

PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS DURANTE EL DESARROLLO DEL CAMARÓN BLANCO

Litopenaeus schmitti.

Damir Hernández ¹, Ubaldo Bécquer ¹, Madelín Montalbán ² y Georgina Espinosa ^{2*}

(1) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Calle 16 No. 114, Playa, Ciudad Habana, Cuba.

(2) Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 No. 455, Plaza, CP 10400, Ciudad Habana, Cuba.

* Autor correspondiente: Email: georgina@fbio.uh.cu

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización de los patrones electroforéticos de siete sistemas enzimáticos (3 deshidrogenasas, 4 hidrolasas) y el patrón de proteínas totales en los diferentes estadios del desarrollo del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*, utilizando geles verticales de poliacrilamida. El análisis de los electroforetogramas mostró que los patrones de bandas cambian entre los estadios del desarrollo, presentándose el patrón más diferenciado en las zoeas. De manera general el número de bandas, tanto enzimáticas como proteicas, aumenta con el desarrollo desde huevo hasta el adulto. Este comportamiento sugiere un aumento de la actividad génica con la ontogenia.

Palabras clave: electroforesis; aloenzimas; estadios de desarrollo; ontogenia; *Litopenaeus schmitti*.

ABSTRACT

Using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), were characterized seven enzymatic system (3 dehydrogenases, 4 hydrolases), and general protein pattern during development of white shrimp *Litopenaeus schmitti*. The bands patterns show several changes among stages, with the most differentiated pattern present in zoea stage. The number of enzymatic and general protein bands tends to increasing with development from eggs to adult stage. This behavior suggests an increase in gene activity with the ontogeny.

Key words: electrophoresis; aloenzymas; development stages; ontogeny; *Litopenaeus schmitti*.

El camarón blanco *Litopenaeus schmitti* ha sido ampliamente estudiado en Cuba. Las poblaciones adultas del medio natural se han caracterizado desde el punto de vista morfológico y genético (Espinosa *et al.*, 1989; Espinosa *et al.*, 2003; Borrell *et al.*, 2004) al igual que las poblaciones cautivas (Bécquer *et al.*, 2002; Espinosa *et al.*, 2002). Sin embargo los estudios en las primeras fases de su ciclo de vida se han limitado a la descripción de los estadios iniciales (García, 1972) y a los cambios ontogenéticos de la actividad de enzimas digestivas (González *et al.*, 1994).

En otras especies de camarones peneidos se han referido cambios en los patrones enzimáticos en diferentes fases del desarrollo. Por ejemplo Lavery y Staples (1990) informaron diferencias en los patrones enzimáticos de 39 loci en postlarvas de *P. esculentus* y *P. semisulcatus*, y Lester y Cook (1987) utilizaron patrones isoenzimáticos para comparar la expresión génica durante el desarrollo en cuatro especies de peneidos, encontrando diferencias en el número y posición de las bandas tanto entre

especies como entre los estadios de una misma especie.

El análisis de la expresión de los genes que regulan el desarrollo también ha sido foco de interés en los últimos 20 años y se ha observado que son bastante conservados a través de los metazoos (Deutsch, 2001). Estos genes han sido muy estudiados en crustáceos y es significativo el plan corporal tan bien conservado que existe en los crustáceos malacostracos a los que pertenece *L. schmitti* (Deutsch y Mouchel-Vielh 2003). Sin embargo en *L. schmitti* no existen reportes de estudios similares.

Debido a la falta de información que existe sobre los primeros estadios del ciclo de vida de *L. schmitti* y la importancia del conocimiento de determinados parámetros genéticos en la ontogenia para un mejor manejo de este recurso, se hace necesario extender los trabajos de caracterización genética a las primeras fases del ciclo de vida de esta especie.

El objetivo de este trabajo es caracterizar y comparar los patrones genético bioquímicos en los

diferentes estadios del desarrollo del camarón blanco cubano, *Litopenaeus schmitti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se capturaron ejemplares adultos de *Litopenaeus schmitti* en aguas aledañas a la estación de camaronicultivo de Tunas de Zaza, (latitud 21° 37' 10" N, longitud 79° 32' 15" W) provincia de Sancti Spiritus, Cuba.

