Patrón electroforético y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa de músculo esquelético y cardíaco de *Discoglossus pictus* (Otth) y *Rana ridibunda* (Pallas)

J. Costa-Ruiz, A. Sigüenza, G. Barja de Quiroga,
M. Alonso-Bedate y A. Fraile

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Biología
Universidad Complutense
Madrid (España)

(Recibido el 21 de diciembre de 1977)

J. COSTA RUIZ, A. SIGÜENZA, G. BARJA DE QUIROGA, M. ALONSO-BEDATE and A. FRAILE. *Electrophoretic Pattern and Activity of Lactate Dehydrogenase in Discoglossus pictus (Otth) and Rana ridibunda (Pallas) Skeletal Muscle and Heart*. Rev. esp. Fisiol., 34, 401-406. 1978.

The electrophoretic isozyme patterns, total and specific activity of lactate dehydrogenase on skeletal and cardiac muscles in *Discoglossus pictus* and *Rana ridibunda* have been studied.

The isozymes were separated out in polyacrylamide gels. The LDH activity bands were developed selectively. The percentage of the H subunits are significantly higher in *Discoglossus* than in *Rana*, probably because *Rana* is subjected to more severe anaerobic conditions during the hibernation time.

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (E.C. 1.1.1.27) presenta, en la mayoría de los vertebrados, cinco tipos isoenzimáticos, derivados de la combinación de dos cadenas polipeptídicas diferentes, designadas como «H» (Heart) y «M» (Muscle). Las cinco formas moleculares difieren en su carga eléctrica y pueden ser separadas, por consiguiente, por electroforesis, siendo la LDH-1 (H₄) la más anódica y la LDH-5 (M₄) la más catódica.

Se ha puesto de manifiesto actualmente que la distribución relativa de las isoenzimas de LDH es diferente en cada tejido. Esta variación se ha correlacionado con la función metabólica específica de los distintos tejidos. Así, algunos autores han propuesto (9) que, en mamíferos, los tejidos que pueden funcionar en anaerobiosis, como el músculo esquelético, contienen un porcentaje mayor de subunidades M, mientras que los tejidos con un metabolismo más aerobio, como el cora-

zón y el cerebro, contienen un porcentaje mayor de subunidades H.

En mamíferos invernantes (7) y en heterotermos durante el letargo (6), se han encontrado incrementos significativos de las subunidades M en relación con la acomodación al frío. En estos últimos casos se supuso que este aumento era debido a las condiciones anaerobias, consecuencia del letargo. También se han realizado estudios que relacionan la distribución relativa de las isoenzimas de LDH con la adaptación a determinados ambientes ecológicos, la acción de la temperatura y de la dieta, etc., tanto en mamíferos como en otros vertebrados (12, 15).

En *Discoglossus pictus* (anfibio anuro, Otth), se encuentran las cinco formas isoenzimáticas en todos los tejidos, aunque en porcentajes diferentes. El corazón se incluye dentro del tipo H y el músculo esquelético dentro del tipo M (2, 3).

Rana ridibunda (Pallas) no presenta la isoenzima LDH-2 en ninguno de sus tejidos; y hasta el momento actual no se ha realizado ningún estudio detallado sobre el porcentaje de actividad de sus isoenzimas (1).

Nos ha parecido de interés estudiar comparativamente los patrones electroforéticos, así como también la actividad específica de la enzima LDH, en el músculo esquelético y en el cardíaco de *Discoglossus pictus* y *Rana ridibunda*, debido a que el primero posee una extraordinaria actividad, gran agilidad, varios períodos de puesta de huevos al año y no presenta un verdadero letargo invernal, siendo por tanto prácticamente activo durante todo el año, mientras que por el contrario *Rana ridibunda* presenta un largo período de invernación, durante el cual un cambio o acomodación a un tipo de metabolismo más anaerobio podría ser esencial.

