

TRANSFERRINAS DE PECES DEL ORDEN SILURIFORMES

EUGENIO D. TEJEDOR (1)

INDALECIO R. QUINTEROS (1-3)

WILMER J. MILLER (2)

PRESENTADO EN LOS CONGRESOS:

- a) *Séptimo Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética (S.A.G.). Ushuaia, República Argentina, 12-17 de agosto de 1976.*
- b) *III Congreso Latinoamericano de Genética - Sociedad Latinoamericana de Genética. Montevideo, Uruguay, 6-12 de febrero, 1977.*

RESUMEN

Mediante electroforesis horizontal sobre gel de almidón hidrolizado se detectaron fenotipos de Transferrinas en peces de los géneros *Plecostomus* y *Luciopimelodus*, confirmando el resultado por marcación del plasma con Fe^{59} , de cada una de las fracciones proteicas expresadas en la corrida electroforética y posterior autorradiografía. Se infiere la posible importancia de la aplicación de marcadores genéticos en estudios ictiológicos.

SUMMARY

*By horizontal hydrolyzed starch gel electrophoresis were detected transferrin phenotypes in fishes of *Plecostomus* and *Lucio pimelodus* genus, which was confirmed marking the plasma with Fe^{59} and every one of the protein fractions expressed in the electrophoretic run and further autoradiography. It is inferred the possible importance of the application of genetic markers in ichthyological studies.*

(1) Instituto de Inmunogenética Animal y Genética, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(2) Department of Genetics, Iowa State University, AMES, Iowa 50010, U. S. A.

(3) Director del Instituto de Inmunogenética Animal y Genética.

INTRODUCCION

Esta presentación forma parte de un trabajo sobre "Introducción al Estudio Inmunogenético en Peces" que abarca la investigación de peces argentinos de los órdenes Siluriforme, Characiforme, Mugiliforme y otros.

La importancia de la determinación de transferrinas en especies de peces de la cuenca Parano-Platense y su posible aplicación a distintos aspectos de estudios ictiológicos promueven la comunicación de este hallazgo en la primera etapa de nuestro trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares procesados fueron capturados con red de arrastre en la costa del Río de la Plata, en la zona de Los Talas, localidad de Berisso. Se ensayaron técnicas de sangría por punción cardíaca y seccionamiento transversal del pedúnculo caudal. La coagulación sanguínea se produjo a temperatura ambiente y el suero extraído fue centrifugado a 3.000 r.p.m., conservándolo a -20°C hasta su estudio.

El fraccionamiento proteico se realizó por electroforesis horizontal en gel de almidón hidrolizado (Starch hydrolyzed, Connaught Medical Research Laboratories, University of Toronto, TORONTO, CANADA), según el método enunciado por KRIST-JANSSON (1963), con la modificación de QUINTEROS Y MILLER (1968).

En la preparación del gel se utiliza solución buffer ácido cítrico - TRIS (Trihidroximetil amino metano) a PH 6.8. De un volumen total de 500 c.c. para dos geles, 110 c.c. se vierten en un Kitasato con 75 g de almidón, agitándose hasta lograr una suspensión homogénea. El resto se lleva a temperatura de 100°C , para volcarlo en el interior del recipiente mencionado, manteniendo la agitación. La gelificación es instantánea; las burbujas de aire se extraen conectando el Kitasato a bomba de vacío. De inmediato se vierte el contenido en un molde de 22,4 por 13 cm por 6 mm de profundidad, y se lo tapa con un vidrio plano, ejerciendo presión para

erradicar el excedente de gel. El marco con la placa gelificada madura durante 90 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a 4°C en refrigerador.

Las muestras de suero de los distintos ejemplares son preparadas embebando tiras de papel para electroforesis Watman de 8x6 mm; se escurren sobre papel absorbente para evitar difusión, y posteriormente son introducidos en un corte transversal que se practica en el gel a 4 cm de uno de los extremos. En cada placa de gel es posible procesar de 10 a 12 muestras simultaneamente.

