Identificación y caracterización de las isoenzimas de la LDH (Lactato Deshidrogenasa) durante el Desarrollo Tardío en alevinos de *Onchorhyncus mykiss*, en variedades importadas

Jorge Mario Cárdenas Paredes

Trabajo de Grado
Presentado como Requisito Parcial
Para optar el Título de:

Biólogo

Director de Tesis
Daniel Cadena PhD.

Co-Director de Tesis
Alfredo Uribe Msc.

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias Biológicas
Bogotá D.C, 2007

Agradecimientos

Al Señor Soberano Jehová Creador del Universo, por permitirme llevar a cabo este trabajo de grado y darme la oportunidad de terminarlo satisfactoriamente y a cabalidad, sin ningún contratiempo ya que sin su ayuda hubiese sido imposible.

A mis Padres Luis Ernesto y Inés Elvira, por haberme apoyado incondicionalmente en mí proceso de formación académica y profesional y que aún lo siguen haciendo. Estoy infinitamente agradecido con ellos.

Al Profesor Daniel Cadena, por su arduo esfuerzo en la dirección de este trabajo de grado aun no siendo su área, seguramente aprendiendo mucho y complementando con su vasta experiencia; por su apoyo constante en el proceso y en las correcciones de este documento para que fuera claro y sencillo. Muchas gracias Daniel.

Al Profesor Alfredo Uribe, por su gran paciencia en la codirección de este trabajo de grado, por su interés genuino en este trabajo, en su control de calidad y por la calidad docente que lo caracteriza, identificándolo como un excelente profesor y científico.

A mi Grupo forense, al Dr. Manuel Paredes, Érica salguero, Luz Adriana Pérez, Lorena Salazar, Luisa Castillo y María Andrea Hernández por su apoyo académico, emocional y su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Profesora Marina Ordoñez, por su apoyo incondicional todo el tiempo que duro este trabajo desde el principio hasta el final.

Y a todos aquellos que me colaboraron de una manera u otra, Muchas Gracias!!!

1. Resumen

Con el fin de identificar y caracterizar las isoenzimas de la Lactato Deshidrogenasa presentes en el estadio del desarrollo del Alevino de *Onchorhyncus mykiss,* trucha arco iris, se realizaron extracciones de proteínas totales, las cuales se obtuvieron, homogenizando los individuos de diferentes tamaños, como fueron 2 cm, 3 cm y 4cm de longitud (Tratamientos); El último tratamiento (4cm) se dividió en tres diferentes grupos como fueron, Músculo esquelético, Vísceras (Vejiga Natatoria y sistema digestivo) y Ojos. A todos los tratamientos se les determinó la actividad total de la isoenzima presente para cada tamaño espectrofotométricamente a 340 nm, la cual fue estadísticamente significativa (P=0.000) para todos los tratamientos bajo un análisis de varianza (N=25 para cada uno de los tratamientos). Luego con el fin de visualizar las distintas isoenzimas presentes en los distintos tamaños de individuos se corrió para cada uno de los tratamientos una electroforesis en gel de agarosa que separó las diferentes isoformas presentes y luego se analizaron los geles.

Para los diferentes tratamientos se encontró una expresión diferencial para las diferentes isoenzimas, donde la isoforma 5 (LDH-5), fue la que siempre se visualizó en todos los diferentes geles corridos de los distintos tratamientos con una gran intensidad en las bandas electroforéticas, lo cual se puede relacionarse con una alta concentración presente en la muestra. Las demás isoformas que se encontraron para los distintos tratamientos, se pudo identificar

las isoformas 1, 2, 3 y 4 (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4) a lo largo de los diferentes tejidos y de los individuos más desarrollados.

Palabras Claves: *Onchorhyncus mykiss*, Alevinos, LDH, Isoenzimas.

Tabla de Contenidos

Página

1. **Introducción**…….…….…..… 8
2. **Justificación**……12
3. **Objetivos**…….….…13

3.1 Objetivo General……...….…13

3.2 Objetivo Específico……...….13

4. **Marco Teórico** ……...….…….14

4.1 Características Bioquímicas de las isoenzimas de la LDH…….…....16

4.2 LDH en los peces……18

5. **Metodología**……....24
6. **Resultados**……..28
7. **Discusión de Resultados**……..….34
8. **Conclusiones**…….....…41
9. **Recomendaciones**……...…42
10. **Bibliografía**…….…...….43

Índice de Figuras

Figura 1. Reacción catalizada por la enzima Lactato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), la cual es dependiente del pH, favoreciendo la formación del lactato a piruvato (pH > 7) o la formación de piruvato a lactato (pH = 7)

Figura 2. Patrón electroforético en gel de agarosa de las distintas isoenzimas de la Lactato deshidrogenasa, lo cual permite que las diferentes isoformas migren diferencialmente, debido a la carga neta de cada una de ellas. (pH de 8.6). Tomado y modificado de Maestre, 2004.

Figura 3. Alevinos de *Onchorhyncus mykiss*. (a) 1 día después de de la eclosión. (b) Alevinos 4 días después de la eclosión, donde se ve la reducción parcial del saco vitelino. (c) Alevinos de 14 días después de la eclosión, donde el saco vitelino aún se encuentra presente. (d) Alevinos de 21 días después de la eclosión, donde el saco vitelino se ha reabsorbido por completo.

Figura 4. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, (a) Patrón Electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para alevinos de 2 cm de longitud.

Figura 5. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para alevinos 3 cm de longitud.

Figura 6. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en músculo esquelético de alevinos de 4 cm de longitud.

Figura 7. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para vísceras de alevinos de 4 cm de longitud.

Figura 8. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para alevinos 4 Cm de longitud – ojos.

Figura 9. Actividad enzimática total para los diferentes tratamientos; A2, alevino de 2 cm de Longitud; A3, alevino de 3 cm de Longitud; A4Mus, músculo esquelético de alevino de 4 cm; A4Ojos, ojos de alevino de 4 cm; A4Vis, vísceras de alevino de 4 cm. Las cajas encierran la media mitad de los datos (rango intercuartílico), la línea que divide las cajas es el valor para la mediana y las líneas verticales en los extremos, whiskers, indican la extensión de observaciones de los datos del mayor al menor. Letras (A, B, C), Comparación múltiple de Tukey para las actividades totales de los diferentes tratamientos (gl=4, α=0.05) Se encuentran diferencias significativamente altas en las medias de las actividades totales de los tratamientos 2, 3, 4

1. Introducción

Uno de los temas centrales de la biología del desarrollo es la especialización progresiva de los individuos a lo largo de la embriogénesis y la diferenciación que ocurre a nivel molecular y celular en cada uno de los momentos del desarrollo animal. A través de la investigación y experimentación en la biología del desarrollo, se han establecido muchos organismos modelo con el fin de estudiar su comportamiento tanto celular como molecular y bioquímico, durante la fertilización, la embriogénesis y los estadios precedidos por la eclosión. Aunado con esto, la mayoría de estudios se han enfocado hacia la biología comparativa entre los distintos organismos modelo de los diferentes taxones, todo con el objetivo principal de comprender a mayor grado el desarrollo embrionario y los mecanismos tanto celulares como moleculares que están asociados a la especialización de tejidos y células en los seres humanos. Los estudios en biología del desarrollo pueden estar enfocados en una gran diversidad de temas, y suelen involucrar disciplinas complementarias como la biología molecular, la bioquímica y la genética. Esta última disciplina complementaria ha tenido un desenvolvimiento muy significativo en la comprensión de la expresión génica diferencial en los diferentes estadios del desarrollo de los individuos, por lo que gran parte de investigación actual en la biología del desarrollo está orientada hacia la genética molecular y la genética del desarrollo. El área de la genética de desarrollo tuvo como objetivo desde su conformación unir la biología experimental con la genética, cuya contribución radica en el estudio de los genes que confieren

características particulares al fenotipo de los individuos. De esta manera, se consolidó como premisa principal para la genética del desarrollo establecer cómo el genotipo de un individuo puede transformarse en lo que se aprecia en el fenotipo. Por esta razón, el paradigma central de esta disciplina es la expresión génica diferencial de un mismo repertorio nuclear (Gilbert, 2006).

