Revista Tecnológica, Vol. 14, No. 1, Octubre 2000

ESTUDIO DE PATRONES PROTEICOS DE *Acartia* sp. y *Labidocera* sp. POR ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA

Washington Cárdenas[1] y María Auxiliadora Bonilla[2]

RESUMEN

Los procesos físico-químicos y biológicos en los sistemas pelágicos juegan un papel importante en el estudio de la oceanografía biológica, de tal manera que es importante establecer identificaciones confiables de los organismos en estudio para poder entender la interacción de dichos factores en la dinámica poblacional. Los géneros *Acartia* sp. y *Labidocera* sp. pertenecen al grupo de copépodos que dominan la biomasa zooplanctónica en el sistema del Golfo de Guayaquil, importante por su alta diversidad y abundancia biológica. Sin embargo, poco o nada se conoce sobre la caracterización genética o proteica de estas especies, lo que hace lento y difícil los estudios poblacionales de estos organismos. En este estudio, se caracterizaron los patrones proteicos de los géneros *Acartia* sp. y *Labidocera* sp. por medio de un gel de poliacrilamida en condiciones denaturalizantes y reductoras. Con esta técnica de electroforesis se pudo identificar bandas proteicas comunes y específicas a los géneros seleccionados. Este método constituye la posibilidad de desarrollar técnicas inmunoquímicas cuantitativas de identificación de mayor versatilidad que las técnicas basadas en morfología.

1. INTRODUCCION

Los organismos zooplanctónicos son importantes pastoreadores de la biomasa fitoplanctónica y son un nexo entre los productores primarios y los más altos niveles tróficos en el océano (Crawford, 1995). Los copépodos son los organismos más abundantes dentro del zooplancton, importantes por ser los consumidores primarios más numerosos, consumidores de detritus orgánicos, presas de numerosos peces planctófagos (arenque, anchoita, sardina, corvina, entre otros), indicadores de masas de agua, hospederos intermedios de parásitos, bacterias, virus, e idicadores de calidad de agua (Boltovskoy, 1981). Los copépodos *Acartia* sp. y *Labidocera* sp. dominan la biomasa zooplanctónica en la época seca (verano) en el Pto. El Morro, General Villamil Playas (Golfo de Guayaquil). *Acartia* sp. es una especie que cuantitativamente ocupa el segundo lugar en número entre los copépodos, y se encuentra presente durante todo el año (Arcos y Martínez, 1986). Esto implica su importancia alimenticia para peces de interés comercial.

La distribución poblacional de los copépodos en el Golfo de Guayaquil puede verse afectada por factores físicos de diferentes escalas de tiempo como son las mareas, temperatura, salinidad, turbidez, entre otros. En algunos casos, puede ser que patrones climáticos que regularmente se repiten, generen fluctuaciones biológicas cíclicas, aún no conocidas dentro de estas

[1] Ph.D. Biólogo, Investigador, Componente III, VLIR-ESPOL, Guayaquil, Ecuador
[2] M.Sc. Bióloga, Coordinadora Sede FIMCM, RIBEN-ESPOL, Guayaquil, Ecuador

especies. Estudios poblacionales en especies de zooplancton especialmente copépodos aún no están definidos.

El estudio del zooplancton, incluyendo a los copédodos, requiere de una labor intensa de muestreos y de personal entrenado que pueda diferenciar las diversas especies basados en la morfología característica de cada grupo taxonómico. A pesar de ello, debido a la similitud de diferentes especies genéticamente diferentes, errores de identificación pueden ser comunes, además, con los estudios actuales no se puede inferir nada sobre el estado fisiológico de los organismos. Es necesario entonces, desarrollar un método rápido y confiable para el procesamiento e identificación de muestras zooplanctónicas, y que pueda prescindir de personal altamente tecnificado para poder adaptar dicha tecnología a labores de campo.

