

DESHIDROGENASA MALICA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO DE *Hyla labialis*

*Jaime F. George C., Ph. D. **

Irma Colmenares de Escamilla

María E. de Carrillo

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

INTRODUCCION

Uno de los temas de gran interés hoy en día para los científicos es el estudio de las enzimas. Con la invención de la electroforesis, se puso de manifiesto la existencia de varios tipos de enzimas que adoptan más de una forma. Se llaman isoenzimas y presentan entre ellas diferencias en la secuencia de aminoácidos (Latner y Skillen, 1968; Weyer, 1968).

Entre las isoenzimas más conocidas se encuentran las de la dehidrogenasa láctica (LDH), las de la deshidrogenasa del ácido málico (MDH) y las de la deshidrogenasa del ácido glutámico (GDH).

En los mamíferos, la enzima más estudiada ha sido la LDH, la cual se ha presentado en por lo menos cinco formas diferentes de tetrámeros producidas cada una de ellas por la unión de dos monómeros en proporciones diferentes. Uno de los monómeros se presenta más que todo en el tejido del corazón y ha sido denominado "H" y el otro en el músculo estriado y se conoce como "M" (Dixon y Webb, 1964). Asociando estos dos monómeros se puede observar la composición polipeptídica de los cinco tetrámeros así:

H ₄	LDH ₁
H ₃ M	LDH ₂
H ₂ M ₂	LDH ₃
HM ₃	LDH ₄
M ₄	LDH ₅

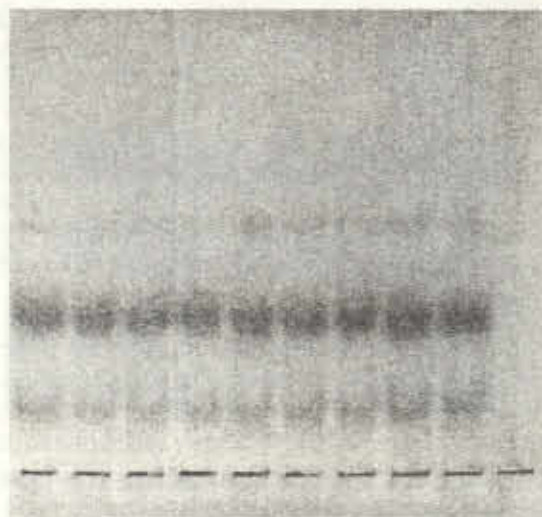


FIGURA 1

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en huevos sin fertilizar.

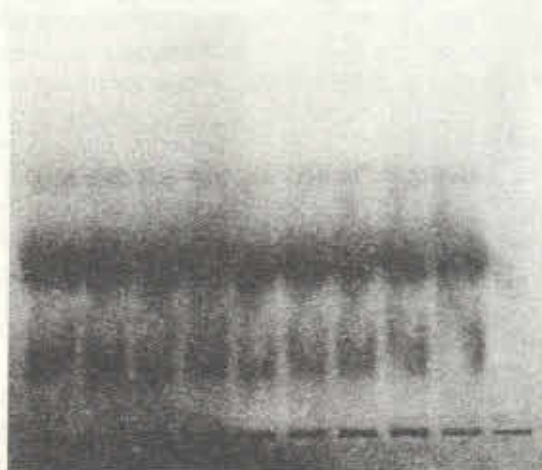


FIGURA 2

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en huevos en primer clivaje (estado 3).

(*) Este trabajo se llevó a cabo mediante una ayuda de Investigación del Fondo Colombiano de Investigaciones y Proyectos Especiales Francisco José de Caldas, COLCIENCIAS.

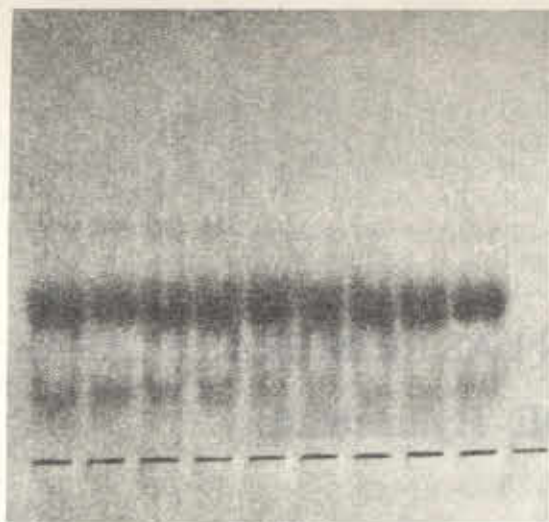


FIGURA 3

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en huevos en segundo clivaje (estado 4).



