ACTIVIDAD DE LA LACTICO DEHIDROGENASA (LDH) EN *EMERITA ANALOGA* (STIMPSON 1857) CRUSTACEA, HIPPIDAE

LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY (LDH) IN *EMERITA ANALOGA* (STIMPSON 1857) CRUSTACEA, HIPPIDAE

Klaudia L. Hernández Rodrigo R. González & Renato A. Quiñones B.

Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción.
Casilla 160-C, Concepción, Chile. khernan@udec.cl

RESUMEN

Emerita analoga (Stimpson 1857) habita en la zona infralitoral de playas arenosas, desarrollando intensa movilidad en la zona de barrido y embate de las olas. Su habilidad motriz, reflejada en una constante actividad muscular explosiva, sugiere una alta actividad glicolítica (fermentativa) complementaria a la fosforilación oxidativa. En este trabajo se determinó la actividad específica aparente de la láctico dehidrogenasa (LDH EC 1.1.1.27) de *E. analoga* como indicador de hipoxia funcional. Además, se estudió el efecto del peso y del pH sobre la actividad LDH, así como en los valores aparentes de sus parámetros cinéticos ($V_{\max}$ y K_m).

Los resultados indican que los organismos grandes ($\geq 1,5$) y pequeños ($\leq 1,5$ mm) de *E. analoga*, se ajustan a una curva alométrica actividad - peso positiva ($p = 0,0108$). El pH óptimo de la LDH es 7,8 para animales pequeños y de 5,5 en animales grandes. Esto sugiere que la acidosis metabólica podría ser regulada a escala enzimática en los animales pequeños y como tampón muscular en los grandes. Para los dos tamaños la LDH mostró una cinética Michaeliana, siendo el $V_{\max}$ de los animales grandes de un orden de magnitud mayor que en los pequeños (1,043 y 0,121 mmol min⁻¹ g wet wt⁻¹ respectivamente). Sin embargo, se observó una mayor afinidad (menor valor de la constante de Michaelis) en los organismos pequeños que en los grandes (0,076 y 0,094 mM respectivamente). Finalmente, la pendiente positiva de la curva actividad - peso concuerda con la alometría del metabolismo anaeróbico escasamente descrito e inverso a la pendiente del aeróbico. Esto sugiere que la LDH tendría un rol importante en la movilidad de *E. analoga* durante su ontogenia en la zona infralitoral.

PALABRAS CLAVES: *Emerita analoga*, metabolismo anaeróbico, láctico dehidrogenasa, LDH, actividad de la LDH, alometría.

ABSTRACT

Emerita analoga (Stimpson 1857) inhabitant sandy beaches, it develops intense activity in swatch and fetch embattle zone of the waves. Its motility reflected by a constant and burst muscular activity, suggests a high glycolytic (fermentative) activity, complementary to the oxidative phosphorylation. In this study, the apparent specific activity of the enzyme lactic dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) of *E. Analoga* was tested, as indicator of functional hypoxia. In addition, the effect of weight and pH on LDH activity was studied, and also the apparent values of its kinetic parameters ($V_{\max}$ y K_m). Our results indicated that apparent specific LDH activity in bigger ($\geq 1,5$ mm) and smaller ($\leq 1,5$ mm in length) organisms of *E. analoga*, correspond to a positive allometric pattern ($p = 0,0108$). The optimal pH for the apparent LDH activity best activity was 7,8 in smaller animals and 5,5 in bigger ones. The results suggest that metabolic acidosis could be regulated at enzymatic level in small animals, and as a muscular buffer in the bigger ones. For the sizes ranges used, enzyme activity showed a Michaelian-Menten kinetic. $V_{\max}$ value in larger animals was one order of magnitude higher than smaller ones (1,043 and 0,121 mmol min⁻¹ g wet wt⁻¹, respectively). However, we observed a high affinity constant in small organisms than in bigger ones (0,076 and 0,094 mM, respectively). Finally, the positive slope of the curve activity /weight is consistent with the positive allometry described for the anaerobic metabolism, scarcely present in literature. Our results suggest an important role of the LDH activity on the motility of *E. analoga* during its ontogenetic development in the infra-littoral zone.

