

COMPORTAMIENTO DE LAS ISOENZIMAS DE LACTATO  
DESHIDROGENASA DE MACERADOS DE CEREBRO DE *AKODON*  
*OLIVACEUS PENCANUS PHILIPPI* 1900, ALMACENADOS A  
DISTINTAS TEMPERATURAS

Behavior of lactate dehydrogenase isozymes from *Akodon olivaceus*  
*pencanus* Philippi 1900 brain homogenates stored at different temperatures.

ROLANDO MONTOYA, FARUK ALAY, EDUARDO KESSI,  
JAIME VIDAL y JOSE CABELLO\*

RESUMEN

El cerebro de *A. olivaceus pencanus* presenta las cinco formas moleculares características de lactato deshidrogenasa de mamíferos. El almacenamiento de los homogenizados a distintas temperaturas reveló una disminución de la actividad enzimática, la que puede deberse a una labilidad aumentada de algunas isoenzimas que poseen la más baja movilidad relativa en geles de poliacrilamida ( $A_4$ ,  $A_3B$  y  $A_2B_2$ ). Se concluye que la temperatura de almacenamiento más adecuada es  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ya que la pérdida de actividad enzimática bajo estas condiciones es mínima.

ABSTRACT

Brain lactate dehydrogenase from *A. olivaceus pencanus* shows the typical five molecular forms of mammals. The storage of brain homogenates at different temperatures shows a decrease in the enzyme activity which can be due to increased lability of those isozymes ( $A_4$ ,  $A_3B$ ,  $A_2B_2$ ) displaying the lowest mobility in polyacrylamide gels. It is concluded that the most useful temperature storage is  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , because the enzyme activity loss was minimal under this condition.

Keywords: Activity. Conservation. Electrophoresis. Isozymes lactate dehydrogenase.

INTRODUCCION

Numerosa es la bibliografía que informa de la utilización de las distintas formas moleculares de una enzima (isoenzimas) para examinar la estructura genética de poblaciones animales y vegetales (Valenta, 1977; Blanco, 1964; Fieldes, 1973; Pai, 1973).

\*Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción. Casilla 2407, Apartado 10, Concepción, Chile.

Lactato deshidrogenasa LDH (E. C. 1.1.1.27) es uno de los sistemas enzimáticos más conocidos y utilizados debido a su amplia distribución en los distintos tejidos y facilidad de detección; los estudios realizados para esta enzima en mamíferos, utilizando principalmente soportes de almidón demuestran la existencia de cinco zonas de actividad enzimática, cada una de las cuales corresponde a un tetrámero formado por la asociación al azar de dos cadenas polipeptídicas que resultan de la expresión de dos genes separados (Markert et al, 1975).

Estudios anteriores realizados sobre poblaciones de roedores endémicos de Chile del género *Akodon* desde el punto de vista de sus caracteres morfológicos (Yáñez, 1979) y de sus cromosomas (Spotorno, 1976; Montoya, 1977; Rodríguez, 1983) han demostrado notables similitudes entre las especies, por lo que la siguiente etapa de investigación debe corresponder a estudios que permitan establecer diferencias precisas. Para esto, las isoenzimas constituyen una de las herramientas más útiles en el reconocimiento de especies, con un alto grado de seguridad. Sin embargo, existe el peligro de que por mal manejo de las muestras se interpreten como siendo de base genética, las alteraciones ambientales que pueden producirse en los zimogramas. Uno de los factores importantes a considerar es la temperatura de conservación de las muestras.

Las razones expuestas nos llevaron a investigar el comportamiento de LDH bajo distintas condiciones de almacenamiento para macerados de cerebro de *A. olivaceus* que en matrices de poliacrilamida presenta también las cinco formas moleculares características de los mamíferos.

## MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS

Reactivos generales, grado proanálisis, (Merck, Darmstadt, RFA).

Nitroblue tetrazolium (NBT), fenacina metosulfato (PMS), nicotinamida adenín dinucleótido, formas oxidadas y reducidas ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

### MATERIAL BIOLÓGICO

Los especímenes de *A. olivaceus pincanus* fueron capturados vivos en la zona de Concepción (Barrio Universitario).

