

LDH EN EL DESARROLLO DE *Hyla labialis*

JAIME F. GEORGE*, IRMA DE ESCAMILLA.

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias.

INTRODUCCION

En la mayoría de los casos estudiados hay suficiente evidencia como para indicar que la deshidrogenasa láctica (LDH) es un tetrámero compuesto por subunidades (CAHN *et al.*, 1962) Estas subunidades serían A y B (APELLA y MARKETIT, 1961) o H y M según DIXON y WEBB (1964) estarían controladas por genes independientes (BOYER *et al.*, 1963; MAUCE *et al.*, 1963).

La asociación de estas dos subunidades en tetrámeros, daría como formas moleculares: A⁴ (LDH-5), A₃B (LDH-4), A₂B₂ (LDH-3), AB₃ (LDH-2) y B₄ (LDH-1).

Se sabe que una de estas diversas formas moleculares se encuentran en algunos tejidos más que en otros. En el corazón se encuentra más la forma B₄ (LDH-1) y en el músculo esquelético la forma A₄ (MARKETIT, 1965). Sin embargo, se han reportado casos como en las Salamandras *Taricha* en las que hay más LDH-1 en el músculo y más LDH-5 en el corazón (SPEAKER, 1965). Puesto que los experimentos se hicieron utilizando electroforesis, una posible explicación podría ser un cambio en las cargas relativas de las subunidades A y B (WRIGHT y MOYER, 1973).

Hay varios casos en los que se han reportado más de cinco formas moleculares de LDH. Es el caso de los testículos (ZINKAHM *et al.*, 1963) y de ciertos tejidos en algunos anfibios (WRIGHT y MOYER, 1966). En este último caso se han encontrado hasta 5 isozimas dentro del grupo de la LDH-1.

Se han reportado variaciones de los patrones isozimicos de la LDH en relación con varias en-

fermedades (LUBRANO *et al.*, 1971; BELFIORE *et al.*, 1973) con el ciclo reproductivo (HALL, 1973; PATTERSON y MASTERS, 1972) con el desarrollo (DAVIS *et al.*, 1973; ADAMS *et al.*, 1965) y se han realizado estudios que clarifican en forma de herencia (WRIGHT y MOYER, 1968; WARD y GUTTMAN, 1973) y su formación durante las etapas de regeneración de miembros en salamandras (CHAN y BALEK, 1973).

Hay varios experimentos que relacionan diferentes etapas de diferenciación en un organismo y su metabolismo con la aparición o aumento en la concentración de las diversas formas de LDH. CAHN y colaboradores (1962) mostraron que en los embriones de pollo, aparece primero la LDH-1, aún en músculos esqueléticos y a medida que se avanza en el desarrollo hay un cambio hacia una mayor producción de LDH-5. El caso es totalmente inverso en ratas en donde primero aparece la LDH-5 y luego la LDH-1 (FINE *et al.*, 1963). Estos hallazgos concentraron nuestra atención en el estudio de las formas de LDH que aparecen a través del desarrollo en los embriones de la rana *Hyla labialis*. Esta rana se encuentra ampliamente distribuida en el territorio colombiano.

MATERIALES Y METODOS

Los especímenes de *Hyla labialis* (DUNN, 1944) fueron colectados en San José Spring, a 6 kilómetros al norte de Bogotá. Los huevos se obtuvieron por ovulación inducida (RYAN y GRANT, 1950) que consiste esencialmente en macerar en solución salina isotónica (0.75%) pituitarias de *Bufo marinus* e inyectar esta solución por vía intraperitoneal tanto a machos como a hembras. Se utilizaron 2 pituitarias en 0.5 ml. de solución salina por

* El presente trabajo se llevó a cabo con la ayuda de FORGE (Foundation for Overseas Research Grants and Education).

espécimen. La ovulación se produce en aproximadamente veinticuatro horas.

Cada muestra estuvo conformada por cuarenta embriones en los siguientes estados de desarrollo: 3 (primer clivaje), 4 (segundo clivaje), 5 (tercer clivaje), 8 (blástula), 12 (grástula), 16 (neurula), 17 (botón de cola), 20 (5 milímetros) y 23 (11 milímetros) (POLLISTER y MOORE, 1937; GEORGE y ESCAMILLA, 1973). Los huevos sin fertilizar se obtuvieron directamente de la cavidad abdominal. Los huevos se liberaron mecánicamente de la capa de gelatina. Estas operaciones, en lo posible, se hicieron a 4° C para impedir que los cigotes continuaran su desarrollo. Los huevos quedaron congelados inmediatamente para su futura utilización.