Material y métodos

Como material biológico fueron utilizados animales hembras de dos géneros

de anfibios anuros diferentes: *Discoglossus pictus pictus* (OTT), variedad a manchas, y *Rana ridibunda* (Pallas). Los ejemplares de *Discoglossus* fueron capturados en octubre, en los alrededores de Madrid; los de *Rana* fueron traídos al laboratorio en septiembre, procedentes de Tarragona. Todos los animales se utilizaron dentro de la semana a partir de su captura. Durante este período se mantuvieron en el laboratorio a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Los tejidos se homogeneizaron en frío en Tris-ClH (0,1 M) a pH 7,4 conteniendo 0,25 M sacarosa, en un homogeneizador de cristal tipo Pobel. Se utilizaron 20 mg de tejido por ml de solución, con excepción del músculo cardíaco de *Rana*, para el que se usaron solamente 10 mg por ml de Tris-ClH sacarosa.

El homogenado se centrifugó a 6.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se conservó congelado y, generalmente, se usó antes de las 48 horas, descongelándose una sola vez.

Para la separación de las isoenzimas se aplicaron los métodos de ORSTEIN (13) y de DAVIS (8) con ciertas modificaciones. Se utilizó un aparato de electroforesis Shandon, con 16 columnas verticales que contienen un gel doble de poliacrilamida (2,5 % arriba y 6,5 % abajo). La electroforesis se realizó durante 1 hora y 15 minutos para los tejidos de *Rana*, a 8°C e intensidad constante de 4 mA por tubo. Para los tejidos de *Discoglossus*, el tiempo de electroforesis fue de 1 hora y 30 minutos, a una intensidad constante de 3 mA por tubo, proporcionada por una fuente de alimentación tipo Shandon Vokam, SAE, 3276.

Las bandas de actividad LDH se visualizaron incubando los geles en oscuridad a 37°C durante 7 minutos, en una solución conteniendo 24 ml de solución tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5; 12 ml de DL lactato sódico (0,4 M), pH 7,5; 0,6 ml de PMS (metasulfato de fenazina) 2 mg/ml; 14 ml de NBT (nitroazul de tetrazolio) 2 mg/ml y 40 mg de NAD (Merck).

Las isoenzimas se cuantificaron en un densitómetro tipo Chromoscan, Joice Loeb. Los geles se fotografiaron y conservaron en oscuridad en 7,5 % de ácido acético.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la «t» de Student. Los resultados experimentales se expresaron en las tablas como la media $\pm$ la desviación típica, considerando como significativas las diferencias cuya *t* correspondió a una probabilidad menor de 0,05.

Para medir la actividad total de la LDH se siguió el método de BERGMAYER *et al.* (5) con algunas modificaciones. Se utilizó tampón fosfato (0,05 M), pH 7,4, piruvato ($3,1 \times 10^{-4}$ M) y NADH (8×10^{-3} M) a 30° C y se midieron a una longitud de onda de 340 nm.

Se midieron los μ moles de NADH oxidados por minuto por mg de tejido fresco por cm de paso de luz de la cubeta, utilizando como coeficientes de extinción molar del NADH 6.220 litros mol⁻¹ cm⁻¹.

Para medir la actividad específica se determinaron las proteínas por el método de LOWRY *et al.* (11), expresándose en μ moles de NADH oxidados por minuto por mg de proteína.

Resultados

En el músculo esquelético de *Discoglossus pictus* se encuentran presentes las cinco isoenzimas de LDH, aumentando su actividad relativa desde $4,46 \pm 1,41$ para a LDH-1 hasta $64,54 \pm 3,29$ para la LDH-5, siendo progresivo este incremento en lo que se refiere a las isoenzimas restantes. En el patrón de isoenzimas en el músculo esquelético de *Rana* solamente aparecen las isoenzimas LDH-1 y LDH-5, siendo el valor de la LDH-1 igual a $1,02 \pm 0,32$ y el de la LDH-5 igual a $98,98 \pm 0,32$ (tabla I).

Comparando ambos resultados se observa que, en *Discoglossus*, las subunidades H son significativamente más altas que en *Rana* ($p < 0,001$).

En el músculo cardíaco de *Discoglossus*, al contrario de lo que sucede en músculo esquelético, la actividad relativa mayor la presenta la LDH-1 con una media igual a $38,16 \pm 3,8$, descendiendo las isoenzimas gradualmente hasta $2,87 \pm 0,55$ para la LDH-5. Por lo tanto, el patrón de isoenzimas en el corazón está invertido con respecto al patrón en el músculo esquelético.

