicos de cada uno. Por ejemplo, en tejidos con requerimiento energético elevado y permanente que cuentan además con aporte suficiente de oxígeno, como los tejidos cardíaco, cerebral, etc., resulta ventajoso un predominio de la actividad de la LDH<sub>1</sub>.<sup>12</sup> Por el contrario, los tejidos que requieren en forma repentina gran cantidad de energía, como es el caso de los músculos esqueléticos que no presentan un suministro abundante de oxígeno, tienen mayor proporción de LDH<sub>5</sub>. Esta interesante relación entre la función del tejido y el patrón isoenzimático, fue presentado por Wilson y cols.<sup>13</sup> en un estudio del músculo pectoral de aves con distintos hábitos de vuelo.

Se ha propuesto que la inhibición de la LDH puede conducir a la inhibición selectiva del crecimiento de células cancerosas por interferencia del metabolismo energético de éstas,<sup>10,14,16</sup> pues se han comprobado que las células de tejidos cancerosos presentan una actividad glicolítica incrementada.

Se ha demostrado que en tejidos cancerosos el nivel de la LDH se encuentra aumentado y las otras dos enzimas (DAPD y HBD) desaparecen o están en pequeñas cantidades.<sup>13</sup>

Por tanto, en la célula cancerosa la reoxidación del NADH + H<sup>+</sup> se logra exclusivamente mediante la actividad de la LDH. Esto muestra la importancia que tiene la LDH en las células de tejido canceroso, ya que es la única enzima que se encargaría del mecanismo de reoxidación del NADH + H<sup>+</sup> cofactor, indispensable para que la célula realice su metabolismo energético y pueda desarrollarse y reproducirse en forma adecuada.

De acuerdo con esto, se piensa que si en un tejido canceroso se logra inhibir selectivamente la LDH, no habría mecanismo de reoxidación del NADH + H<sup>+</sup>, lo cual lesionaría el metabolismo energético de las células (por su incapacidad para degradar glucosa) y traería como consecuencia una disminución del crecimiento de las células cancerosas.<sup>10,14,15</sup> Por tanto, teóri-

camente la inhibición de la LDH traería como consecuencia una inhibición del crecimiento de los tejidos cancerosos. Lograr esto requeriría de un compuesto capaz de inhibir a la LDH en forma selectiva, por lo que se han diseñado y sintetizado algunos inhibidores de la LDH como el ácido 4-yodoacetamido-salicílico y el ácido 3-yodoacetamido-oxanílico.<sup>20,22,23</sup>

Se considera que estos inhibidores primero se combinan con la enzima en su sitio activo debido a su similitud estructural con el sustrato normal y posteriormente se unen en forma irreversible por alquilación a un grupo -SH situado a 13 Å del sitio catiónico.<sup>16,17,18,21</sup> Otro ejemplo de este tipo de inhibidores irreversibles lo constituye la N-(4-carboxi-3-hidroxi-fenil) maleimida.<sup>19</sup> También en este caso se considera que el grupo maleimida reacciona con el grupo -SH situado a 13 Å del sitio catiónico donde se fija el carboxilato del sustrato o del inhibidor.<sup>19</sup>

Realizando estudios sobre inhibición enzimática, se sintetizó la N-(3-carboxi-4-hidroxi-fenil) maleimida, compuesto que logró inhibir *in vitro* la LDH de manera efectiva.<sup>24</sup>

Como los resultados obtenidos *in vitro* no pueden extrapolarse a lo que sucederá *in vivo*, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar el posible efecto inhibitor de este compuesto sobre la actividad y los patrones isoenzimáticos de la LDH *in vivo*, pues en caso de presentarse una inhibición de la LDH<sub>5</sub> el compuesto tendría una posible aplicación en la quimioterapia del cáncer. En caso de observarse también una inhibición de la LDH<sub>λ</sub>, el compuesto tendría un posible empleo en estudios sobre fertilidad y el control de la misma.

## MATERIAL Y METODOS

**Tratamiento de los animales.** Se distribuyeron los ratones machos de la cepa Cf<sub>1</sub> de la ENCB (de tres a cuatro semanas de edad) de la siguiente manera: cuatro lotes con cinco ratones cada uno, que constituyeron los lotes problema y un lote testigo también con cinco ratones.

A cada uno de los lotes problema se les administró una dosis diferente del compuesto por estudiar en la forma siguiente: lote 0, sin tratamiento; lote 1, dosis = 25 mg/kg; lote 2,

dosis = 50 mg/kg; lote 3, dosis = 100 mg/kg; lote 4, dosis = 150 mg/kg.