La expresión diferencial explica que por señales moleculares y por la diferenciación celular, las células tienen un destino particular que depende del lugar espacial donde se encuentren en el embrión. Por esta razón, en diferentes tejidos y partes del embrión pueden expresarse algunas proteínas que en otras partes y células no. Esto está gobernado por múltiples mecanismos, como los factores de transcripción, la metilación de las histonas y otros mecanismos de regulación hormonal (Gilbert, 2006).

Por este motivo, unas de las preguntas que frecuentemente la biología del desarrollo debe afrontar son las de cómo los genes controlan los procesos del desarrollo, y cómo el ambiente externo y celular controlan la expresión diferencial de los genes (Whitt, 1979). Este trabajo tiene como objetivo encontrar una respuesta a la pregunta de cuáles son los mecanismos que juegan un papel en la expresión diferencial, por medio de una aproximación enzimática. Usando un repertorio enzimático específico, es decir la batería de enzimas metabólicas de un individuo, se pretende entender cómo ésta tiene una participación importante a través del control transcripcional y postranscripcional, lo que puede ayudar a entender la expresión diferencial en diferentes tejidos (Paigen, 1979).

La detección de un gen a nivel enzimático es muy específico, ya que el gen transcrito se traduce en un enzima, la cual cataliza alguna reacción, es decir la conversión de un sustrato a un producto específico. Este producto esta relacionado de esta manera con la cantidad de sustrato; si existen altos niveles de la enzima activa que catalice la reacción, como consecuencia se asume que debe haber una alta transcripción del gen en particular y de esta manera pueda detectarse. (Whitt, 1979).

La extensa variedad de enzimas metabólicas dan una amplia gama de elección para estudios en diferentes enzimas que sean relevantes en la investigación de una especie en particular en el transcurso de su desarrollo. Los peces han sido una fuente de investigación muy explorada, por el hecho que son organismos fáciles de mantener en laboratorio y por la alta diversidad a nivel molecular que los caracteriza. En los estudios de la ontogenia de diferentes enzimas en peces, es decir su comportamiento de expresión a lo largo del desarrollo embrionario, se ha podido dilucidar el gran espectro de variabilidad molecular de varias enzimas metabólicas en diferentes estadios del desarrollo.

Los trabajos que se han dedicado a la estudio de la ontogenia de las diferentes isoformas de las enzimas (isoenzimas, enzimas de múltiples formas a nivel molecular), evidencian que la especialización celular es debida a la actividad y expresión diferencial de los genes. Esto se puede concluir ya que la expresión de una isoenzima es particular de un estadio o estadios específicos del desarrollo, por lo que cada estadio refleja el metabolismo del embrión y por lo tanto el cambio bioquímico que éste sufre. Por esta razón, es posible correlacionar los estados de

diferenciación morfológica y funcional del desarrollo con el cambio bioquímico que sufre el embrión en un estadio específico de la embriogénesis (Frankel, 1977).

Durante muchos años, el estudio de la ontogenia de las isoenzimas se ha estado explorando cada vez a mayor profundidad en distintos vertebrados. Varios autores concuerdan en que las isoenzimas muestran un patrón de distribución dinámico a través de los distintos estadios del desarrollo, en los diferentes órganos y las distintas especies (Frankel, 1977; Klyachko, 2001; Whitt, 1977). Estos mismos autores postulan que estudiar la expresión diferencial de los genes que controlan las isoenzimas es una forma de ver el cambio de la ontogenia, y prueba de esto es la evidencia que se observa en la diferenciación bioquímica (Maisel et al, 1965). Se han llevado a cabo varios estudios en peces de distintos clados, de distintas isoenzimas de enzimas metabólicas, como la Malato Deshidrogenasa (MDH), Creatina quinasa (CK), Glucosafosfato isomerasa (GLUPH) y Lactato deshidrogenasa (LDH) (Basaglia, 1988). Estos estudios han comprobado que para estadios particulares del desarrollo hay ciertas isoenzimas que se expresan diferencialmente en distintos tejidos.

2. Justificación

Dada la importancia del conocimiento y la experimentación en el área de biología del desarrollo, con este trabajo se pretende aportar el estudio de una de las diferentes ramas del desarrollo embrionario como es la de la ontogenia de las enzimas. Además, con el fin de aportar más conocimientos sobre el desarrollo de *Onchorhyncus mykiss* (Trucha arco iris), especie en la que ya se han realizado algunos estudios sobre desarrollo temprano, se intenta por medio de este trabajo seguir su caracterización enzimática y expresión génica diferencial a nivel de diferentes estadios y en diferentes tejidos. Específicamente, este trabajo se enfoca en la ontogenia de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en el alevino de trucha, un estadio de desarrollo tardío posterior a la eclosión sobre el cual no se han realizados estudios sobre desarrollo de este tipo, lo que permitirá complementar la descripción que comenzó con un estudio previo (Botero, 2006) y poder contribuir más conocimiento a la biología de este organismo. De modo más general, se espera poder plantear repuestas a preguntas que se refieren a la expresión diferencial en tejidos y estadios.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

- Determinar el patrón de expresión característico y la actividad de las isoenzimas de la Lactato deshidrogenasa (LDH) para diferentes estadios del desarrollo en el alevino de trucha y en diferentes tejidos del mismo en un estadio en particular.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad total de la Lactato deshidrogenasa (LDH), en alevinos de 2 cm y 3 cm.
- Determinar la actividad total de la Lactato deshidrogenasa (LDH) en diferentes tejidos de alevinos de trucha de 4cm de longitud, en músculo, vísceras y ojos.
- Caracterizar e identificar las diferentes isoenzimas de la Lactato deshidrogenasa, presentes en alevinos de trucha de 2 cm y 3 cm.
- Caracterizar e identificar las diferentes isoenzimas de la Lactato deshidrogenasa, presentes en diferentes tejidos de alevinos de trucha de 4 cm de longitud, como son, músculo, vísceras y ojos.

4. Marco Teórico

El término isoenzima fue acuñado por Markert & Moller (1959), quienes identificaron las primeras isoenzimas para una enzima, que fue la LDH. Ellos utilizaron el término isoenzima para describir las distintas formas moleculares de una enzima que catalizan una misma reacción y que se pueden encontrar en diferentes tejidos de un mismo organismo. Las isoenzimas son proteínas multiméricas con función catalítica semejante, y difieren entre ellas en algunas propiedades químicas, físicas y cinéticas. Estas proteínas están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas o subunidades (monómeros), que difieren en su estructura primaria. La modificación de las proteínas puede permitir que se encuentren diferencias funcionales y electroforéticas que repercutan en su estructura y propiedades cinéticas. Si las cadenas de la proteína formadas son idénticas, la isoenzima resultante es un homopolímero, y si son diferentes se tratará de un heteropolímero. Las isoenzimas también se diferencian entre sí por su distribución de carga debido a su configuración aminoacídica y su velocidad de migración en una electroforesis (Matthews, 1999). Cada isoenzima de una misma familia puede presentar una diferente afinidad por su sustrato, de manera que las constantes de afinidad y la especificidad pueden variar, y cada una puede ser inhibida diferencialmente por agentes específicos. (Kaplan, 1990).

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27) es una enzima de vital importancia para la producción de energía en estados de anaerobiosis; se encuentra presente a lo largo de todo el reino animal. Esta enzima se caracteriza por ser una proteína tetramérica, de la cual se pueden encontrar varias formas

moleculares alternativas. Los genes que codifican a esta enzima se han estudiado a lo largo del reino animal, y se ha determinado que dos genes parálogos, A y B, codifican a las dos subunidades diferentes de la Lactato deshidrogenasa.

La LDH es una enzima que cataliza reacciones en el curso final de la glicólisis, donde una molécula de glucosa se degrada a dos moléculas de piruvato, dando como resultado a la producción neta de 2 ATP y la reducción de $2NAD^+$ a NADH. La finalidad del LDH es la regeneración de NAD^+, con lo cual el proceso se hace independiente del oxígeno, y por lo tanto puede funcionar en anaerobiosis. La reacción es dependiente del pH; en el caso de un pH básico (pH > 7) la reacción favorece la conversión de lactato a piruvato y si el pH es neutro (pH = 7) se favorece la reacción inversa, es decir de piruvato a lactato.

