

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ISOENZIMAS DE L-LACTATO: NAD⁺ OXIDOREDUCTASA (LDH; EC. 1.1.1.27) DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ COMBATIENTE SIAMES *BETTA SPLENDENS* (REGAN, 1909)

por

Ronald Maestre-Serrano & Ernesto Pachón-Muñoz*

Resumen

Maestre-Serrano, R. & E. Pachón-Muñoz: Actividad enzimática de isoenzimas de L-lactato: NAD⁺ oxidoreductasa (LDH; EC. 1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario del pez combatiente siames *Betta splendens* (Regan, 1909). Rev. Acad. Colomb. Cienc. **30** (116): 459-464. 2006. ISSN 0370-3908.

Se determinó la actividad enzimática de las isoenzimas de L-lactato: NAD⁺ oxido-reductasa (LDH; EC. 1.1.1.27), en cada una de las etapas del desarrollo embrionario de la especie *Betta splendens*. Se tomaron 200 huevos en cada estado de desarrollo embrionario (oocito fertilizado, clivajes, blástulas, gástrula y neurula), obtenidos a partir de cuatro parejas de peces sexualmente maduras, además de oocitos sin fertilizar, recolectados a partir de dos hembras. Las muestras de 200 embriones y 200 huevos sin fertilizar se homogeneizaron y centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 rpm. A partir de los sobrenadantes, se corrieron las electroforesis en gel de agarosa y se midió la actividad total de LDH por métodos espectrofotométricos. Los electroforegramas, se cuantificaron en un densitómetro a 540 nm para calcular la concentración aproximada de cada banda y posteriormente determinar la actividad específica de las isoenzimas de LDH. Durante el periodo estudiado, LDH-3 y LDH-4 se caracterizaron por presentar la mayor actividad enzimática. LDH-2, se caracterizó por expresarse durante los estadios de gástrula y neurula y presentar la menor actividad.

Palabras clave: Actividad enzimática, *Betta splendens*, isoenzima, lactato deshidrogenasa.

* Unidad de Genética y Biología del Desarrollo, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª N° 43-82. Laboratorio 240, Bogotá-Colombia. Correo electrónico: rmaestre22@yahoo.com

Abstract

The enzymatic activity of L-lactate: NAD⁺ oxide-reductase (LDH; EC. 1.1.1.27) isoenzymes in each of the embryonic development stages of *Betta splendens* was determined. Were taken 200 eggs in each embryonic stage (fertilized oocyte, cleavage, blastula, gastrula and neurula) from four sexually mature fish additionally, unfertilized oocytes were collected from two other females. Each sample (200 embryos or 200 unfertilized eggs) was homogenized and spun 15 minutes at 10000 rpm. The flotant was run by electrophoresis in agarose gels and total LDH activity was measured spectrophotometrically. The electrophoregrams were spun at 540 nm in a densitometer to calculate the LDH isoenzyme specific activity. During the embryonic period, LDH-3 and LDH-4 were characterized by presenting the most enzymatic activity. LDH-2 was expressed in all stages of gastrula and neurula stages but showed less activity.

Key words: Enzymatic activity, *Betta splendens*, isoenzyme, lactate dehydrogenase.

Introducción

Los órganos, tejidos y compartimentos celulares de los diversos organismos pueden contener diferentes formas moleculares de una enzima que catalizan la misma reacción bioquímica. Estas múltiples formas moleculares se denominan isoenzimas, las cuales, están codificadas por genes diferentes y poseen propiedades físicas, químicas y cinéticas específicas que facilitan su caracterización (Dallos *et al.*, 1994; Porras, 1996).

La expresión particular de las isoenzimas en etapas específicas del desarrollo, reflejan los cambios bioquímicos y metabólicos que se llevan a cabo durante el proceso de embriogénesis. Además, la medición de su actividad enzimática permite correlacionar los cambios bioquímicos, con los estados de diferenciación morfológica propios de la embriogénesis y organogénesis (Frankel, 1980; Frankel & Wilson, 1984). La expresión, concentración y actividad enzimática de estas isoenzimas, cambia en forma programada durante el curso de la ontogenia en los distintos organismos, aspecto aún no determinado en la especie *Betta splendens*. Por tal motivo, se considera importante identificar cuándo aparecen las isoenzimas, cuáles son sus concentraciones y actividad enzimática, en los diferentes estados del desarrollo embrionario temprano de la mencionada especie, para ampliar su conocimiento en el área bioquímica y taxonómica.

