

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS PROTEINAS MUSCULARES SOLUBLES DE PECES Y DE SUS PROCESOS DE DEGRADACION

E. ARIAS *

INTRODUCCION

La caracterización de razas de sardina es uno de los problemas al que se le está prestando una atención especial por parte de numerosos investigadores. Hasta ahora, estos trabajos han venido realizándose tomando como base la media vertebral, el índice cefálico o el estudio de las branquispinas.

Con el presente estudio introducimos el fraccionamiento de las proteínas con gel de acrilamida en la resolución del problema planteado.

Al iniciar nuestros trabajos sobre proteínas séricas, estos se encaminaron al estudio de las distintas técnicas utilizadas en el fraccionamiento de las mismas y su posible aplicación al estudio de la caracterización de poblaciones de sardina.

Las dificultades encontradas en la obtención de una cantidad apreciable de suero y el inconveniente que representaba conseguir un número de ejemplares vivos para proceder a su extracción, nos indujo a proseguir nuestra investigación, utilizando como material de trabajo las proteínas extraídas por trituración del músculo dorsal de los distintos peces.

Los conocimientos adquiridos en estas experiencias nos permitieron seguir el camino que consideramos más apropiado para el logro del fin per-

* Instituto de Investigaciones Pesqueras.

seguido, y lo primero que abordamos, por considerar imprescindible, fue la problemática que se nos presentaba con los procedimientos usados corrientemente y que, al aplicarlos a nuestro caso, nos daban resultados poco satisfactorios.

En estas condiciones se hacía necesaria una modificación del procedimiento, así como del aparato utilizado en la llamada electroforesis de disco discontinua.

Las investigaciones efectuadas por PAYNE (1963), MANCUSO (1964), THOMPSON (1967), ROD-CHU (1968) y COWIE (1968) sobre la identificación y diferenciación de diversas especies de peces, las realizaron aplicando el aparato y procedimiento descritos por ORNSTEIN y DAVIS (1965) y que, en esencia, consiste en la obtención de dos geles de acrilamida y un copolímero de acrilamida y metilénbisacrilamida, que actúan como medios de dispersión en la electroforesis de las muestras proteicas.

Análogamente, UTHE y TSUYUKI (1967), MACKIE (1968) y JONES et al (1970) son los nombres de otros investigadores que han realizado estudios sobre proteínas musculares con geles de acrilamida.

MATERIAL

La relación de especies que a continuación se incluye está confeccionada a base de los animales, con los cuales hemos realizado todas las experiencias.

CUADRO I
RELACION DE ESPECIES ESTUDIADAS ENCUADRADAS TAXONOMICAMENTE,
SEGUN LOZANO REY (1945)

Género	Especie	Familia	Orden	Serie
<i>Diplodus</i>	<i>annularis</i>	Sparidae	Peciformes	Fisoclistos
<i>Diplodus</i>	<i>vulgaris</i>	Sparidae	Peciformes	Fisoclistos
<i>Diplodus</i>	<i>sargus</i>	Sparidae	Peciformes	Fisoclistos
<i>Pagellus</i>	<i>acarne</i>	Sparidae	Peciformes	Fisoclistos
<i>Pagellus</i>	<i>erythrinus</i>	Sparidae	Peciformes	Fisoclistos
<i>Lophius</i>	<i>piscatorius</i>	Lophidae	Lofiformes	Fisoclistos
<i>Lophius</i>	<i>budegasa</i>	Lophidae	Lofiformes	Fisoclistos
<i>Mugil</i>	<i>auratus</i>	Mugilidae	Mugiliformes	Fisóstomos
<i>Trachurus</i>	<i>trachurus</i>	Carangidae	Escombriformes	Fisoclistos
<i>Trachurus</i>	<i>trachurus mediterraneus</i>	Carangidae	Escombriformes	Fisoclistos
<i>Sardina</i>	<i>pilchardus</i>	Clupeidae	Clupeiformes	Fisóstomos
<i>Merluccius</i>	<i>merluccius</i>	Gadidae	Gadiformes	Fisoclistos

PREPARACION DE LA MUESTRA

Todos los ensayos los hemos realizado con extractos de proteínas solubles en agua, procedentes del músculo dorsal de los distintos ejemplares estudiados.

Para efectuar la extracción de las proteínas tomábamos 5 gramos de músculo de la zona correspondiente al lomo del animal y 75 ml. de agua destilada y lo triturábamos durante dos minutos con un aparato Multibat. Una vez realizada la extracción de las proteínas, congelábamos a -5 grados centígrados para que la emulsión de grasa formada se pudiera eliminar por centrifugación. A las veinticuatro horas se procedía a su descongelación a la temperatura ambiente y centrifugábamos a 3.000 r. p. m. durante treinta minutos. La última operación consistía en filtrar el líquido que sobrenadaba sobre papel Albet número 242.

METODO

El procedimiento desarrollado se fundamenta en el hecho, experimentalmente comprobado, de que la bondad de un proceso electroforético depende, en primer lugar, de una determinada velocidad de migración que puede considerarse límite. Las velocidades superiores a esta velocidad límite dan origen a una definición insuficiente de las bandas, mientras que las inferiores, dentro de un margen considerado práctico, no ocasionan la aparición de nuevas bandas como desdoblamiento de las anteriores, ni una mayor definición de las mismas.

A este respecto se construyó un aparato en el que los distintos geles se disponen de tal forma que cada uno resulta independiente de los demás. Cada polímero queda conectado con el circuito principal mediante un circuito propio que lleva intercalado en serie un potenciómetro y un interruptor de corriente. De esta forma, si bien existe una fuente única de alimentación primaria de energía, los distintos geles polímeros quedan así sujetos a diversos potenciales. Con esta disposición, a los pocos minutos de haberse iniciado el proceso electroforético, si observamos las bandas de desplazamiento de azul de bromofenol, que constituye el frente de progresión, es posible regular el potencial de cada gel y así rectificar las distintas velocidades hasta aproximarlas a la velocidad límite a que antes se hizo referencia (figura 1).

La posibilidad de independizar el proceso electroforético por elementos ofrece también la ventaja de facilitar la última operación de fijado y revelado. Efectivamente, al finalizar la electroforesis debe procederse a la separación del polímero para fijar las proteínas, teñirlas y eliminar el exceso de

colorante. Esta separación requiere un tiempo apreciable, si se tiene en cuenta que las operaciones se realizan en series de 12 elementos como mínimo. Durante el transcurso de esta fase, y como consecuencia de la desaparición del campo eléctrico que orientaba las partículas, se produce un desplazamiento por difusión que puede afectar la perfecta delimitación de las bandas, introduciendo un factor de inseguridad.