El tratamiento se hizo inyectando por vía intraperitoneal solución acuosa de N-(3-carboxi-4-hidroxi-fenil) maleimida diariamente durante quince días.

Al terminar el tratamiento todos los ratones fueron sacrificados, estrayéndoles tejidos y órganos (corazón, hígado, músculo esquelético y testículos) para observar en ellos los cambios que presentaban los diferentes patrones isoenzimáticos de la LDH.

**Homogeneizados.** Inmediatamente después de matar a los ratones se extraen los órganos y tejidos colocándolos en solución reguladora a 4 grados centígrados. Se determina el peso del tejido y se homogeneiza durante cinco minutos en un homogeneizador *Potter-Elvehjem* empleando regulador de fosfatos 0.05 M, pH = 7.4, en proporción de 125 mg/ml, utilizando un baño de hielo. En seguida se centrifuga a 15 000 rpm durante quince minutos a una temperatura entre cero y cuatro grados centígrados, empleando la centrífuga *Sorvall RC2-B*.

**Determinación de la actividad enzimática.**<sup>26</sup> En una celda de un centímetro se colocan 2.75 ml de solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH = 7.4, 0.05 ml de NADH (5 mg de NADH en 0.75 ml de la solución reguladora de fosfatos) y 0.1 ml de piruvato de sodio 0.031 M. Se agita y se agrega 0.01 ml de la enzima (homogeneizado) diluida aproximadamente con el mismo regulador, de modo que el cambio de densidad óptica por minuto a 340 nm, no sea menor de 0.030 ni mayor de 0.080. Se sigue el curso de la reacción durante cinco minutos haciendo lecturas cada minuto; el promedio de las diferencias de estas lecturas nos dará el cambio de densidad óptica por minuto.

La actividad se da en unidades Wroblewski. Una unidad de éstas se define como la cantidad de LDH capaz de producir un cambio en la densidad óptica de 0.001 en un minuto a 340 nm en 3 ml de mezcla y en una celda de un cm de paso de luz.

**Determinación de proteína.**<sup>27</sup> En un tubo de ensayo se coloca un ml de extracto proteico y se agregan cuatro ml de reactivo de biuret, se agita y se deja reposar a temperatura ambiente durante treinta minutos. Pasado ese tiempo se

determina la densidad óptica a 550 nm. Para saber la cantidad de proteína que contiene un extracto, se interpola la densidad óptica obtenida en una curva tipo de proteína, hecha previamente con diferentes concentraciones de albúmina bovina.

*Electroforesis en tiras de acetato de celulosa.* Para llevar a cabo la electroforesis, primero se sumergen las tiras de acetato de celulosa, por lo menos durante treinta minutos, en solución de albúmina al 1% (un gramo de albúmina en 100 ml de solución reguladora de barbital-barbiturato 0.1 M, pH = 8.6). Se llena la cámara de electroforesis con 750 ml de solución reguladora barbital-barbiturato pH = 8.6 a 5°C. Se coloca la tira de acetato de celulosa sobre un papel filtro grueso húmedo y en seguida, con un aplicador Gelman, se aplican de 10 a 20 unidades Wroblewski de LDH a 5 cm de uno de los extremos de la tira; se colocan éstas en la cámara de electroforesis y se corren. Se utiliza un voltaje de 48 volts por tira durante 90 minutos. Pasado este tiempo las tiras se retiran de la cámara para revelarse. El revelado debe hacerse en la oscuridad y lo más rápidamente posible.

#### *Solución reveladora:*

- a) 0.25 ml de lactato de sodio al 40%
- b) 2 mg de metasulfato de fenacina (al momento de su uso se le agregan 10 ml de agua).
- c) 7.5 mg de NAD<sup>+</sup> + 16 mg de nitro-violeta de tetrazolio.

Se disuelven primero los reactivos del inciso c) en 7.5 ml de agua; una vez disueltos lo mejor posible se agrega el lactato (A) y se agita un poco más. Por separado se disuelve el reactivo del inciso b) y rápidamente se agregan 0.75 ml del mismo a la solución anterior.

Se coloca la solución reveladora en una caja de Petri, donde se humedece una tira de acetato de celulosa (tira reveladora) la cual se coloca sobre la tira que contiene la muestra, eliminando las burbujas de aire que pudieran formarse entre las dos tiras. Las tiras se colocan en una cámara húmeda y se incuban a 37°C en la oscuridad durante diez minutos para después fijar las bandas con una solución de ácido acético al 5% durante cinco minutos. Pasado este tiempo

se lavan las tiras con agua destilada hasta que el olor del ácido acético desaparezca, se dejan secar durante doce horas colocándolas entre papel filtro a presión.