Tabla I. Distribución relativa de las isoenzimas de LDH del músculo esquelético y cardíaco de *Discoglossus pictus* (Otth) y *Rana ridibunda* (Pallas). Entre paréntesis se representa el número de animales por grupo. Las subunidades H son significativamente mayores en *Discoglossus* que en *Rana* ($p < 0,001$).

	Discoglossus pictus		Rana ridibunda	
	m. esquelético (6)	m. cardíaco (8)	m. esquelético (5)	m. cardíaco (5)
<i>Isoenzimas (%)</i>				
LDH-1	$4,46 \pm 1,41$	$38,16 \pm 3,84$	$1,02 \pm 0,32$	$46,04 \pm 7,54$
2	$6,18 \pm 0,88$	$33,63 \pm 2,38$	—	—
3	$10,75 \pm 1,80$	$18,89 \pm 2,45$	—	$5,93 \pm 1,83$
4	$14,13 \pm 3,10$	$6,45 \pm 1,63$	—	$36,13 \pm 6,08$
5	$64,54 \pm 3,29$	$2,87 \pm 0,55$	$98,98 \pm 0,32$	$11,9 \pm 3,4$
<i>Monómeros (%)</i>				
H	$17,98 \pm 1,20$	$74,44 \pm 2,49$	$1,02 \pm 0,32$	$58,04 \pm 6,61$
M	$82,02 \pm 1,20$	$25,56 \pm 2,49$	$98,98 \pm 0,32$	$41,96 \pm 6,61$

Tabla II. *Actividad total y específica de LDH en músculo esquelético y cardíaco de Discoglossus pictus y Rana ridibunda.*

Entre paréntesis se representa el número de animales por grupo. Los resultados se expresan como la media $\pm$ la desviación típica.

	«Discoglossus pictus»		«Rana ridibunda»	
	m. esquelético (8)	m. cardíaco (7)	m. esquelético (6)	m. cardíaco (7)
Activ. total μ moles subs/ min/mg tej.	0,4373 $\pm$ 0,06	0,2905 $\pm$ 0,08	0,5192 $\pm$ 0,06 *	0,3133 $\pm$ 0,03
Activ. específica μ moles subs/ min/mg prot.	6,4968 $\pm$ 0,66	5,330 $\pm$ 1,14	8,3274 $\pm$ 0,69 **	5,9781 $\pm$ 0,51

* Incremento significativo comparado con «Discoglossus» ($p < 0,05$).

** Incremento significativo comparado con «Discoglossus» ($p < 0,001$).

El porcentaje de actividad de las isoenzimas de LDH en corazón de *Rana* aparece en la tabla I. No existe la isoenzima LDH-2, siendo la LDH-1 y la LDH-4 las que presentan mayor actividad.

Cuando se comparan estos resultados se deduce que los monómeros H en el músculo cardíaco son significativamente más elevados en *Discoglossus* que en *Rana*, con $p < 0,001$ (tabla I).

Las actividades total y específica de LDH en músculo esquelético de *Rana* son significativamente más altas que en *Discoglossus* ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente). En músculo cardíaco no se aprecian diferencias significativas ni en la actividad total ni en la actividad específica (tabla II).

Discusión

Discoglossus pictus es un anfibio anuro que no presenta período de invernación propiamente dicho. Es activo durante todo el año y desarrolla esquemas de comportamiento tales como la huida de las zonas de temperaturas extremas. Aun así, durante el período invernal debe sufrir una serie de transformaciones metabólicas que conduzcan al mantenimiento de la actividad a pesar de las bajas temperaturas.