Se analizaron 15 ejemplares (7♂, 8♀) los que presentaron un patrón idéntico de isoenzimas.

Una vez sacrificados se les extrajo y homogenizó el cerebro en tampón Tris. HCL 0.01 M, pH: 7.5, beta mercaptoetanol 0.001 M y EDTA.  $\text{Na}_2$  0.001 M, posteriormente se centrifugó a 13800 x g por 30 minutos a 0°C. Alícuotas de estos homogenizados se almacenaron a + 4°C (T1), 0°C (T2), -4°C (T3), -30°C (T4) y -180°C (T5) hasta el momento de su utilización.

### ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

La determinación de actividades enzimáticas de LDH se realizaron en un espectrofotómetro Gilford Modelo 240, según técnica descrita por Markert et al (1965).

### CONCENTRACION DE PROTEINAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el método de Lowry et al (1951), utilizando seroalbúmina de bovino como patrón.

### ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las separaciones electroforéticas se realizaron en geles cilíndricos de poliacrilamida al 7%, 0°C y con una intensidad de corriente de 4 mA por tubo, según la técnica descrita por Davies, (1964).

### TINCION DE ISOENZIMAS

Las tinciones histoquímicas de lactato deshidrogenasa se realizaron según Siciliano, (1968); incubando los geles por 10 minutos a 37°C; posteriormente se hicieron perfiles densitográficos en un densitómetro ORTEC Modelo 4310.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ACTIVIDADES DE LACTATO DESHIDROGENASA ALMACENADAS A DISTINTAS TEMPERATURAS

En general, se observa una tendencia a perder actividad a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento a las distintas temperaturas a excepción de los homogenizados conservados a -180°C, condición que mantiene la actividad inicial aún después de 16 días de almacenamiento. -4°C es la temperatura a la cual los homogenizados presentan una menor estabilidad lo que se refleja en una pérdida más acentuada de la actividad enzimática (Fig. 1).

En la figura 2 se observa que la concentración de proteínas más adecuada a cargar sobre los geles se encuentra en el rango de 25 a 50 ug. En esta zona de concentración, la separación, resolución y nitidez de las diferentes isoenzimas de LDH es la más adecuada para su posterior análisis.

En la Tabla 1 se señala la movilidad relativa de cada una de las isoenzimas de LDH; los valores corresponden a los promedios obtenidos de 21 corridas electroforéticas. La pequeña desviación standard (DS) observada indica que los geles de poliacrilamida resuelven estas isoenzimas de una manera más clara y constante que los geles de almidón.

La Fig. 3 muestra las zonas de tinción de las isoenzimas de LDH que se obtienen después que las muestras de homogenizados de cerebro de *A. olivaceus* han sido almacenadas a las temperaturas y tiempos mencionados en materiales y métodos.

A (*Dos días de almacenamiento*): No se aprecian diferencias significativas entre los homogenizados conservados a las distintas temperaturas, situación que concuerda con las medidas de actividad enzimática de la Fig. 1.

B (*Ocho días de almacenamiento*): T<sub>1</sub>, no presenta variaciones apreciables en las zonas de actividad enzimática, si se compara con el almacenamiento de dos días.