Posteriormente se hace la cuantificación de los electroforegramas, empleando para ello un densitómetro.

#### RESULTADOS

En el estudio realizado con objeto de ver si la N-(3-carboxi-4-hidroxi-fenil) maleimida presentaba un efecto inhibitor sobre la LDH *in vivo*, se determinó la actividad específica de dicha enzima previo tratamiento y sacrificio de los animales; los resultados se presentan en la tabla 1 y figura 1. En la tabla 2 se muestra el efecto del inhibidor sobre las isoenzimas de la LDH en los diferentes tejidos estudiados. En la figura 2 se hace un estudio comparativo del inhibidor sobre las diferentes isoenzimas de corazón.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con objeto de ver si la N-(3-carboxi-4-hidroxi-fenil) maleimida inhibe a la LDH *in vivo*, se trataron diariamente 4 lotes de ratones con diferentes dosis de esta sustancia durante 15 días; al final del tratamiento se sacrificaron los animales y se les determinó la actividad específica de la LDH en diferentes tejidos. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 1. Puede observarse que el compuesto probado sí inhibe a la LDH *in vivo* en los diferentes tejidos estudiados y además existe una correlación dosis-respuesta, pues a medida que aumenta la dosis se observa mayor efecto inhibitor.

Se puede ver también que el compuesto tiene mayor efecto sobre la actividad total de la LDH de corazón y de testículo, lo cual puede observarse mejor en la figura 1. En esta gráfica podemos ver que la inhibición máxima se obtuvo en corazón y testículo, que hubo una inhibición intermedia en músculo y la mínima inhibición fue obtenida en hígado. Se observa mayor inhibición en corazón y testículo debido a que

**TABLA 1.**

EFFECTO DEL INHIBIDOR SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LACTICA EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATON

Lote	Núm. de animales	Tratamiento con inhibidor. (mg/kg)	ACTIVIDAD (LDH)							
			CORAZON		HIGADO		MUSCULO		TESTICULO	
			actividad especifica	% de actividad						
0	5		437	100	1944	100	7889	100	577	100
1	5	25	391	89.5	1709	87.9	5280	70	531	92.1
2	5	50	168	38.4	1466	75.4	5175	65.6	347	60.1
3	5	100	112	25.6	1446	75.3	4120	52.2	205	35.3
4	5	150	82	18.8	1410	72.5	3578	45.4	108	18.7

**TABLA 2.**

EFFECTO DEL INHIBIDOR SOBRE LAS ISOENZIMAS DE LA LDH DE DIFERENTES TEJIDOS

LOTE	DOSIS mg/kg	TEJIDOS ESTUDIADOS											HIGADO	MUSCULO
		CORAZON					TESTICULO							
		LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>	LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>	LDH <sub>x</sub>		
0	—	20 (20)	25.64 (25.6)	24.61 (24.6)	14.35 (14.3)	15.38 (15.3)	9.94 (9.94)	8.37 (8.37)	6.80 (6.80)	14.13 (14.1)	16.75 (16.7)	43.97 (43.9)	100 (100)	100 (100)
2	50	18.3 (7.02)	21.6 (8.29)	22.2 (8.52)	19.4 (7.44)	18.3 (7.02)			2.56 (1.53)	14.1 (8.47)	29.6 (17.7)	56.4 (33.8)	100 (75.4)	100 (65.6)
4	150	20.58 (3.07)	21.50 (4.04)	21.56 (4.05)	17.15 (3.22)	19.11 (3.59)			2.5 (0.46)	8.9 (1.66)	10.1 (1.88)	78.0 (14.5)	100 (72.5)	100 (45.4)

NOTA: Los números sin paréntesis representan la actividad relativa en %.  
Los números entre paréntesis representan la actividad real (especifica).