El patrón electroforético de las isoenzimas de DH encontrado en el corazón y en el músculo de *Discoglossus pictus* está más cercano al patrón que presentan los mamíferos que al de *Rana ridibunda*, no sólo en la distribución de sus isoenzimas sino también en su velocidad electroforética. En *Discoglossus*, como en mamíferos, en el músculo esquelético, la actividad relativa máxima la presenta la isoenzima LDH-5 descendiendo progresivamente hacia un mínimo para la LDH-1. El corazón tiene este patrón invertido. Las subunidades H en el corazón de *Discoglossus* representan el 72 %, en relación con el 58 % en *Rana*, lo cual indicaría un metabolismo más aerobio en *Discoglossus*. Estos resultados podrían interpretarse en el sentido de que, durante la evolución, ha habido una convergencia. Estos resultados no nos permiten deducir que *Discoglossus* se encuentre en la misma línea evolutiva de los vertebrados superiores.

La isoenzima LDH-1 (10) funcionaría en el corazón únicamente como lactato deshidrogenasa, es decir, oxidando el lactato que llega al corazón a través del torrente sanguíneo. Por otro lado, la presencia en el zimograma de LDH de tejido cardíaco de *Rana*, de una actividad relativa LDH-4 (que funciona mejor en condiciones anaerobias) mayor que en *Disco-*

glossus, podría indicar la posibilidad de un metabolismo anaerobio producido en unas determinadas condiciones de vida del animal, en las que disminuyen las posibilidades de oxígeno, como es en la invernación.

En *Discoglossus*, las actividades total y específica de LDH en el músculo esquelético son menores que en *Rana*. De acuerdo con los resultados de otros investigadores (4) comparando otras especies de anfibios, el músculo esquelético de *Rana* presentaría un metabolismo anaerobio durante la actividad y se fatigaría rápidamente, mientras que el de *Discoglossus* formaría menos lactato y permanecería aerobio, de acuerdo con resultados previos no publicados. Se ha observado al microscopio electrónico que, tanto el número de las mitocondrias como la complejidad de las crestas mitocondriales son mayores en *Discoglossus*. Al mismo tiempo, se observa un mayor espesor de la línea Z, que parece estar relacionado con una mayor resistencia a la fatiga (14).

Resumen

Se estudian comparativamente los patrones electroforéticos y las actividades total y específica de la enzima lactato deshidrogenasa en el músculo esquelético y cardíaco de dos géneros de anfibios anuros, *Discoglossus pictus* y *Rana ridibunda*. Las isoenzimas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se comparan los resultados y se relacionan con las diferentes condiciones ambientales. El porcentaje de subunidades H son significativamente más altas en *Discoglossus* que en *Rana*, probablemente debido a que *Rana* está sujeta a condiciones más anaerobias durante el período de invernación.

Bibliografía

1. ALONSO-BEDATE, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 125-130, 1973.
2. ALONSO-BEDATE, M. y TORRELLAS, A.: *Acta Embryol. Exp.*, **3**, 313-322, 1973.
3. ALONSO-BEDATE, M., BUENO, R. y DE COSTA, J.: *Acta Embryol. Exp.*, **3**, 345-354, 1976.
4. BENNET, A. F.: *Amer. J. Physiol.*, **226**, 1149-1151, 1974.
5. BERGMAYER, H. U., BERNT, E. y HESS, B.: *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmayer, ed.), Academic Press. Nueva York, 1965, pp. 736-743.
6. BRUSH, A. H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **27**, 113-120, 1968.
7. BURLINGTON, R. F. y SAMPSON, J. H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **25**, 185-192, 1968.
8. DAVIS, B. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427, 1964.
9. DAWSON, D. M., GOODFRIEND, T. L. y KAPLAN, N. O.: *Science, N.Y.*, **143**, 929-933, 1964.
10. EVERSE, J. y KAPLAN, N. O.: En «Isozymes II. Physiological function» (C. L. Market, ed.), Academic Press, Nueva York, 1975, pp. 29-43.
11. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
12. OGIHARA, M.: En «Isozymes II. Physiological functions» (C. L. Market, ed.), Academic Press, Nueva York, 1975, pp. 157-170.
13. ORSTEIN, L.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349, 1964.
14. SCHIAFFINO, S., LIKOVA, H. y PIEROBONS, S.: *J. Cell. Biol.*, **47**, 107-109, 1970.
15. SHAKLEE, J. B., CHRISTIANSEN, J. A., SIDELL, B. D., PROSSER, C. L. y WHITT, G. S.: *J. Exp. Zool.*, **201**, 1-20, 1977.