Con el sistema propuesto se disminuye el potencial en esta fase final y se anula así la velocidad de migración, manteniendo las partículas en un régimen prácticamente estático, con lo que cada uno de los elementos puede manipularse por separado sin posibles alteraciones.

La operación posterior de desteñido la hemos realizado con un aparato diseñado por nosotros, en el que la migración del colorante se realiza en sentido transversal, con lo que podemos operar con potenciales más altos y conseguimos una mayor rapidez en el proceso de decoloración.

Como medio de difusión para el fraccionamiento de las proteínas hemos empleado un copolímero de acrilamida y metilénbisacrilamida, y como la velocidad de migración de una molécula proteica en un medio viscoso viene dada por la ley de Stokes, que dice:

$$V = \frac{Q E}{6 \pi \eta r}$$

en donde

Q = Carga

E = Potencial

η = Viscosidad

r = Radio de la partícula

nos damos cuenta que podemos modificar la velocidad de desplazamiento corrigiendo el potencial o la viscosidad, y esta última se puede cambiar aumentando o disminuyendo el tamaño del poro o colocando las muestras en una solución de concentraciones variables de sacarosa. En estas condiciones los mejores resultados los obtuvimos con un gel de acrilamida y metilénbisacrilamida y con el empleo de sacarosa al 40 por 100.

DISOLUCIONES UTILIZADAS

Disolución 1.^a CIH N 48 ml.
TRIS 36,6 grs.
TEMED 0,23 ml.

Se completa hasta 100 ml. con agua destilada.

El pH de esta disolución debe ajustarse con CIH N a 8,9.

- Disolución 2.^a Acrilamida 28 grs.
 BIS 0,735 grs.
 Se completa hasta 100 ml. con agua destilada.
- Disolución 3.^a Sacarosa al 40 por 100.
- Disolución 4.^a Azul de bromofenol 0,001 por 100.
- Disolución 5.^a Amido Schwartz al 1 por 100, en ácido acético al 7 por 100.
- Disolución 6.^a Como electrolito se emplea TRIS-GLICINA 0,37 M.
- Disolución 7.^a Persulfato amónico, 140 mgrs., y se completa hasta 100 c. c. con agua destilada.

En el proceso de decoloración se emplea ácido acético al 7 por 100.

PREPARACION DEL GEL

En unos tubos de vidrio de 8,9 centímetros de longitud y 0,5 centímetros de diámetro interior, aforados a 4,5 centímetros, se vierte, después de haber tapado el orificio inferior con una cantonera de caucho, la mezcla de reactivos siguientes:

Una parte de la disolución primera.

Dos partes de la disolución segunda.

Una parte de agua destilada.

Cuatro partes de la disolución de persulfato.

El vertido se lleva a cabo con una pipeta terminada en capilar y, una vez efectuado el enrase, se añade una gota de agua destilada con el fin de eliminar el menisco de contacto entre la superficie del líquido y las paredes del tubo.

Realizada esta última operación se colocan los tubos en una estufa de cultivos, manteniéndose a la temperatura de 30 ± 1 grados centígrados, durante treinta minutos.

DESARROLLO ELECTROFORETICO CON EL COPOLIMERO DE ACRILAMIDA Y METILENBISACRILAMIDA DE UNA SOLUCION DE PROTEINAS CONOCIDA QUE CONTIENE ALBUMINA, ALFA₁, ALFA₂, BETA Y GAMMA GLOBULINAS

Con el fin de comprobar el fraccionamiento de proteínas con el procedimiento y aparato desarrollados, utilizamos una disolución de Monitrol que contenía albúmina, alfa₁, alfa₂, beta y gamma globulinas y la mezclamos con sacarosa al 40 por 100 en la proporción 1:1.

Una vez verificada la polimerización colocamos los tubos en la cubeta anódica, que contenía como electrolito TRIS-GLICINA 0,37 M y le añadimos 0,15 mililitros de la disolución mencionada, completando el resto del tubo

hasta la cubeta catódica con el mismo electrolito, que contenía unas gotas de disolución azul de bromofenol.

Se conecta, a través de los puentes de platino, la parte superior del tubo con el polo negativo de la fuente de alimentación primaria de energía y el de la cubeta con el positivo, a lo largo del circuito constituido por los interruptores de corriente y los potenciómetros y se ajusta la intensidad de la corriente de forma que correspondan de 4 a 6 m. a. aproximadamente por tubo.

A los pocos minutos de iniciada la operación aparece la banda de colorante y, si se aprecia distinta velocidad de migración en alguno de los tubos, se procede a modificarla, ajustando la misma por medio de los distintos potenciómetros.

Cuando la banda de azul de bromofenol ha emigrado hasta el extremo inferior del tubo, se interrumpe el paso de corriente y se mantiene el resto de los tubos con intensidades tan bajas que, prácticamente, las moléculas proteicas permanecen en estado estacionario sin proseguir el avance.

Una vez finalizado el proceso fijamos y teñimos las proteínas, eliminando el exceso de colorante, con lo que se puso de manifiesto el perfecto fraccionamiento de las proteínas ensayadas (fig. 2).

APLICACION DEL METODO DESCRITO AL ESTUDIO DE LAS PROTEINAS MUSCULARES SOLUBLES EN AGUA DE LAS ESPECIES RESEÑADAS

El método desarrollado lo hemos aplicado al estudio de las proteínas musculares de peces, así como al reconocimiento y clasificación de los mismos, basándonos en sus respectivos proteinogramas.

En un principio, todas las determinaciones las realizamos bajo un aspecto bioquímico, pero al advertir un desarrollo anormal en *Diplodus annularis*, creímos oportuno determinar sexo, talla, peso, estadio sexual, contenido estomacal, grasa visceral, influencia de la oxigenación, método de captura, estado de conservación y de la refrigeración, al objeto de averiguar las causas de las diferencias observadas.

El detalle de dichas características puede apreciarse en el cuadro II.

Los desarrollos electroforéticos referentes a las especies estudiadas se muestran en las figuras 3 y 4, pudiéndose apreciar en las mismas una perfecta reproducción e identificación de las mismas, si bien se advierte en *Diplodus annularis* una diferenciación intraespecífica, que no queda explicada por alguna de las características reseñadas.

De la simple comparación visual de los proteinogramas se puede observar un efecto de arrastre en la zona correspondiente a las proteínas de alto peso molecular, en la misma especie y en *Merluccius merluccius*, que parece va íntimamente ligado con el contenido en grasa del animal.

