

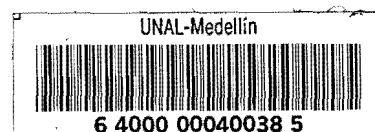
"Diferenciación de especies de la familia Characidae
de la región de Río Claro
por el método de electroforesis"

SONIA DE GREIFF M.
Profesora Asociada

FRANCISCO MONTOYA H.

Trabajo presentado como requisito de Promoción
a la Categoría de PROFESOR ASOCIADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SECCIONAL MEDELLIN
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



597.092 986 126

D34

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	2
2. MATERIALES Y METODOS	8
2.1 SITIOS DE CAPTURA	8
2.2 METODOS DE CAPTURA	8
2.3 METODOLOGIA DEL ANALISIS ELECTROFORETICO	9
3. RESULTADOS	12
4. DISCUSION	25
5. CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFIA	34

Autors VIII - 16-94

Monografía

UNIVERSIDAD NACIONAL
BIBLIOTECA CENTRAL

33914

INDICE DE GRAFICOS

Número		Pág.
1	Metodología de electroforésis de proteínas	11
2	Proteinograma de <u>Brycon moorei moorei</u>	16
3	Proteinograma de <u>Carlastianax aurocaudatus</u>	17
4	Proteinograma de <u>Brycon tovari</u>	18
5	Proteinograma de <u>Hemibrycon jabonero</u>	19
6	Proteinograma de <u>Hemibrycon carrilloi</u>	20
7	Proteinograma de <u>Holobrycon alburnus</u>	21
8	Diagramas de las electroforésis de proteínas	22
9	Electroforésis de las proteínas, valores porcentuales promedios por grupo	27

INTRODUCCION

El empleo de la electroforesis ha demostrado ser altamente efectivo para la separación de mezclas de proteínas existentes en extractos de tejidos animales. Cuando las proteínas son fraccionadas por este método, pueden observarse modificaciones en el recorrido e intensidad de las bandas o fracciones proteicas lo cual ha sido utilizado para demostrar variantes genéticas o polimorfismos a nivel intraespecífico en una gran variedad de organismos, y en diferentes tejidos.

De otro lado, la aplicación de los principios de la Genética de poblaciones al estudio de varias proteínas, polimórficas obtenidas por electroforesis ha demostrado que las frecuencias de alelos a menudo son diferentes entre poblaciones de la misma especie, como pudo comprobarse en el análisis de proteínas del cristalino hechas a peces Salmonideos (Smith, 1967 y Barret, 1967).

Teniendo presentes las anteriores premisas y a fin de indagar sobre posibles polimorfismos en especies de los géneros Brycon sp., Hemibrycon y Holobrycon, este trabajo tuvo como objetivo hacer análisis de proteínas de cristalinos por el método de electroforesis en acetato a fin de indagar sobre posibles polimorfismos interespecíficos e intraespecíficos.

Es importante anotar que los peces de estos géneros todos pertenecen a la familia Characidae, habitan la región de Río Claro (Antioquia) como poblaciones independientes ya que ocupan habitats aislados.

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

De Ligny (1967), Moller y Naevdal (1966-1967) llevaron a cabo estudios en electroforesis sobre gel de almidón en truchas nativas (Salvelinus Fontinalis) y hallaron polimorfismos en las transferrinas de sus sueros sanguíneos.

Posteriormente han sido utilizados otros métodos electroforéticos y con otros tipos de muestras; Smith, 1962-1971; Barret y Williams, 1967 y Eckroat y Wright, 1969 emplearon proteínas del cristalino de peces Scombroides, tunas y truchas Salvelinus fontinalis (M) y a todas las muestras encontraron polimorfismos intraespecíficos.

Otros sistemas polimórficos han sido identificados en peces y otros organismos por el sistema de electroforesis tales como son los enzimáticos; Market C.L. e I. Fanlhaber 1965 obtuvieron el patrón electroforético de la enzima lactato-dehidrogenasa en peces Scombroides y Ridgway G.S. 1970 estudió el polimorfismo de esterasa en el arenque del Atlántico.

Otro método electroforético empleado en la determinación de polimorfismos ha sido el de la polyacrylamida; Hoffman A.D. 1966 empleó este sistema para el estudio de las transferrinas en las truchas de los arroyos y Fujino y T. Kang analizaron este mismo tipo de proteínas ligadas al hierro en peces tunas.