La electroforesis se practica en posición horizontal. Los puentes entre el gel y el buffer de las fuentes se realizan mediante paños esponjas de celulosa (Mortimer C.). Los 15 primeros minutos son corridos a 165 V, al cabo de los cuales se extraen los papeles de siembra. Finalizado este periodo se mantiene el voltaje durante igual lapso, elevando luego a 350 voltios con aplicación de hielo sobre la placa de gel mediante un recipiente de fondo plano, hasta que el frente boratado alcance una distancia de 12 cm desde el corte de siembra. Interrumpido el proceso, el gel se corta longitudinalmente obteniendo dos láminas de 3 mm de espesor. La visualización de las proteínas se realiza por tinción con solución saturada de Buffalo Black N B R (Naftol Blue Black) en una mezcla de alcohol metílico 5 partes, agua destilada 5 par-

tes y ácido acético 1 parte. El exceso de colorante se extrae con la mencionada solución alcohol - agua - ácido acético, hasta lograr contraste satisfactorio. La confirmación de las

transferrinas detectadas se realizó por marcación con Fe^{59} .

La movilidad de las muestras y resolución de las corridas es analizado por comparación con un patrón bovino de genotipo TfA homocigótico.

RESULTADOS

En esta primera etapa se analizaron los sueros de ejemplares que superan las 15 especies de peces de la cuenca Parano-Platense, con resultados alentadores, destacándose un notable polimorfismo fenotípico intra-

específico en las fracciones del suero de Sábalo (*Prochilodus platensis*), Bagre Blanco (*Pimelodus albicans*), Bagre Amarillo (*Pimelodus clarias maculatus*) y otras especies.

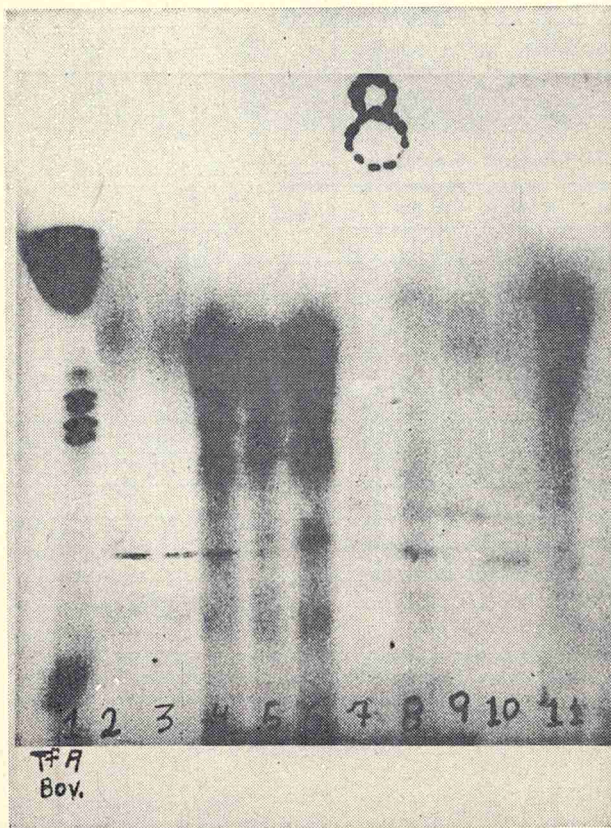


Figura 3: Corrida electroforética en gel de almidón hidrolizado. 1, patrón bovino TfAA, 2 a 5 Luciopime-

Esta figura corresponde a una corrida electroforética de la especie *Luciopimelodus pati* (Patí). La muestra 1 es del patrón bovino TfA homogota; de 2 al 6 corresponde a Patí. Una banda de mayor velocidad común a las muestras 4, 5 y 6 se expresa a la misma altura que la 3ra. banda del Patrón bovino. Otra banda de movilidad menor, cercana a la gamma globulina bovina se detectó en las muestras 2, 3, 4 y 5.