FIGURA 6

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en Gástrula (estado 12).

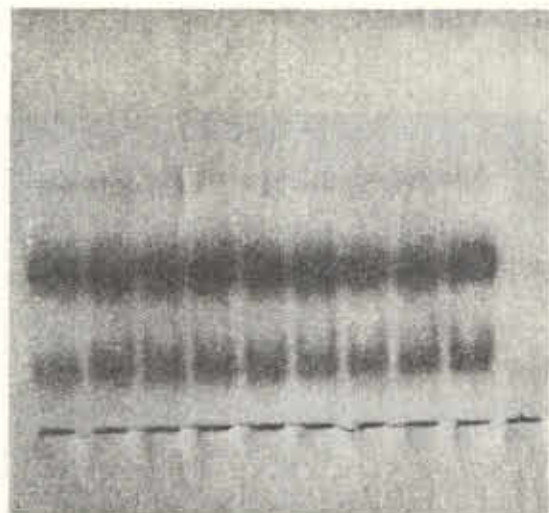


FIGURA 4

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en huevos en tercer clivaje (estado 5).



FIGURA 7

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en Nêurula (estado 16).

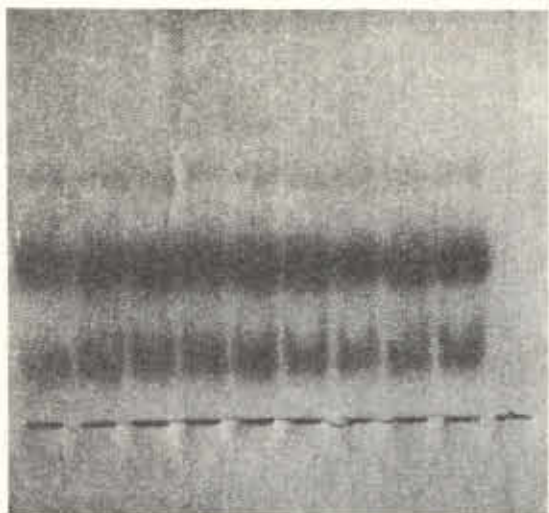


FIGURA 5

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en Blástula (estado 8).

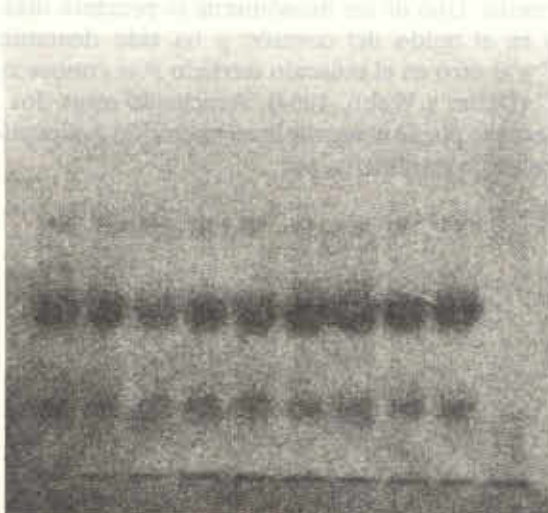


FIGURA 8

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en Botón de Cola (estado 17).

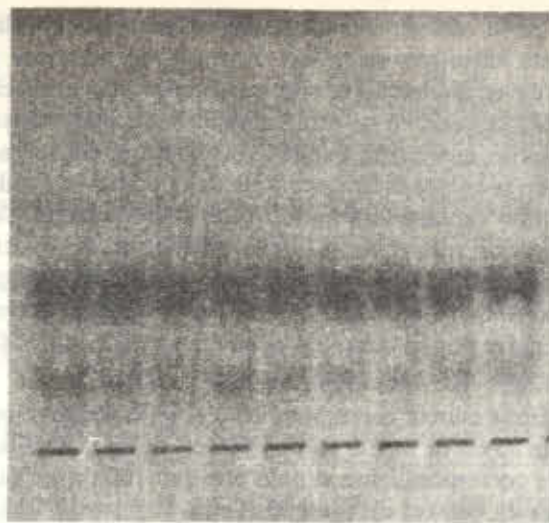


FIGURA 9

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en embriones de 5 mm (estado 20).