En la década a partir de 1960, varios investigadores que habían tenido dificultades para obtener muestras representativas por los análisis electroforéticos comenzaron a emplear líquido del núcleo del cristalino, obteniendo éxito en sus experimentos.

Smith A.C. y R.A. Goldstein 1967 pudieron observar variaciones en las proteínas del cristalino del pez blanco Caulolatilus princeps utilizando este tipo de muestra.

Estos mismos investigadores demostraron las ventajas del uso del líquido del cristalino, ya que según ellos, no tiene efectos graves sobre la vida del pez, ni impide su crecimiento y desarrollo, ya que el pez vivo conserva un ojo; esto tiene ventajas sobre la utilización de otros tejidos en donde los peces deben ser sacrificados.

El análisis de proteínas por el método de electroforesis ha sido de gran utilidad en estudios evolutivos como es el caso de las hemoglobinas y la detección de organismos híbridos. Mannell C. y Baker C.M. (1969) realizaron estudios de este tipo a fin de definir el origen de algunas especies a partir de proteínas híbridas y heterosis; estos mismos investigadores analizaron la genética de las hemoglobinas en organismos híbridos.

La estabilidad de las beta globulinas expresadas en la estabilidad de los patrones electroforéticos resultantes de estudios en diversos

organismos, han hecho que éstas sean elegidas por muchos investigadores para la detección de polimorfismos; este grupo de proteínas son conocidas como Transferrinas; Hersherberg W.K. 1970 analizó las propiedades físico-químicas de éstas en la trucha Arco Iris.

Valenta y col. 1977 revelaron que la multiplicidad de formas moleculares de transferrinas en Salmonideos y algunas otras especies de peces puede ser explicado por los diferentes residuos de ácido siálico los cuales pueden ser añadidos a las moléculas de transferrinas. Estos investigadores concluyeron, una vez que evaluaron el nivel de variación de las transferrinas en varias especies de peces, que esa condición está basada en la variabilidad de un locus que existe en muchos tipos de peces, con alelos codominantes.

Otras proteínas han sido evaluadas en peces por métodos electroforéticos, como son los de las haptoglobinas que también son variables en éstos; tres variantes de esta proteína se han conocido y se denominan A-B y O; un simple sistema codominante de haptoglobina descubrió Polyakovsky en 1973 en la carpa Carassius carassius.

En cuanto a las albúminas, pudo concluirse que el patrón electroforético de estas proteínas, ha sido difícil de explicar ya que las fracciones resultan difusas y no siempre forman diversas bandas. El sistema polimórfico de albúminas ha sido detectada en el Salmón del Atlántico y en la trucha por Wright 1966 y Nyman 1967, los cuales detectaron alelos en números de 2 a 5. Tres fenotipos de albúminas fueron analizadas en la carpa plateada por Polyakovsky en 1973.

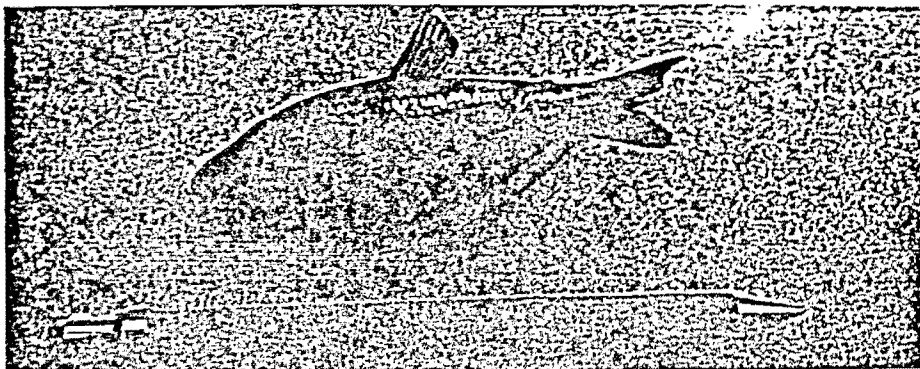
Un sistema simple de prealbúminas expresadas por dos alelos ha sido encontrada en Myoxocephalus quadricornis por Balachnin y colaboradores en 1973.

Otras proteínas no identificadas han sido encontradas por Lukyanenko en 1975, en Sardinias; Nyman y Westin años más tarde, siguieron que dichas proteínas correspondían a ceruloplasminas.