CUADRO II

CARACTERISTICAS DE LOS EJEMPLARES DE *DIPLODUS ANNULARIS* REFERENTES A TALLA, SEXO, ESTADIO SEXUAL, CONTENIDO ESTOMACAL Y GRASA

Ejemplares	Long. cm.	Peso gr.	Sexo	Estadio sexual	Contenido estomacal	Grasa
1	17	89	M	Maduración	Vacío	2
2	18	111	H	En desarrollo	Vacío	2
3	15	57	H	En desarrollo	1	1
4	14	54	M	Maduración	1	4
5	15	68	M	Maduración	2	4
6	13	40	H	Reposo	1	3
7	16	74	H	En desarrollo	2	2
8	16	78	H	En desarrollo	2	3
9	15	63	M	Reposo	3	3
10	17	82	M	En desarrollo	2	3
11	15	65	H	En desarrollo	1	2
12	16	72	M	Reposo	2	2
13	18	85	M	En desarrollo	1	2
14	16	67	M	Reposo	1	2
15	17	92	H	En desarrollo	2	2
16	14	60	H	Maduración	2	3
17	15	67	M	Reposo	2	2
18	15	63	M	Reposo	1	2
19	17	84	M	Reposo	1	1
20	15	64	M	En desarrollo	2	3
21	15	66	H	En desarrollo	2	2
22	17	83	M	Reposo	1	2
23	16	75	H	Reposo	2	2
24	18	108	H	Maduración	1	4
25	13	45	M	Reposo	1	3
26	14	52	M	Reposo	2	2
27	17	86	H	Reposo	1	2
28	14	65	M	Reposo	3	3
29	17	88	H	Maduración	2	3
30	17	83	H	Maduración	2	4
31	16	71	H	En desarrollo	2	2
32	15	66	H	Reposo	1	2
33	18	109	H	En desarrollo	1	2
34	13	36	M	Reposo	1	1
35	15	65	H	En desarrollo	2	2
36	17	93	M	Reposo	1	2
37	16	75	M	Reposo	2	2
38	16	79	H	En desarrollo	2	3
39	17	85	H	Reposo	1	2
40	14	61	H	Maduración	1	4
41	16	72	M	Reposo	1	2
42	17	80	M	Reposo	1	2

Contenido estomacal 1. Ligero contenido.
 2. Parcialmente lleno.
 3. Lleno.

Grasa 1. Sin grasa.
 2. Escasa cantidad.
 3. Apreciable cantidad.
 4. Mucha cantidad.

INFLUENCIA DE LOS METODOS DE CAPTURA Y DEL CONTENIDO DE OXIGENO DE LAS AGUAS EN LOS DESARROLLOS ELECTROFORETICOS

El hecho de que THURSTON (1967), en sus estudios sobre proteínas extraídas de *Salmo gairdneri*, apreciase modificaciones provocadas por el método de captura y por diferencias ambientales, hizo que realizásemos una serie de experiencias con ejemplares procedentes de acuario, a los que se les sometió a sobresaturación de oxígeno y que fueron posteriormente capturados con salabre.

En nuestras experiencias quedó demostrado, contrariamente a lo que expone el mencionado autor, que no se observan diferencias entre los ejemplares procedentes de lonja, capturados con trasmallo, y los que sacrificamos del acuario. En cambio, sí que nos mostramos coincidentes en no apreciar modificaciones motivadas por la mayor o menor concentración de oxígeno de las aguas.

INFLUENCIA DE LA ALIMENTACION EN LOS PROTEINOGRAMAS

Las mismas experiencias anteriores nos sirvieron para descartar la posible influencia de la alimentación en las modificaciones de los electroforegramas, ya que tanto los ejemplares procedentes del acuario, alimentados con jurel, sardina y anchoa, como los que provenían de su biótomo natural, nos dieron idénticos desarrollos electroforéticos.

INFLUENCIA DE LA CONSERVACION A BAJAS TEMPERATURAS EN LOS ELECTROFOREGRAMAS

Posteriormente, con otros ensayos realizados, pudimos comprobar, de forma análoga a TANIGUCHI (1969), como las muestras de proteínas musculares, cuyos ejemplares los habíamos mantenido a -10 grados centígrados por espacios de tiempo comprendidos entre uno y veinticinco días, se mantenían en perfecto estado de conservación. Esto nos permite la resolución del problema tecnológico de la identificación de especies, que, siguiendo el tratamiento adecuado para su conservación por el frío, son privadas de ciertas partes de su cuerpo, con lo que, desaparecidos los caracteres básicos de los ejemplares (caracteres taxonómicos), se hace difícil su clasificación incluso por personal especializado.

DEMOSTRACION ESTADISTICA DE LA BONDAD DEL PROCEDIMIENTO

Las experiencias así ordenadas nos han servido para confirmar como la diferenciación intraespecífica observada no es motivada por ningún carácter accidental. En este aspecto coincidimos con ROD-CHU (1968) y TSUYUKI et al

teres (1967), quienes aprecian en determinadas especies la aparición de un polimorfismo en ciertas proteínas, mientras que en otras especies los proteinogramas son muy uniformes y perfectamente reproducibles, tal como nosotros hemos encontrado.

Puesto que estas conclusiones se han fundamentado única y exclusivamente en los electroforegramas obtenidos, se hace necesario demostrar estadísticamente como los mismos se reproducen con exactitud en un número indeterminado de ejemplares, cuadro III.

CUADRO III
DIPLODUS ANNULARIS A

Distancias calculadas desde el origen Ejemplar número	Azul Brf.	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇
1	488	395	333	250	200	125	109	84
2	478	387	326	241	192	117	100	80
3	479	388	327	243	194	120	101	82
4	482	390	331	247	196	121	103	82
5	471	380	329	239	191	116	96	77
6	483	391	333	241	195	120	108	82
7	482	390	332	241	193	121	105	81
8	469	382	328	235	188	115	96	80
9	472	385	329	238	190	116	99	80
10	484	392	332	241	191	122	104	81
11	483	392	334	242	193	123	103	82
12	484	393	333	241	193	123	105	83
13	483	390	335	244	193	121	101	82
14	484	394	334	241	192	124	106	84
15	482	390	330	240	191	120	101	81

Así, si medimos las distancias recorridas por la banda de azul de bromofenol (tomada como referencia) y por todas y cada una de las fracciones proteicas obtenidas, medidas con un pie de rey y calculadas desde el origen hasta el límite distal de cada una de las bandas, nos daremos cuenta que ciertas fracciones tienen idéntica movilidad electroforética, y que la diferenciación interespecífica viene determinada por la presencia o ausencia de determinados grupos proteicos tal y como se puede apreciar en las figuras 3 y 4.

No obstante, y a pesar de cuanto llevamos expuesto, hemos creído conveniente calcular el valor medio de las distancias medidas, las desviaciones típicas de las mismas, las desviaciones típicas del valor medio y el intervalo de confianza para un 5 por 100.

