

# Electroforesis de proteínas en los batracios andinos

(*Telmatobius Culeus* y *Bufo Spinolosus Spinolosus*)

C. Mario Galarza Guzmán

Instituto Boliviano de Biología de Altura - Dpto. de Bioquímica

## SUMMARY

*In different developmental stages, hemoglobins and serum proteins of the amphibians Telmatobius culeus and Bufo Spinolosus Spinolosus were studied. In both species the suppression of the hemoglobin biosynthesis is different. Unlike in other species, in Bufo Spinolosus Spinolosus as well as Telmatobius culeus, we found an adult hemoglobin in the larval period. The number of serum proteins varies between species. This change occurs more regularly in Bufo Spinolosus Spinolosus.*

*Albumin increases in accordance with the metamorphose. Immunoelectrophoresis shows four immunoglobulins in the Telmatobius and two immunoglobulins in the Bufo Spinolosus. The two species are immunoelectrophoretically identical in five proteins.*

## RESUMEN

En diversos estados de desarrollo se estudiaron hemoglobinas y proteínas séricas en los batracios: *Telmatobius culeus* y *Bufo Spinolosus Spinolosus*. La supresión de la biosíntesis de Hbs es diferente en ambas especies. A diferencia de otras especies tanto en el *Bufo Spinolosus Spinolosus* y *Telmatobius culeus*, encontramos una Hb adulta en el periodo larvario.

El número de proteínas séricas varía de una especie a otra, este cambio es más regular en el *Bufo Spinolosus Spinolosus*.

La albúmina se incrementa conforme transcurre la metamorfosis.

La inmunoelectroforesis, revela en la especie *Telmatobius*, cuatro inmunoglobulinas, en la especie *Bufo Spinolosus*, dos inmunoglobulinas.

Las dos especies estudiadas son idénticas inmunoelectroforéticamente en cinco proteínas.

## INTRODUCCION

En las altas regiones de Bolivia se desarrollan 5 géneros de batracios: *Bufo*, *Telmatobius*, *Batrachophrynus*, *Pleuroderma* y *Gastrotheca*, todos muestran un elevado grado de especialización para la vida en las grandes alturas.

Tres factores principales han acondicionado la vida de los batracios a las grandes alturas: la sequedad del aire, disminución de la presión atmosférica y el frío; para resistir a estos factores adversos buscaron sitios húmedos y en algunos casos se ubicaron en los grandes lagos de la altura para llevar una vida exclusivamente acuática, como es el caso de la especie *Telmatobius culeus*, abundantemente distribuida junto a otras especies en el lago Titicaca, Vellard J. (1951). Por ser una rana muy poco

estudiada, por su habitat en grandes alturas, por su morfología tan particular, nuestro mayor interés se ha volcado en el estudio de esta especie que a diferencia de otras especies, mantiene su actividad sexual durante todo el año. Los oocytos de esta especie alcanzan 2.5 mm de diámetro promedio, el hemisferio animal es negro, y blanco el hemisferio vegetativo, el número de oocytos fluctua de un ejemplar a otro de 800 a 1,800 (observación del autor).

El estudio de las proteínas séricas y hemoglobinas en diferentes etapas de desarrollo de los batracios, ha sido encarado por muchos autores: Guttman (1972) y Dessauer (1964) realizaron análisis electroforéticos a fin de dilucidar la afinidad filogenética de los anuros. Frieden (1957) y Herner (1960) por electroforesis en papel demostraron un incremento de albúmina de 2 a 10 o/o en la etapa temprana de la metamorfosis y 45 o/o de

albúmina en el estado adulto. Lauren (1964) por electroforesis en papel estudió las proteínas de sangre en las especies, *Bufo Americanos* y *Bufo Woodhousei*, reportaron en ambas especies, 7 proteínas y una banda de hemoglobina. Chen (1970) usando el método del disco electroforético investigó los cambios de proteínas séricas durante el curso de desarrollo de las extremidades posteriores y regresión de la cola de la rana temporaria y *Bufo bufo* y solo pudo encontrar una concentración de albúmina de 15 a 25 o/o. Sin embargo los cambios de proteínas que más llaman la atención sin duda son los cambios a nivel de hemoglobinas. La existencia de hemoglobinas larvianas de migración rápida y lenta, el surgimiento de hemoglobinas adultas en la etapa postmetamórfica o la aparición de estas hemoglobinas durante el clímax de la metamorfosis, fueron reportados por Callegarini C. y Col (1971); Baglioni y Col (1963) Moss B. y Col (1968); Hamada y Col (1976); Michelle M. y Col (1972); Galarza M. (1979).