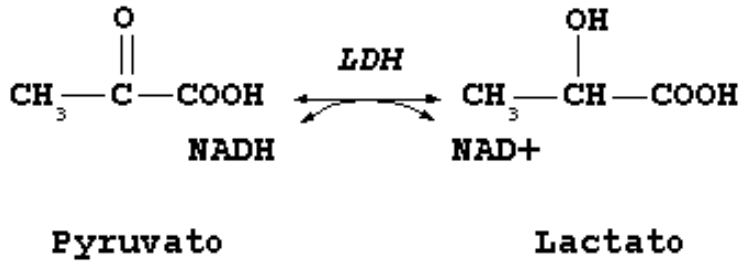


Figura 1. Reacción catalizada por la enzima Lactato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), la cual es dependiente del pH, favoreciendo la formación del lactato a piruvato (pH > 7) o la formación de piruvato a lactato (pH = 7) Tomado y Modificado de: www.answers.com/topic/ldh-reaction-png

La lactato deshidrogenasa es una proteína de aproximadamente 140.000 Daltons, ésta se encuentra en el citoplasma de todas las células (Kaplan, 1990).

4.1 Características Bioquímicas de las isoenzimas de la LDH

En los vertebrados, la LDH está constituida por dos tipos de subunidades polipeptídicas; H (heart) y M (muscle), las cuales son bioquímica y genéticamente diferentes. Cada una de las isoenzimas es ensamblada de una manera diferencial por la combinación aleatoria de estas subunidades en el entorno citoplasmático, un proceso que trae como resultado la formación de las cinco isoenzimas principales, que tienen la siguiente composición: H_4 **(LDH-1)** (B_4), H_3M **(LDH-2)** (B_3A_1), H_2M_2 **(LDH-3)** (A_2B_2), HM_3 **(LDH-4)** (B_1A_3) y M_4 **(LDH-5)** (A_4).

Por la naturaleza bioquímica de las subunidades, la carga neta de las diferentes isoenzimas generadas es diferente, y por lo tanto su corrido electroforético es distinto, como lo indica la figura 2.

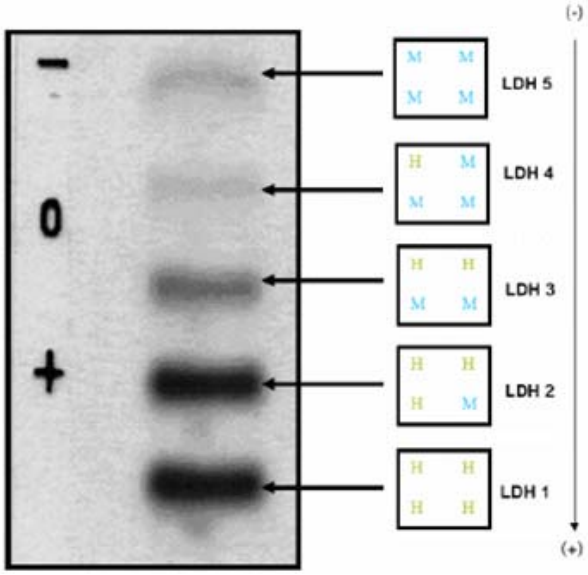


Figura 2. Patrón electroforético en gel de agarosa de las distintas isoenzimas de la Lactato deshidrogenasa, lo cual permite que las diferentes isoformas migren diferencialmente, debido a la carga neta de cada una de ellas. (pH de 8.6). Tomado y modificado de Maestre, 2004.

El peso molecular de las subunidades M (A) y H (B) es de aproximadamente 35.000 Daltons y cada una de estas contiene sólo un cuarto del número de residuos de lisina y arginina encontrados en el total de la enzima, lo cual sugiere que las isoenzimas de movilidad intermedia son híbridos compuestos por la mezcla de subunidades. Lo anterior explica la diferencia en carga para cada subunidad, que se traduce en que existe una carga total particular para cada isoenzima (Botero, 2006).

Algunos autores han explotado la diversidad molecular del genoma de los peces, con objeto de estudiarlos en diferentes disciplinas, como por ejemplo en la microevolución de los loci enzimáticos, en estudios taxonómicos para la identificación de especies, o en genética de poblaciones para el estudio la variación enzimática entre de las poblaciones (Basaglia, 1989).

La caracterización bioquímica de las larvas y los juveniles aporta información acerca de la historia de vida de la especie, que puede ser útil cuando no se pueden detectar caracteres físicos y anatómicos en estos estadios del desarrollo (Gardinier, 1974). De esta forma, el estudio analítico de las isoenzimas puede ayudar a establecer patrones en la identificación para ciertas especies. (Lundstrom, 1977)

4.2 LDH en los peces

En la mayoría de los vertebrados la LDH, es codificada por 2 loci (Ldh-A y Ldh-B) que están ubicados en cromosomas distintos en todos los vertebrados estudiados (Whitt, 1984), los cuales sintetizan las subunidades Ldh-A y Ldh-B, que se asocian aleatoriamente en el citoplasma formando 5 tetrámeros diferentes, las isoenzimas A_4 y B_4 y tres isoenzimas, A_3B_1, A_2B_2, A_1B_3 (Figura 2.), que poseen diferentes propiedades físicas, químicas y cinéticas. Estudios en elasmobranquios indican que cada forma molecular cataliza su reacción en un tejido particular (Basaglia, 1989). Adicionalmente, se ha descrito el tercer locus LDH-C, que se expresa en peces teleósteos de los órdenes Gadiformes y Cypriniformes (Crawford, 1989).

En casi todos los peces que han sido objeto de estudio, la isoenzima A_4 (LDH-5), que interviene en la reducción de piruvato en tejidos con un metabolismo anaerobio, es predominante en músculo esquelético blanco el cual no usa lactato sino que lo produce. En el orden Gadiformes, esta isoenzima es más activa en la vejiga natatoria que en el músculo esquelético. En el curso del desarrollo embrionario de los peces, A_4 (LDH-5), empieza expresarse sólo cuando la diferenciación muscular se ha completado y cuando las primeras contracciones empiezan.

Por otro lado, la isoenzima B_4 (LDH-1), que es más termoestable en comparación con la A_4, es predominante en metabolismos aerobióticos, como consecuencia de que ésta tiene mayor afinidad a su sustrato en tejidos que tienen una mayor

provisión de oxígeno y donde la utilización de lactato es constante como es en el caso del corazón, cerebro y músculo rojo (Shaklee, 1981; Basaglia, 1989). La migración electroforética de las isoenzimas de A_4, las cuales tienen una baja velocidad anodal y las de B_4 que tienen una alta carga negativa, resulta en diferencias metabólicas significativas y consecuencias ecológicas (Powers, et al, 1983). Por lo tanto, se puede concluir que esta expresión diferencial puede estar relacionada con diferencias catalíticas entre las diferentes isoenzimas, lo que podría sugerir un destino fisiológico especial para cada una de las dos LDHs.

Las isoenzimas A_4 y B_4, que son codificadas por genes distintos, tienen diferencias funcionales y estructurales, que aparentemente se pueden explicar por su estructura primaria (Klyachko, 2001). Se ha propuesto que para B_4 existen asociaciones modificadas no covalentes, que le podrían permitir a la isoenzima algún tipo de regulación durante el desarrollo ontogénico, y de esta manera cambiar sus propiedades estructurales y funcionales (Klyachko, 2001)

En la mayoría de los peces óseos, se ha descrito un tercer locus, C. La isoenzima C_4 se expresa como una isoenzima altamente anodal y es específica del ojo en especies de peces de algunos clados (Whitt 1975); en otros peces, esta isoenzima es relativamente catodal y es específicamente encontrada en el hígado (Shaklee et al, 1973). Por ejemplo, en los órdenes Cypriniformes y Gadiformes, C_4 está presente en el hígado y su actividad se evidencia una vez la diferenciación celular y morfológica del tejido está completa. Se ha argumentado que la diferencia entre estas dos isoenzimas en cuanto a su expresión diferencial y carga neta en

diferentes especies no son simples polimorfismos, sino el resultado de variación en los mecanismos de regulación génica (Shaklee, 1981).

