



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
Departamento de Ciencias Biológicas Animales



**“DISPONIBILIDAD DE ENZIMAS PARA LA SÍNTESIS DE  
GLICÓGENO POR LA VÍA INDIRECTA EN OOCITOS DE  
RANA CHILENA (*Caudiverbera caudiverbera*):  
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y CARACTERIZACIÓN  
PARCIAL DE LACTATO DESHIDROGENASA”.**

**RODRIGO GUERRERO BOSAGNA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biologicas Animales

**PROFESOR GUIA: EDUARDO KESSI C.**

Santiago, Chile  
2006

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.- RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2.- SUMMARY</b> .....	<b>4</b>
<b>3.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>4.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
<b>5.- OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
General .....	12
Específicos .....	12
<b>6.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
Animales y células. ....	13
Reactivos .....	13
I. Localización subcelular de lactato deshidrogenasa .....	13
Obtención de mitocondrias .....	13
Marcadores de fracciones subcelulares.....	14
Determinación de la concentración de proteínas .....	14
Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa .....	14
Determinación de la actividad de fosfoglucosa isomerasa .....	15
Determinación de la actividad de succinato deshidrogenasa.....	15
Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa .....	15
II. Purificación parcial de lactato deshidrogenasa .....	16
Obtención de la preparación enzimática .....	16
Cromatografía de intercambio iónico .....	16
Cromatografía de exclusión molecular .....	17
III.Caracterización parcial de lactato deshidrogenasa .....	17
Determinación de $K_m$ aparente para los sustratos.....	17
Determinación de pH óptimo.....	17
Determinación del peso molecular nativo mediante cromatografía de exclusión molecular.....	17
Electroforesis desnaturante .....	18
Electroforesis nativa.....	18
Comparación de secuencias.....	19
<b>7.- RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
I.Localización subcelular de lactato deshidrogenasa .....	20
II.Purificación parcial de lactato deshidrogenasa .....	22
III.Caracterización parcial de lactato deshidrogenasa .....	24
Determinación de $K_m$ aparente para los sustratos.....	24
Determinación de pH óptimo .....	27
Determinación del peso molecular nativo mediante cromatografía de exclusión molecular.....	29
Electroforesis desnaturante .....	29

Electroforesis nativa.....	30
<b>8.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
I.Localización subcelular de lactato deshidrogenasa .....	32
II.Purificación parcial de lactato deshidrogenasa .....	34
III.Caracterización parcial de lactato deshidrogenasa .....	34
Determinación de $K_m$ aparente para los sustratos .....	34
Determinación de pH óptimo.....	35
Determinación del peso molecular nativo.....	35
Determinación del peso molecular de la subunidad .....	36
Determinación de isoenzimas .....	36
<b>9.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>38</b>
<b>10.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>40</b>

## 1.- RESUMEN

Lactato deshidrogenasa es una enzima que clásicamente se ha descrito como citoplasmática. Pese a ello, algunos autores han aportado evidencia que sugiere la presencia de esta enzima en mitocondrias, lo que ha generado controversia respecto a su localización subcelular. Con el ánimo de aportar información que permita comprender el funcionamiento de la vía indirecta de síntesis de glicógeno en oocitos de rana, se decidió estudiar la localización de la enzima así como algunas de sus características.

Para determinar la localización subcelular se compararon los resultados obtenidos de actividad de LDH con los resultados de actividad de enzimas marcadoras de fracción citoplasmática y mitocondrial en fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial de extractos de oocitos de rana. La caracterización parcial de la enzima se realizó determinando los valores de  $K_m$  para los sustratos, el pH óptimo de actividad de la enzima y el peso molecular nativo mediante cromatografía de exclusión molecular y el peso molecular de la subunidad por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (PAGE). Además, se observó la existencia de isoformas mediante cromatografía de intercambio iónico y electroforesis nativa en geles de poliacrilamida.

Se determinó que lactato deshidrogenasa está presente en la fracción citoplasmática de los oocitos de rana y que está ausente en la fracción mitocondrial. Se caracterizaron las dos fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico observando una gran similitud en las características cinéticas de la enzima presente en cada fracción. Se calculó el peso molecular nativo de 131 KDa mediante cromatografía de filtración en gel y el peso molecular de la subunidad de la enzima de 33 KDa mediante electroforesis desnaturante. Se determinó la presencia de dos isoformas de la enzima mediante cromatografía de intercambio iónico.

## 2.- SUMMARY

Lactate dehydrogenase has been classically described as a cytoplasmatic enzyme in a number of species and tissues. Nevertheless, some evidence indicating a mitochondrial location for the enzyme has been reported. The question then arises about the location of lactate deshydrogenase in frog oocytes, in order to understand the operation of the indirect pathway for glycogen synthesis. The aim of the present work was to study the sub-cellular location of the enzyme and, also characterize some of its biochemical properties.

In order to determine the sub-cellular localization of the enzyme, the activity was measured in several sub-cellular fractions obtained by differential centrifugation from homogenates of frog oocytes. Partial characterization of the enzyme was performed using DEAE-cellulose fractions, which were used for determination of the  $K_m$  values for the substrates, the optimum pH for the enzymatic activity and the native molecular weight through gel filtration chromatography.

Lactate dehydrogenase is a cytoplasmatic enzyme in frog oocytes. The two fractions eluted from anionic exchange chromatography were similar respect of  $K_m$  values for substrates, optimum pH and native molecular weight.

### 3.- INTRODUCCIÓN

A pesar de los innumerables estudios realizados acerca del metabolismo de los carbohidratos, aún existen interrogantes y discrepancias en ciertas etapas y procesos. La operación del metabolismo celular requiere de una organización que debe disponer de enzimas, aporte de sustratos y cofactores, pero además requiere que las enzimas estén disponibles en lugares y momentos específicos (Ureta, 1985). Estos sustratos al interior de la célula sufren transformaciones en su composición química, dando origen a una serie de productos intermediarios hasta la formación de productos finales, los cuales pueden quedar disponibles para otros procesos metabólicos.

La síntesis de glicógeno corresponde al proceso mediante el cual unidades glucosilo se incorporan al polímero. Se han descrito dos vías para la síntesis de glicógeno; la vía clásica o directa, y la vía indirecta. La vía clásica se inicia con la incorporación de glucosa a altas concentraciones (1 mM intracelular), la que posteriormente es fosforilada seguida de una serie de reacciones y formación rápida de glicógeno. La vía indirecta se inicia con la incorporación de glucosa a bajas concentraciones (0,17 mM intracelular), la que también es fosforilada, y a través de la operación de la glicólisis, resulta en la formación de lactato en el citoplasma. Éste, mediante la operación de las reacciones de la vía gluconeogénica es incorporado al glicógeno.

Un modelo que ha resultado de particular utilidad en el estudio de la síntesis de glicógeno es el oocito de estadio VI de la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linnaeus, 1758), perteneciente a la familia Leptodactylidae (Werner, 1896). En efecto, los oocitos de *C. caudiverbera* han resultado ser un modelo de gran interés para el estudio del metabolismo de glucosa *in vivo*, debido a que son células relativamente grandes lo que permite manipular las concentraciones de metabolitos

y enzimas mediante microinyección (Ureta *et al.*, 2001). Además, se obtienen fácilmente mediante cirugía y disgregación manual con pinzas.

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una proteína tetramérica que cataliza la conversión reversible de piruvato a lactato usando  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  como cofactor. Cada subunidad presenta un peso molecular de 35 kDa y se han descrito 6 isoformas (Baumgart *et al.*, 1996). Aún cuando se la ha descrito clásicamente como una enzima de citoplasma, resultados obtenidos en estudios realizados por diversos autores sobre la localización subcelular de esta enzima, han sido materia de controversia. Mientras algunos autores han demostrado que esta enzima es exclusivamente de citoplasma, otros han aportado evidencia que indica que la enzima existiría además en una forma intramitocondrial. Esto último resulta de particular interés para comprender cómo opera la síntesis de glicógeno a través de la vía indirecta en los oocitos de rana.

La presente memoria de título tiene como propósito aportar antecedentes que permitan una mejor comprensión de la operación de la vía indirecta de síntesis de glicógeno, determinando la localización subcelular de LDH y caracterizando parcialmente sus propiedades en oocitos de rana chilena.

#### 4.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El glicógeno es el principal producto del metabolismo de la glucosa en oocitos de rana. Su síntesis puede ocurrir mediante la operación de dos vías. La vía clásica o directa, y la vía indirecta. La vía clásica se inicia con el ingreso de la glucosa al citoplasma de la célula, la que se fosforila para producir glucosa-6-fosfato. Luego ésta se convierte en glucosa-1-fosfato, y posteriormente es convertida en uridina difosfo-glucosa que se incorpora a glicógeno en forma rápida. La vía indirecta también se inicia con la fosforilación de la glucosa, formando glucosa-6-fosfato, seguida de una serie de reacciones que implican la formación de triosas hasta piruvato/lactato (mediante operación de la glicólisis), que son finalmente incorporadas en glicógeno mediante la operación de la vía gluconeogénica que produce glucosa-6-fosfato que es incorporada en glicógeno mediante las reacciones de la vía directa (Kessi *et al.*, 1996).

Los oocitos de rana chilena han resultado un sistema particularmente útil para el estudio del metabolismo de glucosa. En efecto, son células relativamente grandes ( $\approx 3 \mu\text{l}$  volumen interno) lo que permite manipular las concentraciones de metabolitos y enzimas mediante microinyección, posibilitando de este modo el estudio del metabolismo *in vivo*. Trabajos previos han demostrado que la microinyección de oocitos con glucosa marcada radiactivamente, resulta en la incorporación de aproximadamente 95% de la marca en glicógeno, en tanto que el 5% restante se libera como  $\text{CO}_2$  radiactivo (Ureta *et al.*, 2001).