Las muestras fueron homogenizadas a 0° C en 3.0 ml. de solución salina isotónica y el homogeneizado se centrifugó por veinte minutos a 20.000 rpm a 4° C. El sobrenadante se utilizó inmediatamente en la electroforesis. Para la separación de las isozimas se utilizó el método de electroforesis en gel de almidón descrito por SMITHIES (1955) y modificado por NEWCOMER (1966).

El buffer empleado fue el reportado por BOYER y colaboradores (1963). El buffer contiene EDTA 0.02 M, ácido bórico 0.5 M y tris 0.9 M con un pH 8.6 (obtenidos de Sigma Chemical Co. Missouri).

Para la preparación del gel se utilizó almidón (Electrostrach Co. Madison, Wis) al 12% en solución buffer 1:20 con agua deionizada. El molde (Buchler Instruments, Los Angeles, California) con el gel, se coloca a 4° C por un mínimo de dos horas.

Se colocan en las hendiduras del gel 0.05 ml. del sobrenadante del homogeneizado y se corre la electroforesis por 16 horas a 12,5 miliamperios, 215 voltios a 4° C.

Se empleó una fuente de poder Heathkit modelo Ip 17. En la cámara anódica se colocó buffer con una dilución 1:5 en agua destilada y en la catódica 1:7. Las tajadas se colorearon con una solución reveladora que contenía el sustrato lactato de Litio 0.1 M, 6 mg/ml de NAD y 1 mg/ml de Nitro BT (obtenidos de Sigma Chemical Co. Missouri) en tris HCL 0.25 M a pH 7.4 (ALLEN, 1961). La reacción se llevó a cabo en la oscuridad. Los geles se fijaron luego con una solución de ácido acético, metanol y agua 1:5:5. Como control se utilizó plasma humano.

RESULTADOS

En los huevos no fertilizados y en los clivajes primero, segundo y tercero, en blástula, gástrula, neurula y botón de cola, aparecen como únicas bandas las correspondientes a LDH-1 (B_4 o M_4) y a LDH-2 (figura 1). Vale la pena anotar que la banda correspondiente a la LDH-1 en el estado de neurula fue bastante difusa como se muestra en la figura 2. Habría la posibilidad de que esta banda estuviese formada por sub-bandas como en casos que se mencionan en la introducción. La extrac-

ción de la banda y la realización de una electroforesis con el contenido de la misma, podría dar la respuesta a este interrogante. Las bandas 1 y 2 continúan apareciendo en todos los estados estudiados.

En el estado 20 (5 milímetros) aparece ya la banda correspondiente a la LDH-5 (figura 3). Esta se mantiene en todos los estados posteriores estudiados.

La banda correspondiente a la LDH-4 aparece solo en el estado 21, correspondiente a 7 milímetros (figura 4) y la LDH-3 aparece sólo en el estado 23, 11 milímetros (figura 5).

En el estado 11 milímetros se nota además una pequeña banda de muy escasa migración que podría representar una sub-banda de la LDH-4 o sencillamente un artefacto. Esta última posibilidad no es del todo convincente puesto que la banda es consistente en todos los experimentos en este estado.

La figura 6 resume la presencia o ausencia de las diferentes bandas a través de los estados de desarrollo estudiados.

Las migraciones relativas se obtuvieron midiendo en milímetros la distancia de cada banda y dividiendo esta distancia por la distancia de la banda de mayor migración en un control de plasma humano. Los promedios de los datos obtenidos son: 0.708 para LDH-1, 0.561 para LDH-2, 0.342 para LDH-3, 0.0954 para LDH-4 y — 0.0178 para la LDH-5.

DISCUSION

Durante las primeras etapas del desarrollo en anfibios L ϕ EVTRUP (1959) ha indicado que la energía para los procesos vitales se deriva esencialmente de los carbohidratos. La presencia de glicólisis se puede inferir de la presencia de LDH en un tejido (RECHTERICH *et al.*, 1963). Este es el caso de la *Hyla labialis*.

Por otra parte se esperaría que el aumento en el consumo de oxígeno, a medida que avanza el desarrollo (BOELL, 1955) estuviese ligado con un cambio en el tipo de enzimas presentes en el organismo.

ADAMS y FINNEGAN (1965), trabajando con *Rana aurora* han reportado una disminución en la actividad específica de la LDH inmediatamente después de la neurulación. Aunque en este trabajo no se presentan datos cuantitativos, es muy sugestivo el hecho de que también en este estado se presenta algún cambio, indicado por una banda difusa al nivel de la LDH-1.

Esa banda difusa podría además indicar que hay sub-bandas en ella. Si este es el caso, habría más de 5 isozimas presentes y no sería fácil explicarlo con la hipótesis de tetrámeros de dos subunidades básicas propuestas por APELLA y MARKET en 1961.

