



---

**EXPRESIÓN DE ISOENZIMAS DE L-LACTATO: NAD<sup>+</sup>  
ÓXIDO-REDUCTASA  
(LDH; EC. 1.1.1.27) DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO DEL PEZ COMBATIENTE SIAMES *Betta  
splendens* (REGAN, 1909)**

**L-LACTATE: NAD<sup>+</sup> OXIDE-REDUCTASE (LDH; EC. 1.1.1.27)  
ISOENZYMES EXPRESSION DURING EMBRYONARY  
DEVELOPMENT OF SIAMESE FIGHTING FISH *Betta  
splendens* (REGAN, 1909)**

**Ronald Maestre-Serrano, Edilma Guevara-Rozo, Irma Colmenares-de Escamilla,  
Ernesto Pachón-Muñoz**

*Unidad de Genética y Biología del Desarrollo,  
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana,  
Cra. 7 N° 43 - 82, Bogotá-Colombia.  
rmaestre22@yahoo.com*

**Resumen**

Se reportó la expresión de isoenzimas de L-lactato: NAD<sup>+</sup> óxido-reductasa (LDH; EC. 1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario de *Betta splendens* por métodos electroforéticos.

Se tomaron 200 huevos en cada estado de desarrollo embrionario (oocito fertilizado, clivajes, blástulas, gástrula y neurula), obtenidos a partir de cuatro parejas de peces sexualmente maduras de la especie *Betta splendens*; además de oocitos sin fertilizar, colectados a partir de dos hembras de la especie mencionada. Cada muestra de 200 embriones y 200 huevos sin fertilizar, se homogeneizaron y centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 rpm. A partir de los sobrenadantes obtenidos, se corrieron las electroforesis en gel de agarosa.

Todas las etapas de desarrollo embrionario estudiadas, se caracterizaron por la expresión de las isoenzimas LDH-3 y LDH-4. Los estadios de gástrula y neurula, expresaron además la isoenzima LDH-2.

**Palabras clave:** *Betta splendens*, expresión, isoenzimas, lactato deshidrogenada.

**Abstract**

Expression of the L-lactate: NAD<sup>+</sup> oxide-reductase (LDH; EC. 1.1.1.27) isoenzymes, was reported during embryonic development of *Betta splendens* using electrophoretic methods. Two hundred eggs were taken in each state of embryonic development (fertilized oocyte, clivajes, blástulas, gástrula and neurula), from four sexually mature couples of fish *Betta splendens*. Oocytes without fertilizing from two females of the same species were collected. Each sample of 200 embryos and 200 eggs without fertilizing, were homogenized and centrifugated during 15 minutes to 10.000 rpm. Electrophoresis was run in agarosa gel.

All the stages of embryonic development studied were characterized by expression of isoenzymes LDH-3 and LDH-4. Gastrula and neurula stadiums also expressed isoenzima LDH-2.

**Key words:** *Betta splendens*, expression, isoenzymes, lactate dehydrogenase

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario de un organismo, inicia a partir del cigoto mediante una serie de procesos biológicos que implican; morfogénesis, proliferación y diferenciación celular; lo cual genera una gran variedad de estructuras con funciones especializadas.

El desarrollo embrionario requiere de la acción genética, esto conlleva a que determinados genes se expresen en espacios y tiempos específicos durante este proceso biológico, indicando el grado de diferenciación celular que se evidencia mediante variaciones en los repertorios proteicos y enzimáticos. (Whit, 1981; Dallos *et al.*, 1994).

Los órganos, tejidos y compartimentos celulares de los diversos organismos pueden contener diferentes formas moleculares de una enzima que catalizan la misma reacción bioquímica. Estas múltiples formas moleculares se denominan isoenzimas; las cuales, están codificadas por genes diferentes y poseen propiedades físicas, químicas y cinéticas específicas que facilitan su caracterización (Dallos *et al.*, 1994; Porras, 1996).

La electroforesis, ha sido una herramienta de gran importancia en el análisis de la variabilidad genética, al generar una primera aproximación de los patrones de expresión de muchos loci, usando isoenzimas como indicadores de dicha expresión durante la ontogenia de un organismo. Además, el número de loci de isoenzimas y su patrón de expresión temporal y espacial, se utilizan como herramienta bioquímica y molecular en la identificación taxonómica de las diferentes especies (Brzuzan, 1995).