Siguiendo la metodología descrita por (Ramos *et al.*, 1995) se desovaron las hembras grávidas, se colectaron los huevos y luego de la eclosión, se siguió el desarrollo larval hasta la abultes. El desarrollo ontogenético de *L. schmitti*, como el de otros camarones peneidos, pasa por varios estadios después de la eclosión (cinco estadios de nauplius, tres de zoea, tres de mysis, varios de postlarva, juvenil y adulto). Para este estudio se colectaron huevos, nauplius 5, los tres estadios de zoea, mysis 2 y 3, postlarva 9 y adultos.

Se analizó la variación de la expresión de loci proteicos en la ontogenia preparando homogenados con una mezcla de animales completos para cada estadio, excepto en los adultos donde se tomaron fragmentos de músculo y hepatopancreas por separado. El número de animales por estadio se estableció luego de ensayar la constancia de los patrones con diferentes cantidades de individuos, o sea, para preparar los homogenados en cada estadio se tomó el menor número de animales para el que se mantenía el mayor número de bandas. De esta manera se determinó utilizar 20 huevos; 20 nauplius 5; 15 zoeas 1, 2y 3; 10 mysis 2 y 3; 5 postlarvas 9 y 4 adultos.

Las muestras fueron mantenidas en condiciones estables de congelación (-20 °C). Los homogenados fueron preparados como recomienda Espinosa *et al.* (2003).

Las muestras fueron sometidas a electroforesis verticales sobre geles laminares de poliacrilamida (PAGE) según Davis (1964).

Se estudiaron siete sistemas enzimáticos (aldehído oxidasa (*Aox*), fosfatasa alcalina (*Akp*), amilasa (*Amy*), esterasas (*Est*), glutamato deshidrogenasa (*Gdh*), malato deshidrogenasa (*Mdh*) y peroxidasa (*Per*)), y el patrón de proteínas totales. La visualización de los sistemas enzimáticos y las proteínas totales se llevó a cabo mediante tinciones específicas de acuerdo al procedimiento seguido por Murphy *et al.* (1996).

Para cada estadio se analizó el número de bandas y su migración y se compararon entre estadios. La migración de las bandas se estimó calculando la movilidad relativa de las mismas (MR). La MR es la razón entre la migración de la banda y la del bromofenol azul (colorante utilizado como indicador del frente de la corrida electroforética). Para evitar posibles errores, se realizaron tres replicas de cada corrida electroforética para cada sistema proteico y estadio analizado.

Como medida del grado de identidad entre estadios se calculó el índice de similitud (D) (Espinosa *et al.*, 1990):

$$S = 2 \frac{c}{a + b}$$

donde:

a = número de bandas en estadio a.

b = número de bandas en estadio b.

c = número de bandas coincidentes entre los estadios a y b.

Luego de comprobar el cumplimiento de normalidad (prueba de Shapiro-W) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene), Se comparó el número total de bandas enzimáticas y de proteínas totales entre estadios aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y post hoc la Prueba de Tukey, utilizando el programa STATISTICA versión 6 (StatSoft, Inc., 2001).

RESULTADOS

Variaciones en los patrones electroforéticos de proteínas durante el desarrollo.

Los patrones electroforéticos obtenidos con los sistemas enzimáticos y las proteínas totales durante el desarrollo se muestran en la Fig. 1. La mayoría de los sistemas enzimáticos muestran patrones de bandas peculiares por estadio. En sentido general se observa una tendencia al aumento del número de bandas a través del desarrollo, con la excepción de la aldehído oxidasa que tiende a una disminución del número de bandas con la ontogenia.

El patrón de bandas más sencillo se observó en la amilasa con ausencia de actividad hasta la zoea 1 y solo dos o tres bandas en los estadios siguientes. Por el contrario en las esterasas y las proteínas