Técnicas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), así como la determinación de antígenos específicos utilizadas en especies de cualquier filum pueden ser útiles para la identificación de especies con mayor rapidez y precisión, así como para estudios de distribución, diversidad, biología y reclutamiento de especies de importancia comercial (DeLong and Ward, 1992).

En este artículo se describen los resultados preliminares en el desarrollo de una técnica inmunoquímica para la identificación del zooplancton. Dos géneros de copépodos fueron seleccionados (*Acartia* sp. y *Labidocera* sp.) para el estudio de sus patrones proteínicos por medio de la electroforesis de poliacrilamida. La identificación de proteínas específicas a cada género permitirá conocer la factibilidad de elaborar anticuerpos que reaccionen específicamente contra antígenos de cada género en muestras heterogéneas de zooplancton, y por lo tanto, su identificación.

2. MATERIALES Y METODOS

El plancton fue colectado en el Canal del Puerto El Morro-General Villamil Playas (Guayas, Ecuador). El muestreo se realizó por la mañana, con una red cónica simple de 30 cm de diámetro, 1 m de largo, y 300 µ de apertura de poro de malla. Los arrastres fueron verticales de 27 m de profundidad hasta la superficie. Las muestras se mantuvieron refrigeradas con hielo hasta llegar al laboratorio donde fueron procesadas.

En el laboratorio se separaron los copépodos presentes en las muestras utilizando un estereomicroscopio, una cámara de Bogorov y pipetas de transferencia. Después de la selección inicial, los copépodos se separaron a nivel de género. Los géneros seleccionados fueron *Acartia sp.* y *Labidocera sp.*

Una vez seleccionados los dos géneros de copépodos, los animales fueron lavados del agua natural con un buffer salino (BS) de la siguiente constitución: 30 mM Tris, 428mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.5. El lavado se efectuó mediante centrifugaciones de 1 min, a temperatura ambiente, y, 700 *g*. Al final del día se obtuvieron tres tubos con cada uno de los géneros antes mencionados, y un tubo con muestra heterogénea de zooplancton, todos en BS. Los tubos fueron congelados a -20 °C hasta el día siguiente.

Los tubos fueron descongelados y se les adicionó a cada uno alrededor de 100 mM de Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) para inhibir la acción de proteasas. Los tubos fueron congelados nuevamente, pero en nitrógeno líquido. Las muestras se sometieron a varios ciclos de congelamiento y descongelamiento para asegurar una buena liberación del material intracelular de los organismos. Al final de los ciclos de congelamiento, los tubos fueron descongelados y centrifugados a 14.000 *g* por 30 min y a -20 °C. Los sobrenadantes obtenidos fueron tranferidos a nuevos tubos eppendorf de 1.5 ml. Los pellets restantes fueron resuspendidos en 0.5 ml de buffer alcalino (BA) con la siguiente constitución: 30 mM Tris-HCl, 20 mM ß-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.2 % ácido ascórbico, pH 7.5. Los tubos fueron centrifugados como se mencionó anteriormente y cada sobrenadante se incorporó al respectivo sobrenadante obtenido en BS. Los sobrenadantes de *Acartia*, *Labidocera* y

plancton fueron precipitados con acetona fría (-20 °C) con un cociente acetona: sobrenadante de 5. La precipitación se la llevó a cabo a -20 °C por dos horas, luego de lo cual se procedió a una centrifugación similar a la descrita arriba. La acetona fue decantada y el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Después del secado, el pellet fué resuspendido en BA y congelado a -20 °C hasta su posterior uso. A esta fracción se la denominó S 1.

Los pellets restantes de S 1 fueron lavados 3 veces en BA con centrifugaciones de 14000 *g* por 30 min y a -20 °C. Al final del lavado, los pellets fueron resuspendidos en BA conteniendo Triton X-100 (0.2% concentración final). La extracción con Triton fue realizada a 4 °C, toda la noche. Al día siguiente las muestras fueron centrifugadas como se indicó arriba y el sobrenadante fue precipitado con acetona de igual manera que S 1, a esta fracción se la denominó S 2.