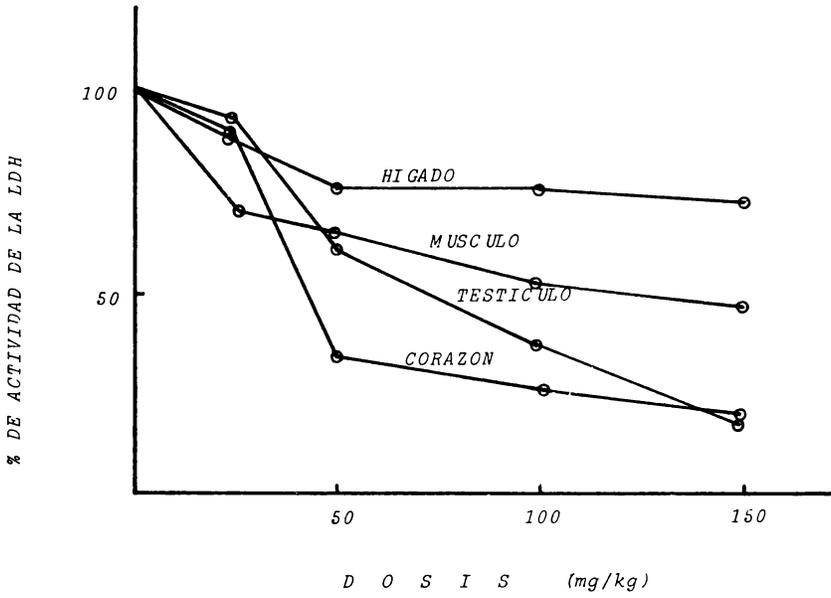


Fig. 1. Efecto del inhibidor sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica en diferentes tejidos de ratón.

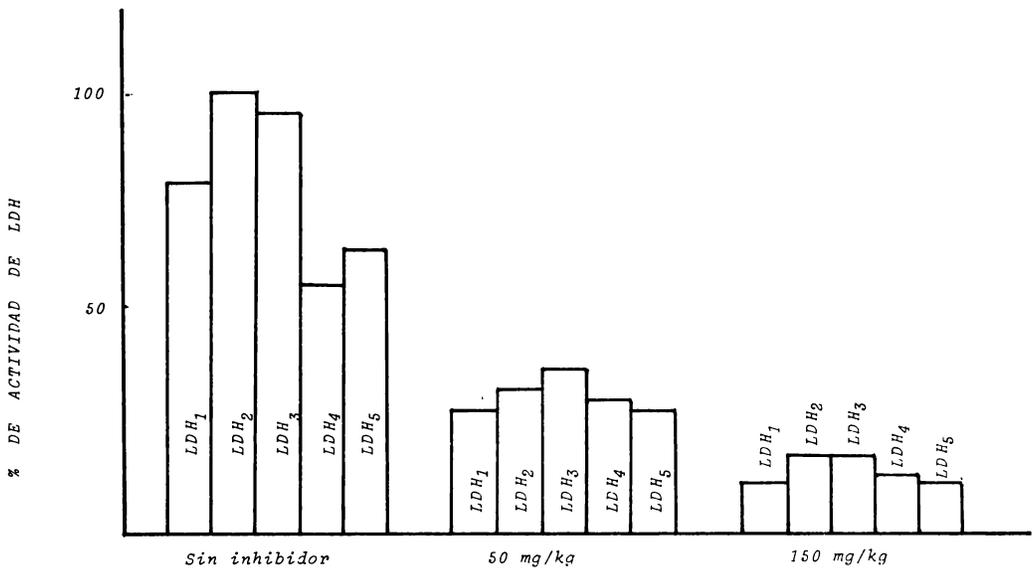


Fig. 2. Efecto del inhibidor sobre las diferentes isoenzimas de la LDH de corazón de ratón.

la actividad total de la LDH en estos tejidos es mucho menor que en hígado y músculo.

Con respecto a la inhibición observada en hígado y músculo donde es más abundante la LDH, se esperaría mayor inhibición en hígado que en músculo, pues tiene menor actividad total de LDH; pero como el hígado es el órgano donde la mayoría de los fármacos se metabolizan, es probable que en dicho órgano la concentración de inhibidor sea mucho menor.

Durante el tratamiento de los animales se hizo también un control de peso corporal y pudo observarse que hay disminución en el peso de los ratones tratados comparado con el de los ratones testigo, la reducción es muy pequeña con las tres primeras dosis y sólo con la dosis más alta se detectó mayor disminución de peso durante el tratamiento. Se observó que no existe correlación entre baja de peso y aumento de dosis, lo cual excluye la posibilidad de que la inhibición de la LDH pudiera deberse a la disminución de peso corporal.

Se hizo también un control de consumo de alimento durante el tratamiento y se observó que las bajas en el peso corporal en los tres primeros lotes tratados, pueden ser atribuidas a la disminución en el consumo de alimento en estos lotes. Con dosis más alta se observó la disminución más importante en el consumo de alimento, lo cual explica por qué el lote tratado con dosis de 150 mg/kg fue el que disminuyó más de peso.