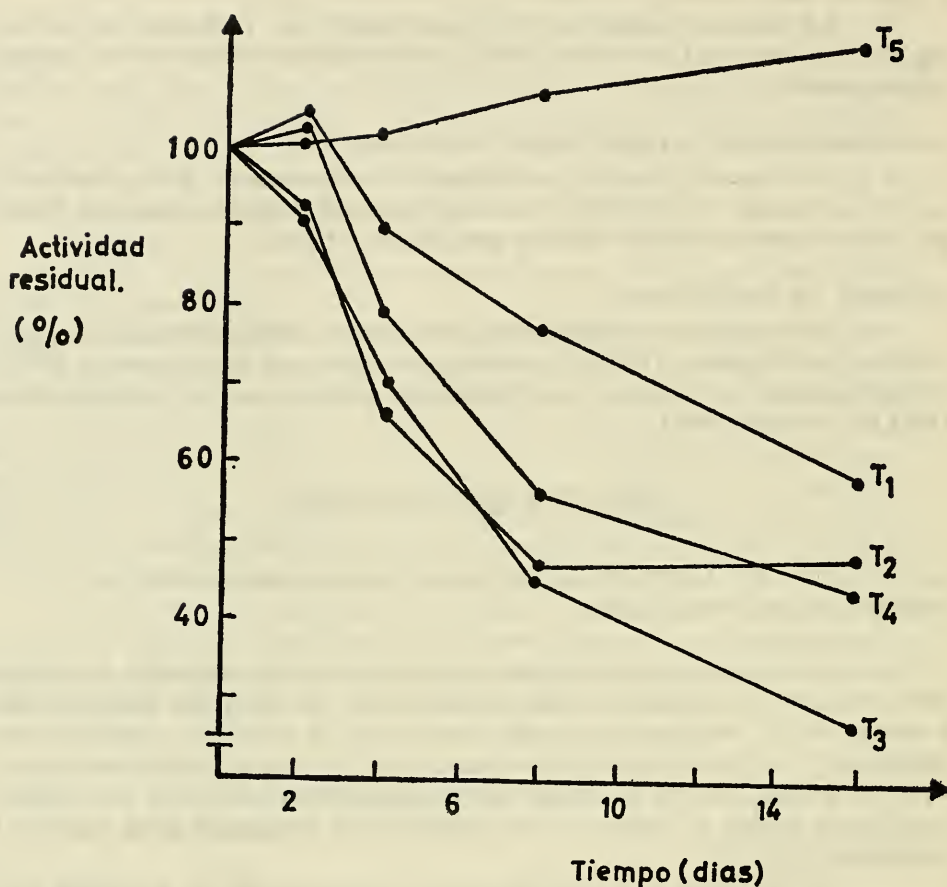


Fig. 1.- Actividades de lactato deshidrogenasa de *A. olivaceus* almacenadas a distintas temperaturas, T<sub>1</sub> - T<sub>5</sub>: + 4°C, 0°C, -4°C, -30°C, y -180°C, medidas a distintos tiempos de almacenamiento.

T<sub>2</sub>, la actividad relativa de A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> y AB<sub>3</sub> han disminuido respecto de A<sub>3</sub>B y B<sub>4</sub>.

T<sub>3</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> y AB<sub>3</sub> han disminuido notablemente sus actividades siendo menos afectadas A<sub>4</sub> y A<sub>3</sub>B; B<sub>4</sub> mantiene su actividad inicial.

T<sub>4</sub>, A<sub>4</sub> ha desaparecido totalmente, A<sub>3</sub>B mantiene muy escasa actividad lo que contrasta notoriamente con las tres isoenzimas restantes, las cuales mantienen su actividad inicial.

C (Dieciséis días de almacenamiento): T<sub>1</sub>, se detectan zonas de tinción con una intensidad similar a las observadas en dos días de almacenamiento para A<sub>3</sub>B y B<sub>4</sub>, disminuciones de la actividad se observan para A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> y AB<sub>3</sub>.