De los datos programados y de los resultados obtenidos (cuadro IV), se llega a la conclusión que el método nos permite la reproducción de los electroforegramas si tenemos en cuenta las pequeñas desviaciones típicas halladas.

Si además comparamos las distintas desviaciones típicas de las medias, observaremos cómo los valores de la dispersión de las mismas son sumamente bajos, cosa que coadyuva a confirmar estadísticamente lo que por las figuras ya se intuía y mostraba.

Si, por otro lado, nos fijamos en los resultados hallados al calcular el intervalo de confianza para un riesgo de un 5 por 100, es decir $\pm 2,5$ los valores de la desviación típica, nos daremos cuenta que en la curva de Gauss trazada, estos datos se mueven dentro de unos límites sumamente estrechos, lo que prueba la bondad del método ensayado.

CUADRO IV
DIPLODUS ANNULARIS A

Longitud media hasta la línea azul de bromofenol, 480,133.
Desviación típica de la variable, 5,59974.
Desviación típica de la media, 1,44584.
Intervalo de confianza en la media para un riesgo del 5 por 100, 2,833.
BANDA NÚM. 1
Distancia media, 389,27001.
Desviación típica de la variable, 1,06241.
Desviación típica de la media, 0,27431.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,53765.
BANDA NÚM. 2
Distancia media, 331,08591.
Desviación típica de la variable, 1,93032.
Desviación típica de la media, 0,49840.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,97688.
BANDA NÚM. 3
Distancia media, 241,60109.
Desviación típica de la variable, 1,23225.
Desviación típica de la media, 0,31816.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,62360.
BANDA NÚM. 4
Distancia, media, 192,80150.
Desviación típica de la variable, 0,79959.
Desviación típica de la media, 0,20645.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,40464.
BANDA NÚM. 5
Distancia media, 120,25074.
Desviación típica de la variable, 0,48196.
Desviación típica de la media, 0,12444.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,24390.
BANDA NÚM. 6
Distancia media, 102,44251.
Desviación típica de la variable, 0,64065.
Desviación típica de la media, 0,16541.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,32421.
BANDA NÚM. 7
Distancia media, 81,39432.
Desviación típica de la variable, 0,20015.
Desviación típica de la media, 0,05167.
Intervalo de confianza para un riesgo del 5 por 100, 0,10129.

LA CARACTERIZACION DE POBLACIONES DE SARDINA PILCHARDUS (WALB) POR ELECTROFORESIS

Desde el punto de vista meramente biológico el problema de las poblaciones o razas de sardina ha sido estudiado por AHLSTROM (1960) BLACBURN (1960), JAGER (1960), MATEWS (1960), quienes han trabajado, respectivamente, en la sardina del Pacífico *Sardinops caerulea* (Girad); *Sardinops neopilchardus* y *Sardinops ocellata* (Pappe), los dos últimos investigadores.

En el caso de *Sardina pilchardus* (Walb), FAGE (1920) estableció, tomando como base la media vertebral, la existencia de cinco razas:

1. Raza de la Mancha.
2. Raza del Golfo de Vizcaya.
3. Raza Atlántica meridional.
4. Raza Mediterránea septentrional.
5. Raza Mediterránea meridional.

Por otro lado, FURNESTIN (1952) hizo un reagrupamiento, teniendo en cuenta el índice cefálico y revisando los módulos de la media vertebral, estableciendo las siguientes razas:

1. Raza Atlántica.
2. Raza Meridional o Ibérica.
3. Raza Marroquí.
4. Raza Sahariana.

Posteriormente ANDREU (1968), en su estudio sobre las branquispinas en la caracterización de poblaciones de *Sardina pilchardus*, llega a la conclusión de la existencia de dos poblaciones de la misma en la zona gallega, siendo las demás razas fisiológicas, típicas, consecuencia de la selección dirigida de mutaciones, en armonía con las condiciones ecológicas de las áreas colonizadas.

La aplicación de los procedimientos electroforéticos al estudio de poblaciones de peces ha ido alcanzando un amplio desarrollo en la última década y, de forma muy especial, en los años postreros.

La diversificación de métodos se fundamenta primordialmente en los medios de difusión empleados y los mismos van acompañados con una variedad en el material empleado. Así, mientras GUTIÉRREZ (1969) emplea el acetato de celulosa como medio de difusión y estudia las proteínas solubles del cristalino; TSUYUKI et alteres (1969), TSUYUKI y ROBERTS (1969) y UTTER (1969) utilizan el almidón hidrolizado y fundamentan sus trabajos en el polimorfismo de las transferrinas del suero y de la hemoglobina de la sangre; unos terceros, que efectúan sus desarrollos electroforéticos con geles de almidón y agar combinados, como BARON (1968), NAEVDAL (1969, 1970, 1970), DAG MØLLER (1969) y DAG MØLLER y G. NAEVDAL (1969), y, por último, TSUYUKI et alteres (1967), que utilizan la acrilamida en esta clase de estudios.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL EMPLEADO EN LA CARACTERIZACION DE POBLACIONES DE SARDINA PILCHARDUS (WALB)

En la exposición detallada, al hablar del procedimiento desarrollado para fraccionar las proteínas musculares solubles en agua, indicamos que la modificación de la velocidad de desplazamiento de las moléculas proteicas, a través de la acrilamida como medio de difusión, se podía variar si disminuíamos el tamaño de poro o si, por el contrario, aumentábamos la concentración de sacarosa de la muestra.

Las experiencias realizadas con polímeros de distinto tamaño de poro y con concentraciones de sacarosa crecientes, nos permitieron comprobar cómo los mejores resultados se obtenían aumentando la concentración citada hasta un 30 por 100, con lo que conseguíamos una disminución de la velocidad de desplazamiento de las moléculas proteicas, una mejor definición de fracciones y un mayor desdoblamiento de ciertas proteínas, particularmente las de menor movilidad electroforética.

La duración del proceso, que en un principio era de ochenta minutos, pasaba a ser, con esta modificación, de unos ciento treinta minutos, manteniendo el potencial a 125 V para conseguir una intensidad de 2,5 m. a. aproximadamente por tubo.

ESTUDIO DEL MATERIAL EMPLEADO EN NUESTRAS EXPERIENCIAS

Tal como hemos podido comprobar por el estudio bibliográfico anteriormente expuesto, el material empleado en este tipo de trabajo es variado, si bien se aprecia una mayor tendencia al uso del suero y de la hemoglobina. El estudio del polimorfismo de las transferrinas y hemoglobinas, que observan algunos investigadores, son la base y fundamento de las hipótesis genéticas desarrolladas para caracterizar las distintas poblaciones de peces.

