

Determinación Electroforetica del Patron Proteico de Tres Poblaciones del Caracol Rosado, *Strombus gigas*, en las Costas de Quintana Roo y el Uso de un Software de Imágenes para su Analisis

JORGE ARTURO TELLO CETINA y LUIS ALFONSO RODRÍGUEZ GIL

Instituto Tecnológico de Mérida
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Av. Tecnológico S/N. AP 9-11
Mérida, Yucatán. México

RESUMEN

La determinación del proteinograma de muestras de músculo de caracol rosado, *Strombus gigas*, obtenidas en Isla Mujeres, Punta Allen, y Banco Chinchorro en la zona norte, centro y sur del estado de Quintana Roo, se realizó por medio de la técnica de electroforesis en geles de acrilamida (PAGE) al 10 % en medio disociante (SDS) con el propósito de establecer la posible diferenciación y separación geográfica de poblaciones del molusco.

El análisis visual de los proteinogramas presentó similitud en el número de fracciones proteicas para los sitios de Punta Allen e Isla Mujeres y diferencias entre estos sitios y Banco Chinchorro, sin embargo al someter los proteinogramas al análisis digital del programa de PROANA, se estableció la diferencia entre machos y hembras, determinándose 12 fracciones para los machos y 13 fracciones para las hembras en Punta Allen e Isla Mujeres y de 15 y 16 fracciones para machos y hembras en Banco Chinchorro.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten establecer lo valioso del software PROANA como herramienta para el análisis digital de las fracciones proteicas reveladas en los proteinogramas obtenidos electroforeticamente que en forma visual no pueden ser detectadas, además de reducir los costos y tiempos de trabajo en el análisis.

La posible separación geográfica de las poblaciones del molusco en el caribe mexicano, con las reservas que el método utilizado presenta, se puede considerar en función de los resultados aquí obtenidos.

PALABRAS CLAVE: *Strombus gigas*, SDS, electroforesis, análisis de imágenes

ABSTRACT

The determination of the proteinogram of samples of muscle of the pink snail, *Strombus gigas*, obtained in Isla Mujeres, Punta Allen and Banco Chinchorro in the north area, center and south of Quintana Roo's state, was carried out by means of the electrophoresis technique in acrylamide gels (PAGE)

to 10% between disociante (SDS) with the purpose of establishing the possible geographical differentiation between populations.

The visual analysis of the proteinograms indicated similarity in the number of proteins fraction for samples taken from Punta Allen and Isla Mujeres and differences between these places and Banco Chinchorro. However, when the proteinograms were subjected to digital analysis (PROANA), the difference settled down among males and female was determined 12 fractions for the males and 13 fractions for the females in Punta Allen and Isla Mujeres and of 15 and 16 fractions for males and females in Banco Chinchorro.

The results of this work provide an evaluation of the efficacy of computer software(PROANA) as a tool for digital analysis of protein fractions revealed in proteinograms that cannot be detected visually, besides reducing the costs and times of work in the analysis.

The possible geographical separation of the populations of *Strombus gigas* in the Mexican Caribbean, with the reservations that the used method presents, should be considered in the interpretation of the results reported in this study.

KEYWORDS: *Strombus gigas*, SDS, electroforesis, image analysis

INTRODUCCION

Estudios poblacionales de especies marinas comercialmente importantes son de interés teórico para los biólogos y de valor práctico para los manejadores de pesquerías, sin embargo, la estructura poblacional está influenciada por el concepto mismo de población, ya que en un sentido amplio una población puede ser definida desde una perspectiva biológica la cual implica algún nivel de aislamiento reproductivo, o bien desde la perspectiva pesquera a la cual le concierne una descripción práctica de un grupo de organismos explotados en un área específica, siendo en cualquier caso el nivel y número de distinciones de la (s) población (es) de interés primario (Kinsey et al. 1994).

El problema se agudiza cuando se tiene como característica de los organismos que componen a la población el desplazamiento de estos en alguna etapa de su vida por medios totalmente independientes, caso de organismos que poseen una fase planctónica, en su dispersión y desplazamiento se rigen por el tiempo de permanencia en la columna de agua y del sistema de corrientes que priven en el área de influencia de su desarrollo (Ayre et al. 1995).