Experimentalmente se ha observado que la operación de las vías directa e indirecta para la síntesis de glicógeno en los oocitos de rana es dependiente de la cantidad de glucosa microinyectada. Cuando se microinyecta 0,5 nmoles por oocito de glucosa, opera principalmente la vía indirecta, mientras que cuando se inyecta 3 nmoles predomina la vía directa (Kessi *et al.*, 1996; Guixé *et al.*, 1997). La coinyección de 0,5 nmoles de glucosa marcada con 0,3 nmoles de fructosa-2,6-bisP,

un potente inhibidor de la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-*bis*fosfatasa, resulta en una marcada inhibición de la incorporación de unidades glucosilo en glicógeno por la vía indirecta, y en la acumulación de lactato radiactivo y alanina, principales metabolitos acumulados luego de 15 minutos de incubación. Además, la fructosa-2,6-*bis*P inyectada en oocitos desaparece luego de 1 hora de incubación lo que sugiere que la fructosa-2,6-bisfosfatasa está activa (Guixé *et al.*, 1997). Adicionalmente, ha sido posible mostrar que el notable efecto inhibitorio que ejerce la fructosa-2,6-*bis*P, es notoriamente menor cuando los oocitos son microinyectados con 3 nmoles de glucosa (Ureta *et al.*, 2001). Si la síntesis de glicógeno en oocitos a bajas concentraciones de glucosa implica el uso de enzimas de la gluconeogénesis, la inhibición de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa debería resultar en un bloqueo significativo en la formación del polisacarido desde la glucosa marcada. De hecho, se ha observado una fuerte inhibición de la incorporación de glucosa a glicógeno en células coinyectadas con [U-<sup>14</sup>C]glucosa y 3-mercaptopicolinato, clásico inhibidor de la enzima gluconeogénica (Kessi *et al.*, 1996).

La producción de lactato cuando opera la vía indirecta sugiere que este metabolito sería un intermediario de la vía de síntesis de glicógeno en oocitos. No obstante, la microinyección de [<sup>14</sup>C]-lactato no resulta en su incorporación en glicógeno, como tampoco la microinyección de piruvato ni de alanina radiactivos incluso en presencia de glucosa no marcada (datos no publicados, Tabla 1), observándose sin embargo una alta producción de CO<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren que piruvato (o lactato) exógeno no son capaces de ingresar al compartimiento gluconeogénico, pero sí al ciclo de Krebs (Kessi *et al.*, 1996).

Una forma de explicar las observaciones anteriores, es suponer la existencia de complejos supramacromoleculares en que los intermediarios de las vías metabólicas serían canalizados y no estarían accesibles al medio intracelular. A este respecto, existe abundante literatura que acredita que las enzimas se asocian (muchas veces de manera transitoria) para estructurar complejos multienzimáticos

en los cuales los intermediarios metabólicos se encuentran canalizados y comprometidos con un destino particular (Srere, 1987; Srere y Ovadi, 1990; Ovadi y Srere, 1996). De este modo, el lactato (o piruvato) microinyectado al oocito no tendría acceso al compartimiento formado por las enzimas que lo incorporarían finalmente en glicógeno.

**Tabla 1. Incorporación de radiactividad en glicógeno a partir de [U-<sup>14</sup>C]-glucosa, [U-<sup>14</sup>C]-lactato y [U-<sup>14</sup>C]-alanina**

Compuestos inyectados (nmoles/oocito)	Marca en glicógeno (pmoles/oocito)
[U- <sup>14</sup> C]-glucosa 0,4	65,0 ± 20,0 (5)
[U- <sup>14</sup> C]-lactato 0,44	0,33 ± 0,09 (6)
[U- <sup>14</sup> C]-alanina 0,41	5,6 ± 1,7 (4)

Los oocitos se inyectaron con 50 nl de una solución salina que contenía los compuestos indicados. Luego de 20 minutos, las células se procesaron individualmente para extraer el glicógeno y posteriormente contar la radiactividad. Los resultados se expresan como el promedio de *n* determinaciones (entre paréntesis) ± el error estándar.

No obstante lo anterior, otra posibilidad que explicaría la falta de incorporación de lactato microinyectado en glicógeno, es que éste ingrese a la mitocondria y se convierta en piruvato. Esta posibilidad requiere que exista la actividad de LDH al interior de la mitocondria. Se sabe que la producción de lactato en la glicólisis ocurre en el citoplasma pudiendo incluso acumularse en él. La enzima responsable de la conversión de piruvato en lactato (LDH) ha sido descrita clásicamente como una enzima citosólica. Por otra parte, las mitocondrias son abundantes en ambos hemisferios de los oocitos de *C. caudiverbera*, encontrándose, al igual que en los oocitos de *X. laevis*, agrupaciones de ellas en la región perinuclear (Dabiké y Preller, 1999; Wilding *et al.*, 2001).

La presencia de LDH al interior de la mitocondria es materia de controversia. En fracciones mitocondriales de células de músculo *soleus* de rata obtenidas por fraccionamiento subcelular se ha encontrado que la actividad de LDH asociada a la fracción mitocondrial era sólo el 0,7 % del total, lo que se puede atribuir a una leve

contaminación de la fracción mitocondrial con la fracción citosólica. Al medir el consumo de oxígeno en la fracción mitocondrial usando como sustrato lactato, piruvato o combinación de ellos, se ha observado consumo de oxígeno con piruvato, pero no con lactato. En presencia de condiciones en las cuales el lactato es convertido a piruvato (adición externa de lactato, LDH y  $\text{NAD}^+$ ), se observa un incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial en un 50% de la velocidad máxima, en cambio adicionando sólo piruvato el consumo fue muy semejante (Sahlín *et al.*, 2002). Esta evidencia hace suponer que la mitocondria posee la maquinaria enzimática para oxidar piruvato, pero no lactato.

No obstante lo anterior, existe información en la literatura que sugiere que la mitocondria sería capaz de oxidar lactato, debido a la existencia de transportadores de monocarboxilatos (MCT1) en la membrana interna, y de LDH en la matriz. La concentración de lactato excede a la de piruvato en el citoplasma; la presencia de MCT1 permitiría el flujo de lactato al interior de la mitocondria (Brooks *et al.*, 1999a). Al incubar con piruvato o lactato fracciones mitocondriales obtenidas a partir de células hepáticas, cardíacas y de músculo esquelético, pero en presencia de oxamato que es un inhibidor de la actividad de la LDH, se pudo observar que el consumo de oxígeno en presencia de piruvato no varió significativamente en tanto que al usar lactato como sustrato no se registró consumo de oxígeno, debido al bloqueo de la oxidación del lactato. De esta forma ha sido posible determinar la presencia de LDH intramitondrial en forma indirecta. Por otro lado a través de microscopía electrónica usando anticuerpos antiLDH se ha comprobado en forma directa su presencia, lo que ha sido confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa. Controles negativos hechos en otros tejidos han mostrado ausencia de marca al usar anticuerpos anti LDH-1 y anti LDH-5, lo que permite eliminar la posibilidad de contaminación accidental (Brooks *et al.*, 1999a). No obstante, no es posible detectar la presencia de señales para destinación mitocondrial en la estructura primaria de la LDH.

Bajo ciertas condiciones de ejercicio ha sido posible observar en el músculo una alta concentración de lactato en el citoplasma, lo que genera un gradiente respecto del interior de la mitocondria. La presencia de MCT1 existentes en la membrana mitocondrial interna (Brooks *et al.*, 1999b) favorecería el ingreso de lactato citoplasmático a la mitocondria. Al interior el lactato sería oxidado a piruvato gracias a la presencia de LDH para luego salir al citoplasma y seguir el camino de la gluconeogénesis. Utilizando anticuerpos marcados para MCT1 en fracciones mitocondriales de músculo esquelético, cardíaco interfibrilar y subsarcolemma de rata fue posible visualizar una abundante presencia de MCT1 por medio de traspaso electroforético de proteínas seguido de detección inmunológica y microscopía electrónica. Usando anticuerpos para GLUT-1 (proteína de membrana de sarcolemma transportadora de glucosa), por medio de traspaso electroforético de proteínas seguido de detección inmunológica y microscopía electrónica, se observó una mínima contaminación cruzada por membranas celulares de organelos adyacentes. A esta fracción mitocondrial se administró cinamato (inhibidor del transporte de piruvato en muchos sistemas, incluidas mitocondrias de hígado y eritrocitos). Se observó un bloqueo en la oxidación de piruvato y lactato. Evidencias que MCT1 está presente en la mitocondria, que es sensible a cinamato y que inhibe la oxidación mitocondrial de lactato y piruvato, han sugerido que es un candidato a transportador de lactato y piruvato al interior de la mitocondria (Brooks *et al.*, 1999b).

## **5.- OBJETIVOS**

### **General**

Contribuir al conocimiento de la operación y la organización del metabolismo de la glucosa.

### **Específicos**

Investigar la presencia de lactato deshidrogenasa en fracciones subcelulares de oocitos de rana.

Caracterizar parcialmente la actividad de lactato deshidrogenasa de oocitos de rana.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales y células:** Se utilizaron oocitos de rana chilena (*Caudiverbera caudiverbera*) de estadio VI de maduración de acuerdo al criterio de clasificación de Dumont (Dumont, 1972). Los ejemplares de rana se mantuvieron en el laboratorio en un estanque con agua potable, y se alimentaron con hígado de vacuno cada 2 días. Previa anestesia del ejemplar, los oocitos se extrajeron quirúrgicamente y el ejemplar usado se mantuvo aislado en observación hasta su recuperación. Este procedimiento se realizó una sola vez a cada ejemplar. Los oocitos se obtuvieron por disgregación manual mediante pinzas en medio Barth (NaCl 88 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,41 mM, KCl 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,82 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,33 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,6).