Las muestras 7 a 11 inclusive, pertenecen a Bagre Blanco (*Pimelodus albicans*) las cuales no se incluyen en este trabajo. Los cinco ejemplares expuestos, juntamente con otros de la misma especie demuestran amplio polimorfismo intraespecífico.

La figura 2 corresponde al protocolo de interpretación de la figura 3.

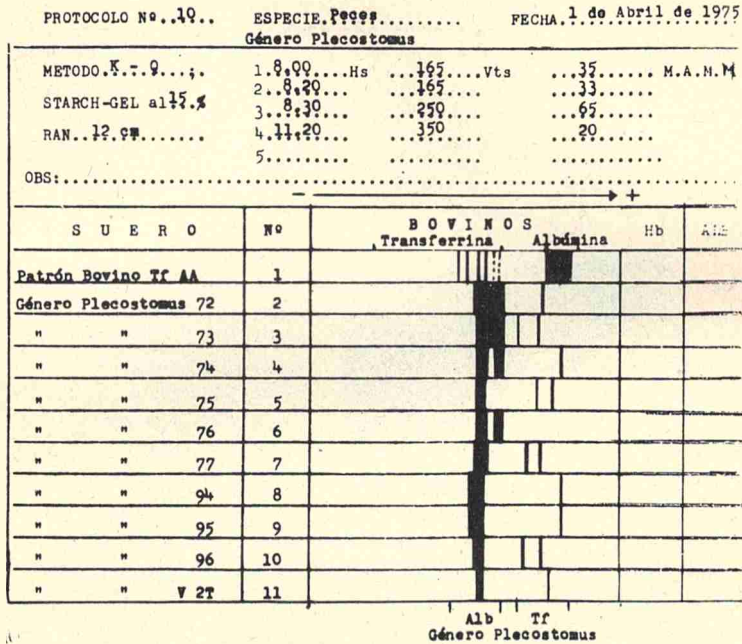


Figura 2: Protocolo e interpretación de la corrida electroforética de 10 muestras de peces del género *Plecostomus*. La figura 4 certifica por autorradiografía las fracciones proteicas transportadoras de hierro expresadas en la figura 3, usando como patrón TfAA bovino (figura 3).



hidrolizado, de 10 muestras del género *Plecostomus* y un patrón de Transferrina de Bovino (TfAA homocigótica).

Los especímenes pertenecen a 10 ejemplares del género *Plecostomus*, nombre vulgar Vieja de Agua, provenientes de muestreos generales donde la determinación sistemática sólo se realizó hasta clasificación de género. No obstante, en muestreos posteriores se diferenciaron las especies *Plecostomus commersoni* y *Plecostomus laplatae*, cuya diferenciación no se incluye en esta presentación.

El tratamiento específico de las 10 muestras permitió confirmar por autorradiografía 10 fracciones trans-

portadoras de hierro, cada una con movilidad diferente, ubicadas aproximadamente en un punto medio entre las albúminas rápidas o F de bovinos y las primeras bandas de TfA. Las muestras 3, 5, 7 y 10 expresan dos bandas y el resto solamente una.

Otras fracciones de menor velocidad, que corren por detrás de las fracciones transportadoras de Fe, se presentan francamente densas. Dadas sus características fenotípicas se induce que estarían constituidas por albúminas y alguna otra fracción que los autores aún no han clasificado.