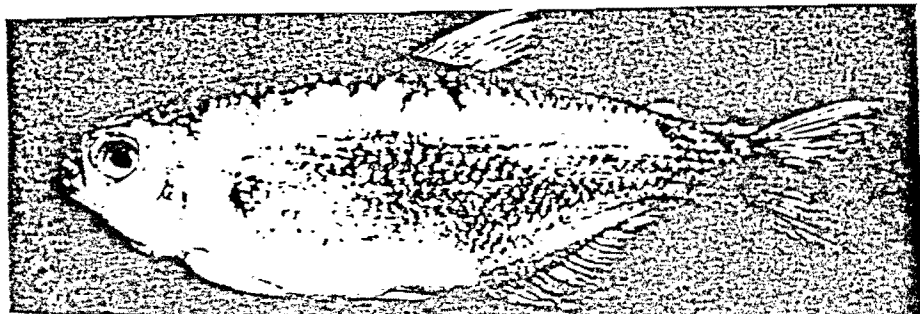
La variabilidad del patrón electroforético relativo a la zona A, en el Salmón descrita por Altukhov en 1972, se debió a la variación cuantitativa de los fosfolípidos presentes en las lipoproteínas.

Otros aspectos de interés, ha logrado ser dilucidados en los peces, a través de muestras de cristalino, tales como el estado nutricional; Lord R.D. 1962, también realizó este tipo de estudios en ciervos con los análisis electroforéticos de proteínas.

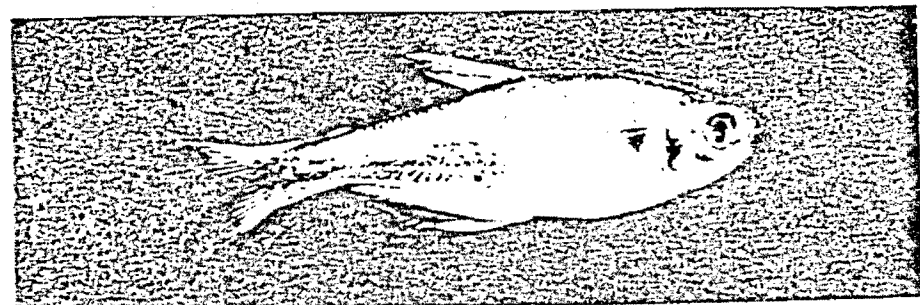
Eckroat R.L. 1969 obtuvo cinco fenotipos del loci de proteínas solubles en la trucha nativa y comparó resultados con los métodos de acrylamida y electroforesis de almidón; en los análisis utilizó líquido de cristalino y suero y obtuvo resultados de las frecuencias de los alelos inoculados.



Hemibrycon carrilloi



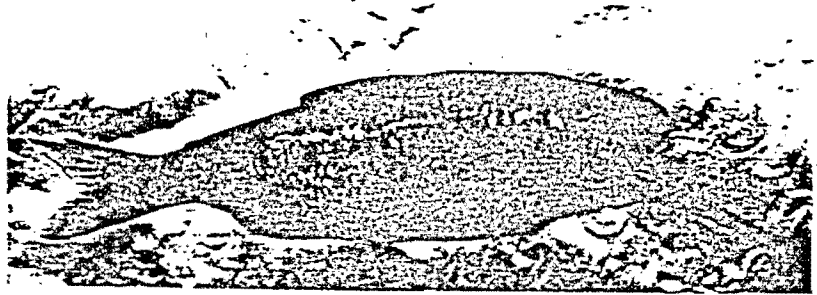
Holobrycon alburnus



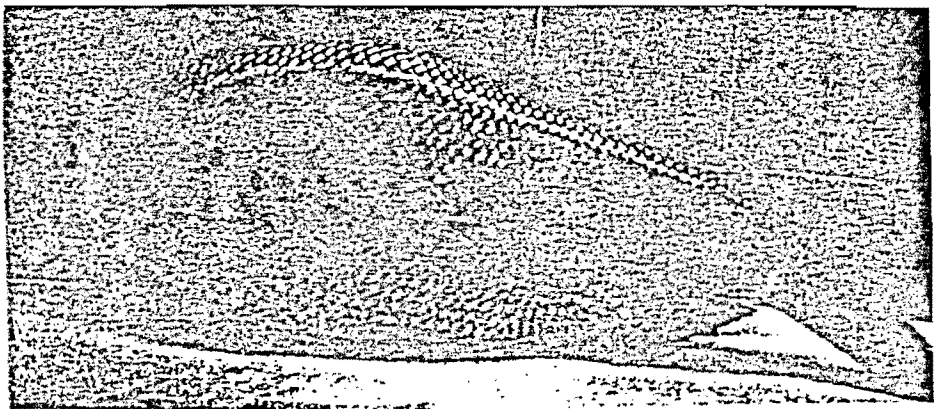
Brycon tovari



Carlastianax aurocaudatus



Hemibrycon jabonero



Brycon moorei moorei

2. MATERIALES Y METODOS

La clasificación taxonómica de los peces que se analizaron estuvo basada en la clave de Miles C. cuyas bases son:

1. Número de radios en la aleta anal.
2. Manchas caudales.
3. Tamaño de escamas.
4. Conformación de los dientes.
5. Número de radios en la aleta anal.
6. Número de escamas de la línea lateral.