Los pellets restantes de S 2 fueron lavados 3 veces en BA con centrifugaciones de 14000 *g* por 30 min y a -20 °C. Los pelletes fueron resuspendidos en BA y congelados hasta su posterior uso. A esta fracción se la denominó M.

Las proteinas en S 1, S 2, y, M fueron resueltas en un gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones denaturalizantes y reductoras como se describe en Laemmli (1970). El gel de separación de poliacrilamida tenía un gradiente de 4 a 20 %. La electroforesis se corrió en un aparato Protean II xi (BioRad, Hercules, CA, U.S.A.). Las banadas proteicas en el gel fueron teñidas con una solución al 0.1% de coomassie blue R-250 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) por dos horas, con contínua agitación.

Un marcador proteico de amplio rango de peso molecular (BenchMark Protein Ladder, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) fue cargado en el gel junto con los extractos de los copépodos para poder estimar el peso molecular de las diferentes bandas proteicas.

3. RESULTADOS

En la figura 1a y b se muestran ejemplos de los géneros de copépodos usados en la presente investigación. Estos géneros fueron elegidos por su gran abundancia en las muestras de red, lo que es ventajoso para realizar el estudio preliminar de los patrones proteicos.

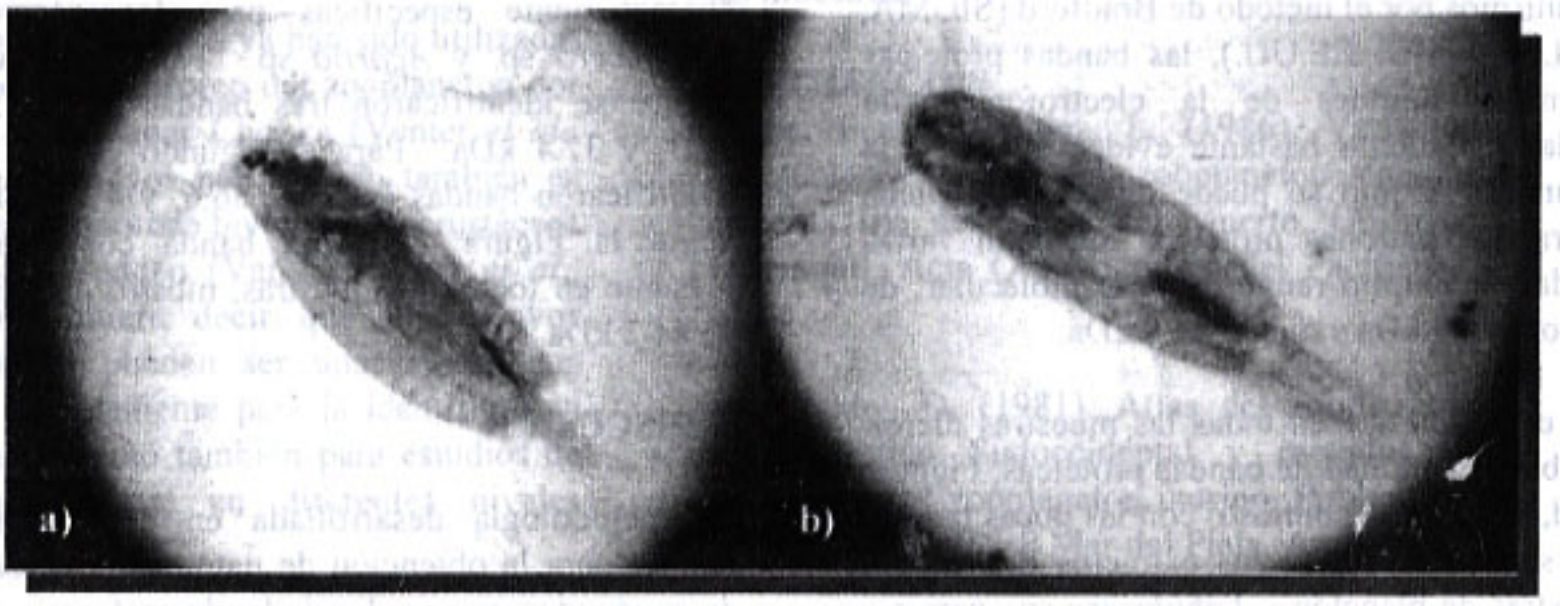

Figura 1.- Microfotografía de copépodos representativos empleados en este estudio: a) Labidocera sp.; b) Acartia sp