La enzima lactato deshidrogenasa (L-Lactato: NAD<sup>+</sup> óxido-reductasa, LDH; EC. 1.1.1.27), actúa al final de la glicólisis (ruta metabólica inicial del catabolismo de los monosacáridos), específicamente en la conversión de lactato a piruvato de forma reversible en el citosol, con la presencia de NAD<sup>+</sup> como molécula aceptor de hidrógenos. Esta, fue la primera enzima en la cual se caracterizaron las isoenzimas (Markert y Moller, 1959).

La LDH es una proteína tetramérica, que en la mayoría de los vertebrados se encuentra codificada por dos loci que expresan dos tipos de subunidades o polipéptidos, bioquímicamente diferentes. El locus Ldh-A, expresa la subunidad M, mientras que el locus Ldh-B expresa la subunidad H. Dichos polipéptidos se combinan de manera aleatoria, para generar cinco isoenzimas con la siguiente composición: H4 (LDH1), H3M (LDH2), H2M2 (LDH3), HM3 (LDH4) y M4 (LDH5) (Yoshikuni *et al.*, 2001; Rossignol *et al.*, 2003) (Figura 1). Adicionalmente, se ha reportado un tercer locus (Ldh-C) para peces teleosteos del orden Gadiformes y Cypriniformes. Éste expresa la isoenzima C4, que se restringe a tejido neural o digestivo, (predominando en hígado). (Whitt, 1981; Frankel, 1981; Frankel, 1985; Crawford *et al.*, 1989; Quattro *et al.*, 1993; Tsuji *et al.*, 1994).

El presente trabajo, se encuentra incluido dentro de la línea de investigación llamada isoenzimas en desarrollo embrionario, de la Unidad de Genética y Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana y es el primero en Colombia en utilizar peces como modelo biológico. El objetivo, es establecer los patrones de expresión genética de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa, en las primeras etapas del desarrollo embrionario de la especie *Betta splendens*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 200 huevos en cada estado de desarrollo a estudiar, desde oocito fertilizado hasta neurula, obtenidos a partir de cuatro parejas de peces sexualmente maduras de la especie *Betta splendens*; además de oocitos sin fertilizar, colectados a partir de dos hembras, de la especie mencionada. Dichos huevos y embriones, se mantuvieron separados según la pareja de origen. Se definió como fuente de variación, cada uno de los estados de desarrollo embrionario y oocitos sin fertilizar (seis en total) y se realizaron 3 repeticiones por fuente de variación.

### Determinación de los estados de desarrollo embrionario

Guevara (1997), realizó un estudio embrionario y larval, macroscópico e histológico de la especie *Betta splendens*; el cual se aplicó, para tomar los tiempos de desarrollo embrionario y separar los embriones en cada uno de los estadios objetos de estudio.

### Procesamiento de las muestras

Se homogeneizaron 200 embriones en cada estado de desarrollo embrionario (oocito sin fertilizar, oocito fertilizado, clivaje, blástula, gástrula y neurula). Este homogeneizado, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm durante 5 minutos. Lo anterior, se realizó para eliminar la capa de lípidos ubicada en la parte superior del sobrenadante, debido a la gran cantidad de vitelo que se encuentra en los oocitos de la mayoría de peces teleósteos. Los sobrenadantes obtenidos (donde se encontraban las isoenzimas de LDH), para huevos no fertilizados y etapas tempranas del desarrollo, se congelaron a -20 grados centígrados hasta la realización de las electroforesis.

Control de isoenzimas de LDH para los electroforegramas

Se utilizó un juego de reactivos marca TITAN GEL CK/LD ISOENZIME CONTROL (catálogo No 5134, Helena laboratory), para el control de las isoenzimas de LDH en las electroforesis. Cada frasco control para isoenzimas de LDH, se reconstituyó con 2 ml de agua deionizada y se congelaron a -70°C, hasta el momento de las electroforesis.