DISCUSION

Los métodos inmunogenéticos de tipificación relativos a grupos sanguíneos eritrocitarios y grupos serogenéticos, estos últimos determinados por fraccionamiento de proteínas del suero y plasma mediante electrofo-

resis en gel de almidón hidrolizado, han sido aceptados como marcadores genéticos en diversos tipos de estudios biológicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de las enzimas

Sorbitol-deshidrogenasas, se infiere la posible poliploidía en algunos miembros de la familia Cyprinidae (Engel et al., 1971). El polimorfismo intraespecífico fue ampliamente aplicado como método de estudio de poblaciones en diversas especies de peces, por ejemplo en Anguila (Drilhon et al., 1966), Salmón (Moller, 1970; Utter et al., 1970), Carpa (Creysell et al., 1966).

Relativo a otras especies de vertebrados se han descrito transferrinas en el ciervo Cola Blanca Americano (*Odocoileus virginianus*) y en el Venado Argentino (*Ozotoceros bezoarticus celer*) determinándose 9 fenotipos de transferrinas coincidentes entre ambas especies y 8 nuevos fenotipos propios de la especie argentina (Quinteros et al., 1969 y 1971).

Kidd y Perschner (1971), describen las posibles distancias y relaciones filogenéticas entre 10 razas bovinas austriacas e infieren movimientos migratorios en el continente europeo, en base al estudio de sus grupos sanguíneos.

Quinteros et al. (1974), estudiaron el Ganado Bovino Criollo de Argentina demostrando un 76% de coincidencia de sus grupos sanguíneos con la raza Longhorn Americano o Cornilargo, ambas razas originadas por el Ganado Andaluz y de Lidia, concordando estos datos con el registro histórico de su formación como raza.

Referente al género *Plecostomus*, en 10 muestras tomadas al azar se observaron 10 tipos de transferrinas de distinta velocidad electroforética, involucrando siete fenotipos diferentes.

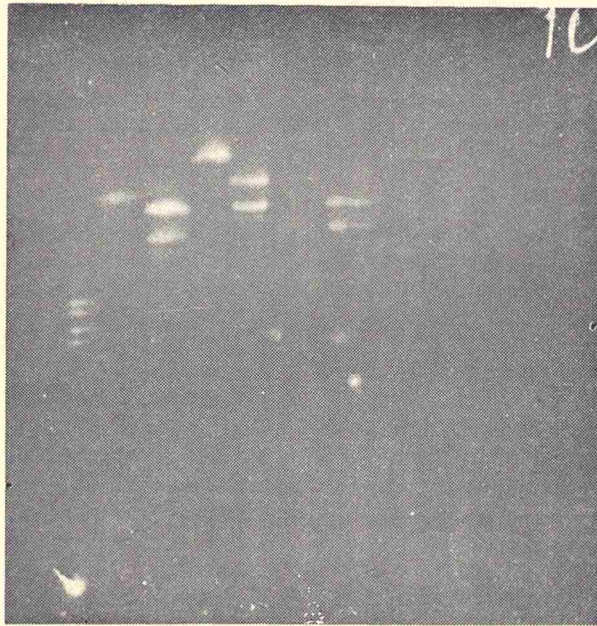


Figura 4: Autorradiografía de transferrinas detectadas. Corresponde a la figura 3.

Muestra 4, 8 y 9, con una sola banda rápida de transferrina, en posición de la Alb F de bovinos.

Muestra 5, se expresa con dos bandas, la más veloz en posición aproxi-

mada de Alb^S de bovinos, y la banda lenta en posición ligeramente más veloz que la banda rápida de la muestra 3 e inmediatamente inferior a la banda rápida de las muestras 7 y 10.

Muestra 11, una sola banda, en posición ligeramente inferior a Alb^S de bovinos.

Muestra 2, banda francamente densa, en posición algo inferior a la única banda de la muestra 11.

Muestra 7, dos bandas. Banda más veloz, en posición ligeramente por encima de la banda lenta de la muestra 5. Banda lenta, por encima del nivel de la banda lenta de la muestra 3 y ligeramente más veloz que la banda lenta de la muestra 10.

Muestra 10, dos bandas. La banda más rápida se expresa con igual velocidad que la banda rápida de la muestra 7, y la banda lenta en posición ligeramente inferior a la banda lenta de la muestra 7.