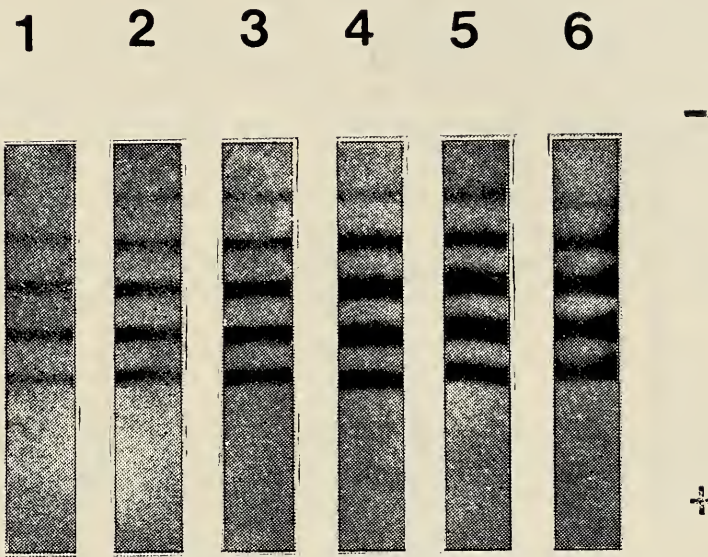


Fig. 2.- Separación electroforética de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa de macerados de cerebro de *A. olivaceus*, en geles cilíndricos de poliacrilamida al 7% 1 - 6: 10, 25, 50, 75, 100 y 150 ug. de proteínas cargadas sobre cada gel.

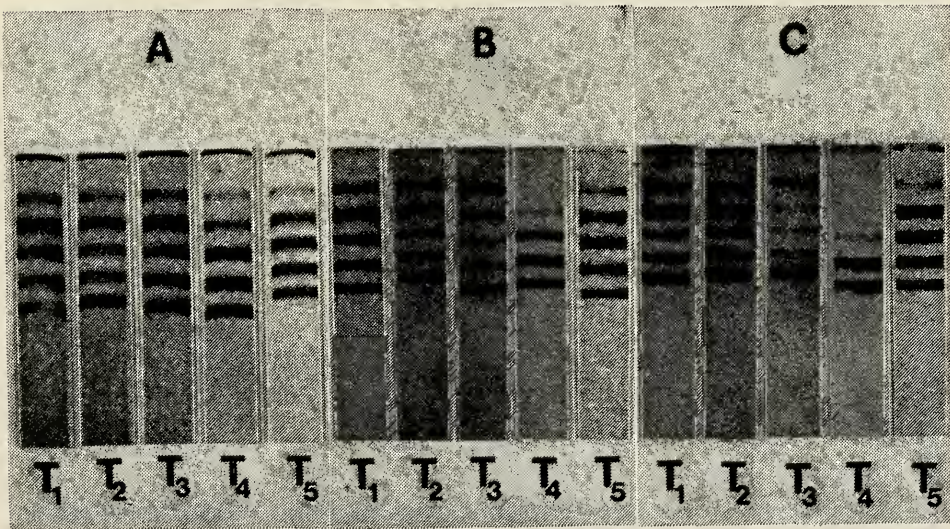


Fig. 3.- Separación electroforética de las isoenzimas de LDH de macerados de cerebro de *A. olivaceus* en geles de poliacrilamida al 7% almacenados a distintas temperaturas, T<sub>1</sub> - T<sub>5</sub>: + 4°C, 0°C, -4°C, -30°C, -180°C. A, B y C: 2,8 y 16 días. Los geles fueron cargados con 50 ug. de proteínas.

$T_2$ , las zonas de tinción son similares a las observadas en  $T_1$ .

$T_3$ ,  $A_4$  ha disminuido su actividad;  $A_3B$ ,  $9_2B_2$  y  $AB_3$  presentan zonas de actividad muy tenues;  $B_4$  no ha sufrido alteraciones.

$T_4$ ,  $A_4$  y  $A_3B$  han desaparecido totalmente;  $A_2B_2$  mantiene una muy escasa actividad;  $AB_3$  y  $B_4$  mantienen su actividad inicial.

$T_5$ , las zonas de actividad enzimática no han experimentado variaciones respecto de los tiempos iniciales de medición de la actividad de las isoenzimas de LDH.