KEYWORDS: *Emerita analoga*, anaerobic metabolism, lactic dehydrogenase, LDH, LDH activity, allometry.

INTRODUCCION

Emerita analoga es un anomuro filtrador típico de playas arenosas, que se encuentra en el sustrato de las zonas de barrido de la ola (Amed *et al.* 1999). Presenta una amplia distribución geográfica desde Alaska (58°N) hasta el sur de la costa chilena (insconspicuamente en playas arenosas disipativas, hasta 55°S), exceptuando zonas tropicales de aguas con temperaturas superiores a los 20 °C (Núñez *et al.* 1974, Contreras *et al.* 1999). Posee un ritmo migratorio mareal, afín con las condiciones físicas dadas por el retroceso de la ola y marea baja (Jaramillo *et al.* 1993, 2000). Otros factores que controlan su distribución intermareal están dados por el grado de golpe de la ola y la predación (peces, aves, anfípodos) en la zona de lavado (Perry 1980). También se ha detectado una zonación vertical en la zona de barrido de la ola donde los organismos de mayor tamaño alcanzarían mayores profundidades de enterramiento (Myers *et al.* 1980).

Para resistir el embate del oleaje y la predación, *E. analoga* depende de su habilidad de nado, enterramiento prolongado y emergencia explosiva dada por sus apéndices (Trueman 1980). En este contexto, el metabolismo anaeróbico es empleado en situaciones de hipoxia funcional o ambiental (Schiedeck 1997, 1991, González & Quiñones 2000, González & Quiñones 2002) como la ya observada frente a incrementos drásticos de la actividad muscular en algunos peces, crustáceos y bivalvos (Childress & Somero, 1990, Livingstone 1991, Grieshaber *et al.* 1994). Esto sugiere una alta actividad glicolítica por la vía del lactato, complementaria a la fosforilación oxidativa para *E. analoga*. En este estudio se determinó la actividad específica aparente de láctico dehidrogenasa LDH, como un indicador de la adaptación a la hipoxia funcional de crustáceos (Livingstone 1991) y se determinó el efecto del peso y pH sobre su actividad, así como en los parámetros cinéticos aparentes ($V_{\max}$ y K_m).

MATERIALES Y METODOS

50 ejemplares de *E. analoga* fueron colectados en mayo del 2001, en una playa de baja energía en el sector oeste de la Bahía de Coliumo (36° 32' S 72° 57' W). En el laboratorio se congelaron en $N_{2(l)}$ para su posterior análisis enzimático. Se les separó a sim-

ple vista por tamaño y se obtuvo su peso húmedo individual (ww), cuyo rango estuvo entre 0,8 y 2,7 g. Los individuos fueron homogeneizados en tampón de K_2HPO_4 80 mM (pH 7,4), 1:10. El homogeneizado se centrifugó a 6600g por 10 min a 4°C. La actividad de LDH fue determinada en el sobrenadante (SN1), según Bennett *et al.* (1985).

Actividad de la LDH: La mezcla de reacción contenía tampón K_2HPO_4 80 mM (pH 7,4), NADH 0,1 mM y Piruvato 3,2 mM. La reacción se inició por adición del SN1. La actividad fue determinada por método cinético-espectrofotométrico a 20 °C, se utilizó un coeficiente de extinción $\epsilon_{340nm} = 6290$ L cm^{-1} mol^{-1} . La actividad se expresó en μmol $min^{-1}g^{-1}$ ww.

Utilizando este protocolo básico se determinó:

- El efecto del tamaño sobre la actividad de la LDH, por medio de mediciones de actividad en animales grandes (> 0,3 g ó 1,5 mm) y pequeños (< 0,3 g ó 1,5 mm).
- El efecto del pH (entre 5,5 y 9,7) sobre la actividad enzimática en el rango mayor (> 0,3 g ó 1,5 mm) y menor de tallas (< 0,3 g ó 1,5 mm).
- Los parámetros cinéticos aparentes ($V_{\max}$ y K_m) en las mismas tallas que en b, a través de gráficos Lineaweaver-Burk.