**Reactivos:** Los reactivos generales fueron de calidad para análisis, principalmente de Sigma Chemical Co. y Merck

### I. Localización subcelular de lactato deshidrogenasa

**Obtención de mitocondrias:** Con el objetivo de determinar la localización subcelular de LDH en oocitos de rana se modificó un protocolo de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial (Bogehagen *et al.*, 2003, Bogehagen com. personal). En una preparación típica, 3,16 gramos de oocitos se homogeneizaron suavemente en Potter-Elvehjem (20 golpes) en amortiguador A (Hepes 20 mM /HCl pH 8,0, EDTA 2 mM, manitol 0,21 M, sacarosa 70 mM) en una relación 1/6 (p/v). El homogeneizado resultante se centrifugó a 1085 x g por 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente a 1085 x g por 10 min obteniéndose la fracción denominada SN1. Los sedimentos de las centrifugaciones previas se combinaron y resuspendieron en un mínimo del amortiguador A obteniéndose una fracción denominada P1. Luego de guardar una alícuota apropiada para las determinaciones de actividad enzimática y de proteínas, la fracción SN1 se centrifugó a 29400 x g por 15 min, obteniéndose un sobrenadante (fracción SN2) y

un sedimento. Sobre este sedimento, aún al interior del tubo de centrifugación, se observó la presencia de una capa de grasa, la cual se mezcla con el sobrenadante (fracción SN2) al momento de separarlo del sedimento (fracción P2) que luego es resuspendido en un mínimo del amortiguador A. Luego de guardar una alícuota apropiada para las determinaciones de actividad enzimática y de proteínas, la fracción SN2 se centrifugó a 29400 x g por 15 min, para separar la capa de grasa del SN2, obteniéndose un sobrenadante (fracción SN3) y un sedimento (fracción P3). Estas fracciones se separaron de modo que la capa grasa permaneciera en la fracción P3 (ver anexo).

**Marcadores de fracciones subcelulares:** Como marcador de la fracción citosólica se usó la enzima fosfoglucoasa isomerasa. Como marcador de la fracción mitocondrial se usó la enzima succinato deshidrogenasa. Las actividades de las enzimas se midieron en todas las fracciones obtenidas. Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato a 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto. Adicionalmente se usó la enzima citocromo oxidasa también como marcador de la fracción mitocondrial. La unidad de esta enzima corresponde a los nmoles de oxígeno consumidos por minuto.

**Determinación de la concentración de proteínas:** La concentración de proteínas de cada fracción obtenida se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar.

**Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa:** La determinación de actividad de lactato deshidrogenasa se realizó mediante un ensayo continuo, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 usando piruvato como sustrato y midiendo la desaparición de NADH a 340 nm, a 25°C (Bergmeyer *et al.*, 1963). Para estas determinaciones se usaron las siguientes concentraciones finales en un volumen de 1 ml: Tris 50 mM pH 7,8, EDTA 0,5 mM, piruvato 0,3 mM y NADH 0,2 mM. En todos los casos la reacción se inició con la adición del piruvato.

Los registros duraron generalmente dos minutos.

**Determinación de la actividad de fosfoglucoosa isomerasa:** La determinación de la actividad de fosfoglucoosa isomerasa se realizó mediante un ensayo acoplado, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453, usando fructosa-6-P como sustrato en presencia de un exceso controlado de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Gracy y Tilley, 1975), y midiendo la formación de glucosa-6-P a partir de la aparición de NADH a 340 nm, a 25°C (Olive y Levy, 1975). Para estas determinaciones se usaron las siguientes concentraciones finales en un volumen de 1 ml: Tris 50 mM pH 7,8, EDTA 0,5 mM, NAD 0,5 mM, 2,26 unidades de glucosa-6-P deshidrogenasa y fructosa-6-P 1,5 mM. En todos los casos la reacción se inició con la adición de fructosa-6-P. Los registros se hicieron generalmente durante dos minutos.

**Determinación de la actividad de succinato deshidrogenasa:** La determinación de la actividad de succinato deshidrogenasa se realizó mediante un ensayo continuo, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453, usando succinato como sustrato y diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor de electrones, cuya decoloración se mide a 600 nm, a 25°C (Nohl y Hegner, 1977). Para estas determinaciones se usaron las siguientes concentraciones finales en un volumen de 1 ml: Fosfato 50 mM pH 7,5, succinato 6,0 mM, DCPIP 0,045 mM y cianuro de potasio 1 mM. En todos los casos la reacción se inició con la adición de una alícuota de la fracción. Los registros duraron generalmente 10 minutos.

**Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa:** La determinación de la actividad de citocromo oxidasa se realizó midiendo el consumo de oxígeno en un oxígrafo, usando tetrametilparafenilendiamina (TMPD) como dador de electrones. Para comprobar que el consumo de oxígeno registrado es mitocondrial, ésta se detuvo con azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), potente inhibidor de la enzima citocromo oxidasa. Para estas determinaciones se usaron las siguientes concentraciones finales

en un volumen de 1,7 ml: fosfato de potasio 84,11 mM pH 7,4, TMPD 1,18 mM y  $\text{NaN}_3$  0,59 mM. En todos los casos la reacción se inició con la adición de una alícuota de 250  $\mu\text{l}$  de cada fracción. Los registros se hicieron a 25°C durante aproximadamente 15 minutos. Para estas determinaciones se usó el protocolo de fraccionamiento hasta la obtención de la fracción P2.

## **II. Purificación parcial de lactato deshidrogenasa**

**Obtención de la preparación enzimática:** La enzima se purificó parcialmente a partir de 4,36 gr de oocitos de rana, los que se homogeneizaron en amortiguador Tris 10 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM en una relación 1/5 (p/v) en presencia de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMFS) 0,1 mM. Este homogeneizado se centrifugó a 27000 x g por 20 min obteniendo un sobrenadante (SN) y descartándose el sedimento.

**Cromatografía de intercambio iónico:** El sobrenadante obtenido en la etapa anterior, se sometió a una cromatografía de intercambio iónico usando una columna de DEAE-celulosa (1,4 x 9,3 cm). La elución de la enzima se realizó con 140 ml de amortiguador Tris 10 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM con una gradiente de 30-300 mM KCl. Se colectaron fracciones de 1,5 ml a las cuales se midió la actividad de lactato deshidrogenasa. Las fracciones con actividad se mezclaron, y el volumen resultante se sometió a diálisis en membrana de diálisis SpectraPor (CO 3500) contra Tris 20 mM pH 7,8, EDTA 1mM, a 4°C con al menos tres cambios cada dos horas. La fracción dializada se concentró durante toda la noche poniendo la membrana de diálisis en contacto con sacarosa. Alternativamente, las fracciones dializadas resultantes de la cromatografía de intercambio iónico se concentraron por centrifugación en concentradores MiliPore (CO 10000), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este conjunto de fracciones con actividad, concentrado y dializado se denominó C1.

**Cromatografía de exclusión molecular:** La preparación resultante de la etapa anterior se sometió a una cromatografía en columnas de filtración en gel; para estos efectos se usó una columna de Sephacryl S-200 (2,1 x 83,5 cm) equilibrada en amortiguador Tris 50 mM pH 7,8, KCl 100 mM, glucosa 1 mM,  $\beta$ -mercapto etanol 1 mM, glicerol 50 mM. Se cargó en la columna un volumen de 1 ml de la fracción obtenida en la etapa previa y se colectaron fracciones de 1 ml. Las fracciones que presentaron actividad se mezclaron y el conjunto se concentró del mismo modo que en la etapa anterior, al cual se denominó C2.

### III. Caracterización parcial de lactato deshidrogenasa

**Determinación de  $K_m$  aparente para los sustratos:** Se determinaron los valores de  $K_m$  aparente para piruvato y NADH, utilizando las fracciones DEAE1 y DEAE2 como fuente de enzima. Se midió la actividad de lactato deshidrogenasa a distintas concentraciones de piruvato y una concentración fija de NADH a 0,2 mM. Por otro lado se usaron distintas concentraciones de NADH para medir la actividad enzimática a una concentración fija de piruvato de 0,3 mM. Previamente, usando concentraciones fijas de ambos sustratos se determinó la variación de la actividad enzimática (velocidad de la reacción) en función de la variación de la concentración (cantidad) de enzima.

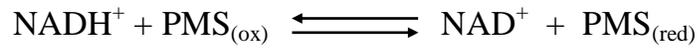
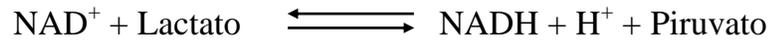
**Determinación de pH óptimo:** Para estas determinaciones se usaron como amortiguadores Tris, Mes y Hepes a distintos pH a las siguientes concentraciones finales en un volumen de 1 ml: amortiguador 50 mM, piruvato 0,3 mM y NADH 0,15 mM y las fracciones DEAE1 y DEAE2 como fuentes de enzima. En todos los casos la reacción se inició con la adición del piruvato. Los registros duraron generalmente dos minutos.

**Determinación del peso molecular nativo mediante cromatografía de exclusión molecular:** Para estos efectos se usó la columna de Sephacryl S-200 (2,1 x 83,5 cm) equilibrada con amortiguador Tris 50 mM pH 7,8, KCl 100 mM, glucosa

1 mM,  $\beta$ -mercapto etanol 1 mM, glicerol 50 mM. Se cargaron 900  $\mu$ l de la fracción C1, (aproximadamente 17,85 unidades de enzima). La columna se calibró con 3 mg de seroalbúmina bovina (BSA, 66 kDa), 56,52 unidades de glucosa-6-P-deshidrogenasa (110 kDa), 3 mg de ovoalbúmina (44 kDa) y 50  $\mu$ l citocromo C (12,4 kDa); el volumen vacío se determinó usando azul dextrano.