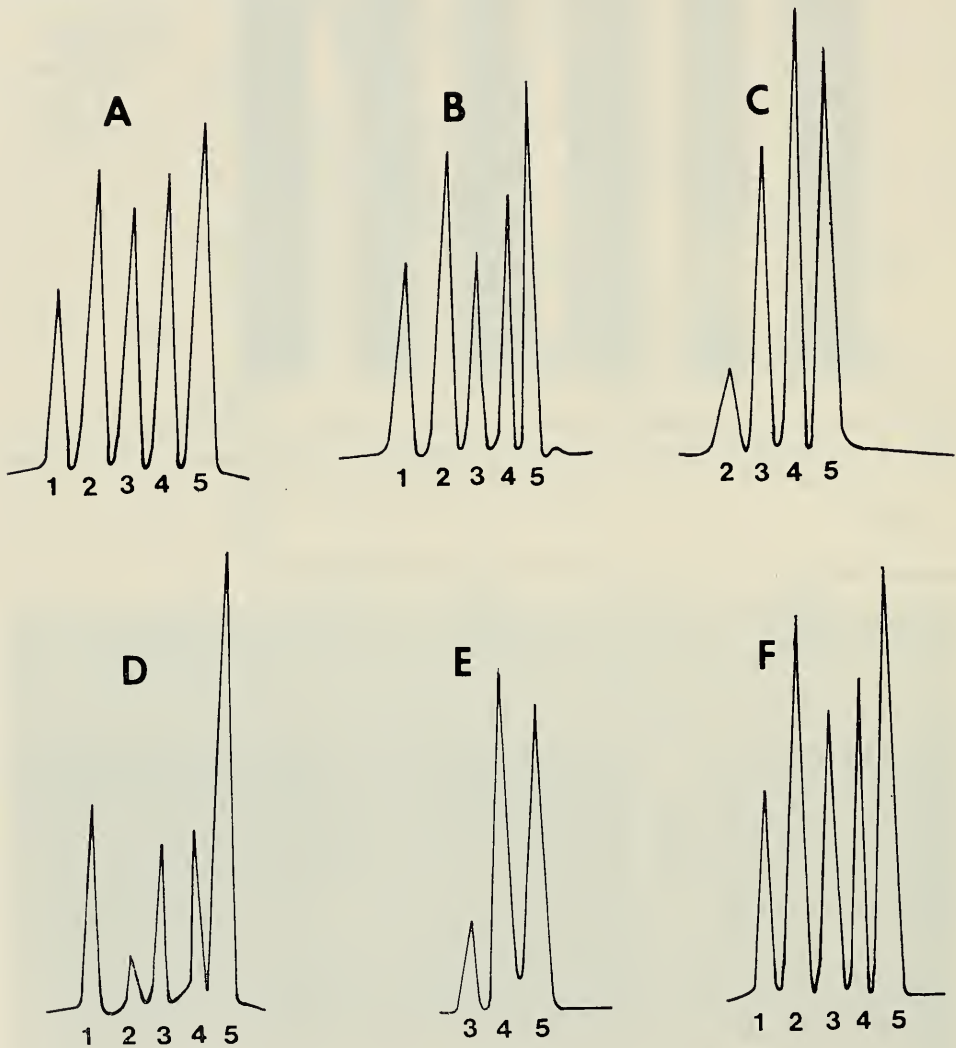


Fig. 4.- Densitogramas de isoenzimas de LDH de macerados de cerebro de *A. olivaceus* mantenidos a distintas temperaturas y por tiempos variables de conservación.

A : 0	días de almacenamiento	1 : $A_4$
B : $T_2$	4 días de almacenamiento	2 : $A_3B$
C : $T_3$	16 días de almacenamiento	3 : $A_2B_2$
D : $T_4$	8 días de almacenamiento	4 : $AB_3$
E : $T_4$	16 días de almacenamiento	5 : $B_4$
F : $T_5$	16 días de almacenamiento	

En la Fig. 4 se observan densitogramas de algunos de los geles presentados en la Fig. 3. Los resultados grafican lo que se observa por simple análisis visual de la Fig. 3, vemos, por ejemplo, que el densitograma E indica la pérdida de las actividades enzimáticas de  $A_4$  y  $A_3B$  y la disminución en  $A_2B_2$  coincidiendo con los resultados analizados en la Fig. 3, gel C -  $T_4$ .

