

# Estudo Eletroforético de Lactato Desidrogenase (LDH) em *Astyanax bimaculatus* provenientes de lagoas de mineração / São José dos Campos-SP

Ana Carolina Isaias<sup>1</sup>, Murilo Pires Fiorini<sup>2</sup>, Lorenzo Girardi<sup>3</sup>, Maria Regina de Aquino Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba / Faculdade de Educação/Curso de Ciências Biológicas  
<sup>1234</sup>Universidade do Vale do Paraíba / NEPLI/IP&D- Av. Shishima Hifumi, 2911, CEP 12244-000 São José dos Campos – SP

**Resumo-** A evolução dos organismos, do metabolismo se adaptaram às temperaturas ambientais. Os peixes apresentam um maior número de locos gênicos do que os vertebrados terrestres, principalmente no que se refere aos sistemas isozímicos como a da lactato desidrogenase ocupando uma importante posição no metabolismo celular fora da via glicolítica, na fase anaeróbica, que o piruvato é convertido a lactato pela ação da LDH – lactato desidrogenase, e as enzimas podem alterar a sua afinidade de acordo com o substrato. O estudo da LDH teve um grande impulso pela combinação da técnica de eletroforese em gel de amido, foi detectado que existe como cinco formas moleculares resultantes da associação ao acaso de duas subunidades, A e B, formando o loco *LDH-A\**, codifica a subunidade A, predominante em músculo esquelético e o loco *LDH-B\** codifica a subunidade B, em músculo cardíaco. A LDH serve como indicadora de condições fisiológicas ou estruturais alteradas, desempenha um papel importante em condições de estresse ocasionado por agentes químicos, e têm sido objeto de estudos devido à alteração de sua atividade em organismos aquáticos sob exposição aguda ou crônica a agroquímicos.

**Palavras-chave:** Isozimas, lactato desidrogenase e eletroforese.

**Área do Conhecimento:** Genética e evolução.

## Introdução

As características estruturais e funcionais de um organismo, em geral, parecem ser especializadas em aumentar suas chances de sucesso no ambiente em que se encontram.

Durante a evolução dos organismos, o metabolismo celular e conseqüentemente, a estrutura e função dos componentes celulares se adaptaram às temperaturas ambientais e celulares (ZUBER, 1988).

Assim, dentro desta forma de adaptação bioquímica, as enzimas podem alterar a sua afinidade ao substrato em função da temperatura, pH e outros fatores pelos quais suas funções sejam moduláveis.

Os peixes apresentam um maior número de locos gênicos do que os vertebrados terrestres, principalmente no que se refere aos sistemas isozímicos da isomerase fosfoglicônica, lactato desidrogenase, malato desidrogenase e creatina quinase. Segundo FISHER *et al.* (1980), a relativa constância no número de locos entre as várias espécies de peixes, assim como os padrões característicos de expressão tissular diferencial dos locos isozímicos para estes organismos sugerem que as isozimas desempenhem papéis essenciais na fisiologia destes organismos.

A existência de variabilidade genética é uma condição necessária para a evolução. Na

realidade, uma quantidade específica e um tipo definido de variação genética pode provocar a adaptação e a adaptabilidade de uma população. As vantagens de um estoque de variação genética são evidentes, pois quanto maior o número de tipos genéticos em uma população, tanto maior a sua probabilidade de incluir genótipos capazes de suportar mudanças estacionais ou temporais. Assim, a presença da variabilidade genética permite uma utilização melhor do ambiente, uma vez que tornam possível a colonização de habitat marginais e diferentes sub-nichos.

Desta forma, o estudo de isozimas proporcionou, e tem proporcionado, uma considerável compreensão das subunidades estruturais das enzimas (MARKERT & WHITT, 1968).

A lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27 lactato: NAD-oxidoreductase) é encontrada em todas as células dos vertebrados assim como, em muitos invertebrados, ocupando uma importante posição no metabolismo celular fora da via glicolítica. Na fase anaeróbica, o piruvato é convertido a lactato pela ação da LDH, com oxidação simultânea da coenzima NADH a qual é essencial para a complementação de um passo anterior da glicólise, ou seja, na passagem de gliceraldeído-3-fosfato para 1,3-difosfoglicerato. Isto possibilita a continuidade da glicólise mesmo em ausência de oxigênio. Quando o oxigênio se

torna novamente disponível, o lactato pode ser reoxidado; e o piruvato é levado, via acetil coenzima A, para o ciclo de Krebs com conseqüente fosforilação oxidativa e formação de gás carbônico e água.