**Electroforesis desnaturante:** Se realizó en geles de poliacrilamida (PAGE) 10% de 5,5 x 9 cm con SDS (dodecilsulfato de sodio) 0,1%, según lo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se sometieron a desnaturación con amortiguador de muestra (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 5%,  $\beta$ -mercapto etanol 2,86 M, Azul de bromofenol 0,06 mM, glicerol 4%) en una relación 1/4 (amortiguador/muestra) por 2 min a 100°C. Se usaron marcadores de peso molecular entre 6,5 a 66 Kda. En general, se cargaron aproximadamente 40  $\mu$ g de proteína por pocillo, excepto que se indique otro valor.

**Electroforesis nativa:** Se realizó electroforesis nativa en duplicado usando geles de 5,5 x 9 cm (PAGE) 7%. El amortiguador de muestra usado fue Tris-HCl 250 mM, pH 6,8,  $\beta$ -mercapto etanol 2,86 M, Azul de bromofenol 0,06 mM, glicerol 4%) en una relación 1/3 (amortiguador/muestra). En general, se cargaron aproximadamente 40  $\mu$ g de proteína por pocillo, excepto que se indique otro valor, las muestras se distribuyeron de igual forma en ambos geles. Finalizada la electroforesis, uno de los geles se tiñó con azul de Coomasie. La detección de la actividad enzimática se efectuó mediante la producción de formazan usando lactato y  $\text{NAD}^+$  como sustratos, fenazina metasulfato (PMS) como intermediario y NitroBlue Tetrazolium (NBT) como aceptor final de los electrones (Radojković y Ureta, 1982) (Figura 1). Para ello el gel se incubó a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos en una mezcla que contenía Tris 150 mM pH 8,0, NAD 0,415 mM, lactato de sodio 100 mM, fenazina metasulfato 0,39 mM y NBT 0,09 mM. La reacción se detuvo con ácido acético al 5%.



**Figura 1.** Esquema de la reacción para la detección de lactato deshidrogenasa en geles de poliacrilamida. (ver detalles en el texto)

**Comparación de secuencias:** El presente estudio utilizó el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) para el alineamiento de secuencias de aminoácidos de LDH A de *Gallus gallus* y LDH C de *Xenopus laevis*. Para la realización de la matriz de identidad de secuencias se utilizó el programa Bioedit (Hall, 1999). Las secuencias se obtuvieron de Genbank con los siguientes números de acceso: AAA50433 (*Xenopus laevis*) y P00340 (*Gallus gallus*).

## 7.- RESULTADOS

### I. Localización subcelular de lactato deshidrogenasa

Mediante el uso del protocolo de centrifugación diferencial modificado de Bogenhagen (Bogenhagen *et al.*, 2003) se obtuvieron distintas fracciones subcelulares en las que se midió la actividad de lactato deshidrogenasa y de las enzimas marcadoras. Como se observa en la Tabla 2, la mayor actividad específica en sobrenadantes de lactato deshidrogenasa se encuentra principalmente en la fracción SN3, que resulta de centrifugar a 29400 x g por 15 minutos. En efecto, 69,3% de la actividad inicial se recupera en esta fracción. El valor de actividad medido en la fracción P3 es, probablemente, resultado de contaminación con la fracción sobrenadante.

**Tabla 2. Localización subcelular de lactato deshidrogenasa en oocitos de rana chilena.**

Fracción	Actividad (U/ml)	Actividad Total (U)	Proteína (mg/ml)	AE* (U/mg)
SN1	1,19	31,04	1,57	0,76
P1	0,57	6,25	45,66	0,01
SN2	1,14	29,59	1,24	0,92
P2	0,61	0,85	2,4	0,25
SN3	1,17	25,84	0,79	1,49
P3	0,26	0,29	0,37	0,70

\*AE: Actividad Específica; la actividad de la enzima se expresa en U como se describe en Materiales y Métodos.

La distribución de actividad de la enzima en las distintas fracciones, es comparable a la observada para la fosfoglucoasa isomerasa (Tabla 3). Puesto que esta última enzima es un marcador de fracción citosólica, de la cual se recupera 72,4% de la actividad inicial en SN3, y que la actividad medida en P3 se puede considerar como contaminación del sobrenadante, es posible deducir que los datos obtenidos para lactato deshidrogenasa indican que su localización es, al igual que la fosfoglucoasa isomerasa, citosólica.

**Tabla 3. Localización subcelular de fosfoglucoasa isomerasa en oocitos de rana chilena.**

<b>Fracción</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>AE* (U/mg)</b>
<b>SN1</b>	<b>2,39</b>	<b>62,26</b>	<b>1,57</b>	<b>1,53</b>
<b>P1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>45,66</b>	<b>0</b>
<b>SN2</b>	<b>2,11</b>	<b>54,99</b>	<b>1,24</b>	<b>1,71</b>
<b>P2</b>	<b>0,76</b>	<b>1,07</b>	<b>2,4</b>	<b>0,32</b>
<b>SN3</b>	<b>2,05</b>	<b>45,10</b>	<b>0,79</b>	<b>2,59</b>
<b>P3</b>	<b>0,33</b>	<b>0,36</b>	<b>0,37</b>	<b>0,89</b>

\* AE: Actividad Específica; la actividad de la enzima se expresa en U como se describe en Materiales y Métodos.

Como se observa en la Tabla 4, la mayor actividad específica en sedimentos de succinato deshidrogenasa, enzima marcadora de fracción mitocondrial, se encuentra principalmente en la fracción P3. Aún cuando se recupera 33,6% de la actividad inicial en esta fracción, se calculó valores de actividad específica 33,7 veces superior a la fracción SN1 que corresponde al total de la actividad de la enzima. El valor de actividad medido en la fracción SN3 se puede atribuir a contaminación con la fracción sedimento. Resultados similares se obtuvieron cuando se usó citocromo oxidasa como enzima marcadora de fracción mitocondrial (datos no mostrados). La distribución de actividad de esta enzima en las distintas fracciones, también es comparable a la observada para la citocromo oxidasa. Con los datos obtenidos es posible deducir que la fracción P3 corresponde a una fracción mitocondrial más pura.

**Tabla 4. Localización subcelular de succinato deshidrogenasa en oocitos de rana chilena.**

<b>Fracción</b>	<b>Actividad (mU/ml)</b>	<b>Actividad Total (mU)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>AE* (mU/mg)</b>
SN1	8,63	224,34	1,57	5,5
P1	0	0	45,66	0
SN2	3,69	95,83	1,24	2,97
P2	65,14	91,20	2,4	27,14
SN3	0,29	6,35	0,79	0,37
P3	68,57	75,43	0,37	185,33

\*AE: Actividad Específica; la actividad de la enzima se expresa en mU como se describe en Materiales y Métodos.

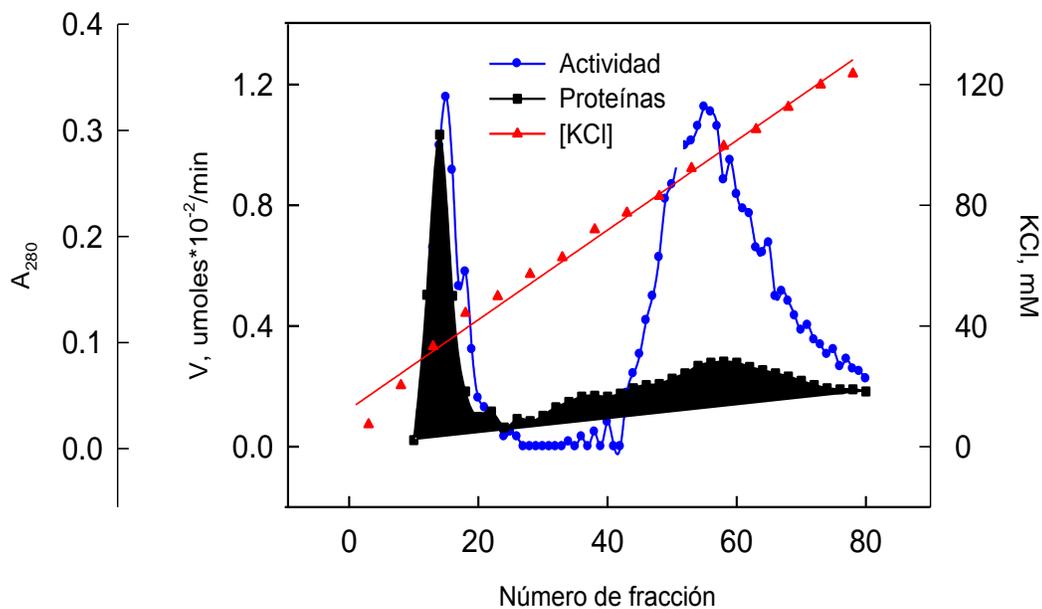
## **II. Purificación parcial de lactato deshidrogenasa**

Con el objetivo de caracterizar parcialmente la lactato deshidrogenasa, la enzima se sometió a dos etapas de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa, y de exclusión molecular. El sobrenadante (SN) obtenido a partir de la centrifugación a 27000 x g de un homogeneizado de oocitos de rana se usó para purificar la enzima. Como se muestra en la Tabla 5, el rendimiento de esta etapa fue aproximadamente 51 %.