Con respecto al origen de la LDH, se han propuesto varias hipótesis. Primero, se ha propuesto que el ancestro común debía tener una copia, es decir un solo gen de la LDH, condición que aún es presente en las lampreas modernas (Basaglia, 1989) Esto implica que luego existió una duplicación del gen, la primera en el orden Myxiniformes y la otra en los gnatostomados lo que como resultado produjo los dos loci de la LDH. Una segunda hipótesis propone que ambas isoenzimas están presentes en las lampreas, pero que sólo una de ellas puede ser observada (Whitt, 1987). Una última hipótesis formula que la subunidad C dio origen a la subunidad B, por lo tanto C estaría antes la duplicación que dio lugar a las subunidades A y B (Basaglia, 1989)

En la última década, se han realizado varios estudios en peces a nivel nacional que han podido establecer patrones de expresión y la ontogenia de varias isoenzimas (Dallos, 1994; Maestre, 2006; Botero, 2006). Para el caso de la LDH se han realizados dos estudios; el primero de ellos se llevó a cabo en el desarrollo embrionario de *Betta splendens (*pez combatiente siamés*),* donde se pudo establecer un patrón definido de actividad y expresión para los estadios de oocitos sin fertilizar, oocitos fertilizados, y en los estadios de clivaje, blástula, gástrula y neúrula (Maestre, 2006). Este estudio concluyó que las isoenzimas LDH-4, LDH-3 y LDH-2 sufrieron un cambio importante 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 neúrula, y mostró un constante aumento en su actividad enzimática en la ontogenia, lo cual fue 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 (Maestre, 2006).

En segundo estudio se realizó en *Onchorhyncus mykiss* (Trucha arco iris), en el que se identificó un patrón de expresión y de actividad para la LDH, para los oocitos sin fertilizar, oocitos fertilizados y los estadios desde clivaje hasta la neúrula (Botero, 2006). Este estudio sólo documentó la expresión de la isoenzima LDH-3 en los estadios del desarrollo analizados y sugirió que la actividad enzimática de la LDH estuvo relacionada con los eventos morfogenéticos específicos de cada estadio y los cambios bioquímicos y metabólicos que sufrió el embrión en desarrollo (Botero, 2006).

En el presente estudio se complementa el estudio de Botero (2006) documentando los patrones de expresión de isoenzimas en un estadío del desarrollo más tardío de *Onchorhyncus mykiss*, el de alevino. Este estadio comprende los primeros días después de la eclosión, cuando todavía se encuentra el saco vitelino en los animales y el desarrollo embrionario no ha cesado. (Figura 5.)

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 3. Alevinos de *Onchorhyncus mykiss*. (a) 1 día después de de la eclosión. (b) Alevinos 4 días después de la eclosión, donde se ve la reducción parcial del saco vitelino. (c) Alevinos de 14 días después de la eclosión, donde el saco vitelino aún se encuentra presente. (d) Alevinos de 21 días después de la eclosión, donde el saco vitelino se ha reabsorbido por completo. Imágenes Tomadas y disponibles electrónicamente de http://www.troutlodge.com/tech/Crianza_Inicial_De_La_Trucha_Arco_Iris.pdf recuperadas el 26 de junio de 2007

A través de este estudio se podrá continuar el estudio de la ontogenia de esta enzima, y de sus diferentes isoenzimas en el desarrollo de *Onchorhyncus mykiss*, y así seguir aportando conocimientos relacionados con el desarrollo molecular de esta especie. Si se encuentran diferencias significativas en la expresión de las isoenzimas en diferentes estadios y tejidos, se encontrará un patrón dinámico para estas a lo largo del desarrollo en este estadio para esta especie.

5. Metodología

Se tomaron aleatoriamente alrededor de 25 alevinos de trucha, para cada uno de los tratamientos, los cuales fueron, **1)** Alevinos de 2 cm de longitud, **2)** Alevinos de 3 cm de longitud y alevinos de 4 cm de longitud divididos en 3 grupos: **3)** músculo esquelético **4)** vísceras (entre ellas vejiga natatoria, aparato digestivo y corazón) y **5)** Ojos.

Para los alevinos de 2 cm de longitud, se extirpó el saco vitelino, que todavía se encuentra presente en este estadio. En los alevinos de 4 cm de longitud se extrajeron de un mismo animal las tres partes principales mencionadas anteriormente. Los alevinos de 3 cm de longitud se homogenizaron completos; todos los tratamientos fueron homogenizados en 1 mL de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, a 4°C. Los homogenizados fueron centrifugados (SORVALL Biofuge Primo R) en tubos falcón de 15 mL en dos sesiones de 1 hora a 8,500*g* a 4°C, siguiendo el protocolo de extracción de proteínas elaborado por G. Whitt & D. Philipp (1977).

Una vez centrifugadas las muestras, se procedió a tomar el sobrenadante y pasarlo a tubos falcón nuevos. Luego se repitió 2 veces el procedimiento anterior y finalmente se almacenaron los tubos con los sobrenadantes a –77 °C en un refrigerador REVCO® hasta el momento en que se procedió a realizar las determinaciones espectrofotométricas y electroforéticas.

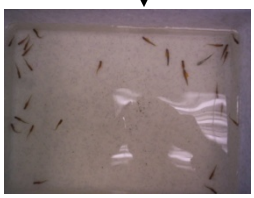
Con el fin de determinar presencia de la enzima LDH en las muestras y su actividad total para cada tratamiento, se realizaron análisis espectrofotométricos utilizando el kit LDH-P 4 + 1 SL (ELITECH Diagnostics) con las especificaciones del fabricante. La presencia de la enzima y su actividad total se examinaron en una espectrofotómetro COMPUR M 2000 CS a una longitud de onda de 340 nm.

La determinación de la actividad total de la enzima se realizó en una serie de lecturas durante 240 segundos, donde a cada 60 segundos se tomaban datos de absorbancia en el equipo. Se efectuaron tres réplicas de los homogenizados obtenidos para cada tratamiento y se estimaron los deltas de las lecturas de cada 60 segundos. Para calcular la actividad total, se multiplicó el delta por el factor de 11496 especificado por el fabricante en el Kit. Para determinar si había diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño completamente al azar, con un nivel de confianza, $\alpha = 0.05$. (STATISTIX 8.0, 2003).

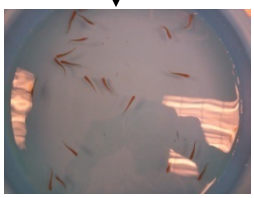
Para realizar los análisis electroforéticos, se tomaron tubos eppendorf de 1.5 mL para cada uno de los tratamientos (5 Tubos) en los cuales se colocó 1 mL de los sobrenadantes guardados en frio y se tomó una alícuota de 2.5 μL del sobrenadante de cada uno de los tratamiento y del control. El control, provisto por la casa comercial Helena Laboratories, (CK/LD Isoenzyme Control, Cat. No. 5134), consiste de las cinco isoformas de la LDH preparados de extractos de tejidos de ratones y de suero humano.

La siembra fue realizada sobre un gel de agarosa, provisto por el Kit de Helena Laboratories, (TITAN GEL LD Vis Isoenzyme Kit, Cat. No. 3043) en un Buffer Barbital de pH 8.6. La electroforesis se corrió a 85 Voltios y 10 miliamperios por 50 minutos, después del cual se visualizaron las bandas usando una reacción cruzada acoplada a una colorante de formazan. Luego se escanearon los geles para la visualización de las bandas y se invirtieron los colores, con el fin de obtener una mayor resolución de las mismas.

25 Alevinos de trucha de cada tipo, 2 cm, 3cm y 4cm de longitud



Alevinos de trucha 2 cm de longitud, extirpar saco vitelino

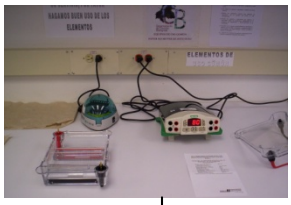


Alevinos de trucha 4cm de longitud, Músculo, Vísceras y ojos

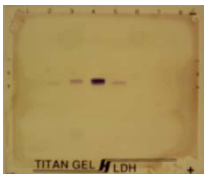
Homogenización de todos los tratamientos en Tris-HCl

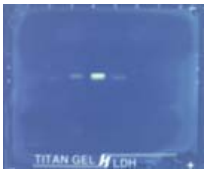
Centrifugación a 8,500g x 2 veces por 1 hora

Electroforesis de sobrenadante a 85 V y 10 mA por 50 min.