### Electroforesis

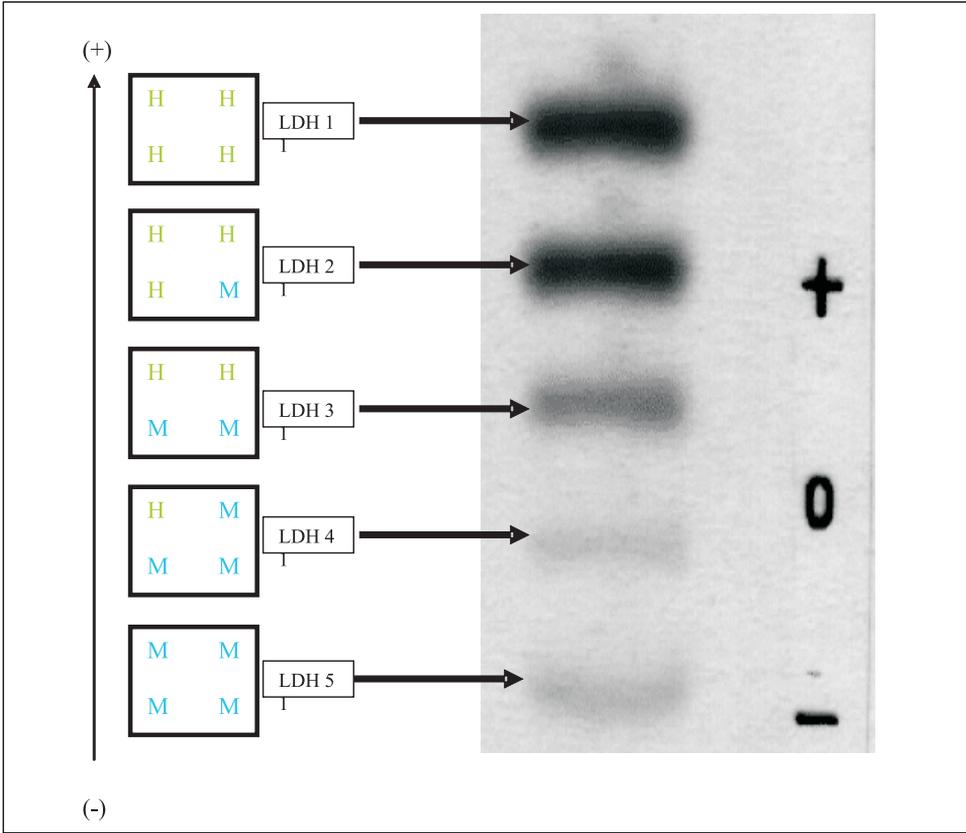
Las isoenzimas de LDH, se separaron por electroforesis en una cámara modelo TITAN GEL CHAMBER, marca Helena laboratory; una fuente de poder modelo POWER STATION 300 PLUS, marca LABNET y utilizando un juego de reactivos TITAN GEL Isoenzyme (catálogo No 3043, Helena laboratory). Se utilizó gel de agarosa con pH de 8.3.

Las electroforesis se corrieron a 100 voltios, 17 amperios, durante 15 minutos. Una vez finalizadas, se realizó la visualización del gel de forma colorimétrica, basada en la reducción de la sal azul de tetrazolio (NBT) en medio alcalino a formazan; incubándolos durante 25 minutos a 45°C en cámara húmeda.

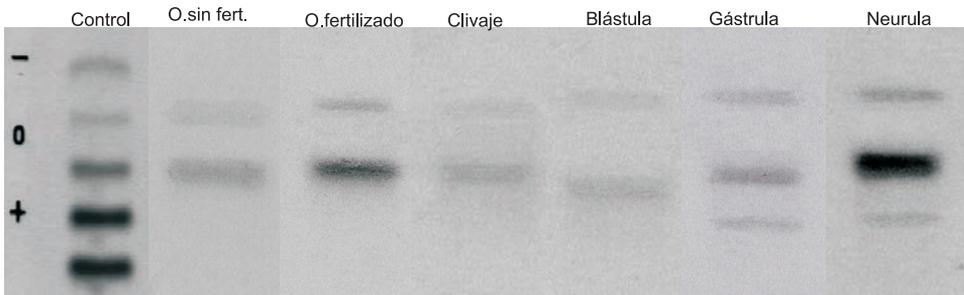
## RESULTADOS

Los patrones electroforéticos de isoenzimas de LDH, para cada una de las etapas del desarrollo embrionario de *Betta splendens*, se observan en las Figuras 1 y 2.

Todas las etapas de desarrollo embrionario estudiadas, se caracterizaron por la expresión de las isoenzimas LDH-3 y LDH-4. Los estadios de gástrula y neurula, expresaron además la isoenzima LDH-2.