Muestra 3, dos bandas. La banda rápida en posición ligeramente inferior a la banda lenta de la muestra 5 y la banda lenta en posición inferior a la banda lenta de la muestra 7 y 10.

Referente a la muestra 6, no se logró la marcación radiactiva de la fracción proteica transportadora de hierro.

Debido al notable polimorfismo en transferrinas detectado en el género estudiado, y ante la evidente posibilidad de encontrar nuevas variantes de interés que amplíen el número de fenotipos observados, en este trabajo no se asignan símbolos a las fracciones de transferrinas detectadas.

Los autores de distintos países aceptan denominar transferrinas a las fracciones transportadoras de hierro, cuando el transporte es confirmado por autorradiografía en plasma y suero de peces. Jiménez et al. (1973), y Fine et al. (1970), tipifican las bandas proteicas con letras, diferenciando los tipos según su movilidad. Por otra parte, consideran homocigóticas a las muestras de una sola banda y heterocigóticas las de dos bandas.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al señor jefe del Servicio de Medios Audiovisuales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, D. Julio BERMAN, por su excelente contribución fotográfica.

BIBLIOGRAFIA

1. CREYSELL, R., RICHARD, G. B. and SILBERZAHN, P. 1966. Transferrin variants in Carp serum. *Nature*, Lond. 212:1362.
2. DRILHON, A., FINE, J. M., BOFFA, G. A., AMOUCH, P. and DROUCHET, J. 1966. Les groupes de transferrine chez l'anguilla de l'Atlantique et les anguilles mediterraneennes. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris*, 262:1315-1318.
3. ENGEL, W., FAUST, J., and WOLF, U. 1971. Isoenzyme polymorphism of the Sorbitol dehydrogenase and the NADP Dependent isocitrate dehydrogenase in the fish family Cyprinidae. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 2:127-133.
4. FINE, J. M., DRILHON, A., MARNEUX, M., MAZEAUD, F. and AMOUCH, P. 1970. Polymorphism of transferrin in *Ictaurus melas*. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 1:235-240.
5. JIMÉNEZ, M. and PLANAS, J. 1973. Plasma proteins of the goosefish *Lophius piscatorius*. *J. Fish. Biol.* 5:125-130.
6. KIDD, K. and PIRCHNER, F. 1971. Genetic relationships of Austrian

- cattle breeds. Anim. Blood Grps. Genet. 2:145-158.
7. KRISTJANSSON, F. K. 1963. Genetics control of two pre-albumin in pigs. Genetics 48:1059-1063.
 8. MOLLER, D. 1970. Transferrin polymorphism in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). J. Fish Res. B. D. Can. 27:1617-1625.
 9. QUINTEROS, I. R. and MILLER, W. J. 1968. An alternative method in distinguishing cattle transferrin phenotypes. Biochemical Genetic, 2:213.
 10. QUINTEROS, I. R. y MILLER, W. J. 1969. Nuevos fenotipos de transferrina en el Ciervo Cola Blanca Americano. Analecta Veterinaria 1 (3) : 93-98.
 11. QUINTEROS, I. R., MULLER, A. O., MILLER, W. J. y BISCHOFF, J. R. 1971. Fenotipos de transferrinas en el Venado Argentino (*Ozotoceros bezoarticus celer*). Analecta Veterinaria 3:107.
 12. QUINTEROS, I. R., MULLER, A. O., GARCÍA VALENTI, H., TEJEDOR, E. D. y BISCHOFF, J. R. 1974. Algunos marcadores genéticos en Bovinos Criollos de Argentina. I. Inmunogenética. A.A.P.A. 3:241-257.
 13. UTTER, F. M., AMES, W. E., and HODGINS, H. O. 1970. Transferrin polymorphism in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Bd. Can., 27:2371-2373.