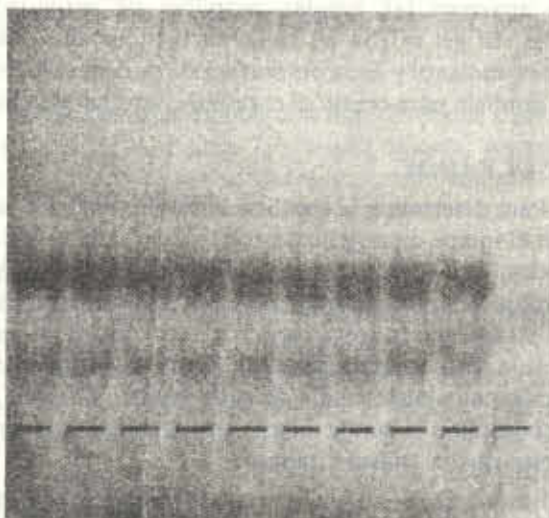


FIGURA 10

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en embriones de 7 mm (estado 21).



FIGURA 11

Electroferograma representativo de las isozimas de MDH en embriones de 11 mm (estado 22).

Las isoenzimas de la MDH como las de la LDH parecen tener también dos tipos de monómeros organizados en cinco diferentes combinaciones de tetrámeros, los cuales entre otras propiedades difieren en su movilidad electroforética y en su punto isoelectrico.

La deshidrogenasa del ácido málico es una de las enzimas que actúa en el metabolismo de los carbohidratos. Es una oxidoreductasa que cataliza la interconversión entre el ácido málico y el ácido oxaloacético, usando como coenzima el Dinucleótido de Nicotinamida Adenina (NAD).

Market y Moller en 1959 empleando el método de separación por electroforesis en gel de almidón y trabajando con tejidos frescos de animales encontraron que la MDH se separaba en dos fracciones diferentes. En 1960 Tsao utilizando la misma técnica obtuvo los mismos resultados en varios tejidos de rata. Estos científicos coincidieron en sus investigaciones al encontrar las dos formas diferentes de la enzima MDH sin embargo, ninguno explicó el significado biológico de esta heterogeneidad.

Hallazgos similares fueron reportados por Latner y Skillen en 1962 en espermatozoides humanos, por Englard y Breiger en 1962 en músculo de corazón de buey, por Wiggert y Vilee en 1962 en fracciones de corazón, hígado, riñón, pulmón y corteza cerebral de fetos humanos en varios estados de diferenciación y por Grossman, Kaplan y Thorne, en 1963, en el corazón del cerdo. La conclusión a la cual llegaron estos investigadores es que en los tejidos de los vertebrados únicamente se presentan dos bandas con actividad de la enzima MDH, las cuales podían separarse electroforéticamente.

Siegel y Englard en 1962 purificaron la MDH del corazón del buey, cristalizaron la enzima y determinaron su composición de aminoácidos. Posteriormente, Thorne y Cooper (1963) obtuvieron composiciones similares de aminoácidos para la MDH del extracto de células del corazón del pollo. En 1963 Golberg y Cather, encontraron la presencia de tres bandas con actividad de MDH, durante el desarrollo embriológico del caracol *Ilyanasa obsoleta*.

En 1963 Moore y Vilee, separaron los blastómeros del erizo de mar *A. punctulata* en el estado de 64 células, mediante tratamientos con tripsina y luego por centrifugación en un gradiente de sucrosa. Hicieron microelectroforesis en disco de policrilamida de macro y micro blastómeros y encontraron que en los macroblastómeros habían dos bandas con la actividad de MDH y en los microblastómeros, tres bandas. Seis horas después de la fertilización los embriones seguían presentando las mismas tres bandas y a las cuarenta y ocho horas se presentaron cuatro bandas con actividad MDH. En huevos sin fertilizar reportaron cinco bandas. Sin embargo, en 1967 Francesco y Vilee utilizando el mismo animal, reportaron que antes de la fertilización aparecían ocho bandas; éstas se reducían y cinco minutos más tarde aparecían de nuevo los faltantes. La concentración de esta enzima, detectada por un aumento en la intensidad del color de las bandas, aumentaba noventa minutos después de la fertilización.