Actividad total de LDH por Espectrofotometría a 340 nm





Análisis de Geles con colores invertidos para mejor resolución

Statistix
Analytical Software

ANOVA Completamente al Azar de Réplicas

6. Resultados

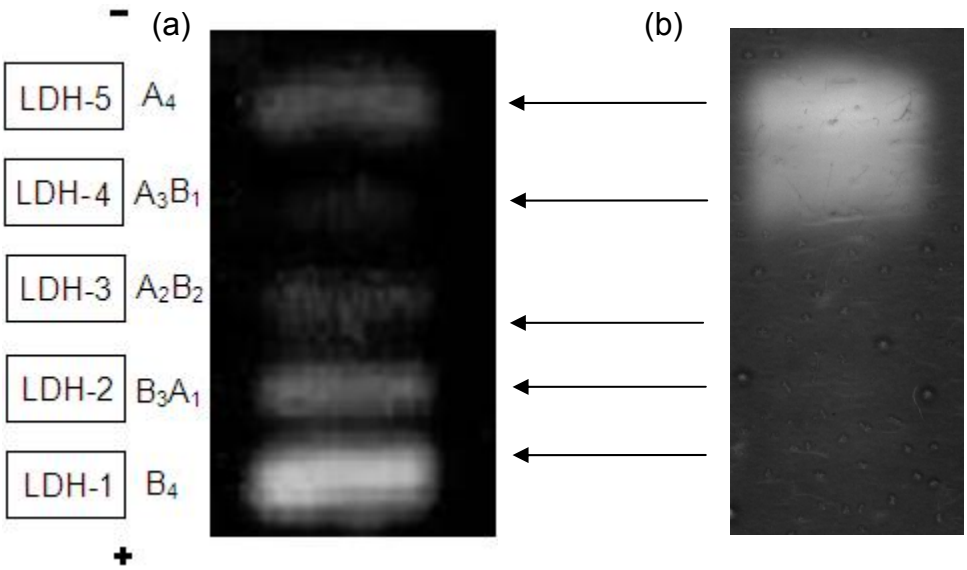


Figura 4. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, (a) Patrón Electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para alevinos de 2 cm de longitud.

El análisis electroforético indica para el estadio del desarrollo de 2 cm de longitud del alevino de *Onchorhyncus mykiss,* existe una banda bastante intensa correspondiente al tetrámero de A_4 (LDH-5), que sugiere una alta concentración de esta isoenzima (Figura 4). También se observa una banda que se superpone parcialmente con la de la isoenzima LDH-5; ésta corresponde a la isoenzima LDH-4, que igualmente presenta una alta concentración indicada por la alta intensidad en la banda. Luego se distinguen tres bandas bastante tenues que se relacionan con una muy baja concentración para este estadio. En orden de migración del polo negativo al polo positivo, éstas corresponden a las isoenzimas A_2B_2 (LDH -3), A_1B_3 (LDH -2) y B_4 (LDH - 1).

Para el estadio de 3 cm de longitud, se pueden identificar dos bandas en el gel (Figura 5). La banda correspondiente a la isoenzima LDH-5 no es tan intensa como en el estadio de 2 cm, lo que indica que su concentración en este estadio es menor. Sin embargo, la presencia de los homopolímeros de A presentes en las dos isoenzimas (LDH-5 y LDH-4) en el gel en una mayor concentración, se deben a que en estos tratamientos se existe un alto grado de tejido muscular.

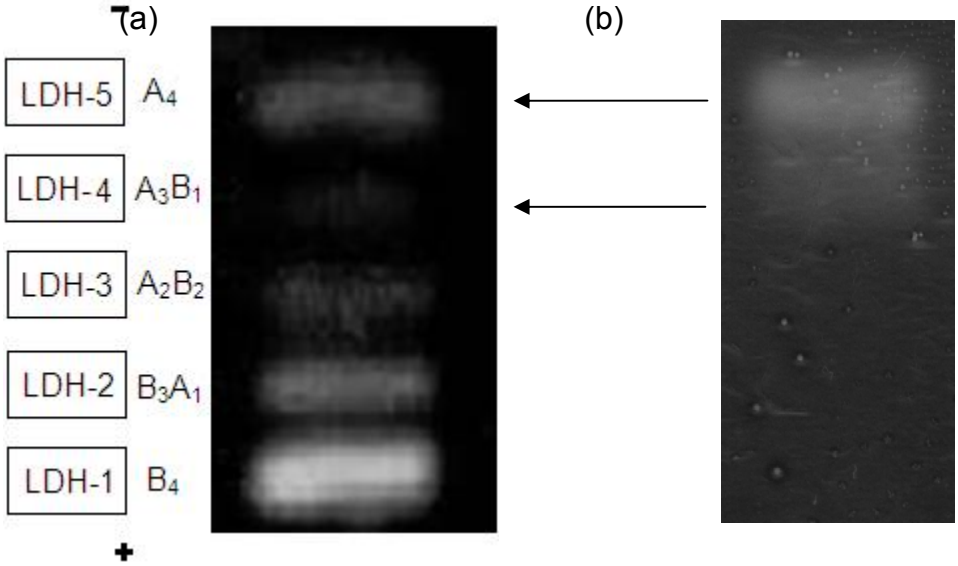


Figura 5. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para alevinos 3 cm de longitud.

Para el tratamiento de músculo esquelético de alevino de 4 cm de longitud, (Figura 6), la presencia de una banda intensa correspondiente a la isoenzima A_4 (LDH-5) sugiere una alta expresión en este tejido. También puede visualizarse la isoenzima LDH-4. Las demás bandas están ausentes, indicando que las otras isoenzimas no se expresan en este tejido en este estadio específico del desarrollo.

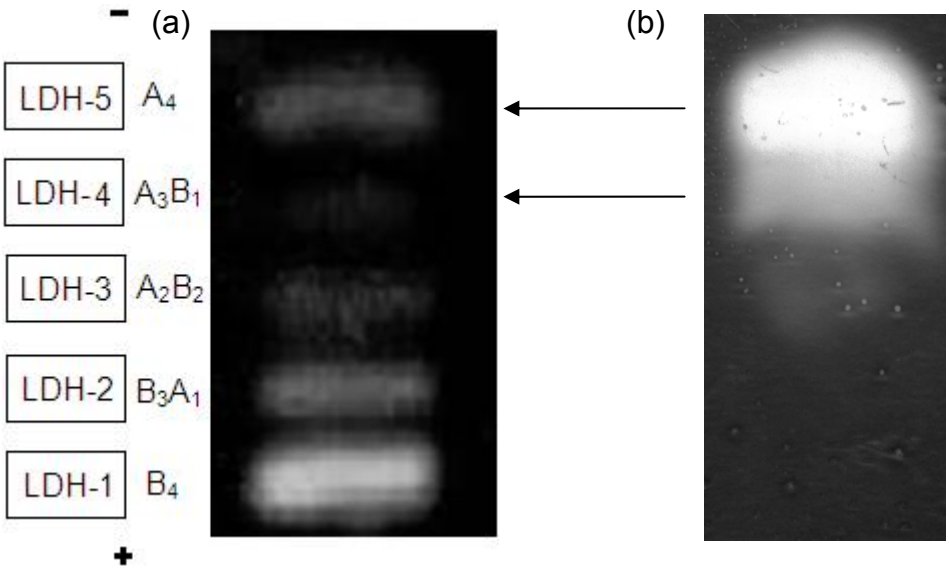


Figura 6. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en músculo esquelético de alevinos de 4 cm de longitud.