Strombus gigas, caracol marino ampliamente distribuido en el área del caribe, es de importancia capital para los pescadores del área al sustentar estos su economía en la captura de este molusco. A raíz del intenso esfuerzo de pesca a la que esta sometido este recurso, diversas medidas de manejo se han implementado con el propósito de restringir su explotación, así como su eventual desaparición de la zona del caribe mexicano, estas medidas, empíricas la mayoría de las veces,

no se sustentan en parámetros válidos propiciando con ello ambigüedades en los datos de captura y en la aplicación de las medidas de manejo.

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, como una herramienta de separación, nos permite establecer la diferencia entre los patrones electroforéticos de proteínas entre especies y/o poblaciones para establecer una huella de cada una. No obstante, los resultados obtenidos en los proteinogramas la mayoría de las veces suelen tender a propiciar confusión en su interpretación debido al traslape de las fracciones o bien al elevado número de fracciones presentes. Mediante la digitalización de imágenes estos problemas se han podido minimizar permitiendo al investigador contar con un elemento con el que se obtenga una mejor resolución y definición de las fracciones proteicas reveladas, además de facilitar el trabajo de análisis de las mismas (Gordillo et al. 1992).

El objetivo de este trabajo fue establecer la posible separación geográfica de poblaciones del caracol rosado *Strombus gigas* en tres sitios de captura en las costas de Quintana Roo, utilizando la técnica de electroforesis en medio disociante, SDS, (Corzo et al. 1984) y la utilización de un software de análisis de imágenes para el estudio de las fracciones proteicas reveladas por medios de digitalización de imágenes como un argumento de apoyo para la implementación y aplicación de medidas de manejo de este recurso marino.

METODOLOGIA

La colecta de los organismos se realizó en tres sitios en las costas del estado de Quintana Roo, elegidos por ser considerados zonas tradicionales de captura de *Strombus gigas*; Zona norte, Isla Mujeres; Zona centro, Punta Allen y Banco Chinchorro en la zona sur.

Por medio de buceo se obtuvieron 50 organismos, de todas las tallas, en cada sitio de colecta con ayuda de pescadores de las zonas y previa autorización de la SEMARNAP. El método de captura se hace necesario utilizarlo debido a que los organismos en algunos casos se encuentran a profundidades de 40 metros.

Aproximadamente 1 g de músculo, se utilizó para la extracción de proteínas en un buffer conteniendo Tris-HCl 0.1 M y pH 6.8, SDS al 10 %, Azul de Bromofenol al 1 % y 2- Mercaptoetanol al 5 %.

Geles de poliacrilamida homogéneos al 10 % en medio disociante, SDS, fueron corridos en una cámara de electroforesis vertical (Laemmli, 1970), colocada en un refrigerador a 4 °C, utilizando el buffer Tris - Glicina - SDS 0.5 M con pH 8 y 150 V durante 4 horas. Terminado el corrido el gel fue lavado y fijado en metanol al 30 % y teñido con azul de Coomassie al 0.5 % durante toda la noche. Se utilizó un software de análisis de imágenes denominado "PROANA", para elaborar el histograma de frecuencias de las fracciones reveladas con el objetivo de corroborar si el número de fracciones establecidas y determinadas visualmente coincidían con el número determinado por el software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la naturaleza prácticamente todas las especies de animales y plantas existen como un mayor o menor numero de poblaciones completa o parcialmente aisladas, propiciando con ello la aparición de subespecies geográficas y subgrupos menores.

La identificación morfológica de estas poblaciones muchas veces no satisface los requerimientos establecidos ni muchos menos arrojan resultados confiables, por lo que se convierte esto en un gran problema de sistemática en primera instancia y de manejo en segundo lugar.

Con la implementación de la electroforesis en la época de los cincuentas, su aplicación en la determinación de biomoléculas y la relación de estas con el aspecto genético de los organismos se pudo establecer la identificación de especies cercanas de organismos y mejorar los resultados taxonómicos anteriormente obtenidos (McAndrew and Majumdar 1983).