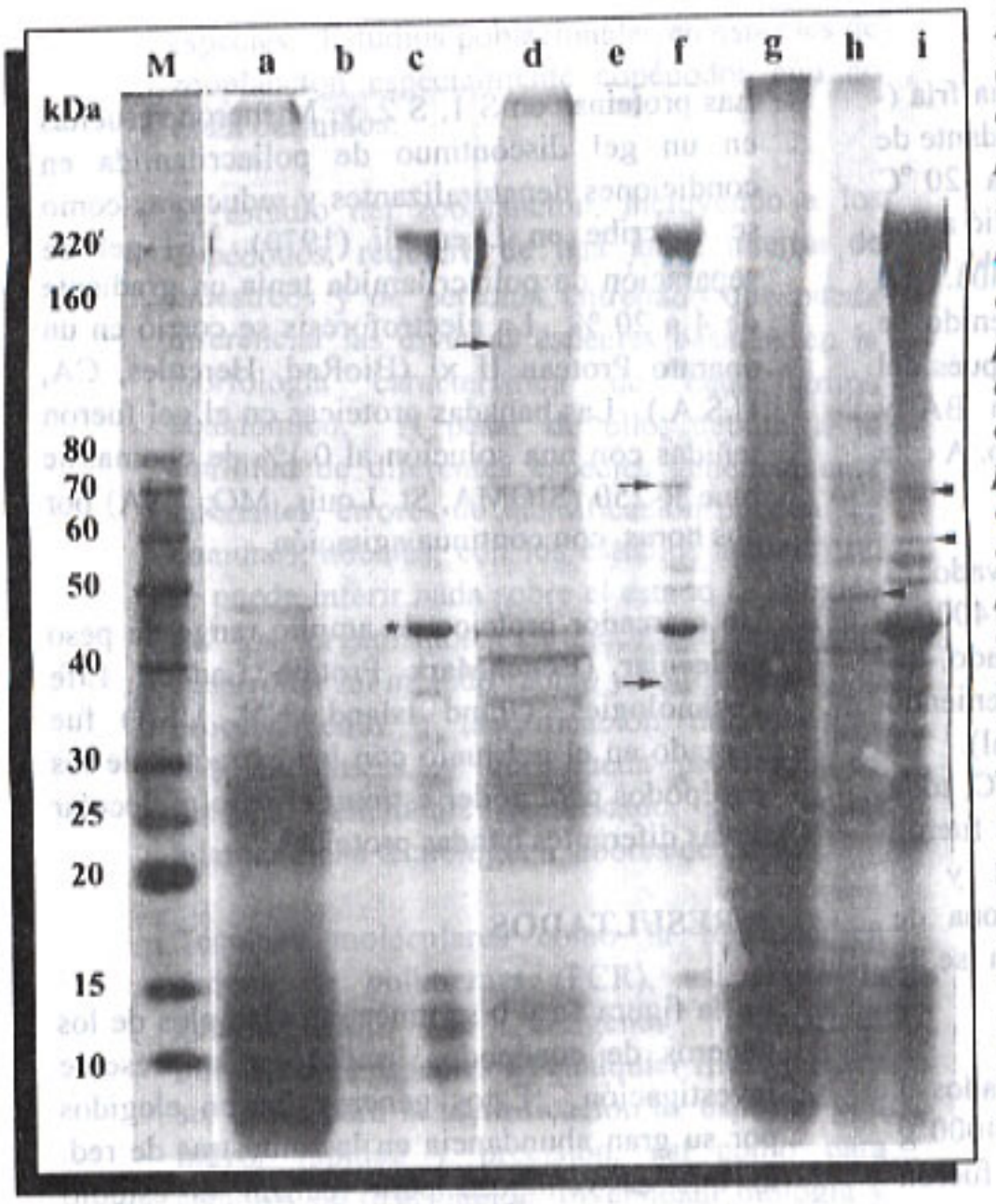

Figura 2.- Gel de poliacrilamida (gradiente de 4 a 20%) en condiciones denaturalizantes y reductoras: a) proteinas de plancton (S 1) extraidas en BS y BA (vea métodos); b) proteinas de plancton (S 2) extraidas en BA más 0.1% Triton X-100; c) proteinas de plancton (M) extraidas con SDS presente en el buffer de cargado de la electroforesis; d) proteinas de Labidocera (S 1) extraidas igual que en a); e) proteinas de Labidocera (S 2) simliares a b); f) proteinas de Labidocera (M) similar a d); g) proteinas de Acartia (S 1) similares a a); h) proteinas de Acartia (S 2) similares a b); proteinas de Acartia (M) similares a d). Flechas en d y f denotan proteinas especificas para Labidocera de 125.3, 71.3, y 37.4 kDa. Cabezas de flecha en h e i denotan proteinas especificas para Acartia de 68.5, 56.6, y 47.7 kDa. El asterisco denota una banda común para ambos géneros de 44.2 kDa. M es el marcador de peso molecular.

Aunque no se pudo cuantificar la concentración de proteinas presentes en los extractos de los organismos por el método de Bradford (SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU.), las bandas proteicas obtenidas después de la electroforesis de acrilamida fueron bastante evidentes, véase la Figura 2. Como se puede observar en dicha figura, los patrones proteicos muestran varias bandas de amplio rango de peso molecular, de mayor a 200 kDa y menor a 10 kDa.