Para saber si la inhibición fue selectiva sobre alguna de las isoenzimas de la LDH, se cuantificaron éstas después de la electroforesis y los resultados aparecen en la tabla 2.

De los tejidos estudiados el que se presta mejor para el estudio del efecto del inhibidor sobre las isoenzimas de la LDH es el corazón, puesto que hígado y músculo presentan una sola isoenzima y en testículo también hay predominancia de una de ellas ( $LDH_X$ ), lo cual dificulta ver el efecto real sobre las isoenzimas pues como puede verse en la tabla 2, aparentemente desaparecen las isoenzimas 1 y 2 en testículo por efecto del inhibidor; esto es debido a que la  $LDH_X$  se encuentra en tan alta proporción en los extractos enzimáticos de testículo,

que tuvo que ponerse una cantidad muy pequeña de dichos extractos al hacer la electroforesis para que pudiera obtenerse una banda correspondiente a dicha isoenzima que pudiera cuantificarse, lo cual disminuyó la concentración de las otras isoenzimas.

En la figura 2 se puede apreciar mejor el efecto del inhibidor sobre las isoenzimas de la LDH en corazón de ratón. Puede observarse que el inhibidor no presenta selectividad por alguna de las isoenzimas, ya que todas son inhibidas más o menos en la misma proporción; por tanto, este inhibidor podría encontrar aplicación en estudios en los que se trate de inhibir la actividad total de LDH o como inhibidor de cualquiera de las isoenzimas de la LDH en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

## RESUMEN

En trabajos anteriores se demostró que *in vitro* la N-(3-carboxi-4-hidroxi-fenil) maleimida es un buen inhibidor de las isoenzimas de la LDH.<sup>24</sup> En el presente trabajo se estudió el efecto de dicha sustancia sobre la actividad específica de la LDH en diferentes tejidos de ratón, encontrándose que esa sustancia *in vivo* también inhibe a esta enzima. Se observa que hay mayor inhibición en la LDH de corazón y de testículo y menor en la de hígado, en tanto que en músculo se encontró una inhibición intermedia. Aun a dosis de 25 mg del compuesto/kg de peso se obtuvo inhibición, observándose que a mayor dosis mayor efecto inhibidor; la mayor dosis estudiada fue de 150 mg/kg.

Se estudió también el efecto de este inhibidor sobre las isoenzimas de la LDH, encontrándose que no existe selectividad del inhibidor por alguna de las isoenzimas, pues todas son inhibidas más o menos en la misma proporción.

El estudio de peso corporal y del consumo de alimento durante el tratamiento parece indicar que las variaciones de peso observadas se deben a la disminución en el consumo de alimento, no observándose correlación alguna entre la disminución de peso y la disminución en la actividad enzimática.

## SUMMARY

Previous works have shown *in vitro* that N-(3-carboxi-4-hidroxiphenil) maleimide is an effective inhibitor of the LDH enzymes. In this work the effect of such substance on the specific activity of LDH on different tissues of the mouse was studied; it was found that this substance, *in vivo* also inhibits this enzyme, greater inhibition is observed on heart and testicle LDH than of the liver; whereas in the muscle it is intermediate. Even at a dosis of 25 mg. of the compound per kg of weight, an inhibition was obtained, and the greater the dose the greater the inhibition; the highest dose studied was 150/kg.

It was found also that this inhibitory effect has no selectivity for any of the isoenzymes, since all are inhibited more or less in the same proportion.