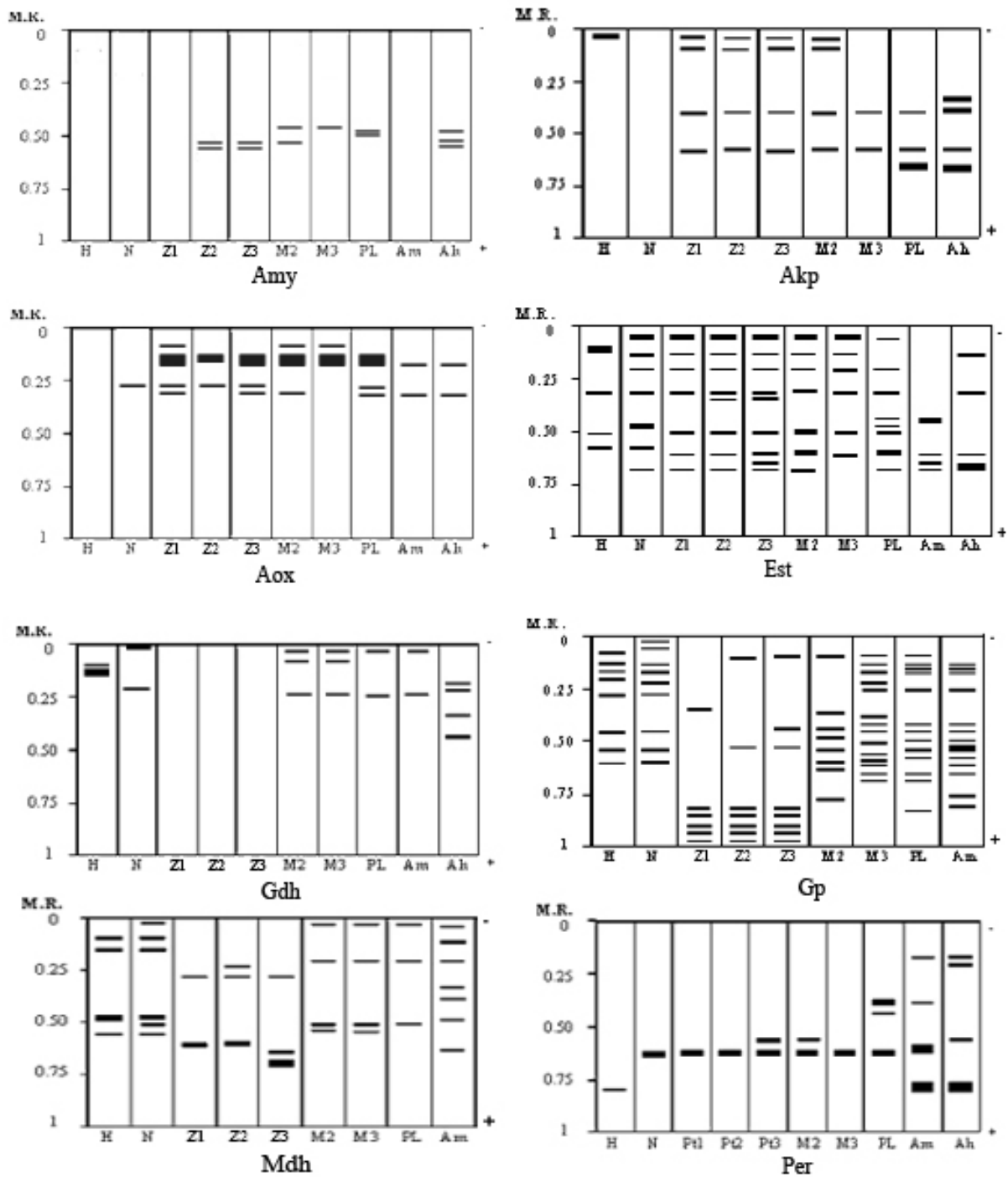


Fig.1. Electroforetogramas que resultaron de la tinción de las enzimas oxidorreductas (*Aox*=Aldehído Oxidasa, *Gdh*=Glutamato deshidrogenasa, *Mdh*= Malato deshidrogenasa, y *Per*= Peroxidasa), hidrolasas (*Amy*= Amilasa, *Akp*= Fosfatasa alcalina y *Est*= Esterasas) y patrón de proteínas totales (*Gp*) en la ontogenia del camarón blanco cubano *Litopenaeus schmitti*. M.R.: Movilidad relativa; H: huevos; N: nauplius; Z 1, 2, 3: etapas de zoeas; M 2, 3: etapas de mysis; PL: postlarvas; Am: Músculo de adultos y Ah: hepatopáncreas de adulto.

totales se observaron los patrones más complejos con un elevado número de bandas por estadio.

Los índices de similitud fueron mayores entre subestadios que entre estadios (Fig. 2). Los cambios entre estadios (huevo-nauplius, nauplius-zoea y postlarva-adulto), mostraron los valores de similitud más bajos.