Las regresiones lineales de la actividad se realizaron como una función del peso húmedo del organismo, y la pendiente fue comparada entre organismos grandes y pequeños (Zar 1986).

RESULTADOS Y DISCUSION

a) Efecto del tamaño sobre la actividad de la LDH
Como se observa en la Figura 1, tanto las tallas mayores como las menores de *E. analoga* se ajustan a una curva actividad/peso positiva ($p = 0,0108$). La pendiente positiva concuerda con la alometría del metabolismo anaeróbico, escasamente descrito para peces, reptiles (Bennett *et al.* 1985, Childress & Somero 1990, Goolish 1991), y algunos invertebrados como moluscos, anélidos, sipuncúlidos, crustáceos y poliquetos (Livingstone 1991, González & Quiñones 2000, Yaikin *et al.* 2002, González & Quiñones 2002). La correlación positiva observada es inversa al escalamiento negativo descrito para el metabolismo aeróbico (Peters 1983,

Schmidt-Nielsen 1984, Quiñones *et.al* 1994). Estos resultados concuerdan con la hipótesis sobre el poder glicolítico del músculo, que es sinérgico con respecto al aumento de la masa corporal, cuando la actividad muscular es demasiado intensa para ser sólo sustentada por la energía de la fosforilación oxidativa (Childress &

Somero 1990, Grieshaber *et.al* 1994). Así, el incremento de la actividad de LDH con el aumento del tamaño es consistente con la zonación vertical en la zona de barrido de la ola observada para *E. análoga*, donde los organismos de mayor tamaño alcanzarían mayores profundidades de enterramiento (Myers *et al.* 1980).

FIGURA 1. Actividad específica aparente de LDH en función del peso húmedo de *E. analoga*.

FIGURE 1. Apparent LDH specific activity versus *E. analoga* wet weight.

FIGURA 2. Efecto del pH sobre la actividad aparente de LDH en animales pequeños de *E. analoga* (< 0,3 g ó 1,5 mm).

FIGURE 2. pH effect on apparent LDH activity in small animals of *E. analoga* (< 0,3 g ó 1,5 mm).

b) Efecto del pH sobre la actividad enzimática en el rango mayor (> 0,3 g ó 1,5 mm) y menor de tallas (< 0,3 g ó 1,5 mm)

La mayor actividad de LDH se observa a pH 7,8 en animales pequeños (Figura 2). No obstante, para el rango de pH ensayado, la actividad de LDH observada en los animales grandes se incrementa al aumentar la acidez del medio de incubación (Figura 3). La acidosis metabólica podría ser regulada a escala enzimática en los animales pequeños (baja

masa muscular) y al nivel de tampón muscular en los grandes (Childress & Somero 1990, Goolish 1991). La regulación enzimática en los organismos pequeños es consistente con la idea de la inhibición por sustrato, como producto de un alto flujo glicolítico después de sobrepasado el punto pasteur (Livingstone 1983). Sin embargo, no se descarta la presencia de otras piruvato oxireductasas y otros productos de su actividad como etanol y L-lactato (Childress & Somero 1990, Grieshaber *et.al* 1994, Livingstone 1991).

FIGURA 3. Efecto del pH sobre la actividad aparente de LDH en animales grandes de *E. analoga* (> 0,3 g ó 1,5 mm).

FIGURE 3. pH effect on apparent LDH activity in big animals of *E. analoga* (> 0,3 g ó 1,5 mm).

Emerita al igual que otros invertebrados puede regular el contenido de agua a nivel de la musculatura (Freel 1978), lo que le permitiría regular el potencial de producción de ácido y la capacidad de producción de energía anaeróbica (Livingstone 1991). Para aumentar el pH intracelular, y prevenir la perturbación del balance osmótico, se excretan protones y se retienen aniones de los ácidos dentro de la célula (Grieshaber *et.al* 1994). En adición, el CaCO_3 de las conchas y caparazones de cangrejos y bivalvos, puede ser empleado como buffer de protones metabólicos durante largos períodos de anaerobiosis dados por el ambiente y la alta movilidad de sustrato (Freel 1978).

c) Parámetros cinéticos aparentes ($V_{\max}$ y K_m) en el rango mayor (> 0,3 g ó 1,5 mm) y menor de tallas (< 0,3 g ó 1,5 mm).