2.1 SITIOS DE CAPTURA.

Los sitios de captura fueron: el Río Claro, Riachuelo los Guácharos, Quebrada Río Claro, Río Dormilón, Cueva del Cóndor, Quebrada Puente Madre.

2.2 METODO DE CAPTURA DE EJEMPLARES.

Los peces se capturaron con anzuelos que tuvieron por carnada lombrices de tierra, en el caso de los ríos caudalosos; para los peces más pequeños de arroyos y riachuelos o quebradas, se utilizaron costales de cabuya a manera de redes; para facilitar la captura, se represaron las corrientes con piedras o grandes troncos de madera.

Una vez capturados, se metieron en bolsas plásticas, y se les suministró oxígeno para transportarlos hasta la ciudad. Los peces permanecieron luego en estanques tipo acuario hasta el momento de los análisis.

2.3 METODOLOGIA DEL ANALISIS ELECTROFORETICO.

Para hacer la electroforesis se siguió el método de Beckman para acetato en cámara microzone. La muestra empleada fué líquido del cristalino del ojo que se obtuvo con una jeringuilla y aguja Nº 24. Mientras se prepararon las membranas de acetato para iniciar el proceso, las muestras se depositaron en cajas de Petri con algodones humedecidos a fin de evitar evaporación.

Para depositar las muestras sobre la membrana de acetato, fué necesario humedecerla en una solución de buffer fosfato a pH 8,6 y posteriormente se secó, poniéndola entre dos papeles secantes gruesos.

Realizado el paso anterior, la membrana se colocó en el adaptador de la cámara de electroforesis y se depositaron en ésta las muestras por medio de un aplicador Beckman.

La solución buffer que se utilizó en la cámara fué la misma utilizada para empapar la membrana de acetato. Para la migración

de las proteínas, se eligió una corriente de 280 voltios durante un tiempo de 18 minutos.

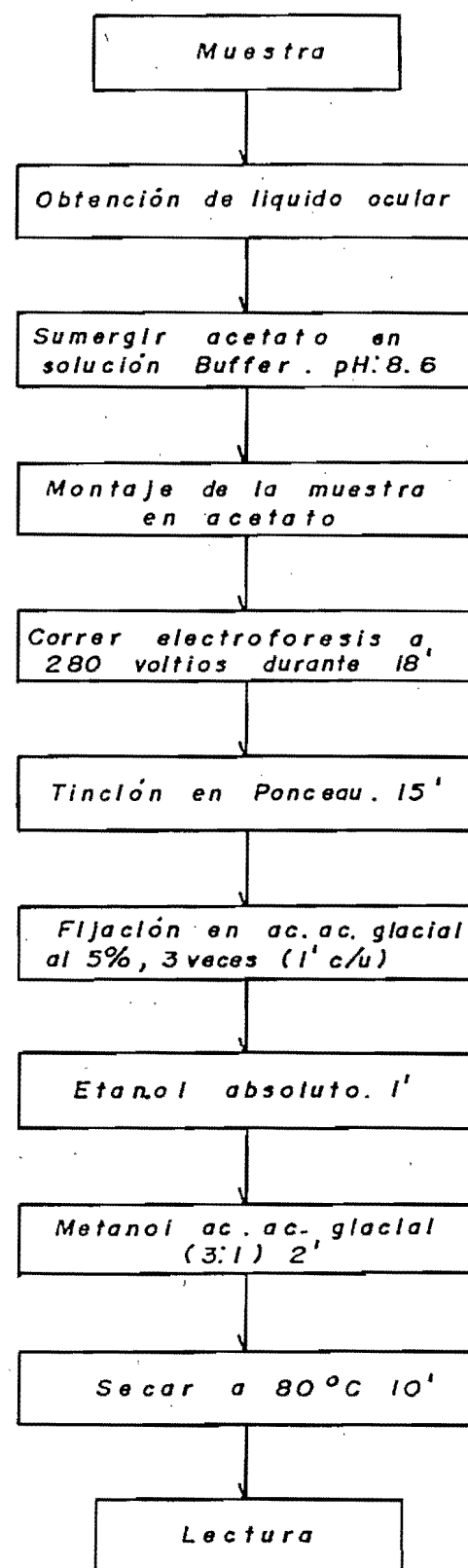
Una vez cumplido el tiempo de migración de las proteínas, se retiró la membrana de acetato del aparato con unas pinzas y fué sumergida para la coloración de las diferentes bandas, en colorantes de Ponceau durante 15 minutos; luego fué pasada por 3 recipientes que contenían ácido acético al 5% para llevar a cabo la fijación; luego, los acetatos se pasaron en etanol absoluto por unos segundos y en seguida a una mezcla de metanol-ácido acético en proporción de 75 ml y 25 ml respectivamente.