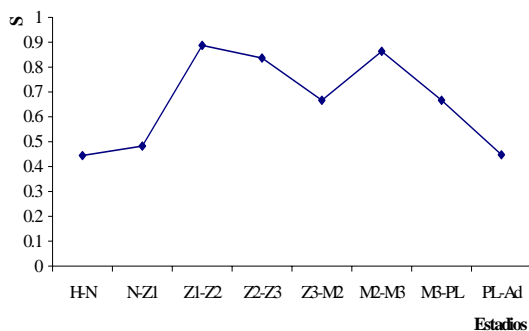


Fig. 2. Índices de similitud entre etapas del desarrollo en el camarón blanco cubano *Litopenaeus schmitti*. Las abreviaturas como en la Fig. 1.

El número de bandas de los patrones electroforéticos de los sistemas enzimáticos y de las proteínas totales presentaron un comportamiento diferente. En las enzimas el número de bandas totales se incrementa con el desarrollo, mostrando valores significativos entre la mayoría de los estadios $F=115.8$; $p=0$ (Fig. 3a) aunque como excepción mysis 3 sufre un decremento con respecto a mysis 2, lo que trae como resultado que no existan diferencias entre el número de bandas de este estadio y el encontrado para zoea y nauplius. El número de bandas de las proteínas totales forma dos grupos estadísticamente diferentes con los estadios, $F=45.1$; $p=0$ (Fig. 3b): el primero incluye los estadios desde huevo hasta mysis 2, aunque para la zoea se presenta un número de bandas estadísticamente diferente al de huevo y nauplius. En el segundo grupo mysis 3, postlarva y adultos muestran números de banda estadísticamente iguales.

DISCUSIÓN

A través del desarrollo desde huevo hasta adulto un camarón experimenta gran número de cambios drásticos en su morfología, fisiología y bioquímica. En *Litopenaeus schmitti* la descripción morfológica de cada uno de estos estadios larvales fue

realizada por Garcia (1972) refiriendo entre el huevo y el adulto: cinco estadios de *nauplius*, tres de *zoea*, tres de *mysis* y varios estadios postlarvales.

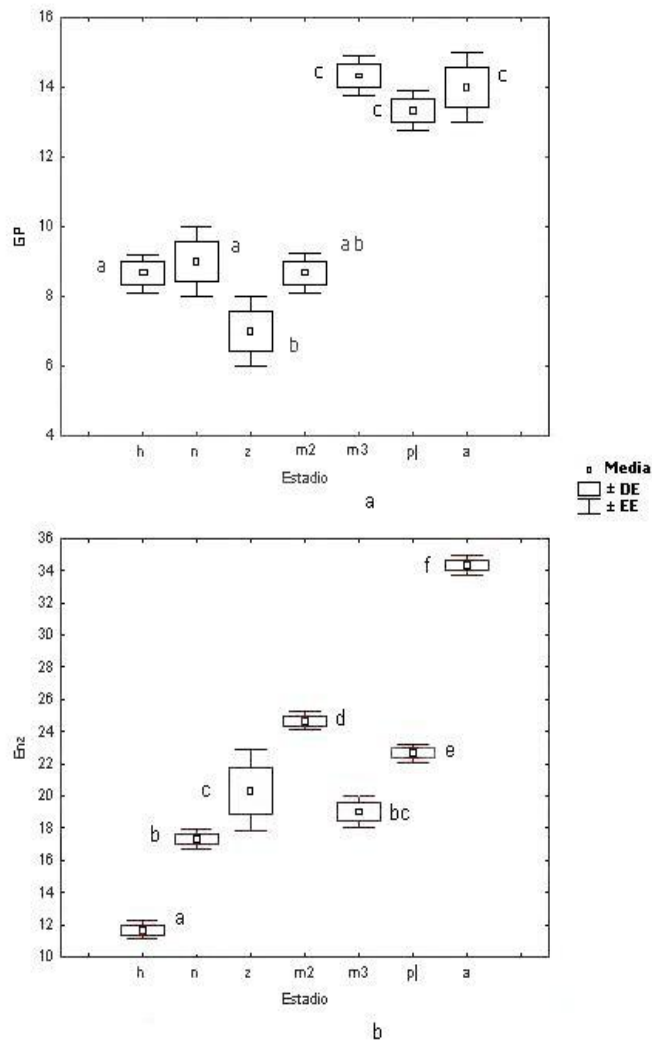


Fig. 3. Comparación del número de bandas totales de enzimas (a) y proteínas (b) entre los estadios de desarrollo en el camarón blanco cubano *Litopenaeus schmitti*. Para la comparación se utilizó un ANOVA de clasificación simple y la prueba Tukey. Las letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas y letras iguales representan diferencias estadísticas no significativas en el número de bandas entre los estadios comparados. DE: desviación estándar, EE: error estándar.