El considerable error observado en las curvas de progreso para la saturación de LDH por piruvato es consistente con la utilización del primer sobrenadante, producto de la centrifugación del homogeneizado inicial y sin otro paso de purificación posterior. En las dos tallas estudiadas se observó una cinética Michaeliana (Figuras. 4 y 5), siendo el $V_{\max}$ de los animales grandes un orden de magnitud mayor que en los pequeños (1,043 y 0,121 $\text{mmol min}^{-1} \text{g wet wt}^{-1}$ respectivamente), pero con tendencia a mayor afinidad en los pequeños que en

los grandes (0,076 y 0,094 mM respectivamente). Esta tendencia podría estar involucrada con una menor disposición de piruvato en los organismos pequeños como producto de una mayor respiración aeróbica específica, inferido desde el escalamiento negativo (aeróbico) ampliamente descrito (Peters 1983, Schmidt-Nielsen 1984).

Este resultado también es consistente con la presencia de organismos de tallas menores en

la zona más superficial del barrido de la ola, donde el sustrato más penetrable y la oxigenación es continua (Myers *et al.* 1980). Sin embargo, los organismos pequeños no poseerían un alto potencial glicolítico anaeróbico (menor $V_{\max}$), para proporcionar una alta capacidad muscular, necesaria para alcanzar mayores profundidades de enterramiento, como lo observado para los animales grandes.

FIGURA 4. Curva de saturación de piruvato para la actividad aparente de LDH, en animales pequeños de *E. analoga* (< 0,3 g ó 1,5 mm).

FIGURE 4. Piruvate saturation curve of apparent LDH activity, in small animals of *E. analoga* (< 0,3 g ó 1,5 mm).

FIGURA 5. Curva de saturación de piruvato para la actividad aparente de LDH en animales grandes de *E. analoga* (> 0,3 g ó 1,5 mm).

FIGURE 5. Piruvate saturation curve of apparent LDH activity in big animals of *E. analoga* (> 0,3 g ó 1,5 mm).

CONCLUSIONES

En *E. analoga*, para el rango de tallas analizado, la actividad específica aparente de LDH se incrementa (log-log) con el peso ($p = 0,0108$). Este patrón alométrico positivo es consistente con la hipótesis del incremento del poder glicolítico específico del músculo con el aumento del tamaño. Este patrón anaeróbico ha sido escasamente descrito en comparación al conocimiento existente para el patrón alométrico aeróbico. La actividad específica aparente de la láctico dehidrogenasa (LDH) en *E. analoga* podría ser utilizada como indicador de desarrollo ontogenético en la zona infralitoral del área de estudio.

La diferencia del pH óptimo de LDH entre los dos rangos de tallas analizadas sugiere que la acidosis metabólica podría ser regulada a escala enzimática en los animales pequeños y a nivel de tampón muscular en los grandes.

En los rangos de tallas analizados, LDH mostró una cinética Michaeliana, siendo el $V_{\max}$ aparentes de los animales grandes de un orden de magnitud mayor que en los pequeños. Sin embargo, se observó una mayor constante de afinidad en los organismos pequeños que en los grandes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero del proyecto Fondecyt 2000133, Programa FONDAP (Conicyt-Chile) y de la Agencia Alemana para Intercambio Académico (DAAD). Proyecto FONDAP COPAS, Centro de Investigación Oceanográfica en el Pacífico Sur-Oriental. Los autores desean agradecer muy especialmente a Beatriz Yannicelli y María Cristina Krautz.