Los resultados obtenidos al determinar y cuantificar el proteinograma de diferentes organismos se mejoraron cuando se utilizó el agente disociante SDS como un elemento de separación de las diferentes fracciones o subunidades que componen a una proteína (Weber y Osborn 1967) y permitió asimismo la determinación del peso molecular de las mismas (Kukatla 1996) al considerar que el tamaño efectivo de las proteínas era directamente proporcional a la carga proporcionada por la cantidad de SDS utilizado en recubrir a la proteína para su posterior separación (Rybiki and Purves 1998).

El análisis visual del proteinograma estimo un numero idéntico de fracciones para todas las muestras en cada uno de los sitios analizados, sin embargo al analizar la imagen del proteinograma con el programa PROANA, se pudo establecer que existían diferencias en el número de fracciones en cada sitios y entre los sitios, (Tabla 1) específicamente en lo referente a machos y hembras.

Tabla 1. Número de fracciones proteicas determinadas en músculo de *Strombus gigas* en tres sitios del Caribe Mexicano

Sitio	Numero de Fracciones	
	Machos	Hembras
Isla Mujeres	12	13
Punta Allen	12	13
Banco Chinchorro	15	16

En todos los proteinogramas analizados digitalmente se pudo establecer la presencia de una fracción de más en las columnas correspondientes a las muestras de hembras.

Proceedings of the 52nd Gulf and Caribbean Fisheries Institute

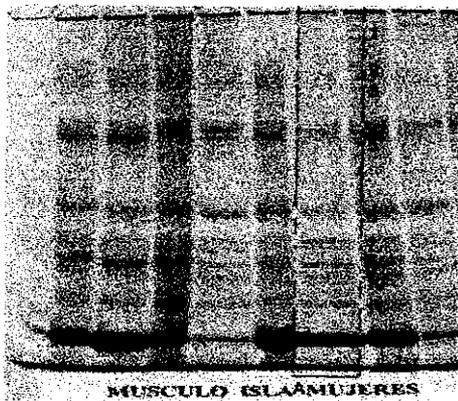
En las imágenes obtenidas de las muestras de Punta Allen e Isla Mujeres se observa la presencia de 12 (Figura 1a y c) y de 13 fracciones (Figura 1b y d), respectivamente.



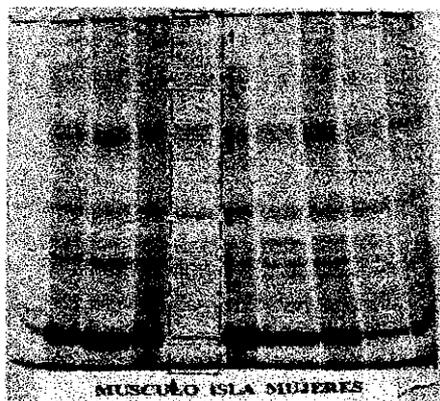
a.-



b.-



c.-



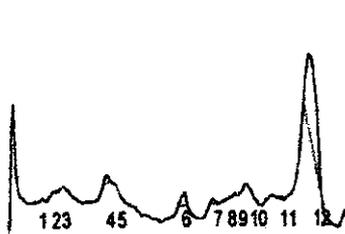
d.-

Figura 1. Imágenes de proteinogramas. A- Muestras Allen machos 12; B. Muestras Allen hembras 13; C. - Muestras Isla machos 12; D. - Muestras Isla hembras 13.

Al analizar los polígonos de densidad obtenidos del análisis digital de las imágenes (Figura 2, a - d), se determinó la presencia de 1 fracción de más en las muestras correspondientes a las hembras.

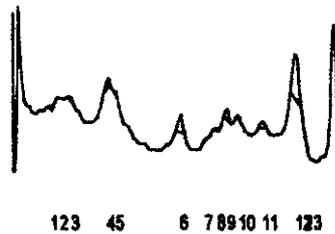
ANÁLISIS DE DENSIDAD.

ANÁLISIS DE DENSIDAD.