Manwell (1966) halló diferencias en la actividad de la MDH en hígado de renacuajo y de rana. En hígado de renacuajo encontró en la zona intermedia de tres a cuatro sub-bandas isozimicas, mientras que en el hígado de la rana las zonas catódica y anódica eran las más marcadas.

En 1971 Pakhomov y Perevozchikov, revelaron la presencia de tres zonas de actividad de MDH en los músculos esqueléticos de pollos en desarrollo. Se encontraron las mismas bandas en los músculos y corazones de los pollos adultos.

En el mismo año Engel, Wolfgang y Wolf, mediante estudios electroforéticos en ratas, anotaron que no había actividad enzimática alguna en los huevos sin fertilizar o en los estados de preimplantación. Después de la implantación observaron por primera vez, un patrón isozimico que aparecía a los diez días, el cual presentaba tres bandas diferentes. Doscientas cuarenta horas después aparecieron cinco bandas con actividad de MDH. La conclusión fue que la MDH aparecía un poco más tarde en el desarrollo.

Los hallazgos descritos motivaron el interés por estudiar las variaciones de esta enzima durante el desarrollo de *Hyla labialis*, una rana muy común en Colombia pero poco conocida biológicamente.

MATERIALES Y METODOS

Para estos experimentos se utilizaron los anfibios *Hyla labialis*, descritos por E.R. Dunn en 1944. Las ranas adultas se recolectaron en la Urbanización San José, la cual está situada tres kilómetros al occidente del tercer puente de la autopista norte de Bogotá, Colombia.

Una vez en el laboratorio se seleccionaron los machos y las hembras y se colocaron en recipientes de vidrio a una temperatura entre 8 y 14°C, siendo procesados antes del tercer día de cautiverio.

Para obtener los huevos se utilizó un método de la ovulación inducida (F.J. Ryan y R. Grant, 1940), que consiste en inyectar a la hembra y al macho en la cavidad abdominal cinco pituitarias de *Buffo marinus* maceradas en 0.5 ml. de solución salina al 0.75%.

Después de la inyección se colocó a cada pareja en un frasco y se la aisló en un sitio oscuro para facilitar así el proceso de la ovulación. Los huevos fertilizados se colocaron en cajas de Petri, con 30 ml. de agua fresca y con la ayuda de un microscopio esteroscópico, se separaron las diferentes etapas del desarrollo.

En pequeños tubos de vidrio se colocaron de 100 a 200 huevos en los diferentes estados de desarrollo, hasta llegar al botón de cola. En los embriones de 5mm., 7mm., y 11 mm., solamente se recolectaron sesenta especímenes debido al tamaño de estos.

Los embriones se homogenizaron en 0.2 ml. de solución buffer stock, descrita por Boyer, *et al.* (1963). Esta contiene ácido tricloroacético 0,5 M, ácido bórico 0.02M y TRIS 0.9 M., a un pH final de 8.60. Luego se centrifugaron en una centrífuga clínica a 5.000 rpm durante media hora a 0°C, guardando el sobrenadante.

El gel se prepara mezclando en un erlenmeyer 60 grms. de almidón (Otto Hiller) con 25 cc. de solución Buffer stock y se completa con 475 cc. de agua destila-

da. Se la calienta en un mechero agitándola continuamente hasta que se espesa. Se retira del mechero y se remueven las burbujas con una bomba de vacío. El almidón se vacía en un molde procurando sacar todas las burbujas que hayan quedado. Cuando el gel se ha enfriado se coloca en cada celdilla de éste, con la ayuda de un tubo capilar, una muestra del sobrenadante. Como patrón de referencia se utilizó plasma humano, cuyas isoenzimas han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas. Se recubren las celdillas con parafina derretida y se corre por 16 horas a 4°C aplicando 12.5 ma. a 200 v. con una fuente de poder Heathkit 1 pw. 17.

En la cubeta correspondiente al polo negativo se colocan 75 cc. de buffer stock y 600 cc. de agua destilada y en la correspondiente al polo positivo 100 cc. de buffer stock en 600 cc. de agua destilada.

Las tajadas se tiñen, una con naphthol blue black (3.5 gr. en 1 litro de solución blanqueadora) para detectar proteínas en general y la otra con una sal de ácido málico con el colorante NBT para detectar actividad de MDH. Esta última tajada se deja en la oscuridad hasta que aparecen las bandas púrpuras de actividad de MDH. El gel se fija en solución blanqueadora (ácido acético metanol y agua destilada 1:5:5). Esta solución se usa también para retirar el exceso de naphthol blue black.