La dificultad que representaba la obtención de una cantidad apreciable de suero en las debidas condiciones, hizo que nos inclinásemos por la utilización de las proteínas musculares solubles, para comprobar si en sus electroforegramas se apreciaban modificaciones en alguna fracción determinada, que nos permitiesen hallar diferenciaciones intraespecíficas.

El trabajo lo realizamos con 42 lotes de sardinas, procedentes de las regiones gallega y catalana, habiendo efectuado los estudios correspondientes a esta primera región en la sede del Instituto de Investigaciones Pesqueras de Vigo.

En nuestras observaciones tuvimos en cuenta la talla, el sexo y el estadio

sexual de los diversos ejemplares, por si los mismos podían tener alguna relación con las variaciones electroforéticas observadas, y en cada uno de los muestreos escogimos machos y hembras de la misma talla y estadio sexual, efectuando los desarrollos electroforéticos tomando la máximas precauciones, con el fin de evitar resultados anómalos que pudieran inducirnos a error. A este respecto tuvimos buen cuidado en obtener los geles de la misma forma, no obstante, lo cual efectuamos duplicados de las muestras estudiadas al objeto de eliminar algún posible defecto de polimerización.

Los electroforegramas así obtenidos se mostraron independientes de las características señaladas en los ejemplares y, en consecuencia, las fracciones proteicas que presentan polimorfismo deben considerarse como un carácter racial.

El estudio de los desarrollos electroforéticos de *Sardina pilchardus* (Walb) nos permite apreciar (fig. 5) las fracciones proteicas obtenidas y, en la misma, podemos observar un polimorfismo en las bandas 2, 2', 3 y 3'. En el proteinograma C se aprecia la ausencia de la banda 2, y en los A y B las fracciones 3' y 2' tienen distinta concentración y movilidad electroforética que los 3 y 2 de los mismos electroforegramas.

Puesto que los proteinogramas obtenidos con ejemplares de la región gallega muestran una diferenciación con los estudiados de la región catalana, vamos a establecer nuestras consideraciones y conclusiones ateniéndonos a la localización geográfica.

Así en la región gallega (fig. 5), se observa una clara diferenciación entre los dos proteinogramas, lo que nos indica la presencia de dos poblaciones bien definidas, cosa que coincide con el trabajo de ANDREU (1969) sobre el estudio de las branquispinas en la caracterización de poblaciones del mencionado clupeido. No obstante, si intentamos establecer una hipótesis genética para explicar los resultados obtenidos, nos encontramos que los dos alelos codominantes, representados en nuestro caso por las proteínas P_2 y P_3 darían lugar a los homocigotos $P_2 P_2$ y $P_3 P_3$ y al heterocigoto $P_2 P_3$ que son los responsables de los genotipos 22, 33 y 23, con lo cual teóricamente deben encontrarse tres poblaciones de sardina representadas por los fenotipos correspondientes.

En las experiencias realizadas hemos encontrado ejemplares representantes de dos de las poblaciones mencionadas, lo que nos hace suponer la existencia de una tercera que no está representada en nuestro muestreo.

Por lo que hace referencia a los estudios realizados en Cataluña, los resultados son todavía más complejos.

En el primer período de las experiencias siempre obtuvimos los resultados que se observan en la figura 5, electroforegramas A y los mismos se reproducían con exactitud, lo que era indicio de la existencia de una sola población. Este hecho era lógico y se explicaba fácilmente por la proximidad de

las zonas de captura de las muestras estudiadas. No obstante, en el segundo ciclo de las investigaciones observamos una variación de los electroforegramas y en esta ocasión se repitieron los desarrollos que se muestran en la figura 5, proteinograma B.

Se trata, por tanto, de dos genotipos distintos, homocigotos ambos, lo que induce a pensar en una posible migración de las poblaciones sin que aparezca un entrecruzamiento de las mismas, o al menos no lo hemos hallado en estas experiencias.

ESTUDIOS SOBRE LOS PROCESOS DE DEGRADACION DE LAS PROTEINAS MUSCULARES DE «MERLUCCIUS MERLUCCIUS»

La descomposición del pescado es un proceso muy complejo y los motivos que lo aceleran o retardan dependen de numerosos factores, entre los que se pueden citar, tal como indica STANSBY (1958 y 1963): su método de captura, manipulación, almacenaje, refrigeración, etc.

Desde el mismo momento en que el pez muere se inicia la desorganización de sus tejidos y los glúcidos, lípidos y proteínas sufren distintas reacciones de degradación autolítica. Estos procesos de degradación se completan con la acción bacteriana y conducen en las proteínas a la formación de sustancias volátiles del nitrógeno, como la trimetilamina, o a la presencia de productos de degradación como la histamina.

Son muy numerosos los trabajos sobre determinación del grado de frescura del pescado fundamentados en señalar un índice químico o bacteriológico que permita, en un momento determinado, establecer el estado de conservación del mismo. Este índice, tal como se ha podido comprobar, varía de forma considerable de una especie a otra. con lo que al no poderlos aplicar de forma generalizada debemos estudiarlos independientemente y concretarlos a una especie determinada.

Entre los índices químicos corrientemente utilizados se pueden citar el contenido en trimetilamina, el pH y la histamina. En este sentido, encontramos trabajos como el de SIMIDU e HIBIKI (1954), sobre la determinación del contenido de histamina en *Scomber scombrus*, y en el mismo se llega a la conclusión de que se produce en grandes cantidades al principio de la descomposición, cuando todavía no se ha hecho perceptible por los sentidos la alteración del pescado. Por el contrario, estos mismos investigadores y en idénticas condiciones, observan que en el género *Seriola* la cantidad de histamina determinada era escasísima si se la comparaba con la especie anterior.

Algo parecido se puede exponer sobre la determinación de la trimetilamina. Así, DYER y MOUNSEY (1945) llegan a la conclusión de que al ser un pro-

ducto de degradación química de los tejidos puede utilizarse como indicador de su estado de conservación.

Son, pues, tan múltiples y complejos los procesos de descomposición que no se puede especular sobre la bondad o inconvenientes que pueden presentar en el laboratorio, sin haberlos comprobado con suficientes datos analíticos.

METODO DESCRITO PARA COMPROBAR LA DEGRADACION DE LAS PROTEINAS MUSCULARES

Hasta el momento actual no se han desarrollado métodos sencillos que permitan dar una medida exacta del grado de alteración del pescado. No obstante, desde el punto de vista tecnológico, es sumamente interesante la consecución de un procedimiento rápido que nos resuelva el problema.

Parece lógico suponer que los proteinogramas utilizados para la identificación de especies por electroforesis sufran modificaciones que afecten no sólo al contenido proteico de las distintas fracciones, sino también de las diversas bandas.