BIBLIOGRAFIA

- AMED, M. & A. SHANKS. 1999. Timing of Larval release in the mole crab *Emerita talpoidea*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 183:295-300.
- BENNETT, A. F., R. S., SEYMOUR, D. F. BRADFORD & G. J. WEBB. 1985. Mass-dependence of anaerobic metabolism and acid base disturbance during the activity in the salt-water crocodile *Crocodylus porosus*. J. of Exp. Biol. 118: 161-171.
- CHILDRESS, J., J. & G. N. SOMERO. 1990. Metabolic scaling: A new perspective based on scaling of glycolytic enzyme activities. Amer. Zool. 30: 161-173.
- CONTRERAS, H., O. DEFEO & E. JARAMILLO. 1999. Life history of *Emerita analoga* (Stimpson), (Anomura, Hippidae) in a sandy beach of south central Chile. Est. Coast. and S. Fish Sci. 48: 101-112.
- FREEL, R. W. 1978. Patterns and solute regulation in the muscle fibres of osmoconforming marine decapod crustaceans. J. Exp. Biol. 72: 107-126.
- GOOLISH, E. 1991. Aerobic and anaerobic scaling in fish. Biol Rev. 66, 33-52.
- GONZÁLEZ, R., R. & R. A. QUIÑONES. 2000. Pyruvate oxidoreductases involved in glycolytic anaerobic metabolism of polychaetes from continental shelf off central-south Chile. Est. Coast. and S. Fish Sci. 51: 507-519.
- GONZÁLEZ, R., R. & R. QUIÑONES. 2002. LDH activity in *Euphausia mucronata* and *Calanus chilensis*: implications for vertical migration behavior. J. Plankton Res 24 (12):1349-1356.
- GRIESHABER, M. K., I. HARDEWING, U. KREUTZER & H. O. PÖRTNER. 1994. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 125: 44-118.
- JARAMILLO, E., A., MCLAHLAN & P. COETZEE. 1993. Intertidal zonation patterns of macroinfauna over a range of exposed sandy beaches in south-central Chile. Mar. Ecol. Prog. Ser. 101:105-118.
- JARAMILLO, E., J. DUGAN & H. CONTRERAS 2000. Abundance, tidal movement, population structure and burrowing rate of *Emerita analoga* (Anomura, Hippidae) at dissipative and reflective sandy beach in south central Chile. Mar. Ecol. 21(2): 113-137.
- LIVINGSTONE, D. R. 1983. Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. J. Geol. Soc. London. 140: 27-37.
- LIVINGSTONE, D. R. 1991. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. Amer. Zool. 31: 522-534.
- MYERS, J. P., S. L. WILLIAMS & F. A. PITELKA. 1980. An experimental analysis of prey availability for sanderlings (aves: scolopacidae) feeding on sandy beach crustaceans. Can. J. Zool. 58: 1565-1574.
- NÚÑEZ, J., O. ARACENA & M. T. TORRES. 1974. of *Emerita analoga* en Llico, provincia Curico (Crustacea, Dec. Hippidae). Bol. Soc. Biol. de Concepción, Tomo XLVIII; 11-22.
- PERRY, D. 1980. Factors influencing aggregation patterns in the sand crab *Emerita analoga* (Crustacea: Hippidae). Oecologia (Berl.) 45:379-384.
- PETERS, R. H. 1983. The ecological implications of body

- size. Cambridge University Press. 329 pp.
- QUINONES R. A., J. M. BLANCO, F. ECHEVARRÍA, M. L. FERNÁNDEZ-PUENTES, J. GILBERT, V. RODRÍGUEZ & L. VALDÉS. 1994. Metabolic size spectra at a frontal station in the Alboran Sea. Working Group 4 Report. Mar. 58 (1-2): 53-58.
- SCHIEDECK, D. 1997. *Marenzelleria viridis* (Verril, 1873) Polychaeta, a new benthic species within European coastal waters, some metabolic features. J. Exp. Biol. and Ecol. 211: 85-101.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1984. Scaling: Why is animal size so important? Cambridge: Cambridge University Press. 241pp.
- TRUEMAN, E.R. 1980. The Mechanism of burrowing of the mole crab *Emerita*. J. Exp. Biol. 53:701-710.
- YAIKIN, J., R.A. QUINONES & R.R. GONZÁLEZ 2002. aerobic respiration rate and anaerobic enzymatic activity of *Petrolisthes laevigatus* (Anomura, Porcellanidae) under laboratory conditions. J. Crust. Biol. 22(2):345-352.
- ZAR J. H., 1986. Biostatistical Analysis. Prince-Hall International. Englewood Cliffs, New Jersey, USA.

Fecha de recepción: 05/07/02
 Fecha de aceptación: 05/11/02