**Tabla 5. Purificación parcial de lactato deshidrogenasa a partir de un homogeneizado de oocitos de rana.**

<b>Fracción</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Proteína (mg/ml)</b>	<b>AE* (U/mg)</b>
SN	4,86	199,40	2,95	1,65
C1	10,72	101,34	1,94	5,52
C2	1,29	89,94	0,24	5,41

\* AE: Actividad Específica; la actividad de la enzima se expresa en U como se describe en Materiales y Métodos; SN: Sobrenadante resultante de la centrifugación de un extracto homogeneizado de oocitos; C1: Conjunto de fracciones con actividad concentrado y dializado resultante de la columna de DEAE-Celulosa; C2: Conjunto de fracciones con actividad concentrado y dializado resultante de la columna de Sephacryl S-200.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico en DEAE- Celulosa de un homogeneizado de oocitos de rana. La cromatografía se efectuó como se indica en materiales y métodos, excepto que la gradiente usada en este experimento fue 40-200 mM KCl

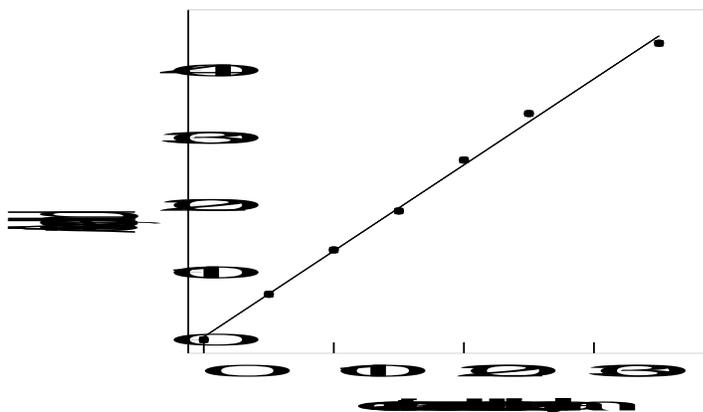
El uso de una gradiente 0-300 mM KCl para eluir la enzima resultó en la aparición de una fracción con actividad, esta fracción se sometió a una gradiente 40-200 mM KCl resultando en la aparición de dos fracciones con actividad, que se denominaron DEAE1 y DEAE2 respectivamente en que la fracción DEAE2, retenida mas fuertemente en la columna, era la fracción mayoritaria (aproximadamente 80%) (Figura 2).

Experimentos preliminares de caracterización parcial de ambas fracciones mostraron que tanto el pH óptimo como los valores de  $K_m$  para ambos sustratos resultaron ser similares (ver más adelante). En experimentos sucesivos, utilizando una gradiente 30-300 mM KCl, las fracciones DEAE1 y DEAE2 se juntaron y se trataron como una. Las fracciones con actividad obtenidas a partir de la

cromatografía en DEAE-Celulosa se concentraron y se dializaron. Este conjunto de fracciones concentrado que se denominó C1, se sometió a cromatografía de exclusión molecular. Las fracciones con actividad obtenidas a partir de esta etapa también se concentraron. Este otro conjunto de fracciones concentrado se denominó C2, con un rendimiento aproximado de 45%. Como se aprecia en la Tabla 5, la variación en la actividad específica es marginal, observándose una pequeña disminución en comparación a la etapa anterior, razón por la que la caracterización parcial de la enzima se hizo a partir de las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico.

### III. Caracterización parcial de lactato deshidrogenasa

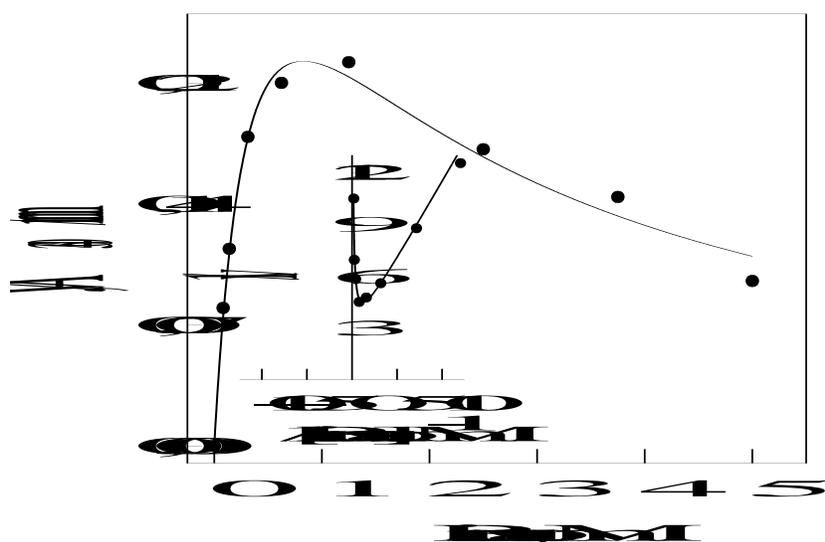
**Determinación de  $K_m$  aparente para los sustratos:** Previo a determinar las constantes cinéticas se realizó un ensayo en el cual se midió la variación de la actividad en la fracción C2, en función de la cantidad de dicha fracción, en presencia de concentraciones fijas de los sustratos. Como se esperaba la actividad aumenta de forma lineal respecto de la cantidad de enzima agregada en el ensayo (Figura 3).



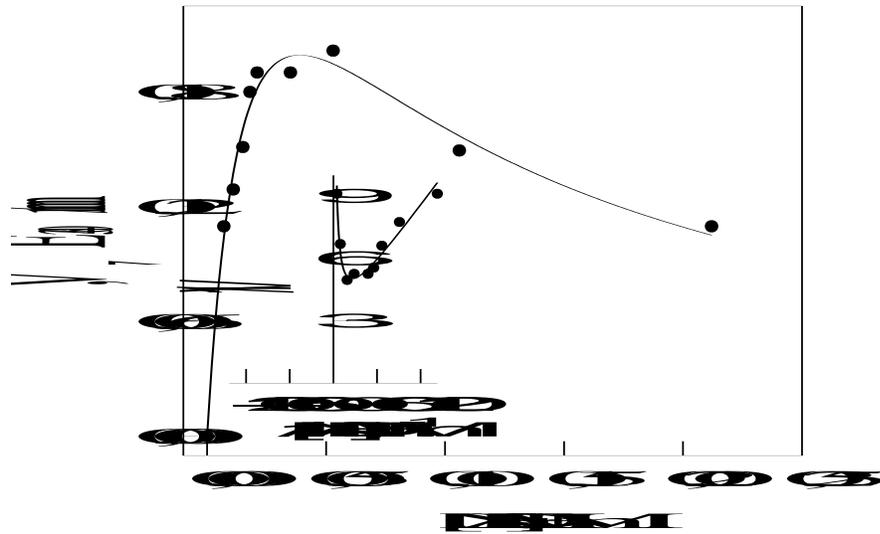
**Figura 3. Variación en la actividad en función de la concentración de la lactato deshidrogenasa.** La actividad se midió en presencia de piruvato 0,3 mM y NADH 0,2 mM.

Con el objetivo de caracterizar parcialmente la lactato deshidrogenasa, se determinaron los valores de  $K_m$  aparente de las dos fracciones enzimáticas obtenidas

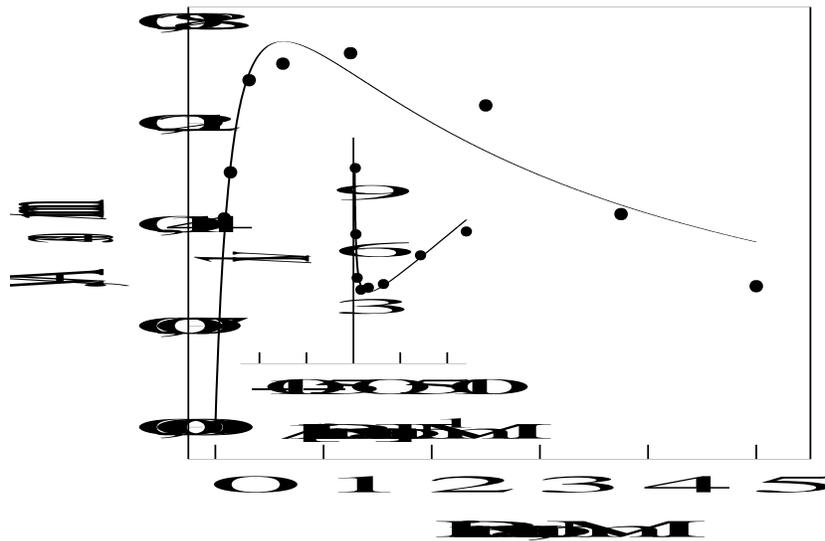
a partir de la cromatografía en DEAE-Celulosa (DEAE1 y DEAE2). En las figuras 4 y 5 se observan las curvas de saturación para piruvato y NADH respectivamente para la fracción DEAE1. En las figuras 6 y 7 se observa la curva de saturación para piruvato y NADH respectivamente para la fracción DEAE2. Los valores de las constantes se obtuvieron a partir de los dobles recíprocos que se muestran en las figuras respectivas y representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  el error estándar. Las curvas se ajustaron usando una ecuación que incluye un término que da cuenta de la inhibición por exceso de sustrato. Al comparar los valores de  $K_m$  de ambas preparaciones para los dos sustratos no se observan grandes diferencias (Tabla 8). Ello indica que a pesar de tratarse de dos formas que se retienen diferencialmente durante la cromatografía de intercambio iónico, ambas presentan valores de  $K_m$  similares para sus dos sustratos.