Cuando iniciamos las experiencias descritas sobre identificación de especies pudimos observar cómo los extractos mantenidos a temperaturas inferiores a los -5°C se conservaban perfectamente durante períodos prolongados de tiempo. Ahora bien, si trabajábamos de forma continuada con los mismos y los sometíamos a congelaciones y descongelaciones repetidas, aparecía un precipitado que, al eliminarlo por filtración, hacía que los desarrollos electroforéticos resultantes sufriesen modificaciones apreciables.

Esto nos hizo suponer que algunas de las anomalías que presentaban los electroforegramas podían ser motivadas por procesos de descomposición enzimática o bacteriana de las proteínas y, en consecuencia, se hacía necesario realizar nuevas experiencias que nos permitieran comprobar y confirmar los resultados accidentalmente observados.

Los trabajos fueron realizados con proteínas musculares de *Merluccius merluccius*, y en las directrices de la investigación seguimos dos caminos diferentes.

El primero de los mismos consistió en hacer desarrollos electroforéticos de los extractos proteicos sometidos a un proceso acelerado de descomposición en una cámara de conservación a 15°C . Estas muestras las analizamos en perfecto estado de conservación, y con posterioridad a los dos, seis, ocho, quince y dieciocho días después de haberse efectuado la extracción.

La segunda parte de las experiencias las realizamos sobre la base de utilizar ejemplares distintos mantenidos en una cámara frigorífica a una temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

RESULTADOS

Tanto en el primer caso como en el segundo, los resultados alcanzados confirman la hipótesis prevista.

Los distintos desarrollos electroforéticos de las primeras investigaciones realizadas quedan expuestas en la figura 6, y en las mismas se puede comprobar una modificación cualitativa ostensible, particularmente en la zona correspondiente a las proteínas de menor movilidad electroforética, en donde se aprecia la total desaparición de las mismas. En este caso cabe suponer que se trata de las sustancias que encontrábamos precipitadas en el extracto proteico.

El estudio de las curvas densitométricas obtenidas con un aparato Vitratón con integrador incorporado, nos permitieron comprobar cómo los proteinogramas sufren constantes modificaciones no sólo de orden cualitativo, sino también cuantitativo. En efecto, las siete fracciones obtenidas cuando el pescado estaba en perfecto estado de conservación, se transformaban en ocho bandas a los dos días de haberse iniciado las experiencias. Posteriormente, este electroforegrama va sufriendo nuevas modificaciones, y al sexto día se aprecian en él seis bandas, que pasan a ser cuatro a los ocho días, manteniéndose constante este número hasta que dimos por finalizadas las experiencias.

CUADRO V
EXPRESION EN POR CIENTO DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS EN
LOS PROCESOS DE DEGRADACION CON INDICACION DE LOS DIAS QUE LA MUESTRA
FUE MANTENIDA A 15° C

Bandas	1	2	3	4	5	6	7	8
A los 2 días	21,3	9,8	18,9	19,9	5,4	2,8	4,4	17,5
A los 6 días	—	—	19,4	31,9	15,3	10,2	8,8	14,8
A los 8 días	—	—	—	—	62,7	7,6	9,0	20,7
A los 15 días	—	—	—	—	9,5	12,6	15,4	62,5
A los 18 días	—	—	—	—	2,4	21,7	21,7	65,1

El cálculo del porcentaje de las distintas proteínas fraccionadas nos permite demostrar cómo de forma paulatina van eliminándose las mismas, particularmente las de menor movilidad electroforética. Parece lógico que así suceda debido a la formación de aminas volátiles y de compuestos de precipitación.

La segunda parte de estas experiencias las realizamos con distintos ejemplares mantenidos en cámara frigorífica a 4 °C. En la preparación y toma de muestras, así como en la obtención de los proteinogramas, hemos seguido el procedimiento descrito anteriormente.

Los resultados conseguidos, si bien no son tan espectaculares como los logrados con los extractos proteicos mantenidos a 15 °C, sirven para comprobar cómo los electroforegramas sufren apreciables modificaciones que pueden ser un índice del estado de conservación del pescado.

IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES SOLUBLES EN MUSCULO DE «MERLUCCIUS MERLUCCIUS»

Los métodos para la caracterización química de las proteínas fraccionadas tras un proceso de electroforesis con agar, almidón o acetato de celulosa, son los mismos que se requieren para estudios histoquímicos, es decir, el producto de la reacción debe ser insoluble para que puedan localizarse con precisión los distintos componentes. Estos pueden, entonces, ser caracterizados por su afinidad con ciertos colorantes.

Además de la identificación por tinción existen una serie de técnicas complementarias que constituyen una ayuda inestimable en la posible resolución del problema. Así, la movilidad electroforética de las fracciones, la determinación del peso molecular de las mismas, la precipitación con sales inorgánicas como el sulfato amónico, la elución de las diversas fracciones y su análisis posterior, son procedimientos que nos pueden ayudar a identificar o al menos homologar las distintas bandas separadas.

ELIMINACION DE LA FRACCION DE MENOR MOVILIDAD ELECTROFORETICA

Cuando describíamos la forma de obtener el extracto proteico, hicimos hincapié en la necesidad de congelar la muestra para eliminar, en lo posible, la emulsión de lípidos formada. Este hecho, que posteriormente comprobamos realizan otros investigadores, nos permitió mejorar la calidad de los distintos proteinogramas. No obstante, en distintos ejemplares de *Diplodus annularis*, *Sardina pilchardus*, *Pagellus acarne* y *Merluccius merluccius*, observamos un efecto de arrastre en las proteínas de menor movilidad electroforética, apreciándose una fracción que desaparecía de los electroforegramas, por precipitación, si sometíamos las muestras a congelaciones y descongelaciones sucesivas. La aparición del precipitado que eliminábamos por filtración coincidía con la desaparición de la fracción antes mencionada, lo que nos hizo sospechar se trataba de compuestos que contienen en su molécula lípidos.

En estas circunstancias hicimos un tratamiento previo de la carne con

butanol, y posteriormente procedimos a la extracción de las proteínas musculares solubles. Con este procedimiento eliminamos la fracción mencionada, al tiempo que conseguimos una mayor nitidez en los proteinogramas.

IDENTIFICACION DE LA FRACCION SOLUBLE EN BUTANOL DE «MERLUCCIUS MERLUCCIUS»

Para identificar la fracción soluble en butanol realizamos, por un lado, un estudio cromatográfico del extracto obtenido y, por otro, eluímos en el mencionado disolvente la parte del cilindro que contenía la fracción problema objeto de identificación.

El procedimiento seguido en ambos casos es el mismo, y en esencia consistió en concentrar el extracto soluble en butanol en un rotovapor y con el residuo resultante efectuar una hidrólisis ácida para degradar las proteínas hasta aminoácidos.