**Figura 1.** Patrón electroforético y composición de cada una de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa



**Figura 2.** Patrones electroforéticos de isoenzimas de LDH en cada una de las etapas de desarrollo embrionario (oocito sin fertilizar, oocito fertilizado, clivaje, blástula, gástrula y neurula) de *Betta splendens*.

La Tabla 1 muestra las isoenzimas identificadas en cada etapa de desarrollo embrionario, su composición en subunidades y los genes que expresan cada subunidad.

**Tabla 1**  
**Isoenzimas expresadas en cada etapa temprana del desarrollo embrionario de *Betta splendens*, sus subunidades de composición y los genes que la expresan**

Estadio del desarrollo	Isoenzima expresada	Composición en subunidades (M - H)	Genes
Oocito sin Fertilizar	LDH-4	3 - 1	A - B
	LDH-3	2 - 2	A - B
Oocito Fertilizado	LDH-4	3 - 1	A - B
	LDH-3	2 - 2	A - B
Clivajes	LDH-4	3 - 1	A - B
	LDH-3	2 - 2	A - B
Blástula	LDH-4	3 - 1	A - B
	LDH-3	2 - 2	A - B
Gástrula	LDH-4	3 - 1	A - B
	LDH-3	2 - 2	A - B
	LDH-2	1 - 3	A - B
Neurula	LDH-4	3 - 1	A - B
	LDH-3	2 - 2	A - B
	LDH-2	1 - 3	A - B

De acuerdo a la presencia de las isoenzimas LDH-4, LDH-3 y LDH-2, se puede decir que las subunidades M y H se expresan durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de *Betta splendens*; con lo anterior, podemos confirmar que esta especie posee los dos loci de LDH fundamentales para todos los vertebrados (Ldh-A y Ldh-B) y que están activos durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario de estos organismos.

## DISCUSIÓN

Basaglia (1989), afirma que las diferencias en expresión de isoenzimas, son consecuencia de la regulación genética y de la variabilidad de expresión de multilocus isoenzimáticos, que han sido acumuladas durante la divergencia en las diferentes especies. Teniendo en cuenta lo anterior y de acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo y a la bibliografía consultada, existen patrones electroforéticos para isoenzimas de LDH durante la embriogénesis de otros teleósteos similares a las reportadas para *Betta splendens*.

Frankel (1981), reportó la isoenzima LDH-4 en oocito sin fertilizar del pez *Brachydanio nigrofasciatus*.

Frankel (1985), detectó isoenzimas de LDH compuestas por subunidad H en huevos no fertilizados y a través del desarrollo de las especies *Barbus tetrazona*, *Barbus conchoni*, *Barbus nigrofasciatus*, *Barbus sachsi* y *Barbus titteya*.

Por otro lado, existen investigaciones con patrones electroforéticos de isoenzimas de LDH para otras especies de teleósteos, diferentes a los encontrados en el desarrollo embrionario de *Betta splendens*.

Frankel y Hart (1977), encontraron las isoenzimas LDH-1 y LDH-2 en oocitos sin

fertilizar de las especies *Brachydanio rerio* y *Brachydanio albolineatus*.

Phillipp *et al.*, (1977), detectaron la expresión de la isoenzima LDH-5 en huevo no fertilizado y a través de la embriogénesis temprana de las especies *Micropterus salmoides salmoides* y *Micropterus dolomieu*.

De igual forma Brzuzan (1995), reportó la isoenzima LDH-5 en oocito sin fertilizar y durante todo el desarrollo embrionario temprano del pez blanco (*Coregonus lavaretus*).

Kliachko y Ozerniuk (2001), reportaron la expresión de la isoenzima LDH1 y LDH2 (esta última con menor actividad enzimática), durante todo el desarrollo embrionario del pez *Danio rerio*.

Estas variaciones en la expresión de multilocus isoenzimáticos entre especies, puede deberse a diferencias en condiciones metabólicas, ambientales y evolutivas propias de cada especie; en el caso específico de *Betta splendens*, es importante aclarar que es una especie introducida en Colombia y que su adaptación a las condiciones ambientales del país pudo haber contribuido a la expresión de los patrones electroforéticos reportados en esta investigación.

Los resultados de la presente investigación, concuerdan con la hipótesis según la cual el genoma materno se expresa y regula las primeras etapas del desarrollo (oocito fertilizado, clivajes, y blástula) y que el genoma embrionario se expresa y regula las etapas tardías del desarrollo embrionario (gástrula, neurula, organogénesis temprana) (Frankel, 1981; Tufaro y Brandhorst, 1982; Basaglia, 1989).