La enzima lactato deshidrogenasa (L-Lactato: NAD⁺ oxido-reductasa, LDH; EC. 1.1.1.27), actúa al final de la glicólisis (ruta metabólica inicial del catabolismo de los monosacáridos), específicamente en la conversión de lactato a piruvato de forma reversible, con la presencia de NAD⁺ como molécula aceptor de hidrógenos.

Esta, fue la primera enzima en la cual se caracterizaron las isoenzimas (Markert & Moller, 1959; Basaglia, 1989). La LDH, es una proteína tetramérica que en la mayoría de los vertebrados se encuentra codificada por dos

loci que expresan dos tipos de subunidades ó polipéptidos, bioquímicamente diferentes. El locus Ldh-A, expresa la subunidad M, mientras que el locus Ldh-B expresa la subunidad H. Dichos polipéptidos se combinan de manera aleatoria, para generar cinco isoenzimas con la siguiente composición: H4 (LDH1), H3M (LDH2), H2M2 (LDH3), HM3 (LDH4) y M4 (LDH5) (Frankel, 1980; Frankel, 1985; Quattro *et al.*, 1993; Tsuji *et al.*, 1994; Brzuzan, 1995; Yoshikuni *et al.*, 2001).

El presente trabajo, es el segundo de una serie de investigaciones acerca de la expresión y actividad enzimática de isoenzimas de LDH, en el desarrollo embrionario y tejidos adultos de *Betta splendens*, y se encuentra incluido dentro de la línea de investigación isoenzimas en desarrollo embrionario, de la Unidad de Genética y Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana; es el primero en Colombia en el que se utilizan peces como modelo biológico y su propósito es determinar la actividad enzimática de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa por métodos espectrofotométricos, obtenidas en cada una de las etapas del desarrollo embrionario temprano.

Materiales y métodos

A partir de cuatro parejas de peces y dos hembras sexualmente maduras de *Betta splendens*, obtenidas del laboratorio de embriología de peces de la Pontificia Universidad Javeriana, donde se encontraban adaptadas a condiciones de laboratorio; se tomaron 200 huevos en cada estado de desarrollo, desde oocito fertilizado hasta neurula; además, de oocito sin fertilizar. Dichos huevos y embriones, se mantuvieron separados según la pareja de origen. Se definió como fuente de variación, cada uno de los estados de desarrollo embrionario y oocito sin fertilizar (seis en total) y se realizaron 3 repeticiones por fuente de variación.

Determinación de los estados de desarrollo embrionario

Guevara (1997), elaboró la tabla de desarrollo para *Betta splendens*. Esta se aplicó, para tomar los tiempos de desarrollo y para separar los embriones en cada etapa de desarrollo.

Procesamiento de las muestras

Se homogeneizaron 200 embriones en cada estado de desarrollo embrionario. Este homogeneizado, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm durante 5 minutos. Lo anterior, se realizó para eliminar la capa de lípidos ubicada en la parte superior del sobrenadante, debido a la gran cantidad de vitelo que se encuentra en los oocitos de la mayoría de peces teleósteos. Los sobrenadantes obtenidos, para huevos no fertilizados y etapas tempranas del desarrollo, se congelaron a -20°C , hasta la realización de las electroforesis y medición de la actividad enzimática total.

Electroforesis

Las isoenzimas de LDH, se separaron por electroforesis en una cámara modelo TITAN GEL CHAMBER, marca Helena laboratory; una fuente de poder modelo POWER STATION 300 PLUS, marca LABNET y utilizando un juego de reactivos TITAN GEL Isoenzyme (catálogo No 3043, helena laboratory). Se utilizó gel de agarosa tamponado a pH 8.3. Las electroforesis se corrieron a 100 voltios, 17 amperios, durante 15 minutos; una vez finalizadas, se incubaron los geles con un sustrato específico para la enzima durante 25 minutos a 45°C en cámara húmeda.

Concentración de isoenzimas de LDH

Los electroforegramas se cuantificaron en un densitómetro marca Zeineh a 540 nm, con el fin de calcular la concentración para cada banda.