Realizada esta operación extrajimos la grasa con hexano, con lo que teníamos dos fracciones: una, la primera, que contenía los aminoácidos, y la segunda con las grasas.

La determinación de aminoácidos la efectuamos con el analizador automático UNICHROM, de la casa Beckman, y con el mismo identificamos: Cisteína, ácido aspártico, treonina, serina, glutámico, prolina, glicina, alanina, cistina, valina, isoleucina, tirosina y fenilalanina. Además de los mencionados se aprecia una fracción, que se presenta en cantidad muy apreciable, y que aparece después de la cisteína, que no identificamos por carecer de solución patrón.

Por lo que hace referencia a los aminoácidos básicos hallamos: Lisina, histidina, grandes cantidades de amoníaco y leves indicios de arginina, apareciendo dos fracciones más que no identificamos por el mismo motivo anteriormente expuesto.

El estudio cromatográfico realizado con los ésteres metílicos de los ácidos grasos nos permitió comprobar la existencia de pequeñas cantidades del éster metílico de diez átomos de carbono y cantidades más apreciables de los ésteres de 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono. Asimismo, apreciamos la existencia de dos fracciones que no identificamos por carecer de los correspondientes patrones.

Con los ésteres obtenidos procedentes de la fracción eluida del cilindro de acrilamida nos ocurrió una cosa análoga, por lo que sólo podemos indicar su existencia.

Estos resultados vienen a confirmar que la fracción de menor movilidad electroforética en *Merluccius merluccius* está constituida por compuestos que contienen en su molécula lípidos.

IDENTIFICACION U HOMOLOGACION DE OTRAS FRACCIONES EN LOS PROTEINOGRAMAS DE «MERLUCCIUS MERLUCCIUS»

Para aislar las proteínas de las soluciones acuosas, un procedimiento que se ha usado profusamente consiste en efectuar su precipitación añadiéndole una cantidad adecuada de una sal inorgánica. Entre estas sales, una de las utilizadas más corrientemente es el sulfato amónico.

El procedimiento que empleamos consistió en la precipitación de las proteínas con concentraciones que iban desde 1,39 mols/l. a 2,80 mols/l. de sulfato amónico. Una vez efectuada la precipitación, centrifugamos y con el extracto proteico resultante, después de dializar, efectuamos los correspondientes desarrollos electroforéticos.

Eliminada la fracción soluble en butanol, con el procedimiento descrito, se consiguió precipitar un grupo de proteínas que presentan una movilidad electroforética análoga, en idénticas circunstancias, que las betaglobulinas, y se separan añadiendo 1,69 mols/l. de sulfato amónico.

Añadiendo 2,80 mols/l. de la misma sal inorgánica, logramos eliminar una fracción que presenta una movilidad electroforética mayor que las albúminas y muy parecida a las prealbúminas.

Resumiendo, podemos decir que en *Merluccius merluccius* existe una fracción soluble en butanol que contiene lípidos y dos bandas que precipitan con sulfato amónico de forma análoga a las beta globulinas y a las prealbúminas, presentando una movilidad electroforética parecida.

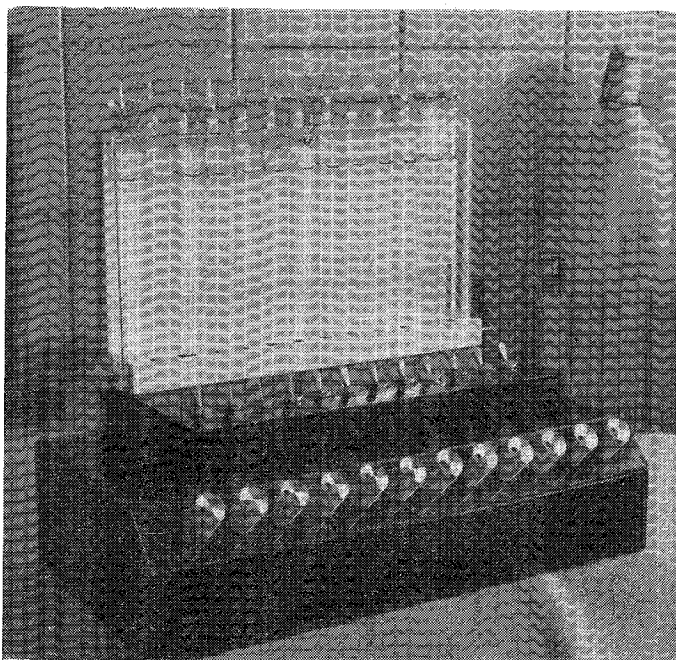


FIGURA 1.—*Aparato de electroforesis patentado utilizado para la obtención de los proteinogramas.*