RESULTADOS

Para determinar la localización de las enzimas se obtuvo el índice de migración relativa de cada una de las bandas, este índice corresponde a la relación a/b , en donde el valor de a corresponde a la distancia en milímetros desde el punto de iniciación del recorrido de la muestra de la deshidrogenasa málica, hasta el extremo de migración en la parte media de cada banda. El valor de b corresponde a la banda de mayor migración del control, en este caso el plasma humano.

Las bandas se numeraron así: la banda de migración más anódica se denominó la banda 1. La banda de menor migración anódica se denominó como la banda 3, siendo la banda 2 la intermedia.

La Tabla No. 1, presenta las migraciones de las bandas en los diferentes estados estudiados y las figuras 1 a 11 los electroferogramas representativos de las siguientes etapas del desarrollo: huevos sin fertilizar (estado 1), primero, segundo y tercer clivaje (estados 3, 4 y 5), blástula (estado 8), gástrula (estado 12), neurula (estado 16), botón de cola (estado 17) y embriones de 5, 7 y 11 milímetros (estados 20, 21 y 22 respectivamente).

En todos los casos estudiados se detectan las tres bandas descritas pero con algunas variaciones. En el estado 3, correspondiente al primer clivaje (Figura 2) se puede observar una mayor coloración de las bandas 2 y 3, las cuales se presentan extendidas.

En el estado 4 correspondiente al segundo clivaje (Figura 3) hay una disminución en el color de las tres bandas con relación a la muestra de primer clivaje (Figura 4), en la cual también se observan las tres bandas.

La Figura 5 indica la fase de blástula (Estado 8) en la cual se nota una mayor intensidad de las bandas 2 y 3. Esta se acentúa en la fase de gástrula (Estado 12, Figura 6), notándose además unos límites más claros en cada

Estado		Huevos sin fertilizar	Primer clivaje	Segundo clivaje	Tercer clivaje	Blástula	Gástrula	Néurula	Botón de Cola	Embrión 5 mm.	Embrión 7 mm.	Embrión 11 mm.
Promedio	B ₁	52.30	52.55	50.92	52.05	52.83	55.22	51.94	51.16	53.77	51.05	50.94
Migración	B ₂	34.68	35.33	32.94	33.50	33.92	36.44	33.88	33.55	34.97	34.38	33.66
Real	B ₃	14.94	16.33	13.94	14.55	14.98	17.00	15.72	14.61	15.00	13.99	13.77
Promedio	B ₁	1.136	1.142	1.111	1.135	1.148	1.187	1.134	1.132	1.144	1.114	1.112
Migración	B ₂	0.742	0.768	0.719	0.728	0.737	0.783	0.739	0.732	0.741	0.750	0.734
Relativa	B ₃	0.337	0.355	0.305	0.317	0.325	0.365	0.343	0.318	0.327	0.305	0.300

TABLA 1

Promedios de migración real y migración relativa de las isozimas de MDH en huevos sin fertilizar, primero, segundo y tercer clivaje, blástula, gástrula, néurula, botón de cola, embrión de 5, 7 y 11 mm. de *Hyla labialis*.

una de las bandas. Las bandas son más definidas a nivel neurula (Estado 16, Figura 7) y botón de cola, (estado 17, Figura 8) pero las intensidades de tinción son menores que en la fase de gástrula.

DISCUSION

De acuerdo con los trabajos de Mackintosh y Bell en 1963 confirmados por las investigaciones de Dixon y Webb en 1964, tanto la Deshidrogenasa del Acido Láctico como la del Acido Málico son el producto de la unión de dos subunidades diferentes formando varias clases de tetrameros. Estas combinaciones producirían cinco formas isozímicas, las cuales difieren en su movilidad electroforética y punto isoeléctrico, entre otras propiedades, sin embargo para ambas enzimas se han presentado informes de casos en los cuales aparece un número diferente de bandas. Por ejemplo, Vescel y Bearn en 1957, trabajando con plasma humano, demostraron la presencia de tres isozimas de LDH y en 1967 Francesconi y Vilee encontraron ocho bandas con actividad de MDH en los huevos sin fertilizar de *Arbacia punctulata*. Pero parece que el caso más común se relaciona con organismos o tejidos en los cuales aparecen cinco bandas con actividad de LDH y dos bandas con actividad de MDH (Wiggert y Vilee, 1964).