Actividad enzimática de LDH

Control normal y elevado de actividad total de LDH

Para obtener datos confiables de la técnica de actividad total de LDH en cada una de las muestras, se usó un juego de reactivos normal y elevado (para humanos); se trata de sueros control liofilizados, estables con concentraciones/actividades de los distintos componentes de suero tanto para valores normales como elevados (Bayer, catálogo N° 6656).

Medición de actividad enzimática total de LDH, en etapas tempranas del desarrollo embrionario de *Betta splendens*.

La actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro marca Compur 2000, donde se siguió la desaparición de NADH a 340 nm. Se realizaron tres lecturas cada 60 segundos a 37°C (Bayer, catálogo BO1-4632-1).

Determinación de la actividad enzimática para cada banda de LDH

Con los datos de actividad enzimática total y concentración para cada una de las bandas de isoenzimas, se calculó la actividad enzimática de las isoenzimas de LDH, como porcentaje de la actividad enzimática total.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó un ANOVA de un factor (Diseño completamente al azar), para analizar si hay diferencias significativas en la actividad de las isoenzimas en cada etapa del desarrollo embrionario temprano. Los ANOVA, se complementaron con una prueba Duncan y por último, se aplicó una prueba t para analizar las diferencias en actividad de las isoenzimas entre parejas de estadios. En todos los casos, el nivel de significancia se estableció en 0.05. Los datos se procesaron con ayuda del paquete estadístico SPSS.

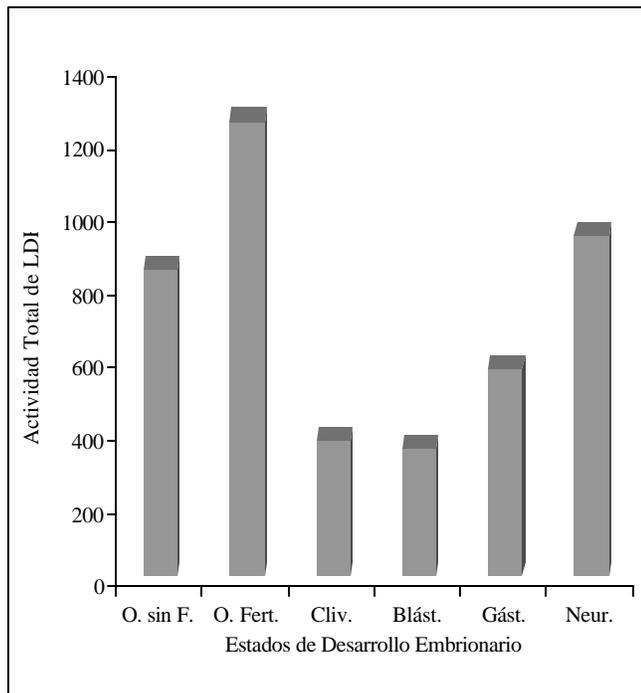
Resultados

La tabla 1, muestra un resumen acerca de el número de bandas, isoenzima correspondiente a cada banda y su concentración promedio, en cada etapa del desarrollo embrionario temprano. Los datos de actividad total de LDH de suero control normal y elevado (para humanos), se ubicaron dentro del rango en cada repetición; por lo tanto, se consideran confiables los datos de actividad total de LDH en cada estadio del desarrollo embrionario estudiado. En las figuras 1 y 2, se observa el comportamiento de la actividad total y específica de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa expresadas durante el desarrollo.

El análisis de varianza para la actividad enzimática de la isoenzima LDH-3, muestra que hay diferencias significativas ($p = 8,32\text{E}-13$; $gl = 5$; $n = 5$); específicamente para los estadios de oocito sin fertilizar, oocito fertilizado, gástrula y neurula. Del mismo modo el análisis de varianza para la actividad de la isoenzima LDH-4, muestra que hay diferencias significativas ($p = 1,62\text{E}-12$; $gl = 5$; $n = 5$); específicamente para los estadios de oocito sin fertilizar, oocito fertilizado y neurula. La prueba t, realizada para la isoenzima LDH-2, muestra que hay diferencias significa-

Tabla 1. Isoenzimas y su concentración promedio en cada etapa del desarrollo embrionario temprano de *Betta splendens*.