O estudo da LDH teve um grande impulso com HUNTER & MARKERT (1957), pela combinação da técnica de eletroforese em gel de amido, desenvolvida por SMITHIES (1955), com métodos histoquímicos (zimograma). Com isso foi possível verificar que a LDH é um tetrâmero que, na maioria dos vertebrados, existe como cinco formas moleculares resultantes da associação ao acaso de duas subunidades, A e B, codificadas por dois locos gênicos diferentes (CAHN *et al.*, 1962; SCHWANTES, 1970). O loco *LDH-A\**, codifica a subunidade A, predominante em músculo esquelético e o loco *LDH-B\** codifica a subunidade B, predominante em músculo cardíaco. Essa associação ao acaso leva a formação dos diferentes tetrâmeros: A4, A3B, A2B2, AB3, B4 com peso molecular de aproximadamente 140.000 (DARNALL & KLOTZ, 1975) apresentando diferentes pontos isoelétricos. O homopolímero B4 é carregado mais negativamente sendo, portanto, anódico. Já o homopolímero A4 é carregado menos negativamente, constituindo-se na isozima catódica e os heteropolímeros, conseqüentemente, apresentam mobilidade intermediária a estes (PICKLES *et al.* 1964). Todavia, em um terço dos teleósteos estudados, a LDH apresenta-se com mobilidade reversa, ou seja, a isoforma A4 é o componente mais anódico e a isoforma B4 é o menos anódico

A LDH é uma enzima não somente funciona como enzima de ligação entre o metabolismo de proteínas e carboidratos, como também serve como indicadora de condições fisiológicas ou estruturais alteradas. Esta enzima desempenha um papel importante em condições de estresse ocasionado por agentes químicos, e têm sido objeto de estudos devido à alteração de sua atividade em organismos aquáticos sob exposição aguda ou crônica a agroquímicos (Rao *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 1995; Asztalos *et al.*, 1990), incluindo compostos com ação fungicida (Rojik *et al.*, 1983, Tiedge *et al.*, 1986).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar o padrão eletroforético da LDH de uma espécie de lambari – *Astyanax bimaculatus*, coletados em uma cava de areia abandonada no Vale do Paraíba (Campus Urbanova-Univap/São José dos Campos).

## Materiais e Métodos

Foram realizadas 02 coletas nas quais utilizou-se redes de espera com malhas de 3,0 a 10,0 cm em diferentes estações ao longo do ambiente de estudo, onde foram coletados vinte e nove

animais.

Na determinação dos padrões eletroforéticos, foram utilizados músculo esquelético, coração e fígado de cada exemplar. Os tecidos foram homogeneizados em um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, em igual volume de tampão fosfato de potássio, 50 mM pH 7,0 e os extratos, obtidos por centrifugação a 12.000g, a 4°C, durante 20 minutos.

Para a determinação dos padrões eletroforéticos dos exemplares, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de amido, sistema horizontal, segundo SMITHIES (1955). No preparo do gel foi utilizado o amido de milho, obtido segundo VAL *et al.* (1981), numa concentração de 13% e os sistemas de tampão Tris Borato EDTA alcalino (EBT) 1,42M pH 8,7.

Após a eletroforese, as bandas com atividade foram reveladas através de métodos de coloração histoquímica. Na detecção da atividade da LDH utilizou-se a seguinte solução de coloração: 64 mM de lactato,  $7,099 \times 10^{-4}$  M de MTT,  $2,88 \times 10^{-4}$  M de PMS,  $2,491 \times 10^{-4}$  M de NAD, dissolvidos em tampão fosfato de sódio pH 7.0 0,5M e ágar 1,5% a 50°C.

Para a descrição dos locos/alelos, foram adotadas as nomenclaturas postuladas por SHAKLEE *et al.* (1989). Em caso de detecção, os alelos foram denominados utilizando o código 100 para o alelo mais comum em cada loco e os demais alelos do loco denominados de acordo com a distância em que as respectivas bandas se posicionaram em relação ao alelo 100.

As frequências gênicas foram calculadas com base na análise dos locos detectados em eletroforese, admitindo-se uma herança mendeliana simples do tipo co-dominante.

## Resultados

Até o presente momento, em 15 exemplares analisados de *Astyanax bimaculatus*, foi identificado em em gel de amido apenas um fenótipo distinto tanto para o loco *LDH – A\**, quanto para o loco *LDH-B\** (A(100) / B(100)).

Os padrões eletroforéticos da Lactato desidrogenase da espécie de peixe, *Astyanax bimaculatus*, aqui analisadas, foram interpretadas de acordo com a mobilidade relativa e a especificidade tissular dos seus componentes eletroforéticos. Assim, no presente trabalho, foram detectados os seguintes componentes: o mais anódico ou B4, que é característico do músculo cardíaco, e o mais catódico ou A4 que é predominante em músculo esquelético. Além dos homopolímeros, o padrão eletroforético da LDH pode apresentar também os heterodímeros A2B2, formados pela associação ao acaso das duas subunidades A e B, sendo os demais heteropolímeros não detectados.