Esto se puede confirmar durante la investigación en *Betta splendens*, por la presen-

cia de las mismas isoenzimas (LDH-4, LDH-3) hasta el estadio de blástula y por la expresión de una nueva isoenzima (LDH-2) a partir del estadio de gástrula y durante neurula. Según la hipótesis anterior, las isoenzimas LDH-4 y LDH-3 presentes en los estadios de oocito sin fertilizar, oocito fertilizado, clivajes y blástula, son el resultado de la expresión del genoma materno durante la oogénesis de *Betta splendens*; mientras que las isoenzimas LDH-4, LDH-3 y LDH-2 presentes en los estadios de gástrula y neurula, son producto de la expresión del genoma embrionario.

Whitt (1981), afirma que el tiempo de aparición de las isoenzimas puede concordar con eventos morfogénéticos específicos. Lo anterior, se observó con la expresión de la isoenzima LDH-2 en los estadios de gástrula y neurula, que puede estar asociado con la diferenciación de mesodermo. Durante la etapa de gástrula, cuando se detectó por primera vez la isoenzima LDH-2, se produjo la diferenciación de esta capa germinativa. Maestre y Pachón (2006), encontraron que dicha isoenzima presentó baja actividad enzimática durante el estadio de gástrula, que se incrementó moderadamente durante el estadio de neurula; y sugieren que este comportamiento en la actividad enzimática puede estar relacionado, con la especialización de la capa germinativa en mesodermo epimérico, mesodermo intermedio y mesodermo hipomérico característicos de la neurulación.

Basaglia (1989), indica que la isoenzima LDH-C4, expresada por el tercer locus reportado en peces teleósteos, se encuentra ausente en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Esta afirmación, coincide con los resultados encontrados en *Betta splendens*, ya que durante las etapas embrionarias estudiadas no se expresó la isoenzima LDH-C4; por lo tanto, se puede

considerar que este locus se encuentra inactivo durante este periodo o que la especie *Betta splendens* no lo posee. Esto último, es objeto de estudio en investigaciones que se realizan en la actualidad y que le dan continuidad al presente trabajo.

Maestre y Pachón (2006), realizaron un estudio acerca de la actividad de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa durante el desarrollo embrionario de *Betta splendens*; encontrando importantes cambios en la actividad total y específica durante los estadios embrionarios estudiados; en los que se puede mencionar: incremento en la actividad total de LDH entre oocito sin fertilizar y oocito fertilizado; un descenso notorio durante los estadios de clivaje a blástula y un incremento notorio durante los estadios de gástrula y neurula. Asimismo, se determinó que la isoenzima LDH-3 se caracterizó por presentar la mayor actividad enzimática, seguida de LDH-4 durante los estadios de oocito sin fertilizar, oocito fertilizado, clivaje y blástula. Los estadios de gástrula y neurula presentaron el mismo patrón, aunque durante éstos se expresó la isoenzima LDH-2 con la menor actividad enzimática. Este comportamiento, se observó en los patrones electroforéticos obtenidos en los resultados de la presente investigación.

El comportamiento en la actividad de LDH durante la embriogénesis de *Betta splendens*, se debe posiblemente a que durante la oogénesis los oocitos de teleósteos acumulan glicógeno que va ser fuente de glucosa para la glicólisis; esta ruta metabólica genera energía suficiente para que los oocitos sean fertilizados y se den las divisiones celulares que se llevan a cabo durante las primeras etapas del desarrollo embrionario temprano (clivaje y blástula) (Boulekbache, 1981). Maestre y Pachón (2006), sugieren que durante los estadios embrionarios de *Betta splendens*, la isoen-

zima LDH-4 relativamente anaerobia, actúa en la glicólisis en la conversión de piruvato a lactato, con el fin de reciclar moléculas de NAD<sup>+</sup> y obtener nuevas moléculas de glucosa a partir del lactato producido y que la isoenzima LDH-3 cuya composición de subunidades es de 2M y 2H, tiene el equilibrio de reacción desplazado hacia la conversión de piruvato a lactato para complementar la función de la isoenzima LDH-4.

Boulekbache (1981), afirma que las etapas tardías del desarrollo (gástrula y neurula), se caracterizan por triplicar y quintuplicar el consumo de oxígeno; lo cual puede estar relacionado con la activación del ciclo de Krebs, ya que la energía generada por la glicólisis no es suficiente y requiere el aporte energético de esta ruta metabólica.