ANÁLISIS DE LA COLUMNA: A

a.-

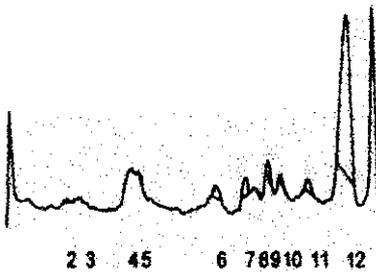


ANÁLISIS DE LA COLUMNA: A

b.-

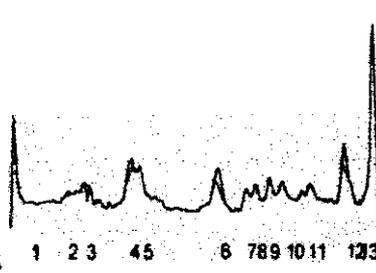
ANÁLISIS DE DENSIDAD

ANÁLISIS DENSIDAD.



ANÁLISIS DE LA COLUMNA: A

c.-



ANÁLISIS DE COLUMNA:

d.-

Figura 2. Polígonos de densidad. A. - Muestras Allen machos 12; B. - Muestras Allen hembras 13; C. - Muestras Isla machos 12; D. - Muestras isla hembras 13.

El mismo problema detectado en los sitios de Allen e Isla se presentó en Banco Chinchorro, ya que los proteinogramas (Figura 3, a - b) señalaron la presencia de 15 fracciones, pero al editar la imagen del análisis de densidad se pudo establecer la presencia de 16 fracciones en las muestras correspondientes a las embras (Figura 4, a - b).

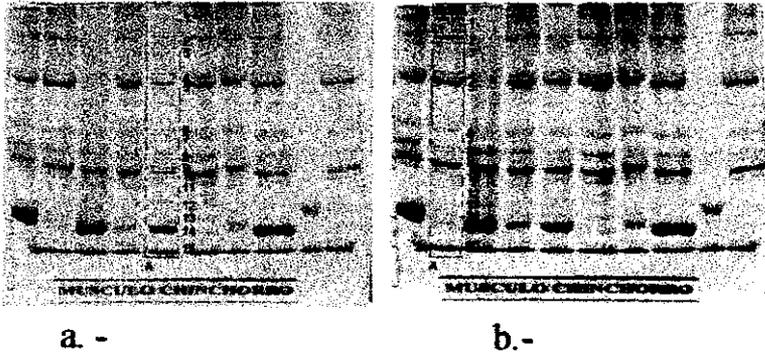
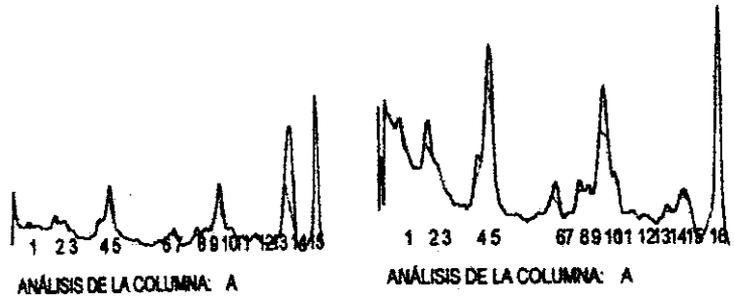


Figura 3. Imagen de proteinogramas. A. - Muestras Chinchorro machos 15; b. - Muestras Chinchorro hembras 16.

La determinación de las fracciones reveladas en los sitios muestreados y el análisis digital de los mismos, nos permite establecer que existen diferencias entre los organismos de cada localidad, específicamente entre machos y hembras; similitud en el número de fracciones en las localidades de Punta Allen e Isla Mujeres y diferencias entre estas localidades y la de Banco Chinchorro, lo que nos permite establecer la posible diferenciación geográfica de los caracoles de estos sitios y cuyo resultado debería de ser tomado en cuenta al efectuar las estadísticas de captura de *Strombus gigas* en las costas del caribe mexicano, con las precauciones pertinentes que amerita el obtener más datos que resulten al emitir algún tipo de conclusión referente a esta posible separación y diferenciación geográfica, y que permita con ello tener un adecuado conocimiento del estado actual de la pesquería del caracol rosado y la aplicación de medidas de manejo acordes a su realidad.

ANÁLISIS DE DENSIDAD.