Los extractos S 1 en todas las muestras dieron una buena cantidad de bandas proteicas, Figuras 2a, d, y g, lo que contrastó con las pocas bandas que se obtuvieron en los extractos S 2 de las muestras de plancton y *Labidocera* sp., pero no de *Acartia* sp., Figuras 2b, e, y h. En todos los extractos M se obtuvo una gran cantidad de bandas proteicas, Figuras 2c, f y i.

En los extractos S 1, S 2, o M se pudo identificar algunas bandas proteicas, aparentemente específicas para los géneros *Labidocera* sp. y *Acartia* sp. Para el primer género se identificaron tres bandas de 125.3, 71.3, y 37.4 kDa. Para el segundo género se identificaron bandas de 68.5, 56.6, y 47.7 kDa, véase la Figura 2. Una banda conspicua, presente en todas las muestras, mostró un peso de 44.2 kDa.

4. DISCUSION

La metodología desarrollada en el presente reporte para la obtención de patrones proteicos de copépodos, por medio de la electroforesis de poliacrilamida, mostró ser efectiva. Se obtuvo un gran número de bandas, ya sea de proteinas solubles o asociadas a membranas. El aumentar el nivel de complejidad en la obtención de los extractos proteicos (S 1, S 2, y M) nos ayudará a

recopilar mayor información sobre alguna proteina de interés. Proteinas solubles estarán asociadas, por lo general, a organismos vivos o estructuralmente intactos. Por otro lado, las proteinas asociadas a membranas, especialmente aquellas con alguna ligación al exoesqueleto, tendrán mayor permanencia y podrán ser detectadas en organismos muertos o en restos de éste.