Los resultados obtenidos en la presente investigación en cuanto a la expresión de la isoenzima LDH-2 durante los estadios de gástrula y neurula para *Betta splendens*, coinciden con los reportados por Maestre y Pachón (2006), donde se encontró con poca actividad la expresión de esta isoenzima, relativamente aerobia y que actúa en la glicólisis en la conversión de lactato a piruvato; En este trabajo, se sugieren que durante los estadios de gástrula y neurula, la isoenzima LDH-3 probablemente tiene el equilibrio de reacción desplazado hacia la conversión de lactato a piruvato, complementando la función de la isoenzima LDH-2.

Según Frankel y Hart (1977); Frankel (1983) y Rossignol *et al.*, (2003), El locus Ldh-A, que expresa la subunidad M presenta un alto grado de actividad en células y tejidos sujetos a periodos relativos de anaerobiosis; mientras que el locus Ldh-B que expresa la subunidad H, se expresa predominantemente en células y tejidos ricos en oxígeno.

De acuerdo a lo anterior y según la Tabla 1 de los resultados, donde se observa el número de subunidades M, con respecto al número de subunidades H expresadas durante el periodo embrionario estudiado; se puede decir, que las primeras etapas del desarrollo embrionario temprano de *Betta splendens* (oocito sin fertilizar, oocito fertilizado, clivaje y blástula) se caracterizan por desarrollarse en periodos de relativa anaerobiosis. Esto se puede confirmar, con la mayor actividad que tuvo el locus Ldh-A con respecto al locus Ldh-B, debido a que el número total de subunidades M para las primeras etapas del desarrollo fue de 20 comparado con 12 subunidades H. Las etapas tardías del proceso de embriogénesis (gástrula y neurula), se caracterizaron por desarrollarse en mejores condiciones aeróbicas con respeto a las primeras; ya que ambos loci tuvieron igual actividad, por la expresión de igual número de subunidades M y H (12 para cada una).

Semenza *et al.*, (1994) y Firth *et al.*, (1995), afirman que la regulación de la expresión genética por concentraciones de oxígeno, es una característica importante de muchos procesos biológicos. En el metabolismo energético, por ejemplo, los niveles de mRNA para un número de enzimas glicolíticas y gluconeogénicas están sujetos a regulación de la transcripción por oxígeno de modo coordinado. Mencionan además, la presencia de un factor nuclear llamado factor 1 de inducción de hipoxia (HIF-1) que regula la transcripción de genes que codifican para enzimas glicolíticas en condiciones anaerobias.

Según lo anterior, HIF-1 podría estar involucrado en la regulación del locus Ldh-A para la expresión de isoenzimas de LDH que contienen subunidad M y que actúan en condiciones anaeróbicas durante la embriogénesis temprana en *Betta splendens*.

## CONCLUSIONES

Todas las etapas del desarrollo embrionario estudiadas en la especie *Betta splendens*, se caracterizaron por la expresión de las isoenzimas LDH-3 y LDH-4. Los estadios de gástrula y neurula, expresaron además la isoenzima LDH-2.

Los electroforegramas, indican la presencia de dos bandas (LDH-4 y LDH-3) para los estadios en donde el genoma materno es quien dirige la síntesis proteica y de tres bandas (LDH-4, LDH-3 y LDH-2) para los estadios en los cuales el genoma embrionario es quien dirige dicha expresión.

La expresión de las isoenzimas LDH-4, LDH-3 y LDH-2, indican que *Betta splendens*, posee los dos loci para LDH, fundamentales para todos los vertebrados y que se encuentran activos durante las primeras etapas de desarrollo embrionario.

Existe actividad diferencial de los genes A y B que expresan las subunidades M y H, para las isoenzimas de LDH durante la embriogénesis temprana de *Betta splendens*.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros agradecimientos, a la profesora Lucía Jiménez del Departamento de Biología de la Pontificia Universidad Javeriana, por todo el conocimiento académico y apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

También queremos agradecer a las doctoras Ofelia Diez (Departamento de Microbiología) y Martha Guerra (Departamento de Nutrición y Bioquímica), de la Pontificia Universidad Javeriana, por sus aportes en el desarrollo de las técnicas utilizadas durante la investigación.