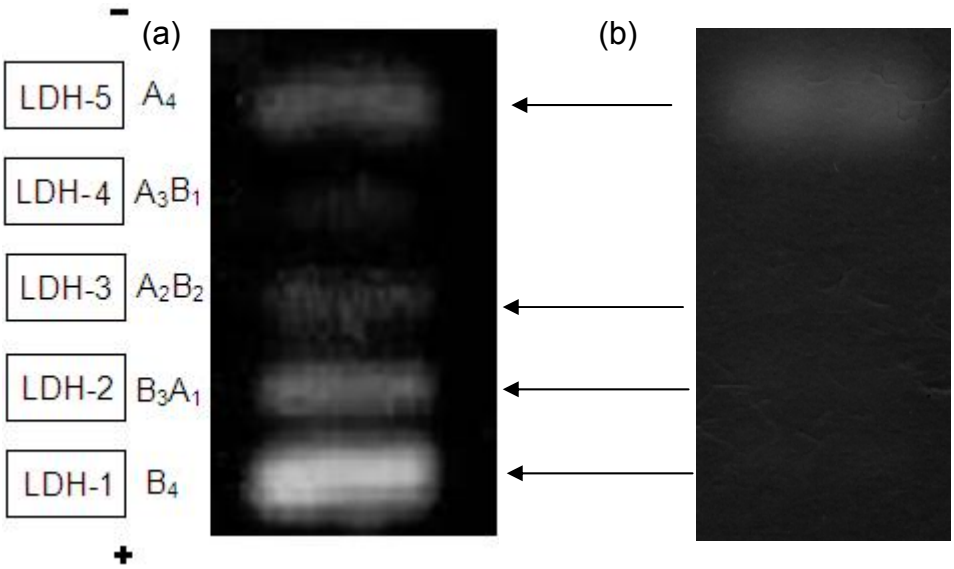


Figura 7. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para vísceras de alevinos de 4 cm de longitud.

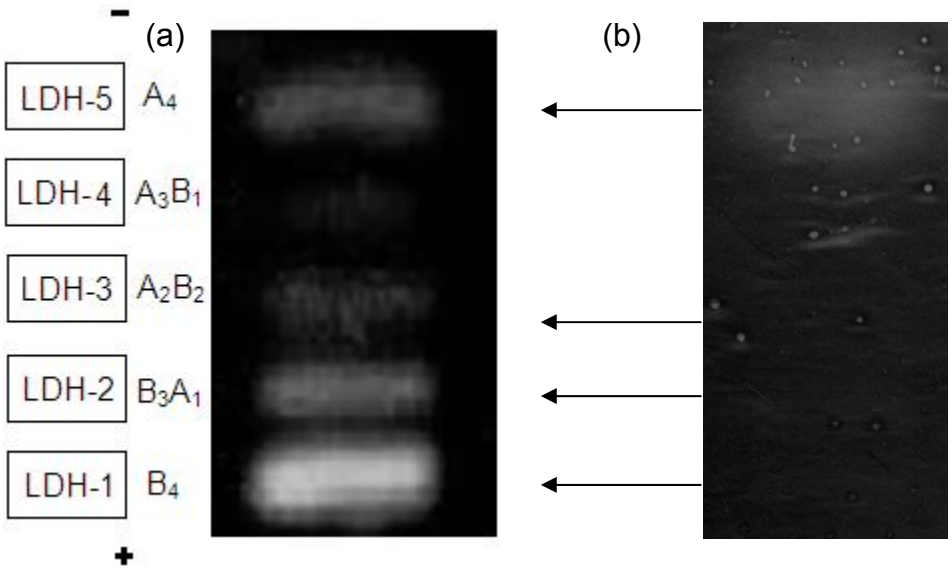


Figura 8. Electroforesis de las isoenzimas de la LDH en homogenizados en gel de agarosa, a) Patrón electroforético de las isoenzimas de la LDH (Control), (b) Electroforesis de las isoenzimas de la LDH para alevinos 4 Cm de longitud – ojos.

En el tratamiento de vísceras de alevino de 4 cm de longitud (Figura 7), se observan bandas bastante tenues en el gel. El homopolímero A, expresado en las isoenzimas LDH-5, LDH-4 y LDH-3, no se encuentra en tan alta concentración como en los estadios de 2 cm, 3cm y músculo (alevino 4 cm), y los homopolímeros de B también están en baja concentración. Por lo tanto, este tejido en este estadio particular del desarrollo muestra una expresión muy moderada de los diferentes loci implicados en la formación de las isoenzimas, lo que, en comparación con los

resultados de músculo esquelético, indica que la expresión de los homopolímeros difiere entre los tejidos estudiados.

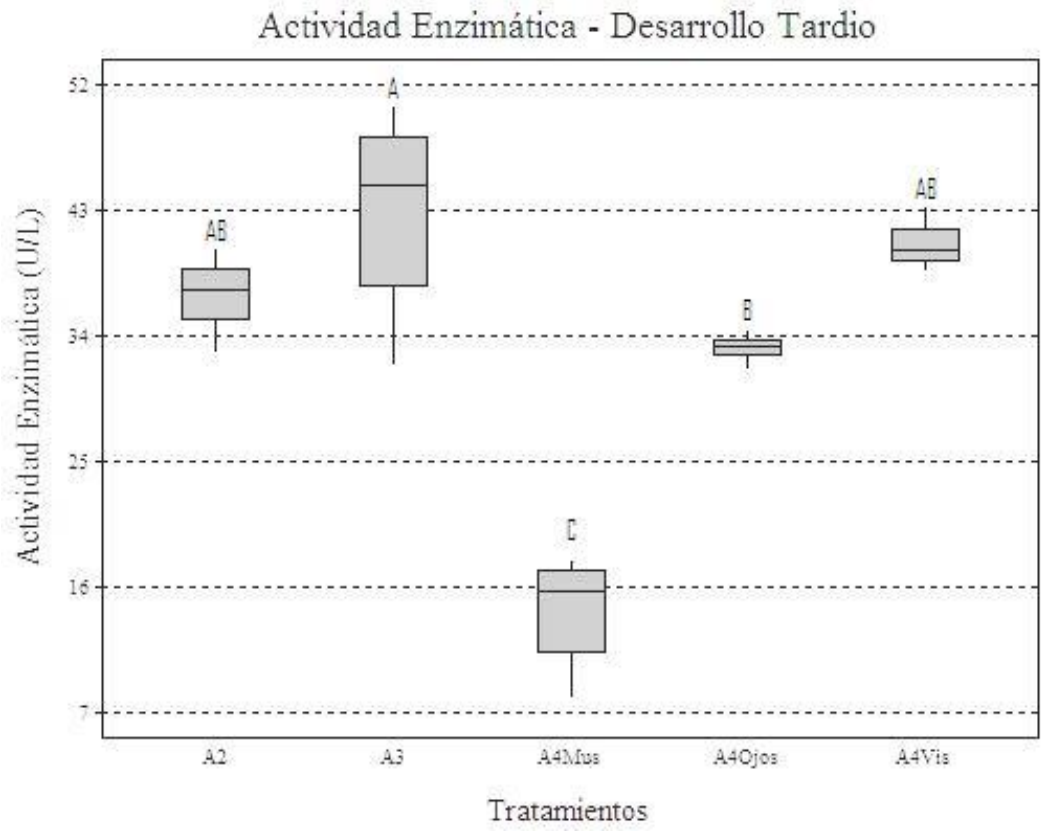


Figura 9. Actividad enzimática total para los diferentes tratamientos; A2, alevino de 2 cm de Longitud; A3, alevino de 3 cm de Longitud; A4Mus, músculo esquelético de alevino de 4 cm; A4Ojos, ojos de alevino de 4 cm; A4Vis, vísceras de alevino de 4 cm. Las cajas encierran la media mitad de los datos (rango intercuartílico), la línea que divide las cajas es el valor para la mediana y las líneas verticales en los extremos, whiskers, indican la extensión de observaciones de los datos del mayor al menor. Letras (A, B, C), Comparación múltiple de Tukey para las actividades totales de los diferentes tratamientos (gl=4, α=0.05) Se encuentran diferencias significativamente altas en las medias de las actividades totales de los tratamientos 2, 3, 4

Por último, en el tratamiento de ojos de alevino de 4 cm (Figura 8), se observa un patrón de expresión de los homopolímeros muy parecido al del tejido visceral. Los homopolímeros de A se encuentran en una concentración media, y los de B en concentración baja.