Aunque el estudio evolutivo de diversas especies se puede verificar con mayor precisión utilizando la genética molecular (DeLong and Ward, 1992), la similitud de los patrones proteicos de *Labidocera* sp. y *Acartia* sp., implica que esta técnica es capaz de discernir grupos taxonómicos similares. Por otro lado, la detección de bandas específicas a los géneros de *Labidocera* sp. (125.3, 71.3, y 37.4 kDa) y *Acartia* sp. (68.5, 56.6, y 47.7 kDa), sugiere que pruebas inmunoquímicas pueden ser desarrolladas para la identificación de estos organismos en muestras heterogéneas de zooplancton. La presencia de una banda de gran intensidad, común a los dos géneros estudiados (44.2 kDa), ofrece la posibilidad de inmuno-identificación de estos organismos a nivel de grupo, de acuerdo al tipo de investigación que se esté llevando a cabo.

Técnicas inmunoquímicas ya han sido utilizadas para el estudio de pastoreo del zooplancton por post-larvas del calamar Chokka (Venter *et al.*, 1999). Inmunoensayos han servido también en estudios de predación de bivalvos por crustáceos en el mar de Wadden (Van Der Veer *et al.*, 1998). Esto quiere decir que los ensayos inmunoquímicos pueden ser una herramienta invaluable, no solamente para la identificación del zooplancton, sino también para estudios de dinámica poblacional en diferentes niveles tróficos.

En otros aspectos de la ecología de sistemas acuáticos, la inmunoquímica puede ser útil en la identificación de dinoflagelados (Lopez-Rodas and Costas, 1999). Esto tiene especial interés en ambientes estuarinos donde el crecimiento acelerado de especies nocivas puede ocasionar la muerte de la fauna presente, y por lo tanto un fuerte impacto en las actividades comerciales que se derivan de la explotación de los recursos que ofrecen estos ecosistemas (Burkholder, 1998).

En conclusión, los resultados prelimares presentados en este artículo ofrecen fuertes argumentos a favor del desarrollo de técnicas moleculares, a nivel proteómico, para la identifición de copépodos. El estudio de los patrones proteicos, por medio de la electroforesis de poliacrilamida, junto con ensayos inmunnoquímicos pueden dar un gran impulso tecnológico a la forma en que las investigaciones de ecosistemas acuáticos se han venido desarrollando históricamente. Además, estos métodos ofrecen mayor versatilidad en su uso de campo y son de relativamente menor costo comparado a técnicas de genética molecular.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. María del Pilar Cornejo, Componente 4, proyecto VLIR-ESPOL, por su apoyo a la presente investigación. Especial reconocimiento al Componente III, proyecto VLIR-ESPOL, y al proyecto RIBEN-FIMCM, ESPOL, por proveer de los materiales necesarios para el procesamiento y análisis de las muestras.

REFERENCIAS

Arcos, F., y Martinez, L. (1986). Variación mensual y mareal del zooplancton en una estación fija del estero del Muerto, Golfo de Guayaquil. Acta Oceanográfica del Pacífico *3*, 61-91.

Boltovskoy, D. (1981). Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Publicación Especial del INIDEP Mar del Plata, Argentina.

Burkholder, J. M. (1998). Implications of harmful microalgae and heterotrophic dinoflagellates in management of sustainable marine fisheries. Ecological Applications *8*, S37-S62.

Crawford, D. (1995). Nuclear genes from the copepod Calanus finmarchicus. Molecular Marine Biology and Biotechnology *4*, 241-247.

DeLong, E., and Ward, B. (1992). Biological oceanography from a molecular perspective. Oceanus *35*, 47-53.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lopez-Rodas, V., and Costas, E. (1999). Immunochemical characterization of morphospecies and strains of Prorocentrum (dinophyceae). Journal of Experiemental Marine Biology and Ecology *238*, 293-308.

Van Der Veer, H. W., Feller, R. J., Weber, A., and Witte, J. I. J. (1998). Importance of predation by crustaceans upon bivalve spat in the intertidal zone of the Dutch Wadden Sea as revealed by immunological assays of gut contents. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology *231*, 139-157.

Venter, J. D., Van Wyngaardt, S., Verschoor, J. A., Lipiski, M. R., and Verheye, H. M. (1999). Detection of zooplankton prey in squid paralarvae with immunoassay. Journal of Immunoassay *20*, 127-149.