En el presente trabajo los resultados obtenidos en las primeras etapas del desarrollo de *Hyla labialis* utilizando el método de electroforesis en gel de almidón sólo permitieron detectar tres bandas, sin que pueda excluirse la posibilidad de que en cada banda haya más de una. Resultados similares obtuvieron Moore y Vilee (1962) en embriones de erizo de mar con 48 horas de desarrollo.

Si se acepta que la intensidad de la coloración refleja la concentración de la enzima, en la figura 1 correspondiente a huevos sin fertilizar hay una cantidad relativamente baja de la MDH activa, lo cual está de acuerdo

con su bajo consumo de oxígeno observado por George, Escamilla y Manrique en 1979.

Teniendo en cuenta que el número de huevos o embriones utilizados en cada experimento fue el mismo, se podría asumir, que la cantidad de material utilizado por experimento fue constante. Es necesario sin embargo tener en cuenta que no se tomó control de peso seco y que la solubilidad de la enzima en el buffer puede variar en las diferentes etapas del desarrollo. Asumiendo cantidades constantes de material utilizado y juzgando la concentración de enzima por el grado de tinción que se observa en las bandas, se nota que con la fertilización se aumenta la cantidad de MDH y que las bandas B₃ y B₂ no son tan limitadas en estos estados como en los huevos no fertilizados (Figuras 1 a 8). Esta falta de límites podría indicar la presencia de bandas adicionales que podrían relacionarse en alguna forma con el aumento en el metabolismo aeróbico reportado por George, Escamilla y Manrique (1979) después de la fertilización.

Durante los estados 4 y 5 correspondientes al segundo y tercer clivajes (Figuras 3 y 4) se mantienen las concentraciones en las bandas 2 pero disminuyen en las bandas 3. Los autores anteriormente citados observaron que en la gráfica de consumo de oxígeno se nota una cierta nivelación y hasta un descenso que se hace más notorio en el estado de blástula, estado en el cual las bandas de MDH comienzan a presentar una mayor intensidad en la coloración. Esto podría indicar la formación de enzimas en una etapa de preparación para gastrulación etapa en la que hay un aumento repentino en el consumo de oxígeno.

La curva de consumo de oxígeno (George, Escamilla y Manrique, 1979), muestra un punto máximo en el estado de neurula, observación que concuerda con la fuerte tinción que se nota en las bandas de la MDH en este estado (Figura 7). La intensidad de tinción disminuye en el último estado estudiado o sea embrión de 11 mm (figura 11).

Este descenso se puede explicar teniendo en cuenta que el número de embriones utilizado fue aproximadamente la mitad del número de huevos utilizados. Esto se hizo debido a que el exceso de concentración de la enzima hacía perder por sobreposición la resolución de las bandas. Por tanto, se puede asumir que la concentración de MDH, en igual número de especímenes sería en realidad, mayor en el estado de botón de cola, correlacionándola de nuevo con un mayor consumo de oxígeno observado en esta etapa del desarrollo de *Hyla labialis*.

RESUMEN

Con la técnica de electroforesis Vertical en gel de almidón se estudió la deshidrogenasa málica en los primeros estados de desarrollo de *Hyla labialis*. Aparecieron siempre tres bandas aunque se presentaron variaciones en las concentraciones de las isoenzimas a juzgar por la intensidad de tinción de las mismas. Se discute estas variaciones.