Terminados estos pasos, las membranas se montaron en una lámina gruesa de vidrio después de "pescarlas" con varillas de vidrio y pinzas metálicas, y se llevaron a una estufa a 80°C por un tiempo de 10 minutos hasta su completa transparencia.

Una vez seca la preparación, se desprendieron los acetatos de los vidrios, con una cuchilla o un bisturí, y se llevaron al densitómetro para la evaluación cuantitativa (ver Gráfico 1).

GRAFICO N° 1

METODOLOGIA DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS



3. RESULTADOS

Los fenotipos de los peces seleccionados en este estudio fueron analizados de acuerdo a los parámetros generales establecidos por Miles C. (1947) que comprenden: número de radios de las aletas dorsal y anal, número de escamas de la línea lateral, conformación de los dientes y el aspecto de las manchas operculares. Se quiso agregar a lo anterior, el tamaño que presentaron los peces adultos de cada especie.

Según estas características fenotípicas, y el patrón electroforético de proteínas, todos los peces seleccionados se pudieron agrupar dentro de la gran familia Characidae que comprende varias subfamilias y géneros.

Las proteínas del cristalino obtenidas por el método de electroforesis en acetato, mostraron cinco bandas por lo general definidas, y otras por su fineza se denominaron sub-bandas. En orden del ánodo y el cátodo, fueron:

1. Prealbúminas
2. Albúminas
3. Globulinas alfa
4. Globulinas beta
5. Globulinas gamma.

La variación fenotípica de las bandas fué expresada como variación en la concentración de proteínas, así: alta (A); intermedia (I) y baja (B).

En las proteínas monoméricas cada homocigoto mostró solamente una banda de proteína en el acetato, después de la tinción con el reactivo de Ponceau. En los heterocigotos, como ambos productos se han formado, se observaron dos bandas cada una de las cuales fué teñida menos intensamente que las bandas de los homocigotos.

Para los análisis electroforéticos se seleccionaron 40 peces de cada una de las muestras en estudio a fin de obtener valores promedios porcentuales de cada una de las proteínas analizadas, y luego se llevó a cabo una correlación entre el número e intensidad de bandas de los acetatos los valores marcados en el densitómetro de cada uno de los individuos analizados (ver Gráficos 2-8).

El estudio arrojó los siguientes resultados: en relación a la especie B. tovarii y B. moorei moorei, el patrón electroforético no marcó bandas en la región de las prealbúminas; los valores relativos a albúminas, globulinas alfa 1 y 2, y globulinas beta, tuvieron valores promedios similares en ambas especies de 33,4% y 39% la región de globulinas gamma, fué negativa en B. tovarii y tuvo un valor promedio de 0,5% en B. moorei moorei.

Estas mismas especies coincidieron en algunos de los rasgos fenotípicos externos tales como el número de radios de la aleta anal (27 a 32), en el número de escamas de la línea lateral (de 48 a 52 escamas) y en los radios de la aleta dorsal (10) un par de dientes cónicos detrás

de las series mandibulares; la similitud entre estos rasgos así como entre los hallados en la electroforesis del cristalino, sirvieron de base para agrupar esta especie dentro del género Brycon de la subfamilia Bryconinae, familia Characidae.