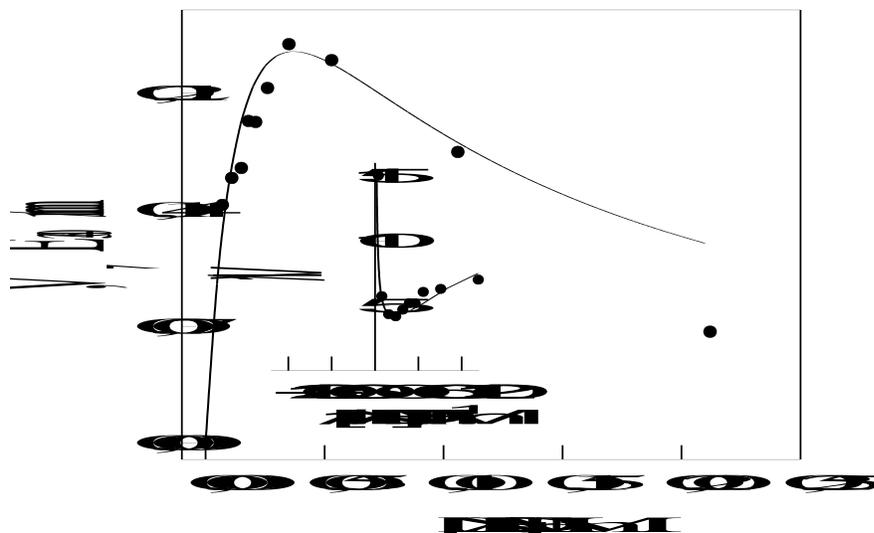
**Figura 4. Efecto de la concentración de piruvato sobre la actividad de lactato deshidrogenasa en una preparación parcialmente purificada. El ensayo se realizó en presencia de NADH 0,2 mM y concentraciones variables de piruvato.**



**Figura 5. Efecto de la concentración de NADH sobre la actividad de lactato deshidrogenasa en una preparación parcialmente purificada.** El ensayo se realizó en presencia de piruvato 0,3 mM y concentraciones variables de NADH.



**Figura 6. Efecto de la concentración de piruvato sobre la actividad de lactato deshidrogenasa en una preparación parcialmente purificada.** El ensayo se realizó en presencia de NADH 0,2 mM y concentraciones variables de piruvato.

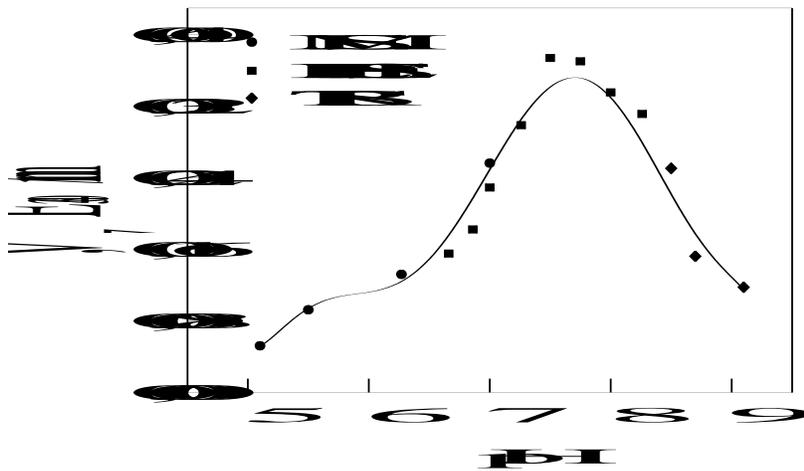


**Figura 7. Efecto de la concentración de NADH sobre la actividad de lactato deshidrogenasa en una preparación parcialmente purificada.** El ensayo se realizó en presencia de piruvato 0,3 mM y concentraciones variables de NADH.

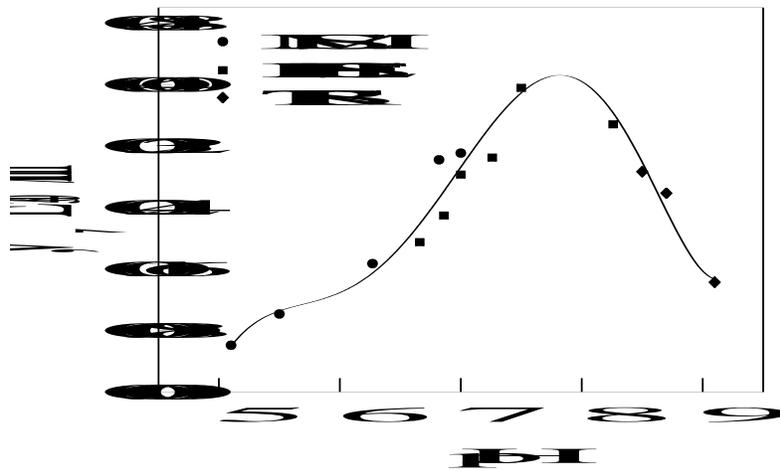
**Tabla 8. Valores de  $K_m$  para lactato deshidrogenasa de oocitos de rana.**

	DEAE 1	DEAE 2
<b>Sustrato</b>	<b><math>K_m</math> (mM)</b>	<b><math>K_m</math> (mM)</b>
<b>Piruvato</b>	<b><math>0,13 \pm 0,03</math></b>	<b><math>0,11 \pm 0,02</math></b>
<b>NADH</b>	<b><math>0,015 \pm 0,002</math></b>	<b><math>0,015 \pm 0,003</math></b>

**Determinación de pH óptimo:** El pH óptimo para la actividad de lactato deshidrogenasa se determinó usando las fracciones DEAE1 y DEAE2. Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9 respectivamente. Comparando los valores de pH en ambas preparaciones no se observaron grandes diferencias y se encontraron valores de aproximadamente 7,5.

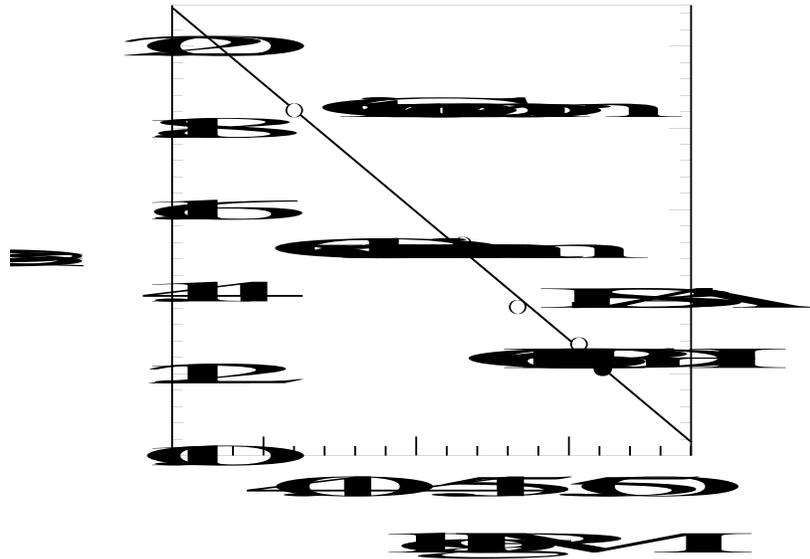


**Figura 8.** Variación de la velocidad de reacción catalizada por lactato deshidrogenasa de la fracción DEAE1 en función del pH. La actividad se midió en presencia de piruvato 0,3 mM y NADH 0,15 mM.



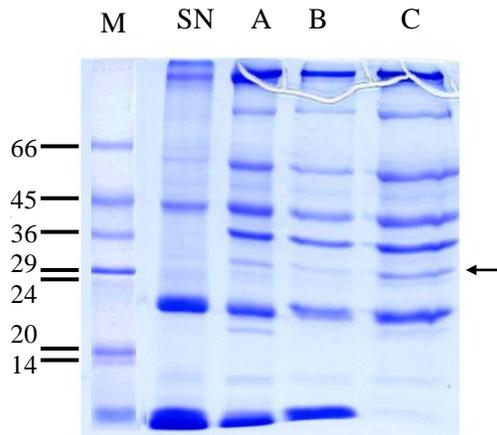
**Figura 9.** Variación de la velocidad de reacción catalizada por lactato deshidrogenasa de la fracción DEAE2 en función del pH. La actividad se midió en presencia de piruvato 0,3 mM y NADH 0,15 mM.

**Determinación del peso molecular nativo mediante cromatografía de exclusión molecular:** El peso molecular nativo estimado es de aproximadamente 131KDa (figura 10).



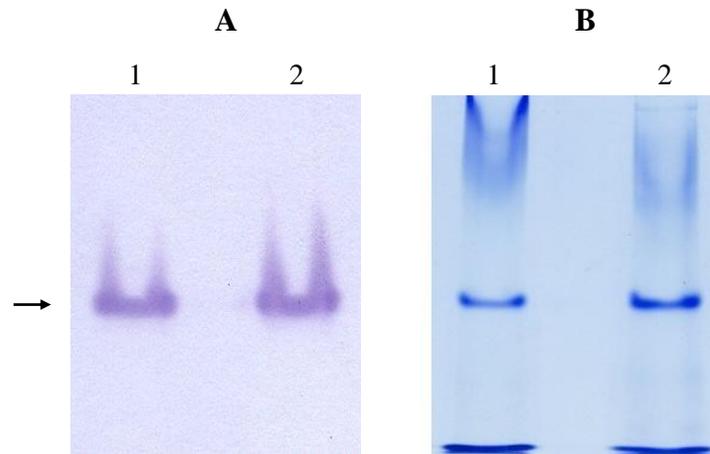
**Figura 10. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de la lactato deshidrogenasa.** Las distintas proteínas usadas como estándares de peso molecular, y la preparación de la enzima se cromatografiaron de acuerdo a los descrito en Materiales y Métodos. El círculo lleno representa el valor de  $V_e/V_o$  para la enzima

**Electroforesis desnaturante:** Como se observa en la figura 11, en todas las fracciones analizadas se observa una banda que migra alrededor de 33 KDa que presuntamente corresponde al peso molecular de la subunidad de lactato deshidrogenasa, lo que se correlaciona con el peso molecular nativo determinado por filtración en gel, que resultó ser de 131 KDa. Puesto que buena parte de las enzimas descritas con actividad de lactato deshidrogenasa son tetrámeros, parece razonable concluir que la banda indicada por la flecha en la figura 11 correspondería a la subunidad de lactato deshidrogenasa.