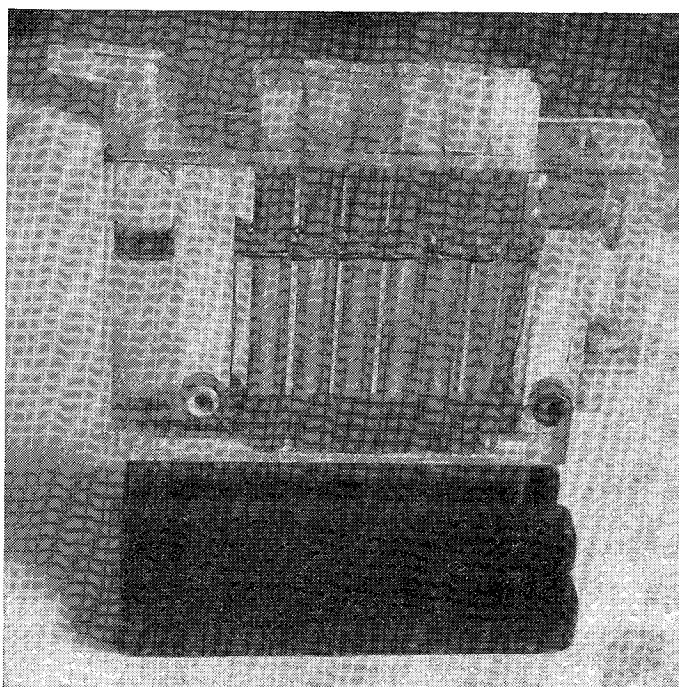


FIGURA 2.—*Aparato de desteñido.*

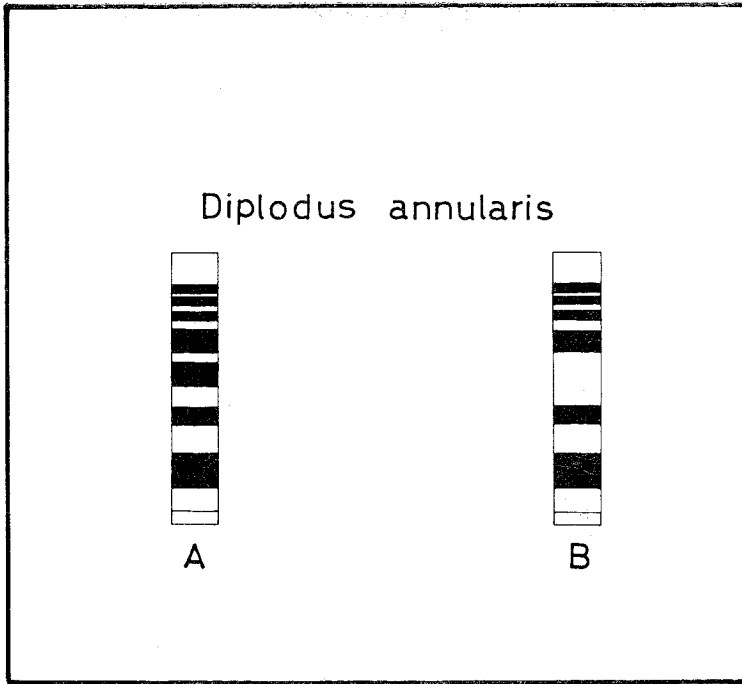


FIGURA 3.—Desarrollos electroforéticos obtenidos con los extractos de proteínas musculares solubles de *Diplodus annularis*.

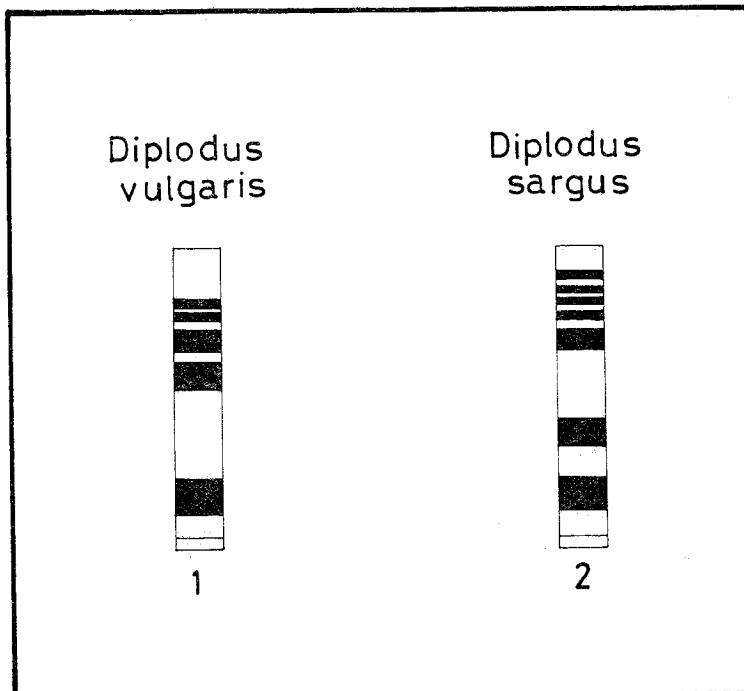


FIGURA 4.—Electroforegramas obtenidos con: 1, *Diplodus vulgaris*; 2, *Diplodus sargus*.

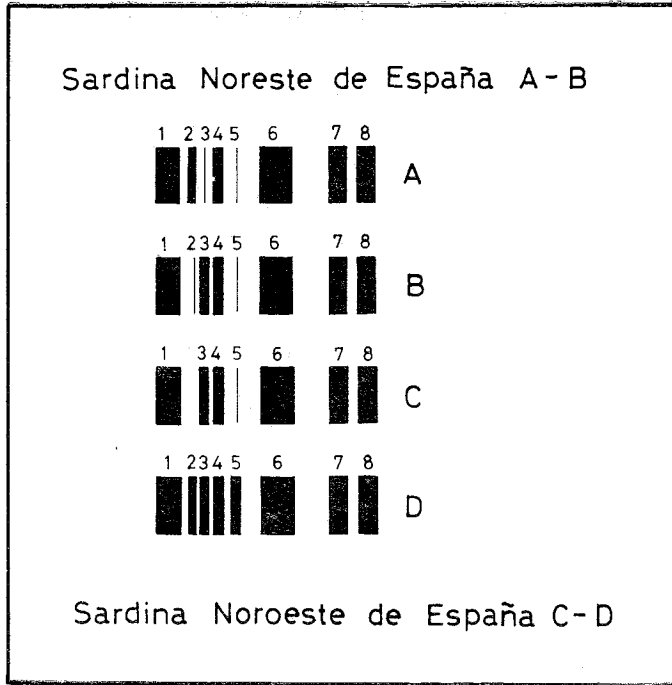


FIGURA 5.—*Proteinogramas de Sardina pilchardus (Walb).*

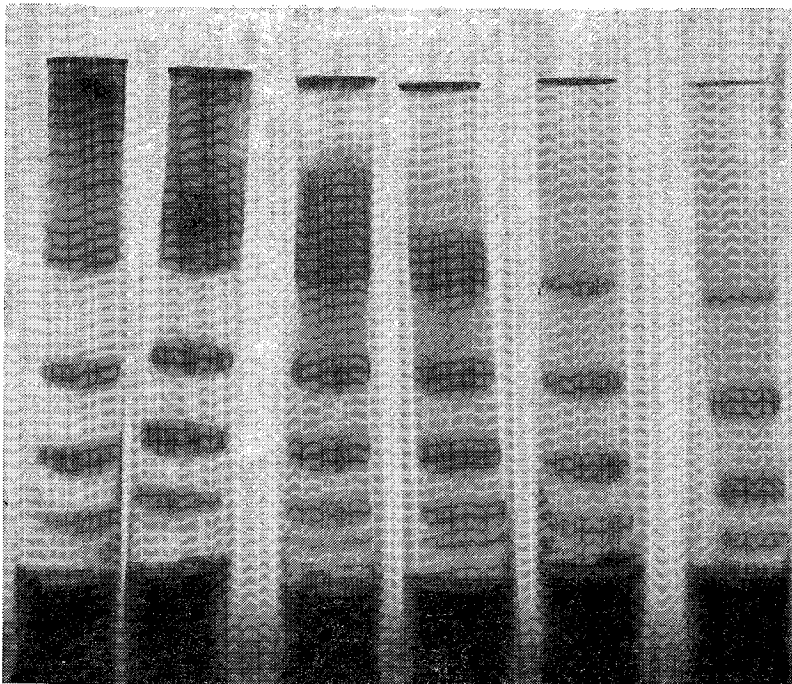


FIGURA 6.—*Electroforegramas de Merluccius merluccius en distintos estados de descomposición.*