Los resultados obtenidos para la actividad enzimática total mediante el análisis de varianza en todos los tratamientos (F= 24.7; P=0.000; gl= 4), muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos. En el caso de la actividad en el alevino de 2 cm de longitud, se observa una diferencia significativa con respecto al tratamiento de músculo de alevino de 4 cm (Prueba de Tukey, Figura 9 Letras) actividad que debe estar representada principalmente por las isoenzimas LDH- 4 y LDH- 5 que se encuentran en alta concentración en este tratamiento (Figura 4.);

La actividad total del la enzima LDH en el tratamiento del alevino de 3 cm de longitud, es significativamente mayor que en los tratamientos A4Mus y A4Ojos (Figura 9, cajas), lo que se puede estar relacionado con la gran expresión de los homopolímeros de A en este tratamiento (Figura 5). En el tratamiento de músculo de alevino de 4 cm, se observa una actividad enzimática total sustancialmente menor que en los demás tratamientos (Figura 9). La actividad enzimática total en las vísceras y ojos de alevino de 4 cm, fue similar, y significativamente mayor que la actividad en el músculo esquelético en este mismo estadio.

7. Discusión de Resultados

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de las isoenzimas de la LDH en alevinos muestra un patrón característico para los estadios estudiados, en el cual los alevinos de 2 cm y 3 cm longitud, se caracterizaron por expresar mayormente las isoenzimas LDH-4, LDH- 5 y los alevinos de 4 cm expresaron mayormente las isoenzimas LDH-5 y LDH-4 en el músculo y todas las isoenzimas en las vísceras y ojos, pero en muy baja concentración.

La presencia de las isoenzimas LDH-4 y LDH5 en el caso del tratamiento del alevino de 2 cm de longitud, pueden estar muy relacionadas con la presencia de músculo esquelético, que en porcentaje de peso total del animal es mucho mayor con respecto a los estadios mas tempranos (~65%). Para este mismo estadio la expresión de homopolímeros de A (Ldh-A) que se expresan en tejidos anaerobios preferencialmente, se aumenta significativamente por el movimiento natatorio de los animales en este estadio, el cual genera una condición altamente anaerobia, lo cual permite que el homopolímero A (tetrámeros A_4 y A_3B_1 en este caso) se exprese preferencialmente con respecto a los homopolímeros de B (Basaglia, 1989). Por esta misma razón, las demás isoenzimas son expresadas en menor medida. Este comportamiento de expresión también puede ser explicado por el hecho que los alevinos de este estadio presentan saco vitelino, que contiene nutrientes (Gilbert, 2006). Esto incrementa un grado de oxidación mayor para el animal por el constante requerimiento de energía del esfuerzo físico generado en

los movimientos, que como resultado aumenta la anaerobiosis en la mayoría de los tejidos.

Al igual que en los alevinos de 2 cm, en los alevinos de 3 cm se expresaron las isoenzimas LDH-5 y LDH-4, pero la intensidad de las bandas fue menor en la electroforesis de alevinos de 3 cm de longitud. Esto se puede explicar con base en el hecho de que en este estadio el saco vitelino se ha consumido por completo, lo que hace que la oxidación sea menor.

En el caso del tratamiento del músculo de alevino de 4 cm, existió una expresión diferencial y preferencial de los homopolímeros de A. Esto se explica teniendo en cuenta el hecho que este tejido se comporta anaerobiamente la mayor parte del tiempo. El resultado obtenido en los tratamientos de las vísceras y ojos de los alevinos de 4 cm probablemente se debe al hecho de las vísceras en gran parte estaban compuestas de aparato digestivo y vejiga natatoria, y estos tejidos presentan concentraciones intermedias de oxígeno. Para el caso del aparato digestivo, caracterizado por la baja concentración de oxígeno esta condición puede sugerir la presencia del Tetrámero de A_4 (LDH-5) y por esto es que en los geles se observa esta banda. Con respecto a este tratamiento de las vísceras, donde se incluye la vejiga natatoria, la expresión de las isoenzimas con el homopolímero B se explica por la presencia de oxígeno en la vejiga natatoria, ya que estas enzimas son preferencialmente expresadas en ambientes aerobios. Sin embargo, la expresión de estas isoenzimas es muy baja; estos resultados son

consistentes con estudios hechos en otros organismos, en los que también se han encontrado concentraciones medias para los homopolímeros de A y muy bajas para los de B en el intestino (Frankel, 1977).

Las diferencias en las actividades enzimáticas entre tratamientos están estrechamente relacionadas con la afinidad que existe entre los homopolímeros que conforman las distintas isoenzimas y el sustrato. Esto se puede concluir porque la actividad enzimática fue mayor en los tratamientos donde la concentración de las bandas que están más cargadas negativamente (LDH-5, LDH-4, Principalmente Homopolímeros de A), como es el caso de los tratamientos de los alevinos de 2 cm, 3 cm y el músculo de alevinos de 4 cm.

No obstante en concentraciones bajas de Homopolímeros de A y altas de homopolímeros de B, es cuando se encuentran las isoenzimas LDH-3, LDH-2, LDH-1 como es en el caso de los tratamientos de vísceras y ojos de alevino de 4 cm; por esta razón se muestra una actividad alta con respecto a los demás tratamientos a pesar de que la concentraciones de las bandas era baja (Figura 9).

Se sugiere con el presente estudio, que aunque las isoenzimas del homopolímero de B se encuentran en concentración baja, éstas tienen una alta cinética de reacción como lo comprueban las actividades totales. Todo índica que los homopolímeros B, conservados molecularmente a lo largo de todos los grupos, se

caracterizan por tener una mayor actividad asociada a una cinética muy alta, en comparación con los homopolímeros de A (Klyachko, 2001).

Los resultados muestran claramente que existe una expresión diferencial de las diferentes enzimas de la LDH con respecto a los y a los tejidos, lo que concuerda con estudios realizados en otras especies (Botero 2006; Low, 1992**;** Frankel, 1983; Frankel, 1977; Whitt, 1981). Los resultados muestran que la expresión de Ldh-A tiene lugar principalmente en tejidos y órganos con un suministro de oxigeno bajo, como es el caso en el músculo esquelético (Frankel, 1977). En el estadio de alevino, el músculo esquelético es muy activo, debido a que los alevinos han agotado sus reservas de vitelo y por lo tanto deben moverse en búsqueda de alimento. Sin embargo, como lo demuestran los geles, la presencia de estas isoenzimas (LDH-1 y LDH2) con homopolímero A, es ubicua y parece expresarse constitutivamente en todas las células. Cabe añadir que los homopolímeros de A se caracterizan por tener una cinética de reacción baja, lo que puede compensarse con una alta concentración en la que siempre está presente (Klyachko, 2001).

Según Botero (2006), en estadios del desarrollo temprano, oocitos sin fertilizar, oocitos fertilizados, y los estadios de clivaje, blástula y neúrula de *Onchorhyncus mykiss*, la única isoenzima que se expresó fue LDH-3 (A_2B_2). En la organogénesis de *Onchorhyncus mykiss* que se lleva a cabo luego del estadio de neúrula (Gilbert, 2006), es cuando el embrión empieza a sufrir cambios dinámicos en los que se

empiezan a expresarse las otras isoenzimas. Los tetrámeros A_4 y A_3B_1 (LDH-5, LDH-4) comienzan a expresarse durante la formación del mesodermo paraxial, caracterizado por la formación de paquetes y fibras musculares. La expresión de las isoenzimas restantes LDH-1 y LDH-2 debe estar regulada por la formación de los órganos característicos en los que se encuentran presentes, como es el ojo para el caso del tetrámero B_4 (LDH-1) (Shaklee, 1981). Todo esto se relaciona con los resultados obtenidos, que demuestran que la expresión de las diferentes isoenzimas concuerda con el momento del desarrollo en el que se encuentra el animal.