En cuanto a los cambios bioquímicos, en este trabajo se observa una tendencia al incremento en la complejidad de los patrones de los sistemas

enzimáticos y de proteínas analizados (Figs. 1 y 3). Estos cambios pudieran ser atribuidos a variaciones específicas de los estadios en el número e identidad de genes activos. En este sentido Lovett y Felder (1990b) detectan variaciones en la activación y actividad de varias enzimas digestivas entre estadios del desarrollo de *Litopenaeus setiferus* que se corresponden con cambios en los hábitos alimentarios de los mismos. Alternativamente los cambios observados pudieran deberse a cambios postranscripcionales específicos de cada estadio (*splicing* alternativo). Estos cambios pueden traer como consecuencia la generación de diferentes productos proteicos o afectar la expresión y/o funcionalidad de los mismos (Lynch y Maniatis, 1996; Lewin, 2000). Casos particulares de *splicing* diferenciales y su incidencia en la expresión de determinados genes han sido referidos en algunos mamíferos y en moscas del género *Drosophila* (Handa *et al.*, 1999).

Los resultados mostrados son diferentes a los de Hedgecock *et al.* (1982), quienes refieren uniformidad en los patrones de aloenzimas de los Decápodos a través de la ontogenia, mientras son similares a los de Lester y Cook (1987), quienes encontraron zimogramas diferentes cuando estudiaron los cambios en los patrones de enzima en *zoeas*, *mysis*, *postlarvas* y *adultos*, en cuatro especies comerciales de peneidos. También coinciden con los cambios en la actividad y número de isoenzimas en varias enzimas digestivas durante algunos estadios del desarrollo de *Penaeus monodon* referidos por Fang y Lee (1992). La ausencia de actividad amilasa en los primeros estadios del desarrollo fue también informada por Lovett y Felder (1990a), Fang y Lee (1992) y Gonzalez *et al.* (1994) trabajando con peneidos.

Un aspecto significativo es la disminución del número de bandas totales de las enzimas en el estadio de *mysis* 3, a partir de la cual comienzan de nuevo a incrementarse en postlarva y adulto. Lovett y Felder (1990b) detectan, en el estadio de *mysis* 3 de *Litopenaeus setiferus*, una disminución de la actividad de algunas enzimas, entre las que se encuentran esterasas, fosfatasa alcalina, tripsina y carboxilpeptidasas, manteniéndose muy bajas en la postlarva 1, este comportamiento se corresponde con la degeneración de una parte del intestino medio, previo a la metamorfosis de *mysis* a postlarva (Lovett y Felder, 1989). La correspondencia en los cambios de actividad enzimática y de hábitos alimenticios durante el desarrollo, pudieran interpretarse como que el cambio ocurrido en las actividades de las enzimas está condicionado por la variación en los hábitos

alimentarios, sin embargo tales cambios ontogenéticos en la actividad enzimática pudieran estar predeterminados y reflejar una regulación genética temporal en la síntesis de enzimas, este tipo de regulación ha sido demostrada en *Homarus americanus* y *Artemia franciscana* (Lovett y Felder, 1990b). Por otra parte Brito *et al.* 2001 refieren, en *L. vannamei*, cambios en la actividad de enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina y amilasas en respuesta a cambios en la dieta.

Un comportamiento similar al encontrado en *L. schmitti* para el número de bandas de las proteínas totales durante el desarrollo fue informado por Lovett y Felder (1990b) para *L. setiferus*, estos autores refieren que el contenido de proteínas totales se mantiene esencialmente constante en el desarrollo excepto en los primeros estadios (*nauplius* y *zoea*).

CONCLUSIONES

Se obtuvo un patrón proteico específico en cada una de los estadios del desarrollo estudiados en el camarón blanco *L. schmitti*, cuya complejidad aumenta con el desarrollo, excepto en la *mysis* 3 que experimenta una disminución significativa del número de bandas enzimáticas.