**Figura 11. Electroforesis desnaturante de fracciones obtenidas a partir de homogeneizados de oocitos.** Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 10% en presencia de SDS. La flecha indica la posición presunta de lactato deshidrogenasa ( $\approx 33$  KDa). Los números indican el peso molecular de los estándares en KDa. M: marcador de peso molecular; SN: sobrenadante; A: fracción DEAE1; B: fracción DEAE2; C: fracción Sepahacryl

**Electroforesis nativa:** Como se observa en la figura 12, en todas las fracciones analizadas sometidas a la tinción para detectar la actividad de lactato deshidrogenasa se observan bandas con migración parecidas (Gel A). Estas bandas coinciden con la migración de las bandas en las fracciones sometidas a tinción con Azul de Coomasie (Gel B). Puesto que las bandas de cada fracción presentan pequeñas diferencias en relación con la migración, sugiere que existe más de una isoforma de la enzima.



**Figura 12. Electroforesis nativa de fracciones obtenidas a partir de homogeneizados de oocitos.** Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 7% y se tiñeron para detectar la actividad de lactato deshidrogenasa (A) o con Azul de Coomasie para detectar proteínas (B). La flecha indica la posición presunta de lactato deshidrogenasa. 1: fracción DEAE1; 2: fracción DEAE2.

## 8.- DISCUSIÓN

La síntesis de glicógeno ocurre mediante dos vías en los oocitos de rana. La vía clásica, o directa, que se inicia con la incorporación de glucosa a altas concentraciones (1 mM intracelular), y la vía indirecta iniciada con la incorporación de glucosa a bajas concentraciones (0,17 mM intracelular). Es en esta vía indirecta que actúa lactato deshidrogenasa y que es responsable de la conversión reversible de piruvato a lactato. Con el propósito de contribuir al conocimiento de la organización del metabolismo de glucosa en oocitos de rana se estudió la localización subcelular de lactato deshidrogenasa.

### I. Localización subcelular de lactato deshidrogenasa

A partir de los resultados de actividad obtenidos para lactato deshidrogenasa y fosfoglucoasa isomerasa, enzima marcadora de fracción citoplasmática, se observó que ambas enzimas se distribuyen de manera similar en las distintas fracciones del protocolo de fraccionamiento subcelular. Debido a que la fosfoglucoasa isomerasa es una enzima presente exclusivamente en el citoplasma, este resultado indica que en los oocitos de rana la localización subcelular de lactato deshidrogenasa es citoplasmática. Los pequeños valores de actividad encontrados en las fracciones mitocondriales corresponden probablemente a contaminación de esas fracciones con la fracción citoplasmática, puesto que valores de actividad relativa comparables se observan para el caso de la fosfoglucoasa isomerasa. En el mismo sentido, la presencia de actividad de enzimas mitocondriales en las fracciones citoplasmáticas es insignificante.

Con respecto a los resultados de actividad obtenidos para succinato deshidrogenasa se observó que se distribuye de manera coherente con su localización mitocondrial. Idénticos resultados se observaron para la enzima citocromo oxidasa (resultados no mostrados). La detección de actividad de los marcadores mitocondriales en las fracciones citoplasmáticas se deben

probablemente a contaminación y/o ruptura de los organelos. Al respecto, durante las determinaciones de citocromo oxidasa, las mediciones de consumo de oxígeno (datos no mostrados) sugieren que las mitocondrias se encuentran intactas, lo que excluye que la contaminación se produzca por ruptura del organelo. Otra posibilidad de contaminación es que al parecer el tamaño de los organelos es variable (Massover, 1971), lo que origina la posibilidad de que existan mitocondrias pequeñas en la fracción citoplasmática obtenida en este trabajo.

Los resultados descritos concuerdan con estudios previos en otros modelos, en los que se ha demostrado que la actividad de LDH asociada a la fracción mitocondrial es atribuible a una leve contaminación con la fracción citosólica, sugiriendo que la mitocondria no posee la maquinaria enzimática para oxidar lactato (Sahlín *et al.*, 2002). Esto está en directa contraposición a lo informado por Brooks *et al.* (1999a), quienes determinaron actividad de LDH en forma indirecta, asociada a fracciones mitocondriales, y en forma directa, por microscopía electrónica usando anticuerpos antiLDH. Por otra parte se sabe que los constituyentes mitocondriales como enzimas y otras proteínas sintetizadas en el citoplasma requieren de la presencia de señales en su estructura primaria para destinación mitocondrial; sin embargo, no se ha identificado en el genoma la secuencia de LDH con las características apropiadas que permitan el movimiento transmembrana de la proteína hacia el interior del organelo. De este modo, los resultados de Brooks *et al.* (1999a) que localizan la enzima al interior de la mitocondria, son difíciles de explicar.

La vía indirecta se inicia con la incorporación de glucosa a bajas concentraciones al citoplasma, resultando en la formación de lactato a través de la operación de la glicólisis. No obstante, la microinyección de [<sup>14</sup>C]-lactato al citoplasma no resulta en su incorporación en glicógeno, observándose, una alta producción de CO<sub>2</sub> (datos no publicados, Tabla 1). Una forma de explicar este hecho, es que el lactato ingrese a la mitocondria y se convierta en piruvato, lo que requeriría actividad de LDH al interior de la mitocondria. Debido a que en este

estudio no se detectó actividad de LDH intramitocondrial, se descarta la posibilidad que el lactato exógeno ingrese y se oxide al interior de la mitocondria. Asimismo, también es poco probable la existencia una etapa intramitocondrial de oxidación de lactato resultante de la etapa de glicólisis en la vía indirecta, que luego, mediante la operación de las reacciones de la vía gluconeogénica es incorporado al glicógeno.

## II. Purificación parcial de lactato deshidrogenasa

El procedimiento contempló el uso de dos técnicas de cromatografía (intercambio iónico y exclusión molecular) para la purificación de lactato deshidrogenasa en oocitos de rana. La elución de dos fracciones con actividad, resultantes de la cromatografía de intercambio iónico, sugiere la presencia de dos isoformas de lactato deshidrogenasa en oocitos de rana. En experimentos sucesivos, utilizando una gradiente 30-300 mM KCl, la fracción enzimática obtenida se purificó 3,35 veces. La actividad específica resultante fue 5,52 U/mg de proteína. Este valor es superior a los 1,65 U/mg calculado para el homogeneizado de oocito de rana, y muy similar al calculado para la fracción resultante de la cromatografía de exclusión molecular de 5,41 U/mg de proteína. Estos resultados indican que el método de exclusión molecular no mejoró el grado de purificación de la enzima. Una explicación posible para lo anterior es que la enzima se inactive durante la cromatografía por efecto de dilución, hecho mencionado por Henzel *et al.*, (1977), para LDH en *Lactobacillus curvatus*.

## III. Caracterización parcial de lactato deshidrogenasa

**Determinación de  $K_m$  aparente para los sustratos:** Como se esperaba, en los experimentos previos se demostró que la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima agregada. Se determinaron los valores de  $K_m$  para los sustratos piruvato y NADH, en las fracciones DEAE1 y DEAE2 retenidas diferencialmente durante la cromatografía de intercambio iónico, resultando ser muy similares para cada fracción (Tabla 8). Los valores de  $K_m$  para

piruvato observados en este estudio son similares al descrito para *Rana perezi* (0,117 mM) (Mendiola y De Costa, 1991). Para NADH en tanto, el valor encontrado para la enzima de *Sphyraena barracuda* (0,0143 mM) (Holland *et al.*, 1997) es similar al informado en el presente estudio.

Se observó una marcada disminución de la velocidad de la reacción al aumentar las concentraciones de los sustratos para ambas fracciones. En el caso del sustrato piruvato se observó que esta disminución se presenta a concentraciones por sobre 1,5 mM. Este efecto se ha observado en el invertebrado *Saduria entomon* (Mulkiewicz *et al.*, 2000). En el caso de NADH la disminución de la velocidad se observó a concentraciones por sobre 0,05 mM. Una explicación posible para estas observaciones es que ocurra, efectivamente, inhibición por exceso de sustrato en las condiciones experimentales usadas. Las concentraciones intracelulares de piruvato y  $\text{NAD}^+$  descritas para oocitos de *Xenopus laevis* son 0,1 y 0,2 mM por huevo, respectivamente (Dworkin y Dworkin-Rastl, 1990). Estas concentraciones son muy cercanas a las utilizadas en los ensayos de este trabajo, y en el caso del  $\text{NAD}^+$  son aún mayores a aquellas concentraciones en que se observa la disminución de la velocidad. Esto sugiere que la disminución observada en nuestro experimento pudiera tener algún significado fisiológico.

**Determinación de pH óptimo:** Se determinó que el pH óptimo para las fracciones DEAE1 y DEAE2 es muy semejante, aproximadamente de 7,5, a lo descrito por Eichner (1982) en *Homarus americanus*.

**Determinación del peso molecular nativo:** El peso molecular nativo obtenido es similar a lo descrito para *Fundulus heteroclitus* (139000 Da) (Place y Powers, 1984). De acuerdo al resultado del presente trabajo, y considerando la conformación tetramérica de la enzima en la enorme mayoría de los estudios informados en vertebrados, el peso molecular obtenido para cada subunidad de la enzima sería de 32750 Da, lo que se aproxima mucho a los 33 KDa calculados en la

electroforesis desnaturante.

**Determinación del peso molecular de la subunidad:** El peso molecular calculado con esta técnica es de 33 KDa. La correlación existente entre este resultado y el peso molecular nativo determinado por filtración en gel de 131 KDa, sugiere que corresponde al peso molecular de la subunidad de lactato deshidrogenasa. Este resultado se aproxima a lo descrito por Place y Powers (1984) para *Fundulus heteroclitus* (33700 Da).