BIBLIOGRAFIA

- Boyer, S.H., D.C. Fainer and E.J. Watson-Williams. 1963. Lactate dehydrogenase variant from human blood. Evidence for molecular sub-units. Science. 141: 642-643.
- Dixon, M. and E.C. Weeb. 1964. Enzymes. 2nd. Ed. Logmans. Cree & Co. Ltda. London.
- Dunn, E.R. 1944. Herpetology of the Bogotá Area. Rev. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 6, 21, PP: 68-61.
- Engel, Wolfgang and U. Wolf. 1971. Synchronous activation of the alleles coding for the S-form of the NADP- dependent MDH during embryologic development of the mouse. Humangenetik 12:2: 162-166.
- Englard, S. and H.H. Breiger. 1962. Beef-Heart Malic dehydrogenases. Preparation and properties of crystalline supernatant Malic dehydrogenase. Biochem. Biophys. Acta. 56:571-583.
- Francesconi, R.P. and C.A. Villee. 1967. Changes in the Malic dehydrogenase isoenzymes of *Arbacia* during the early development. Science 141: 388-390.
- George, J.F., I. Escamilla y C. Manrique. 1979. Consumo de oxígeno en las primeras etapas del desarrollo de *Hyla labialis*. En publicación.
- Grossman, L., N.O. Kaplan and C.J.R. Thorne. 1963. Studies of the multiple electroforetic forms of pig's MDH. Biochem. Biophys. Acta. 73: 193-203.
- Latner, A.L. and A.W. Skillen. 1962. Visual demonstration of isoenzyme activity after starch gel electrophoresis. Pro. Assoc. Clin. Bioche. 2:3-5.
- Mackintosh, F.R. and E. Bell. 1963. Biochem. Biophys. Res. Commun 27:245. In: Bell E. 1969. Molecular and cellular aspects of development. A Harper International Edition. New York.
- Manwell, C. 1966. Electrophoresis: Dehydrogenases, esterases, phosphatases and other soluble proteins in the tad pole and adult frog. Comp. Bioche. Physiol 17: 805-823.
- Markert, C.C.L. and Moller. F. 1959. Multiple forms of enzymes tissue ontogenetic and species specific patterns. Ann. N.Y. Acad. Sci. 451: 753-763.
- Moore, R.O. and C.A. Villee. 1962. Malic Dehydrogenase in separated blastomeres of sea urchin embryos. Science 142: 389-390.
- Pakhomov, A.N. and A.P. Perevozchikov. 1971. Electrophoretic studies of the spectrum of the multiple MDH forms during the development of skeletal muscle in chicken. Vestn. Leningrad. Univ. Ser. Biol. 26:9: 73-80.
- Ryan, F. and J. Grant. 1940. The stimulus for maturation and for ovulation of the frog's eggs. Physiol. Zool. 13:383-389.
- Siegel, L. and B.B. Englard. 1972. Res. Commun. 6: 171. In: Kitto, G.B. and R.G. Lewis, 1967. Purification and properties of tuna supernatant and Mitochondrial MDH. Biochem. Biophys. Acta. 73: 193-203.
- Thorne, C.J. and P.M. Cooper. 1963. Biochem. Biophys. Acta. 81: 397. In: Kitto, G.B. 1967. Malate dehydrogenase: Purification and properties in Ostrich's heart. Biochem. Biophys. Acta. 139: 16-23.
- Tsao, M.U. 1960. Heterogeneity of tissue dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 90: 234-238.
- Vessel, E.S. and A.G. Bearn. 1957. Localization of a lactic dehydrogenase activity in serum fractions. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 94: 96-99.
- Weyer, E.M. 1968. Multiple molecular forms of enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151. Art. 1.
- Wiggert, B.O. and C.A. Villee. 1962. Science 138: 509. In: Moore R. and C.A. Villee. 1963. Malate Dehydrogenase: Multiple forms in separated blastomeres of sea urchin embryos. Science 142: 389-390.
- and C.A. Villee. 1964. Multiple molecular forms of MDH and LDH during development. J. Biol. Chem 239: 444-451.

En el presente trabajo se estudió la deshidrogenasa málica en los primeros estados del desarrollo de *Hyla labialis* utilizando el método de electroforesis en gel de almidón. Se permitieron detectar tres bandas, sin que pueda excluirse la posibilidad de que en cada banda haya más de una. Resultados similares obtuvieron Moore y Villee (1962) en embriones de rizo de mar con 48 horas de desarrollo.

Si se acepta que la intensidad de la coloración refleja la concentración de la enzima, en la figura 1 correspondiente a huevos sin fertilizar hay una cantidad relativamente baja de la MDH activa, lo cual está de acuerdo

El presente trabajo se realizó en la estación biológica de la Universidad de Bogotá, Colombia, en el mes de mayo de 1979, gracias al apoyo económico de la Universidad de Bogotá y del Departamento de Biología de la Universidad de Bogotá.

La curva de consumo de oxígeno (George, Escamilla y Manrique, 1979), muestra un punto máximo en el estado de botón de cola, observándose una coincidencia con la fuerte tinción que se nota en las bandas de la MDH en este estado (Figura 7). La intensidad de tinción disminuye en el último estado estudiado o sea embrión de 11 mm (Figura 11).