La especie clasificada como B. alburnus tuvo algunos aspectos coincidentes con la anterior clasificación de las especies B. tovarii y B. moorei moorei en relación a los valores promedios de las proteínas, aunque con algunas diferencias, ya que aunque el total de albúminas tuvo un valor de 28,9%, éstas se presentaron divididas en dos bandas: una apareció en la región de las prealbúminas con valor de 14,2%, y otra en la región de las albúminas con valor de 14,7%. Otras diferencias con las especies anteriores fueron los valores de las globulinas alfa 1 y alfa 2 que fueron más bajas en el primer caso, y más elevadas en el segundo. Las globulinas beta tuvieron un valor casi idéntico a las especies anteriores, en ambos casos y las globulinas gamma tuvieron un valor de 4,6% más alto que en la especie B. tovarii y B. moorei moorei.

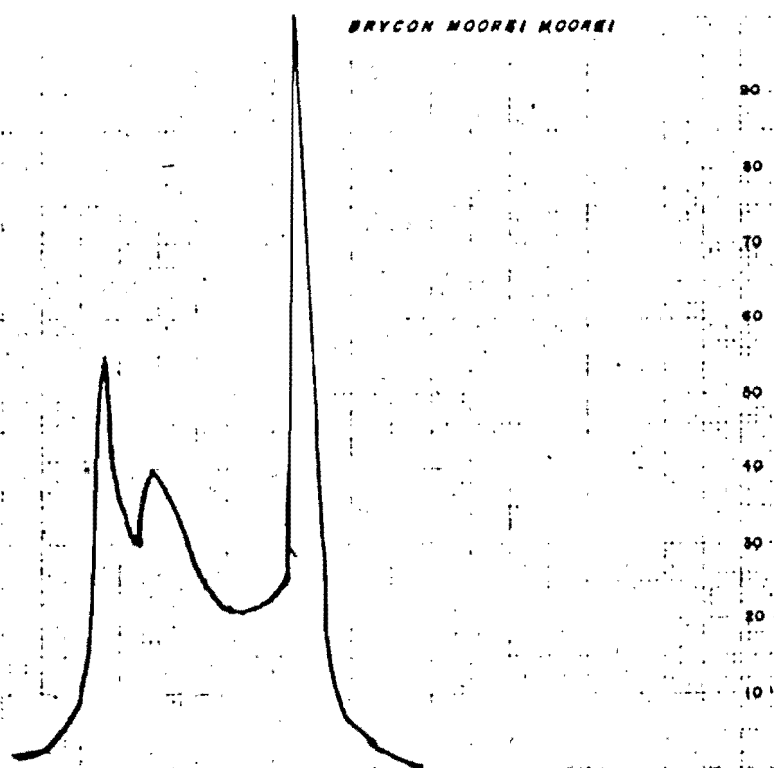
Las características fenotípicas externas difirieron en el tamaño presentado por los animales adultos de B. alburnus, con un total de la cabeza a la cola de 28 a 35 cm, cuando los ejemplares de B. tovarii y B. moorei moorei tuvieron longitudes de 35 a 40 cm y de 42 a 50 cm respectivamente.

Otras características fenotípicas externas de B. alburnus fueron: número de radios de la aleta anal: de 28 a 30; radios de la aleta dorsal: 10; número de escamas de la línea lateral: de 42 a 44.

De acuerdo a los parámetros establecidos por Miles C. (1947) la especie B. alburnus fué reclasificada en el género Holobrycon, que se considera como una subdivisión del género Brycon. Esta reclasificación se llevó a cabo teniendo presente los valores encontrados en los electroforesis que difieren en varios aspectos, de las especies clasificadas como pertenecientes al género Brycon. Este tipo de pez se reclasificó como: subfamilia Bryconinae, género Holobrycon, especie alburnus.

En las especies conocidas vulgarmente como "Sardinias de Río" con tamaño entre 8 y 12 cm de longitud, se encontraron 2 especies: la B. jabonero y la B. carrilloi que tuvieron porcentajes promedios superiores a las especies del género Brycon en cuanto se refiere a las albúminas, con valores de 49,8% y 53% respectivamente. Las globulinas alfa uno, fueron 0,3% y 0,4%, en las especies B. jabonero y B. carrilloi respectivamente; las globulinas alfa dos, entre 0,4% y 0,7% en las mismas especies que fueron valores notoriamente inferiores a las especies del género Brycon analizadas. Las globulinas beta, tuvieron muy alto valor promedio que fluctuó entre 48,3% y 45,1% en B. jabonero y B. carrilloi respectivamente. Las gamma globulinas de ambas especies fueron similares a las del género Brycon.

GRAFICO NR 2



BRYCON MOOREI MOOREI

ALBURNIA
0000
0018
P 33.2
4109.0
04.15.8
04.15.0
04.15.4

GRAFICO Nº 3