Este estudio muestra que la isoenzima LDH-3 (A_2B_2), que se reportó en los primeros estadios del desarrollo temprano de *Onchorhyncus mykiss* (Botero, 2006) no se encuentra en altos niveles en el estadio de alevino. Es probable que esto se deba a que la mayoría de los monómeros de A de se asocian para formar la isoenzima LDH-5 y los de B se expresan en tejidos más específicos, con un mayor suministro de oxígeno lo cual hace a estos monómeros más específicos.

Pudiera pensarse que la actividad de los homopolímeros A es ser mayor que la de los de B por el hecho que en los geles la intensidad de éstos es mayor. Sin embargo, los resultados de las vísceras y ojos demuestran que en tejidos que tienen bajo contenido de monómeros de A la actividad es mayor, en comparación con los tratamientos con los alevinos completos (2 cm y 3 cm) que tienen mayor concentración. Esto concuerda con los hallazgos de Klyachko (2001), los cuales

demostraron que los de monómeros de B tienen una mayor afinidad y cinética de reacción por el sustrato, que como resultado tiene el efecto de aumentar la actividad.

En concordancia con lo que han demostrado varios autores (Frankel, 1977; Whitt 1977; Shaklee, 1981; Basaglia, 1989) en cuanto a que el locus *Ldh-C* es exclusivo de especies de otros clados pertenecientes a los peces cartilaginoso y óseos, ya que en ninguno de los tejidos y animales estudiados se pudo evidenciar la presencia del tetrámero o heteropolímeros con alguno de éstos monómeros (Basaglia, 1989).

Este estudio ilustra que existe una regulación génica diferencial ya que en ciertos tejidos o estadios del desarrollo pueden expresarse algunas isoformas y en otros no. Esto tiene un papel muy importante a la hora de integrar el estudio del desarrollo embrionario con el desarrollo bioquímico que sufre el organismo, ya que la formación de nuevas estructuras va dando lugar a diferentes ambientes celulares, en los que pueden encontrarse metabólitos que no se encuentran en otros ambientes celulares.

8. Conclusiones.

- Se determinó la presencia de las cinco isoenzimas de la Lactado deshidrogenasa para el estadio del alevino de trucha.

- El patrón que se observa para este estadio, se caracteriza por la presencia de las cinco isoenzimas de la Lactato deshidrogenasa en los diferentes tratamientos y una expresión diferencial de estás en los diferentes tejidos.

- La actividad de la Lactato deshidrogenasa está regulada por la presencia de las diferentes subunidades A (*Ldh-A*) y B (*Ldh-B*) que se expresan diferencialmente de acuerdo al ambiente celular.

9. Recomendaciones

- Realizar estudios de actividad enzimática en estadios del desarrollo más avanzados como en los adultos.

- Establecer patrones de expresión enzimáticos para otras enzimas, como en la Malato deshidrogenasa y Glucosafosfato isomerasa.

- Realizar electroforesis en de poliacrilamida (PAGE) para obtener mayor resolución en las bandas electroforéticas.

- Investigar los cambios de expresión en tejidos sexuales, con el fin de definir la ontogenia de la enzima.

10. 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.

Botero, Juan Pablo. 2006. Identificación Y Cuantificación De Las Isoenzimas De L-lactato: Nad Oxido-Reductasa (Ldh; Ec. 1.1.1.27) Durante El Desarrollo Embrionario Temprano De *Onchorhyncus mykiss* (Walbaum 1792).

Crawford, D., Constantino, H., and powers, D. 1989. Lactate Dehydrogenase-B cDNA from the Teleost Fundulus heteroclitus: Evolutionary Implications. *Mol. Biol. Evo*l. 6(4):369-389

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.

Frankel, J. 1983. Lactate dehydrogenase tissue specificity and characterization in the teleost genus Barbus (Comp. biochem. physiol., B. Comp. biochem.) 76(1):103-105

Frankel, J. 1985. Ontogenetic patterns of enzyme locus expression in *Barbus hybrids* (Cypriniformes, Teleostei). *Comp. Bioch. Physio*l. 82 B (3):413-417

Frankel, J., and Hart, N. 1977. Lactate dehydrogenase ontogeny in the genus *Brachydanio* (Cyprinidae). *The Journal of Heredit*y. 68: 81-86**.**

Gardinier, W. R. 1974. An electrophoretic method for distinguishing the young fry *salmo salar* (L.) from those of *salmo trutta* (L.). *J. Fish Biol. 6, 517-519*

Gilbert, S. 2006. Developmental Biology, Eighth Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Pp. 443-469.

Gregory S. Whitt. 1984. Genetic, developmental and evolutionary aspects of the lactate dehydrogenase isozyme system. *Cell Biochemistry and Function.* 2(3):134-139

Guevara Rozo, Edilma 1997. Estudio embrionario y larval, microscópico e histológico de Betta Splendens (Regan, 1909)

Kaplan, L. y Pesce, A. 1990. Química Clínica: Métodos. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.

Low, W. P., Chew S. F. 1992. Differences in electrophoretic patterns of lactate dehydrogenases from the gill, hearts and muscles of three mudskippers. Journal of Fish Biology. 40, 975-977.

Lundstrom R. 1977. Identification of fish species by thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing. *Fish Bull. Calif. 75, 571-576*

Maestre, Ronald. 2004. Expresión y determinación de la actividad enzimática de las isoenzimas de L-Lactato: Nad Oxido-Reductasa (LDH; E.C. 1.1.1.27) en el desarrollo embrionario temprano de *Betta splendens* (Regan, 1909). (Tesis de pregrado). Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 60 pp.

Maestre-Serrano, R. & E. Pachón-Muñoz. 2006 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.

Maisel, H., Kerrigan, M., Syner F. 1965.The ontogeny of lactate dehydrogenase in the chick lens. *Invest Ophthalmol.* Jun; 4: 362-71.

Markert, L., and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45:753-762.

Mathews, C. y Van Holde, K. 1999. Bioquímica. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill, Interamericana. Madrid-España.

Mezhzherin SV, Berezovskaia OP. 2003. Characters of amino acid substitution in LDH-A and LDH-B in the evolutionary line of vertebrates. *Tsitol Genet*. Jan-Feb; 37(1):24-9

Nelson, D., Cox, M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Third Edition. Worth Publishers. Pp. 542 - 544

O. S. Klyachko, N. D. Ozernyuk. 2001. Different Functional and Structural Properties of Lactate Dehydrogenase Isozymes at Different Stages of Danio rerio Ontogenesis *Russian Journal of Developmental Biology* 32(5). 310-312

Philipp, D., and Whitt, G. 1977. Patterns of gene expression during Teleost embryogenesis: Lactate dehydrogenase isozyme ontogeny in the Medaka *(Oryzias latipes). Developmental Biolog*y. 59: 183-197.

Powers D. A., Di Michele L. and Place A. R. 1983. The use of enzyme kinetics to predict differences in cellular metabolism, developmental rate, and swimming performance between LDH-B genotypes of the fish, *Fundulus heteroclitus.* In *Isoenzymes: current Topics in Biological and Medical Research*. Vol 10 pp 147-170.

Rodríguez de Carrillo, Maria Elvira. 1975 Determinación de las hidrogenasas málica en los primeros estados del desarrollo embrionario de la Hyla Labialis. *(Tesis de pregrado*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 73 pp.

Shaklee J., And Whitt G. 1981. Lactate Dehydrogenase Isoenzymes of Gadiform Fishes: Divergent Patterns of Gene Expression Indicate a Heterogeneous Taxon. *Copeia*, (3), pp. 563-578

Uribe, Alfredo. 2004. Técnicas De Separación: Electroforesis De Proteínas Séricas. Práctica de Laboratorio. Departamento de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Bioquímica.

Uribe, Alfredo., Tonguino T. 1989. Valoración de la electroforesis en gel de agarosa para la detección de bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo. Tesis de grado.

Whitt G. S. 1984. Genetic, developmental and evolutionary aspects of the lactate Dehydrogenase Isoenzyme system. *Cell Biochem. Funct*. 2, 134-139.

Whitt G. S. 1987. Species differences in Isoenzyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. In *Isoenzymes: current Topics in Biological and Medical Research*. Vol 15 pp 1-26.

Whitt, G. 1981. Developmental Genetics of Fishes: Isozymic Analyses of Differential Gene Expression. *Amer, Zool.* 21:549-572.