ANÁLISIS DE DENSIDAD.



a.-

b.-

Figura 4. Polígonos de densidad. a. - Muestras Chinchorro machos 15; b. - Muestras Chinchorro hembras 16

Tradicionalmente el análisis de los proteinogramas revelados electroforéticamente se efectuaba en forma visual y era bastante tedioso y tardado no estando exento de resultados erróneos en el conteo y medición de las movilidades relativas de las fracciones reveladas, para tratar de remediar estos problemas diversos programas de análisis digital fueron desarrollados, como el UN-SCAN_IT, el ONE_DSCAN, el ZERO_DSCAN, etc., (González 1996) sin embargo los costos de ellos son elevados, alrededor de 5,000 DLS, lo cual los hacen difíciles de obtener, además de presentar características que restringen el análisis de los proteinogramas y su poca compatibilidad con otros programas que en forma conjunta redundarían en elevar la resolución y manejo de los resultados.

El software utilizado en este trabajo fue elaborado para el reconocimiento y medición de fracciones proteicas obtenidas electroforéticamente, esta desarrollado en lenguaje C++ en el compilador Visual C++ de Microsoft versión 5.0 y es capaz de proporcionar una interfase de usuario en ambiente Windows con herramientas del sistema operativo que facilitan su manejo y enlace con otros programas del ambiente (Myler and Weeks 1993).

Las imágenes pueden ser abiertas en diversos formatos lo cual permite la manipulación de caracteres de brillo, contraste, ecualización y filtrado que mejoran y aumentan la visualización y resolución de las fracciones reveladas

Proceedings of the 52nd Gulf and Caribbean Fisheries Institute

electroforeticamente. Estas características crean un polígono de frecuencias de la composición proteica de la imagen, el cual mediante el manejo y aplicación de los diversos controles contenidos en el programa nos permite discernir, discriminar o considerar la presencia de fracciones que el investigador en forma visual no puede distinguir.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir:

Al nivel de presencia de fracciones proteicas existe diferencia entre las poblaciones de Isla Mujeres y Punta Allen con la de Banco Chinchorro.

El programa PROANA, resultó ser una herramienta valiosa para el análisis de las imágenes obtenidas de los proteinogramas obtenidos electroforeticamente, al permitirnos manipular las imágenes nos da la pauta para establecer la presencia de fracciones proteicas que en forma visual no es posible detectar, reduce los tiempos de análisis y nos permite obtener resultados confiables cuya aplicación sería en forma más realista y benéfica para quien así lo requiera.

El considerar en base a los resultados aquí obtenidos el manejar con cuidado el acopio de datos de captura del caracol rosado y de ello la emisión de estadísticas que repercutan en la implementación de medidas de manejo del organismo que tiendan a sustentar su explotación en forma controlada.

LITERATURA CITADA

- Ayre, D.J.; J. Read, and J. Wishart. 1991. Genetic subdivision within the eastern australian population of the sea anemone. *Actinia tenebrosa*. *Marine Biology* 109:379-390.
- Corzo, J., J.M. Cunas, and E. Meléndez 1984. Fish species identification by electrophoresis of muscle protein in SDS containing polyacrylamide slabs gels. *Electrophoresis* 8:(4).
- González, R. R y R. Woods. 1996. *Tratamiento Digital de Imágenes*. Addison Wesley. USA. 189 pp.
- Gordillo, M. J. L., J. M. Sosa and P. Wiederhold. 1992. Análisis de Imágenes y Reconocimiento de Patrones. Depto. Ing. Eléctrica. CINVESTAV. 1-23.
- Kinsey, S. T., T. Orsoy, T. M. Bert and B. Mahmoud. 1994. Population structure of the spanish sardine, *Sardinella aurita*, natural morphological variation in a genetically homogeneous population. *Marine Biology* 118:309-317.
- Kukatla R. 1996. Electrophoretic separation of proteins one dimensional SDS - PAGE electrophoresis. Department of Biology. Atlanta University. 5 pp.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 nature. London 227:680-685.
- McAndrew, B.J. and C J. Majumdar. 1983. Tilapia stock identification using

- electrophoretic markers. *Aquaculture* **30**:249-261.
- Miller, H.R. and A.R. Weeks 1993. *The pocket handbook of imaging processing algorithms in C ++*. Prentice Hall. New York. USA: 95 pp.
- Rybiki, E. and M. Purves 1998. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). Dept. Microbiology University of Cape Town. USA. 1(5).
- Weber, K. and M. Osborn 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* **244**:16.