## Discussão

A Lactato desidrogenase tem sido estudada em diversos grupos de vertebrados, dos Agnathas ao homem.

Tais estudos têm revelado que a variação genética que leva a existência de alelos e locos múltiplos devida a duplicação gênica, que contribui para a multiplicidade da enzima (LDH) em varias espécies. O numero de genes que codifica a LDH pode variar entre os vertebrados, no restante ela existe tipicamente como uma banda principal podendo ter bandas menores devido aos heterodimeros e também a presença de polimorfismo.

A lactato desidrogenase dos vertebrados é uma enzima de alto significado e de especial interesse por ocorrer como isozimas, codificadas por genes múltiplos, que evoluíram substancialmente em sua estrutura e regulação durante o desenvolvimento filogenético. Assim como, visto anteriormente em outros estudos, foram detectados dois locos – LDH – A\* e LDH – B\*, assim como em outras espécies de peixes.

A atividade em músculo esquelético consistiu principalmente na subunidade produzida pela LDH – A\*, e em músculo cardíaco, predominantemente na atividade do loco LDH – B\*.

## Considerações finais

Foi analisado padrão eletroforético da LDH em 15 indivíduos dos 29 exemplares coletados sendo que, para os dois loci que as codificam, não foi observado a presença de alelos variantes.

Assim, a fim de realizarmos um estudo populacional, torna-se necessário ampliar o número de indivíduos analisados procurando verificar realmente se na população estudada não existe a presença de alelos variantes, para ambos os loci da LDH.

## Referências

-CAHN, R. D., KAPLAN, N. O., LEVINE, L. & ZWILLING, E. Nature and development of latic dehydrogenase. *Science*, **85** :147-165, 1962.

-DARNALL, D.W. & KLOTZ, I.M. Protein subunits: a table (revised edition). *Arch.Biochem.*, **166** : 651-682, 1975.

-FENERICH-VERANI, N.; SCHWANTES, M. L. B. & SCHWANTES, A.R. Patterns of gene expression during *Prochilodus scrofa* (Characiformes: Prochilodontidae) embryogenesis - II. Soluble malate dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**: 247-255, 1990a.

-FISHER, S. F.; SHAKLEE, J. B.; FERRIS, S. D. & WHITT, G. S. Evolution of five multilocus isozyme systems in the chordates. *Genetics*, **52/53**: 73-85, 1980.

-HUNTER, R. L. & MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, **125**: 1290-1295, 1957.

-MARKERT, C.L. & WHITT, G.S. Evolution of gene. *Science*, **189**: 102 – 114, 1975.

-SCHWANTES, M.L.B. & SCHWANTES, A. R. Adaptative features of ectothermic enzymes. II. Temperature effects of acclimation temperature on the malate dehydrogenase of the spot, *Leiostomus xanthurus*. *Comp. Biochem.Physiol.*, **72 B**: 49 – 58, 1982a.

-SHAKLEE, J. B.; WHITT, G. S. Lactate dehydrogenase isozymes of gadiform fishes: patterns of gene expression indicate a heterogenous taxon. *Copeia*, **3**: 563 – 578, 1981.

-SMITHIES, O. Zone eletrophoresis in starch gels: group variation in the serum protein of normal human adults. *Biochemical Journal*. **61**: 629 – 641, 1955.

-RAO, R.V.K.; SURENDRANATH, P.; KODAVANTI, P.R.S. Levels of transaminases in tissues of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) following sublethal kelthane exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.44, p.114-120, 1990

- REDDY, A.N.; VENUGOPAL, N.B.R.K.; REDDY, S.L.N. Effect of endosulfan 35 EC on some biochemical changes in the tissues and haemolymph of a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.55, p.116-121, 1995.

-ROJIK, I.; NEMSOK, J.; BOROSS, L. Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. **Acta Biologica Hungarica**. v.34, p.81-92, 1983.

-TIEDGE, H.; NAGEL, R.; URICH, K. Effect of substituted phenols on transaminase activity in the fish, *Leuciscus idus melanotus* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **36**, p.176-180, 1986.

-VAL, A. L. et al., Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforetico. *Ciencia e cultura*, 33:737 – 741, 1981

-ZUBER, H. Temperature adaptation of lactate dehydrogenase. Structural, functional and genetic aspects. *Biophys. Chem.*, **29**: 171-179, 1988.