Body weight and food consumption studies during tratment seems to indicate that variations in weight are due to decrease in food consumption; correlation between diminution in weight and that of the enzymatic activity was not observed.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Straub, F.B.:** "Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle". *Biochem. J.* **34**: 483. 1940.
2. **Pesce, A., R.H. McKay, F. Stulzenbach, R.D. Cahn y N.O. Kaplan:** "The comparative enzymology of lactic dehydrogenases". *J. Biol. Chem.* **239**, 1753. 1964.
3. **Markert, C.L. y F. Moller:** "Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns". *Proc. Nat. Acad. Sci.* **45**, 753. 1959.
4. **Apella, E. y C.L. Markert:** "Dissotiation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**. 171. 1961.
5. **Plagemann, P.G.W., K.F. Gregory y F. Wroblewski:** "The electrophoretically distinct forms of mamalian lactic dehydrogenase. I. Distribution of lactic dehydrogenases in rabbit and human tissues". *J. Biol. Chem.*, **235**, 2282. 1960.
6. **Markert, C.L.:** "Lactate dehydrogenase isozymes: dissociation and recombination of subunits". *Science*, **140**, 1329. 1963.
7. **Cahn, R.D., N.O. Kaplan, L. Lavine y E. Zwiling:** "Nature and development of lactate dehydrogenases". *Science*, **136**, 962. 1962.
8. **Blanco, A. y W.H. Zinham:** "Lactate dehydrogenases in human testes". *Science*, **139**, 602. 1963.
9. **Wong, C., Yáñez, R., D.N. Brown, A. Dickey, M.E. Parks y R.W. McKee:** "Isolation and properties of lactate dehydrogenase isozyme X from Swiss mice". *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 454. 1971.
10. **Boxer, G.C. y T.M. Deblin:** "Pathways of intracellular hydrogen transport". *Science*, **134**, 1495-1501. 1961.
11. **Plagemann, P.G., K.F. Gregory y F. Wroblewski:** The electrophoretically distinct form of mamalian lactic de hydrogenase. II. Properties and interrelationships of rabbits and human lactic dehydrogenase isozymes". *J. Biol. Chem.*, **235**, 228. 1960.
12. **Kaplan, N.O. y T.L. Goodfiend:** "Role of the two types of lactic dehydrogenase". In *Advances in Enzyme Regulation*. McMillan Co. Nueva York, Vol. 2., 203. 1961.
13. **Wilson, A.C., R.D. Cahn y N.O. Kaplan:** "Functions of the two forms of lactic dehydrogenase in the breast muscle of bird". *Nature*, **197**, 331. 1963.
14. **Bush, H. y P.V. Nair.** "Inhibition of lactic dehydrogenase by fluoropiruvic acid". *J. Biol. Chem.*, **229**, 377. 1957.
15. **Papaconstantinou, J. y S.P. Colowick:** "The effect of lysis in the growth of tumor cells. II. The effect of oxamic acid on growth of hela cells in tissue culture". *J. Biol. Chem.*, **236**, 285. 1961.
16. **Baker, B.R.:** "Non-classical antimetabolites. XI. The bridge principle of specificity with exo-alkilating irreversible inhibitors. IV. Highly selective inhibition of the substrate identical enzyme from two different tissues". *Bioche. Pharmacol.*, **12**, 293. 1963.
17. **Baker, B.R.:** "Factors in the design of active-site directed irreversible inhibitors". *J. Pharm. Sci.* **53**, 347. 1964.
18. **Baker, B.R.:** *Design of active site directed irreversible enzyme inhibitors*. John While and Sons. Inc. Nueva York. 1967.
19. **Carvajal, G.:** "Diseño, síntesis y estudio del efecto antitumoral de un inhibidor de la deshidrogenasa láctica". Tesis Doctoral, ENCB, IPN. 1965.
20. **Baker, B.R., W.W. Lee, E. Tong, L.O. Rosa y A.P. Martínez:** "Non-classical antimetabolites. V. Further factors in the design of exo-alkylating enzyme inhibitors, particulary of lactic dehydrogenase". *J. Theoret. Biol.* **3**, 446. 1962.
21. **Danielli, J.F.:** "Enzymes and drugs action". Ciba Foundation Symposium. J.L. Mongar y D.V.S. Rauck, Eds. J. de A. Churchill. Ltd. **404**, 1962.
22. **Baker, B.R., W.W.E. Tong y I.O. Ross:** "Potential anticancer agents. LXXVIII. Non-classical antimetabolites. III. 4-(iodoacetamido)-salicylic acid, and exo-alkylating irreversible inhibitor of glutamic dehydrogenase". *J. Am. Chem.* **83**, 13, 37, 371. 1961.
23. **Baker, B.R. y W.W.E. Tong:** "Non-classical antimetabolites. IV. 4-(iodoacetamido)-salicylic acid, and exo-alkalating irreversible inhibitor". *J. Theoret. Biol.* **3**, 459-483. 1963.

24. **López, G.G.:** “:Síntesis y estudio de la N-(3-carboxi-4-hidroxi-fenil) maleimida como inhibidor de la deshidrogenasa láctica”. Tesis profesional. ENCB, IPN. 1974.
25. **Blanco, A.:** Tesis doctoral. Universidad John Hopkins, Baltimore, EE. UU. 1965.
26. **Bergmeyer, U.H.:** *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press. Nueva York. Londres., 736, 743. 1965.