Por último, a todas aquellas personas que de una u otra forma realizaron aportes para llevar a feliz término esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- BASAGLIA, F. Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase in fish. *Comp Biochem Physiol* 1989; 92B (2): 213-226.
- BOULEKBACHE, H. Energy metabolism in fish development. *Amer Zool* 1981; 21: 377-389.
- BRZUZAN, P. Isoenzyme expression during early development of whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Ergebnisse der limnologie*, 1995; 46: 33-37.
- CRAWFORD, D.; CONSTANTINO, H. & POWERS, D. Lactate Dehydrogenase-B cDNA from the Teleost *Fundulus heteroclitus*: Evolutionary Implications. *Mol Biol Evol* 1989; 6 (4): 369-389.
- DALLOS, D.; DE ESCAMILLA, I. & PACHÓN, E. Caracterización molecular de isoenzimas de isocitrato NADP: óxido reductasa en *Hyla labialis*. *La Investigación en la Universidad Javeriana*. 1994; Tomo I, 454-457.
- FIRTH, J.; EBERT, B. & RATCLIFFE P. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. *J Biol Chem* 1995; 270 (36): 21021-21027.
- FRANKEL, J. Lactate dehydrogenase isozymes of the *Leopard danio*, *Brachydanio nigrofasciatus*: their characterization and ontogeny. *Comp Biochem Physiol* 1981; 67B: 133-137.
- FRANKEL, J. Ontogenetic patterns of enzyme locus expression in *Barbus hybrids* (Cypriniformes, Teleostei). *Comp Biochem Physiol* 1985; 82B (3): 413-417.

- FRANKEL, J. & HART N. Lactate dehydrogenase ontogeny in the genus *Brachydanio* (Cyprinidae). *J Hered* 1977; 68: 81-86.
- GUEVARA-ROSO, E. Estudio embrionario y larval microscópico e histológico de *Betta splendens* (Regan, 1909). Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 1997. Bogotá, Colombia. 140 págs.
- KLIACHKO O. & OZERNIUK N. Different functional and structural properties of lactate dehydrogenase isozymes at different stages of *Danio rerio* ontogenesis. *Ontogenez*, 2001; 32 (5): 374-376.
- MAESTRE-SERRANO R. & PACHÓN-MUÑOZ E. Actividad enzimática de isoenzimas de L-lactato: NAD<sup>+</sup> óxido-reductasa (LDH; EC. 1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario del pez combatiente siames *Betta splendens* (Regan, 1909). *Rev Acad Colomb Cienc* 2006; 30 (116): 459-464.
- MARKERT, L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci* 1959; 45: 753-762.
- PHILIPP, D. & WHITT, G. Patterns of gene expression during Teleost embryogenesis: Lactate dehydrogenase isozyme ontogeny in the Medaka (*Oryzias latipes*). *Develop Biol* 1977; 59: 183-197.
- PORRAS-CAICEDO, A. Contribución al estudio de patrones isoenzimáticos de la L-Malato: NAD oxidorreductasa en *Hyla labiales*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 1996; 73 págs.
- QUATRO, J.; WOODS, H. & POWERS, D. Sequence analysis of teleost retina-specific lactate dehydrogenase C: Evolutionary implications for the vertebrate lactate dehydrogenase gene family. *Evolution* 1993; 90: 242-246.
- ROSSIGNOL, F.; SOLARES, M.; BALANZA, E.; COUDERT, J. & CLOTTES E. Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. *J Cell Biochem* 2003; 89 (1): 67-79.
- SEMENZA, G.; ROTH, P.; FANG, H. & WANG, G. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; 269 (38): 23757-23763.
- TSUJI, S.; QURESHI, M.; HOU, E.; FITCH, W.; & LI, S. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenase (LDH) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig and rat. *Evolution* 1994; 91: 9392-9396.
- TUFARO, F. & BRANDHORST, B. Restricted expression of paternal genes in sea urchin interspecies hybrids. *Develop Biol* 1982; 92: 209-220.
- WHITT, G. Developmental Genetics of Fishes: Isozymic analices of differential gene expression. *Amer Zool* 1981; 21: 549-572.
- YOSHIKUNI, K.; MATSUDA, J.; PARACOVA, J. & SAKAI, A. Phylogenic study of denaturation of lactate dehydrogenase isoenzymes from different species by high and low temperature. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 248-556.

Recibido: 27-09-06

Aprobado: 28-02-08