Los sistemas enzimáticos y proteicos reflejan comportamientos diferentes en cuanto al número de bandas por estadio. Las enzimas manifiestan una tendencia al aumento del número de bandas con el desarrollo, sin embargo en las proteínas el número de bandas se mantiene esencialmente constante, excepto en los estadios iniciales (*huevo-mysis* 2).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Rolando González, Vicente Berovides y Jean Deutsch las sugerencias y comentarios que ayudaron grandemente al desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- Bécquer, U., R. Díaz, N. Hernández, J. Azanza, G. Espinosa, Y. Borrell, J. Romo y C. Guerrero (2002): La Genética en el Cultivo de Camarón *Penaeus schmitti* en Cuba: Resultados y Perspectivas, 2002. *Revista Acuicultura del Ecuador*. 33-36.
- Borrell, Y., G. Espinosa, J. Romo, G. Blanco, E. Vázquez y J.A. Sánchez (2004): DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti* *Marine Biology* 144: 327-333.

- Brito, R., C. Rosas, M.E. Chimal y G Gaxiola (2001): Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research* 32(4), 257-266
- Davis, B.J. (1964): Disc Electrophoresis. Part II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (121): 402-421.
- Deutsch, J. (2001): Comparative developmental molecular genetics in arthropods. *Revista Cubana de Química* XIII(2): 30-39.
- Deutsch, J. y E. Mouchel-Vielh (2003) : Hox genes and the crustacean body plan. *BioEssays* 25:878-887.
- Espinosa, G., V. Berovides y R. Díaz-Fernández (1989): Genética-Bioquímica y morfometría del camarón blanco *P. schmitti* de Cuba. Resultados preliminares. *Rev. Invest. Mar.* 10(2): 157-162.
- Espinosa, G., A. Posada, V. Berovides y M.E. Alonso (1990): Relaciones entre algunas especies de lagartos del género *Anolis* sobre la base de la movilidad de las bandas de miógeno. *Revista Cubana de Biología* IV(2): 149-155.
- Espinosa, G., U. Bécquer, Y. Borrell, J. Romo, R. Díaz, J. Azanza y R. de Dios (2002): Variación genética y morfológica en poblaciones naturales y cautivas del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en Cuba. <http://www.civa2002.org>, pp: 778-784.
- Espinosa, G., R. Díaz, U. Bécquer, J. Matos, J. Romo y Y. Borrell (2003): Análisis poblacional del camarón blanco cubano (*Litopenaeus schmitti*) utilizando aloenzimas como marcadores genéticos *Rev. Invest. Mar.* 24(1)11-16.
- Fang, L y B. Lee (1992): Ontogenetic Change of Digestive Enzymes in *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Phys.* 103b (4):1033-1037.
- García, T. (1972): Descripción de los estadios larvales del camarón blanco *Penaeus schmitti* (Burkenroad) obtenidos en el laboratorio. *Ciencias (8 Invest. Mar.)*, 54 pp.
- Gonzalez, R., V. Fraga y O. Carrillo (1994): Cambios ontogenéticos en la actividad de las principales enzimas digestivas de *Penaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 15(3): 262-268.
- Handa, N., O. Nureki, K. Kurimoto, I. Kim, H. Sakamoto, Y. Shimura, Y. Muto y S. Yokohama (1999): Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature* 398, 579-585.
- Hedgecock, D., M.L. Tracey y K. Nelson (1982): Biochemical Genetics. In: *Biology of Crustacean* (Lawrence Abele, ed.) Academic Press, vol 2.
- Lavery, S y D. Staples (1990): Use of Allozyme Electrophoresis for identifying two Species of Penaeid Prawn Postlarvae. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 4 (2): 259-266.
- Lester, J.L. y J.P. Cook (1987): Ontogenetic Changes in Isozyme Patterns of *Penaeus* species. In: *Comp. Biochem. Physiol.* 858(2): 253-258.
- Lewin, B. (2000): *Genes VII*. Oxford University Press, 990 pp.
- Lovett, D.L. y D.L. Felder (1989): Ontogenetic of Gut Morphology in the White Shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *Journal of Morphology* 201:253-272.
- Lovett, D.L. y D.L. Felder (1990a): Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in development stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda and Penaeidae). *Biol. Bull.* 178:160-174.
- Lovett, D.L. y D.L. Felder (1990b): Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178:144-159.
- Lynch, K.W. y T. Maniatis (1996): Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev.* 10: 2089-2101.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, D.G. Donald y C.H. Haufler (1996): Proteins: Isozyme Electrophoresis. In *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, Charter 4.
- Ramos, L., M. Espejo, S. Samada y L. Pérez (1995): Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(2): 183-187.
- StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.

Acceptado: 15 de marzo de 2006