**Determinación de isoenzimas:** Por medio de electroforesis nativa se detectaron dos bandas, correspondientes a las fracciones DEAE1 y DEAE2 respectivamente, lo que sugiere, en oocitos de *C. caudiverbera*, la presencia de dos isoformas de lactato deshidrogenasa, corroborando el resultado descrito por Radojković y Ureta (1982). En *Xenopus laevis* en cambio, se ha descrito la existencia de tres isoformas de la enzima, denominadas LDH-A, LDH-B y LDH-C respectivamente (Tsuji *et al.*, 1994). De ellas sólo la secuencia LDH-C se expresaría en oocitos, no encontrándose presentes las isoformas correspondientes a las combinatorias de los productos de expresión de los genes *LDH-A* y *LDH-B*. Respecto de este punto, la literatura da cuenta de la posibilidad que lactato deshidrogenasa sea sustrato de proteína quinasas; en efecto, Cooper *et al.* observaron la existencia de tirosina fosforilada en la posición 239 de LDH-A de fibroblastos de *Gallus gallus* transformados por el virus del sarcoma de Rous, el cual codifica una proteína quinasa específica para la fosforilación de tirosina (Cooper *et al.*, 1984). La inspección de la secuencia de LDH-C de *X. laevis* revela que en ella existe un 69% de identidad con LDH-A de *Gallus gallus*, con un sitio de consenso para fosforilación alrededor de la posición 240, en una secuencia altamente conservada (Tabla 9). De esta forma, una explicación alternativa al número de isoenzimas encontradas por Radojković y Ureta, y a la existencia de formas separables por cromatografía de intercambio aniónico, y por electroforesis nativa, en el presente trabajo es proponer que ellas son el resultado de distintos estados de

fosforilación de la enzima.

**Tabla 9. Comparación de secuencia de aminoácidos de sitios de fosforilación.**

Proteína	Secuencia de aminoácidos
	201.....210.....220.....230.....240.....250
LDH-C ( <i>Xenopus laevis</i> )	VWSGVNVAGV SLKALHPDMG TDADKEHWKE VHKQVDSAY EVIKLKGYS
LDH-A ( <i>Gallus gallus</i> )	VWSGVNVAGV SLQSLKPEIG TDQDSCNWKE VHKKVDSAY EVIKLKGYSN
Consenso	VWSGVNVAGV SL L P G TD D WKE VHK VDSAY EVIKLKGYS

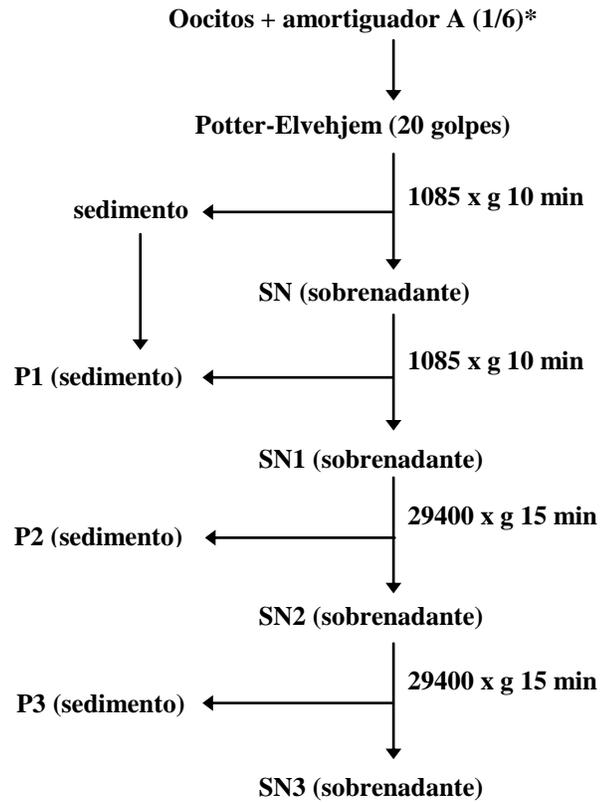
En este estudio, mediante fraccionamiento subcelular, se determinó la presencia de LDH en fracciones citoplasmáticas. Con el objeto de caracterizar parcialmente sus propiedades, la enzima obtenida a partir de oocitos de rana chilena se purificó parcialmente mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. La cromatografía de intercambio aniónico permitió la separación de dos isoformas de la enzima. En ambas isoformas se observó una notable similitud en las propiedades bioquímicas, como el valor de  $K_m$  para los sustratos, pH óptimo de actividad, peso molecular nativo y de las subunidades de ambas isoformas.

## 9.- CONCLUSIONES

1. Se determinó, mediante fraccionamiento subcelular, que la enzima lactato deshidrogenasa está presente en la fracción citoplasmática y ausente en la fracción mitocondrial de los oocitos de rana chilena
2. Se purificó parcialmente lactato deshidrogenasa obtenida a partir de oocitos de rana chilena. Se observó, mediante cromatografía de intercambio iónico y electroforesis nativa, la presencia de dos isoformas de la enzima
3. Los valores de  $K_m$  para los sustratos piruvato y NADH, así como el pH óptimo de ambas isoformas resultaron ser notablemente similares.

## ANEXO

### Protocolo de centrifugación diferencial modificado



\*Relación entre peso húmedo de oocitos por volumen de amortiguador.

**Todos los sedimentos se resuspendieron en un volumen adecuado de amortiguador A**

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- Baumgart E, Fahimi H.D., Stich A, Volkl A.** (1996) L-lactate dehydrogenase A4 and A3B isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver. Evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. *J. Biol. Chem.* **271**: 3846-3855
- Bergmeyer H-U., Berna E., Hess B.** (1963) Lactic dehydrogenase In: *Methods of enzymatic analysis*. H-U Bergmeyer Ed. Academic Press, New York, USA. 736-741
- Bogenhagen D.F., Wang Y., Shen E.L., Kobayashi R.** (2003) Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol. Cell. Proteomics.* **2**: 1205-1216
- Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brooks G.A., Dubouchaud H., Brown M.A., Sicurello J.P., Butz C.E.** (1999a) Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 1129-1134
- Brooks G.A., Brown M.A., Butz C.E., Sicurello J.P., Dubouchaud H.** (1999b) Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J. Appl. Physiol.* **87**: 1713-1718
- Cooper J.A., Esch F.S., Taylor S.S., Hunter T.** (1984) Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **259**: 7835-7841
- Dabiké M., Preller A.** (1999) Cytoarchitecture of *Caudiververa caudiververa* stage VI oocytes: a light and electron microscope study. *Anal. Embryol.* **199**: 489-497
- Dumont J.N.** (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* **136**: 153-180.
- Dworkin M.B., Dworkin-Rastl E.** (1990) Regulation of carbon flux from amino acids into sugar phosphates in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **138**: 177-187
- Eichner R.D.** (1982) L(+)-lactate dehydrogenase from *Homarus americanus*. *Methods Enzymol.* **89**: 359-362
- Gracy R.W., Tilley B.E.** (1975) Phosphoglucose isomerase of human erythrocyte and cardiac tissue. *Methods Enzymol.* **41**: 392- 400
- Guixé V., Preller A., Kessi E., Ureta T.** (1997) Regulatory role of fructose-2,6-bisP on glucose metabolism in frog oocytes: *In vivo* inhibition of glycogen synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**: 75-81

- Hall T.A.** (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 98/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hensel R., Mayr, U., Stetter, K.O., Kandler, O.** (1977) Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Arch. Microbiol.* **112**: 81-93
- Holland L.Z., McFall-Ngai M., Somero G.N.** (1997) Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of barracuda fishes (genus *Sphyraena*) from different thermal environments: differences in kinetic properties and thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site. *Biochem.* **36**: 3207- 3215
- Kessi E., Guixé V., Preller A., Ureta T.** (1996) Glycogen synthesis in amphibian oocytes: evidence for an indirect pathway. *Biochem. J.* **315**: 455-460
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685
- Massover W.H.** (1971) Intramitochondrial yolk-crystals of frog oocytes: I. Formation of yolk-crystal inclusions by mitochondria during bullfrog oogenesis. *J. Cell Biol.* **48**: 266-279
- Mendiola P., De Costa J.** (1991) The effects of temperature and pH on the kinetic properties of heart muscle lactate dehydrogenase from anuran Amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **98**: 529-534
- Mulkiewicz E., Zietara, M.S., Stachowiak, K., Skorkowski, E.F.** (2000) Properties of lactate dehydrogenase from the isopod, *Saduria entomon* *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **126**: 337-346
- Nohl H., Hegner D.** (1977) The effects of some nutritive antibiotics on the respiration of rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 433-437
- Olive C., Levy R.** (1975) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Methods Enzymol.* **41**: 196-201
- Ovadi J., Srere P.A.** (1996) Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell Biochemistry and Function.* **14**: 249-258
- Place A.R.; Powers, D.A.** (1984) Purification and characterization of the lactate dehydrogenase (LDH-B4) allozymes of *Fundulus heteroclitus* *J. Biol. Chem.* **259**: 1299-1308
- Radojković J., Ureta T.** (1982) Regulation of carbohydrate metabolism in microinjected frog oocytes. *Arch. Biol. Med. Exp.* **15**: 395-405
- Sahlin K., Fernström M., Svensson M., Tonkonogi M.** (2002) No evidence of an intracellular lactate shuttle in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* **541**: 596-574

- Srere P.** (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 89-124
- Srere P.A., Ovadi J.** (1990) Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett.* **268**: 360-364
- Ureta T.** (1985) Organización del metabolismo: localización subcelular de enzimas glicolíticas. *Arch. Biol. Med. Exp.* **18**: 9-32
- Ureta T., Preller A., Kessi E.** (2001) Frog oocytes: A living test tube for studies on metabolic regulation. *IUBMB Life.* **51**: 5-10
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T. J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tsuji S., Qureshi M.A., Hou E. W., Fitch W.M., Li S. S.-L.** (1994) Evolutionary relationships of lactate dehydrogenase (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9392- 9396
- Wilding M., Carotenuto R., Infante V., Dale B., Marino M., Di Matteo L., Campanella C.** (2001) Confocal microscopy analysis of the activity of mitochondria contained within the 'mitochondrial cloud' during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Zygote.* **9**: 347-352