La caída de actividad de los macerados almacenados por tiempo prolongado (Fig. 1), explican la desaparición de las actividades relativas de las bandas de isoenzimas de LDH. Esto permite establecer las condiciones más apropiadas de almacenamiento y de este modo corregir posibles errores de interpretación derivados de mal manejo de las muestras que deben ser sometidas a análisis electroforéticos.

TABLA I

Movilidades relativas para las isoenzimas de lactato deshidrogenasa de macerados de cerebro de *A. olivaceus* en geles cilíndricos de poliacrilamida al 7%. Los valores corresponden a promedios obtenidos de 21 corridas electroforéticas.

Isoenzima	Movilidad Relativa ± DS
$B_4$	0.358 ± 0.022
$AB_3$	0.297 ± 0.021
$A_2B_2$	0.233 ± 0.014
$A_3B$	0.166 ± 0.013
$A_4$	0.101 ± 0.008

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados expuestos podemos extraer las siguientes conclusiones para macerados de cerebro de *A. olivaceus*:

1. Es posible utilizar geles de poliacrilamida como matrices alternativas a los geles de almidón en las separaciones electroforéticas de las isoenzimas, puesto que presentan una alta repetitividad (movilidades relativas con baja DS).
2. Cada sistema de isoenzimas a analizar debiera someterse a un control previo de esta naturaleza. La recomendación es válida principalmente para aquellos laboratorios que procesan grandes cantidades de muestras, muchas de las cuales soportan condiciones de almacenamiento por largos períodos de tiempo.
3. Las mejores condiciones de almacenamiento para las isoenzimas de lactato deshidrogenasa de macerados de cerebro de *A. olivaceus* corresponden a una temperatura de  $-180^{\circ}\text{C}$ , a la cual no se registran cambios en la actividad total de los homogenizados ni de las isoenzimas en particular aún después de 16 días de conservación. (Fig. 1, 3 y 4).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción a través de los Proyectos de Investigación 02.08.99 y 20.31.07.

## REFERENCIAS

- Blanco, A., Zinkhan W. H. and L. Kupchyk, 1964. Genetic control and ontogeny of lactate dehydrogenase in pigeon testes. *Journal of Experimental Zoology* 156: 137-152.
- Davies, B. J., 1964. Disc - electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals of New York Academy Sciences* 121: 404-427.
- Fieldes, M. A. and H. Tyson, 1973. Activity and relative mobility of peroxidase and esterase isozymes of flax (*Linum usitatissimum*) genotrophs I. Developing main systems. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 15: 731-744.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and R. L. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Mann, G., 1978. Los pequeños mamíferos de Chile. *Gayana, Zoología* 40: 123-165.
- Markert, C. L. and I. Faulhaber, 1965. Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *Journal of Zoology* 159: 319-332.
- Markert, C. L., Shaklee J. B. and G. S. Whitt, 1975. Evolution of a gene. *Science* 189: 102-114.
- Montoya, R. y W. Venegas, 1977. Bandeado cromosómico: Bandas G en *Akodon longipilis hirtus* Thomas (Rodentia, Cricetidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción Tomo LI*: 159-165.
- Pai, C., Endo T. and H. Oka, 1973. Genic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 15: 845-853.
- Rodríguez, M., Montoya, R. and W. Venegas, 1983. Cytogenetic analysis of Chilean species of the genus *Akodon* Meyen (Rodentia, Cricetidae). *Caryologia* 36: 129-138.
- Siciliano, M. J. and C. R. Shaw, 1976. Separation and Visualization of enzymes on gels. In Smith (ed) *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. 4th. Edition Ed. William Heinemann Medical Books Ltd. (London)
- Spotorno, A. and R. Fernández, 1976. Chromosome stability in southern *Akodon* (Rodentia, Cricetidae). *Mammalian Chromosomes Newsletter* 17: 13.
- Valenta, M., 1978. Polymorphism of A, B and C loci of lactate dehydrogenase in european fish of the Cyprinidae family. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 9: 139-149.
- Yáñez, J., Valencia J. y F. Jaksić, 1979. Morfometría y sistemática del subgénero *Akodon* (Rodentia) en Chile. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 12: 197-202.