ADAMS y FINNEGAN (1965) y CHAN y BALEK (1973) han reportado más de cinco bandas en salamandras. Informes similares se han dado en ranas (WRIGHT y MOYER, 1968) y en otros orga-

nismos. Para explicar la existencia de estas múltiples bandas se han lanzado varias hipótesis como son las de isómeros conformacionales (HOUSSAIS, 1966) presencia de tres genes diferentes (KAPLAN, 1964) y enlaces covalentes de GSH y cisteína a la LDH por enlaces disulfuro (DUDMAN y ZERNER, 1973).

En *Hyla labialis* se observa la aparición de la LDH-5 solo hasta el estado de 5 milímetros, inmediatamente después del estado de botón de cola que es la etapa en la que comienzan los movimientos musculares. El funcionamiento muscular y la aparición de la LDH-5 se relacionan muy bien puesto que es ésta la que se encuentra en mayor concentración en los músculos. Por otra parte, estudios en *Rana aurora* (ADAMS y FINNEGAN, 1965), presentan un aumento en la actividad específica de LDH en esta etapa e investigaciones en *Rana pipiens* muestran que en este tiempo se acumulan ribosomas y hay un aumento en la síntesis de proteínas (BROWN y CASTON, 1962), y en la actividad de varias enzimas (WALLACE, 1961).

También en este estado de desarrollo aparecen las subunidades paternas de LDH en híbridos (WRIGHT y MOYER, 1966) indicando que es el tiempo en que se activan los genomas derivados del padre. WRIGHT y MOYER (1968) han demostrado, utilizando *Rana pipiens*, que en híbridos las enzimas maternas persisten hasta 20 días después de la fertilización y quince días después de que el embrión ha comenzado a sintetizar su propia LDH.

Los puntos expuestos anteriormente y el hecho de que en nuestros experimentos las formas de LDH 1 y 2 están presentes en forma activa en huevos no fertilizados tienden a indicar que ellas son sintetizadas mientras los huevos están en

el organismo materno. Estos dos tipos de LDH persisten durante todas las etapas del desarrollo estudiadas, en *Hyla labialis*, sugieren que son de vida larga o que los genes correspondientes y sus controles están activos durante estas etapas. Los experimentos mencionados en el párrafo anterior tienden a favorecer la primera posibilidad.

La isoforma 5 de la LDH se forma solamente algo después del estado de botón de cola, indicando que el gene correspondiente ha comenzado a actuar o está actuando con una mayor intensidad. Se observa que se forma primero la LDH-5 y luego la 4 y finalmente la 3. Esto podría estar relacionado con el hecho de que las sub-unidades tienen una mayor tendencia a asociarse entre sub-unidades iguales (DUDMAN y ZERNER, 1973).

RESUMEN

Utilizando la técnica de electroforesis vertical en almidón se han estudiado las primeras etapas de desarrollo de la rana *Hyla labialis* en cuanto se refiere a los cambios que se observan en las isoformas de LDH. Se muestra que la LDH-1 y la LDH-2 aparecen en todas las etapas fertilizadas como en todas las etapas de desarrollo estudiadas, que se extienden hasta el estado 23, correspondiente a embriones de 11 milímetros. La LDH-5 hace su aparición en el estado de 5 milímetros, la LDH-4 en el estado de 7 milímetros y la LDH-3 en el estado de 11 milímetros.

Los resultados tienden a confirmar experimentos previos hechos con híbridos en el sentido de que las enzimas sintetizadas por la madre permanecen activas en el embrión y que el embrión posiblemente comienza a sintetizar sus propias enzimas en el estado de botón de cola.

ISOZIMA	HUEVOS SIN FERTILIZAR.	1er. CLIVAJE	2do. CLIVAJE	3er. CLIVAJE	BLASTULA	GASTRULA	NEURULA	BOTON DE COLA	5 M.M.	7 M.M.	11 M.M.
LDH ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDH ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDH ₃											+
LDH ₄										+	+
LDH ₅									+	+	+