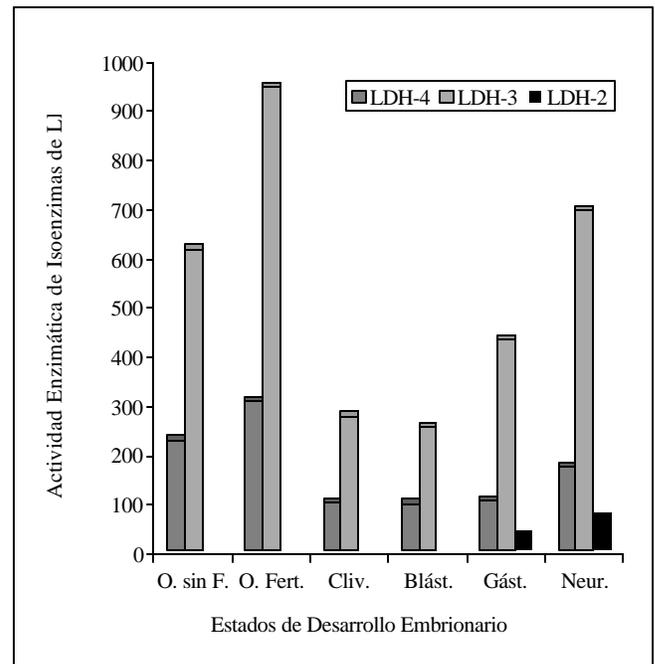
Estadio de desarrollo	Número de bandas	Isoenzimas	Concentración bandas (%)
Oocito sin fertilizar	2	LDH4	26,9
		LDH3	73,1
Oocito fertilizado	2	LDH4	24,4
		LDH3	75,6
Clivajes	2	LDH4	26,1
		LDH3	73,9
Blástulas	2	LDH4	27,7
		LDH3	72,3
Gástrula	3	LDH4	18
		LDH3	76
		LDH2	6
Neurula	3	LDH4	18,3
		LDH3	74,2
		LDH2	7,5

**Figura 1.** Actividad total de LDH, en cada etapa del desarrollo embrionario temprano de *Betta splendens*.

tivas ($t = 5.22$; $gl = 4$; $n = 3$; $p = 0.006$) entre los estadios de gástrula y neurula.

Discusión

Según los resultados, la enzima lactato deshidrogenasa se encuentra metabólicamente activa y sufre importantes cambios en su actividad durante el desarrollo embriona-

**Figura 2.** Actividad específica para cada una de las isoenzimas de LDH expresadas en las etapas del desarrollo embrionario temprano de *Betta splendens*.

rio temprano como se puede comprobar al analizar la figura 1, donde se aprecian tres patrones básicos en la actividad total de LDH: Incremento en la actividad enzimática de LDH entre oocito sin fertilizar y oocito fertilizado. Disminución y relativa uniformidad, en la actividad enzimática de LDH durante los estadios de clivajes y blástula. Incremento en la actividad enzimática de LDH durante los estadios de gástrula y neurula.

Según **Boulekbache** (1981), la glicólisis y el ciclo del ácido tricarbónico son las rutas metabólicas generadoras de ATP y sustratos intermedios, requeridos para la biosíntesis y mantenimiento de la morfología embrionaria durante las primeras etapas del desarrollo. Esta idea soporta, la explicación biológica de los patrones obtenidos en la enzima LDH. Estos patrones, en la actividad total de LDH concuerdan con el estudio realizado por **Boulekbache** (1981), sobre la ontogenia de enzimas glicolíticas incluida la LDH en embriones de trucha, antes de la fertilización y durante los primeros estados del desarrollo (clivajes, blástula, gástrula, neurula y organogénesis temprana).

El comportamiento de la actividad total de LDH entre oocito sin fertilizar y oocito fertilizado, probablemente se debe a que durante la ovogénesis, los oocitos sintetizan y acumulan en su citoplasma macromoléculas como RNAm, enzimas activas e inactivas, entre otras, que posteriormente le van a permitir obtener la energía suficiente para ser fertilizados y llevar a cabo diversas actividades biosintéticas esenciales durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (clivaje y blástula) (**Gueimundi**, 1989; **Gilbert**, 1997). El descenso notorio en la actividad total de LDH, observado en el segundo patrón se explica, dado que después de la fertilización, la demanda energética del embrión se incrementa ya que sufre intensas y rápidas divisiones celulares (clivajes y blástula) que no le permiten la síntesis de nuevas macromoléculas, sino que por el contrario se consumen las sintetizadas y acumuladas durante la ovogénesis (**Boulekbache**, 1981). Es importante aclarar que durante los estadios de clivaje, la enzima se distribuye al azar; mientras que en la etapa de blástula se inicia la formación de zonas presuntivas para las capas germinativas de ectodermo y endodermo. Aquí el embrión inicia una mayor diferenciación, lo que conlleva a que las isoenzimas de LDH ya no se distribuyan al azar, sino que lo haga de acuerdo con las características metabólicas propias de las células que conforman cada zona presuntiva.

El incremento en la actividad total de LDH durante las etapas de gástrula y neurula, posiblemente se debe a que en estas etapas del desarrollo, se llevan a cabo movimientos celulares (epibolía, invaginación, involución) para generar los primordios de los futuros tejidos, entre otros procesos biológicos que requieren grandes cantidades de energía en moléculas como ATP (**Gueimundi**, 1989; **Gilbert**, 1997).

En la etapa de gástrula, por medio de los movimientos de epibolía e involución principalmente, se forman propiamente las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo), que originarán los diferentes tejidos y ór-

ganos en el adulto. Durante la etapa de neurula, unos de los procesos biológicos característicos es la inducción embrionaria que se lleva a cabo, cuando el cordomesodermo que originará la notocorda, induce al ectodermo para la formación de la placa neural y posteriormente el tubo neural, los cuales generan el sistema nervioso central en el organismo en desarrollo (**Gueimundi**, 1989; **Gilbert**, 1997; **Guevara**, 1997).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la actividad específica de isoenzimas de LDH, se puede decir que estas sufren importantes cambios en su actividad durante las etapas estudiadas (Figura 2). La isoenzima LDH-3, se caracterizó por presentar la mayor actividad enzimática, seguido de LDH-4 durante todo el periodo embrionario estudiado. Los estadios de gástrula y neurula, presentan el mismo patrón, aunque la isoenzima LDH-2 se ubica con la menor actividad enzimática (Figura 2).

Según **Boulekbache** (1981), durante la ovogénesis los oocitos de teleosteos acumulan glicógeno que va a ser fuente de glucosa para la glicólisis. Esta ruta metabólica genera energía para las divisiones celulares que se llevan a cabo durante las primeras etapas del desarrollo temprano (clivaje y blástula). Por lo tanto, es posible considerar que la isoenzima LDH-4 relativamente anaerobia, actúa en la glicólisis en la conversión de piruvato a lactato, con el fin de reciclar moléculas de NAD^+ y obtener nuevas moléculas de glucosa a partir del lactato producido. La isoenzima LDH-3 cuya composición de subunidades es de 2M y 2H, tiene el equilibrio de reacción desplazado hacia la conversión de piruvato a lactato para complementar la función de la isoenzima LDH-4, durante dichas etapas.

Boulekbache (1981), afirma que las etapas tardías (gástrula y neurula), se caracterizan por triplicar y quintuplicar el consumo de oxígeno; lo cual puede estar relacionado con la activación del ciclo de Krebs, ya que la energía generada por la glicólisis no es suficiente y requiere el aporte energético de esta ruta metabólica. Durante dicho periodo, se inicia aunque con poca actividad la expresión de la isoenzima LDH-2, relativamente aerobia ya que actúa en la glicólisis en la conversión de lactato a piruvato. Este último genera acetil coenzima A, sustrato del ciclo de Krebs. Durante gástrula y neurula la isoenzima LDH-3 probablemente, tiene el equilibrio de reacción desplazado hacia la conversión de lactato a piruvato, complementando la función de la isoenzima LDH-2.

De acuerdo con la estadística aplicada, las isoenzimas expresadas muestran diferencias significativas en su actividad; por lo tanto, se puede decir que la función que cumplen es importante en la generación de energía para que se lleven a cabo la fertilización y otros procesos biológicos

durante gástrula y neurula, como proliferación celular, diferenciación, morfogénesis, e inducción embrionaria.