FIGURA 6. Comparación de la incidencia de las isoformas de LDH en los diferentes estados de desarrollo embriológico de *Hyla labialis*.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, E. y FINNEGAN, 1965. An Investigation of LDH Activity in Early Amphibian Development. *J. Expt. Zool.*, 158: 241-252.
- ALLEN, V. A., 1961. Multiple forms of LDH in tissues of the mouse: their specificity, cellular localization and response to altered physiological conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94: 937-951.
- BELFIORE, F. LL. VECCHIO y E. NAPOLI, 1973. Serum enzymes in diabetes mellitus, *Clin. Chem.* 19: 447-452.
- BOYER, S. H., D. C. FAINTER y E. J. WATSON-WILLIAMS, 1963. Lactate dehydrogenase variant from human blood: evidencie for molecular subunits. *Science N. Y.* 141: 642-643.
- BOELL, E. J., 1955. Energy exchange and Enzyme development during embryogenesis: *In analysis of development* (Ed. B. H. Willier, P. A. Weiss, V. Hamburg). Pp. 520-555. W. B. Saunder y Co.
- BROWN, D. D. y J. D. CASTON, 1962. Biochemistry of Amphibian Development I Ribosome and protein synthesis in Early Development of *Rana pipiens*. *Devel. Biol.* 5: 412-434.
- CAHN, R. D., N. O. KAPLAN, L. LEVINE y E. ZWILLING. Nature and Development of lactic Dehydrogenases, 1962. *Science*, 136: 962-969.
- CHAN, T. H. C. y R. W. BALEK, 1973. Changes in Lactate dehydrogenases from forelimb and tail regenerates of two species of salamandra. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A: 1093-1100.
- DAVIS, R. M. AL. BALTZ, W. T. HUBBERT y C. K. GRAHAM, 1973. Age-related change of LDH activity and isoenzyme patterns in the Bovine feters. *Neonate*, 22: 64-77.
- DIXON, M. y E. C. WEEB, 1964. Enzymes 2nd. Ed. Logmans-Green & Co. Ltd., Londres.
- DUDMAN, N. P. B. y B. ZERNER, 1973: LDH: Electrophoretic behaviour, electron microscopy and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 310: 248-263.
- DUNN, E. R., 1944. Herpatology of the Bogotá area. *Rev. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 6: 88-8.
- FINE, I. H., N. O. KAPLAN y D. KUFTINEC, 1963. Development Changes of mammalian Lactic Dehydrogenase. *Biochim.* 2: 116-121.
- GEORGE, J. F. e IRMA DE ESCAMILLA, 1973. *Revista La Salle*.
- HALL, K., 1973. Lactic dehydrogenase and other enzymes in the mouse uterus during the perimplantation period of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 34: 79-91.
- KAPLAN, N. O., 1964. Lactate Dehydrogenase Structure and Function. Brook haven. *Symp. Biol.* 17: 131-153.
- LØEVTRUP, S., 1959. Utilization of the energy sources during amphibian embryogenesis at row temperatures. *J. Exp. Zool.* 140: 383-394.
- LUBRANO, T., A. A. DIETZ y H. M. RUBINSTEIN, 1971. Extra lactate dehydrogenase isoenzyme band in serum of patiens with severe liver disease. *Clinical Chem.* 17: 882-885.
- MARKETIT, C. L., 1965. Developmental Genetics, *Harvey Lectures*, 59: 187-218.
- NANCE, W. E., A. CLAFIN y O. SMITHIES, 1963. Lactic dehydrogenase: Genetic control in men *Science. N. Y.* 142: 1075-1077.
- NEWCOMER, R., 1966. Comunicación personal.
- PATTERSON, C. y C. J. MASTERS, 1972. Lactate dehydrogenase isoenzymes and the reproductive cycle in the rat. *J. Reprod. Fert.* 30: 425-431.
- POLLISTER, A. W. y A. J. A. MOORE, 1937. Tables for the normal development of *Rana sylvatica*. *Anat. Rec.* 68: 486-496.
- RICHTERICH, R. P. SCHAFROTH y H. AEBI, 1963. A study of LDH isoenzyme pattern of human tissues by adsorption-evolution on shephadex DEAE. *Clin. Chim. Acta.* 8: 178-192.
- RYAN, F. J. y J. GRANT, 1940. The stimulus for maturation and ovulation of the frog's eggs. *Physiol. Zool.* 13: 383-389.
- SMITHIES, O., 1955. Zone electrophoretic in strach - gels group variation in serum protein of normal human adults. *Biochem, J.* 61: 629-641.
- SPEAKER, C. B., 1965. A comparisson of lactate dehydrogenase. Malate dehydrogenase and esterase in three species of aricha New stand their interspecific hybrids. *Am. Zool.* 5: 205.
- WALLACE, R. A., 1961. Enzymatic patterns in the development frog embryo. *Devel. Biol.* 3: 486-515.
- WRIGHT, D. A. y F. H. MOYER, 1966. Parental influences on lactate dehydrogenase in the Early developmental of hybrid frogs in the genus *Rana*. *J. Exptl. Zool.* 163: 215-230.
- 1968. Inheritance of frog lactate dehydrogenase patterns and the persistence of maternal isozymes during development. *J. Exp. Zool.* 167: 197-206.
- 1973. Inmunochemistry of frog lactate dehydrogenase (LDH), and the subunit homologies of Amphibian LDH isozymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 44B: 1011-1016.
- ZINKHAM, W. H., A. BLANCO y L. KUPCHYK, 1963. Lactate dehydrogenase in testis. *Dissociation and recombination of subunits Science.* 142: 1303-1304.