Según Whitt (1981), el tiempo de aparición de las isoenzimas puede concordar con eventos morfogenéticos específicos. Lo anterior, se observó con la expresión de la isoenzima LDH-2 en los estadios de gástrula y neurula, que puede estar asociada con la diferenciación de mesodermo. Durante la etapa de gástrula, cuando se detectó por primera vez la isoenzima LDH-2, se produjo la diferenciación de esta capa germinativa. Aquí, dicha isoenzima mostró baja actividad y se incrementó moderadamente durante el estadio de neurula; lo que puede estar relacionado, con la especialización de la capa germinativa en mesodermo epimérico, mesodermo intermedio y mesodermo hipomérico característicos de la neurulación.

Conclusiones

La enzima lactato deshidrogenasa, se encuentra metabólicamente activa y sufre importantes cambios en su actividad total, durante el desarrollo embrionario temprano de *Betta splendens*. Las isoenzimas LDH-4, LDH-3 y LDH-2, sufren importantes cambios en su actividad, durante las diferentes etapas. La isoenzima LDH-3, se caracterizó por presentar la mayor actividad enzimática, seguida de la isoenzima LDH-4 durante todo el periodo. La isoenzima LDH-2 se expresó durante las etapas de gástrula y neurula, mostrando un constante aumento en su actividad enzimática; lo cual puede estar relacionado, con un posible incremento en los requerimientos energéticos para llevar a cabo la diferenciación y posterior especialización del mesodermo en estas etapas del desarrollo.

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos a las profesoras Irma Colmenares de Escamilla, Edilma Guevara y Lucía Jiménez, por el apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación. También agradecemos a las Doctoras Ofelia Díez y Martha Guerra, por su colaboración en el desarrollo de las técnicas utilizadas, así como a quienes realizaron aportes para llevar a feliz término esta investigación.

Bibliografía

- Basaglia, F.** 1989. Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B** (2): 213-226.
- Boulekbache, H.** 1981. Energy metabolism in fish development. *Amer. Zool.* **21**:377-389.

- Brzuzan, P.** 1995. Isoenzyme expression during early development of whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Ergebnisse der limnologie.* **46**: 33-37.
- Dallos, D., De Escamilla, I., Y Pachón, E.** 1994. Caracterización Molecular de Isoenzimas de Isocitrato NADP: Oxido Reductasa en *Hyla labialis*. *La Investigación en la Universidad Javeriana.* Tomo I. 454-457 pp.
- Frankel, J.** 1980. Lactate dehydrogenase isozymes of the *Leopard danio*, *Brachydanio nigrofasciatus*: their characterization and ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**: 133-137.
- _____ 1985. Ontogenetic patterns of enzyme locus expression in *Barbus hybrids* (Cypriniformes, Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* **82B** (3): 413-417.
- _____ & **Wilson R.** 1984. Comparison of the spatial and temporal expression of supernatant malate dehydrogenase in *Barbus hybrids* (Cypriniformes, Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* **78B** (1): 179-182
- Gilbert, S.** 1997. *Developmental Biology.* Fifth edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA. 912 pp.
- Gueimundi-Fachado, J.** 1989. Embriología. Editorial pueblo y educación. La Habana- Cuba. 118-129 pp
- Guevara-Roso, E.** 1997. Estudio embrionario y larval microscópico e histológico de *Betta splendens* (Regan, 1909). (*Tesis de maestría*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 140 p.
- Markert, L. & Moller, F.** 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**: 753-762.
- Porras-Caicedo, A.** 1996. Contribución al estudio de patrones isoenzimáticos de la L-Malato: Nad oxidorreductasa en *Hyla labiales*. (*Tesis de maestría*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 73 pp.
- Quatro, J., Woods, H., & Powers, D.** 1993. Sequence analysis of teleost retina-specific lactate dehydrogenase C: Evolutionary implications for the vertebrate lactate dehydrogenase gene family. *Evolution.* **90**: 242-246.
- Tsuji, S., Qureshi, M., Hou, E., Fitch, W., & Li, S.** 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenase (LDH) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig and rat. *Evolution.* **91**: 9392-9396.
- Whitt, G.** 1981. *Developmental Genetics of Fishes: Isozymic Analices of Differential Gene Expression.* *Amer. Zool.* **21**: 549-572.
- Yoshikuni, K., Matsuda, J., Paracova, J., & Sakai, A.** 2001. Phylogenetic study of denaturation of lactate dehydrogenase isoenzymes from different species by high and low temperature. *Annals of Clinical Biochemistry.* **38**: 248-556.

Recibido el 5 de mayo de 2005

Aceptado para su publicación el 27 de julio de 2006