### INDICES Y CARACTERES MORFOLOGICOS CONSIDERADOS EN ESTE ESTUDIO

CUADRO No. I

#### ESPECIE TELMATOBIUSCULEUS

	PERIODO LARVARIO ESTADO U	PERIODO LARVARIO ESTADO V	PREMETAMORFOSIS	METAMORFOSIS	ADULTO
LARGO TOTAL CM	7.12 ± 0.77	7.52 ± 0.7	7 ± 1.4	7.16 ± 0.75	26 ± 7.2
LONGITUD DE LA COLA CM	3.62 ± 1.08	4.25 ± 0.87	3.5 ± 1	3.56 ± 1.09	
EXTREMIDADES POSTERIORES MM	—	1.62 ± 0.94	2.7 ± 0.36	Desarrolladas	
EXTREMIDADES ANTERIORES MM	—	—	0.9 ± 0.44	Desarrolladas	
PESO G					166. ± 9

CUADRO No. II

#### ESPECIE BUFO SPINOLOSUS

	PERIODO LARVARIO ESTADO U	PERIODO LARVARIO ESTADO V	PREMETAMORFOSIS	METAMORFOSIS
LARGO TOTAL CM	6.8 ± 2	7.1 ± 1.2	7 ± 0.70	6.3 ± 0.35
LONGITUD DE LA COLA CM	4.5 ± 1.5	5 ± 2	4.6 ± 1.8	5.2 ± 0.6
EXTREMIDADES POSTERIORES	—	1 ± 0.21	2 ± 0.15	Desarrolladas
EXTREMIDADES ANTERIORES	—	—	0.8 ± 0.22	Desarrolladas

## MATERIAL Y METODOS

Corresponde a 40 ejemplares de la especie *telmatobius* y 40 ejemplares de la especie *Bufo spinolosus spinolosus*. Las primeras especies fueron capturadas en el lago Titicaca (3810 m.s.n.m) y las segundas en la laguna de Achocalla (3300 m.s.n.m) y en el jardín Botánico de la ciudad de La Paz (3500 m.s.n.m).

Las muestras de sangre fueron tomadas en ambas especies por punción ocular con tubos capilares heparinizados y sin heparina. Para el caso de la producción de antisueros las muestras de sangre fueron recolectadas cortando la aorta.

Las corridas electroforéticas de proteínas séricas se realizaron en tiras de acetato de celulosa, tampón veronal veronal sódico, pH 8,6, 250 v, por 30 minutos. Las distintas fracciones de proteínas fueron cuantificadas por

densitometría (Helena Laboratories modelo No. 1111). Para la electroforesis de hemoglobinas, previamente los glóbulos rojos fueron lavados en solución salina al 0,9 o/o una vez hemolizados de acuerdo a la técnica de Drabkin (1949), se sometieron a corridas, en tampón triglicina, pH 8,6 - 9, 250 v.

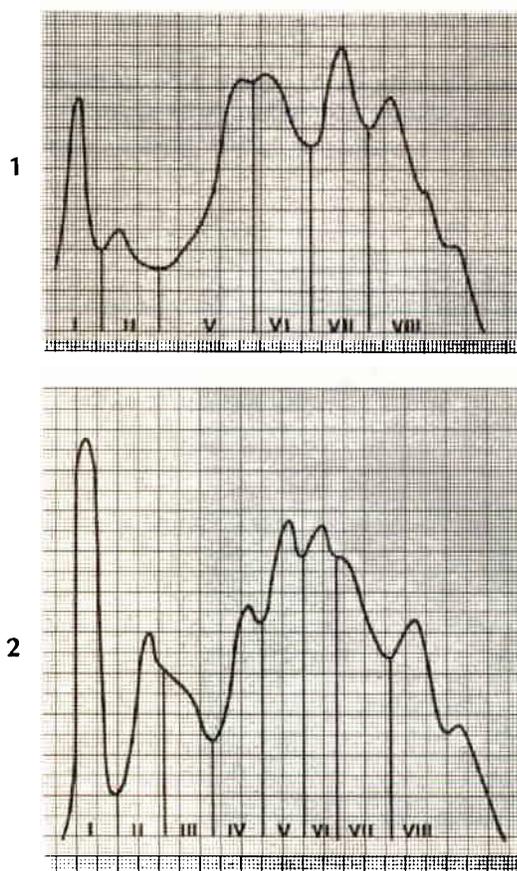
La producción de antisueros *telmatobius* y *Bufo spinolosus spinolosus*, se efectuó inoculando por vía intramuscular una emulsión de suero con adyuvante de Freund (Difco USA), los controles de producción se verificaron de acuerdo a un plan.

La inmunoelectroforesis de Williams Grabar (1960), que nos permitió conocer la identidad de proteínas en ambas especies, se migró en tampón veronal veronal sódico, pH 8,6, las corridas duraron 2 horas. Las diferentes proteínas fueron identificadas de acuerdo a las figuras inmunoelectroforéticas de los laboratorios Oxfor.

## RESULTADOS

### DIAGRAMAS ELECTROFORETICOS DE PROTEINAS EN SUEROS

#### TELMATOBIOUS CULEUS

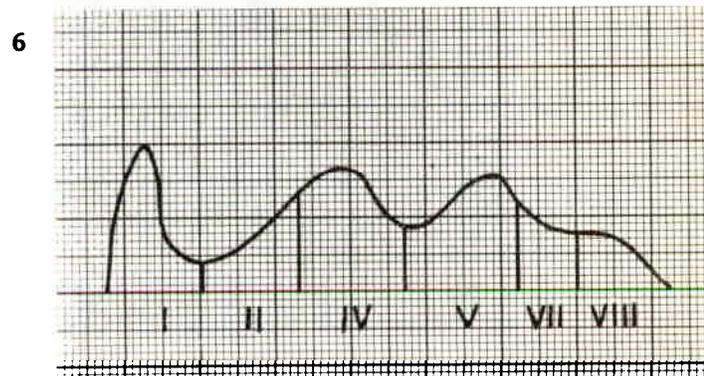


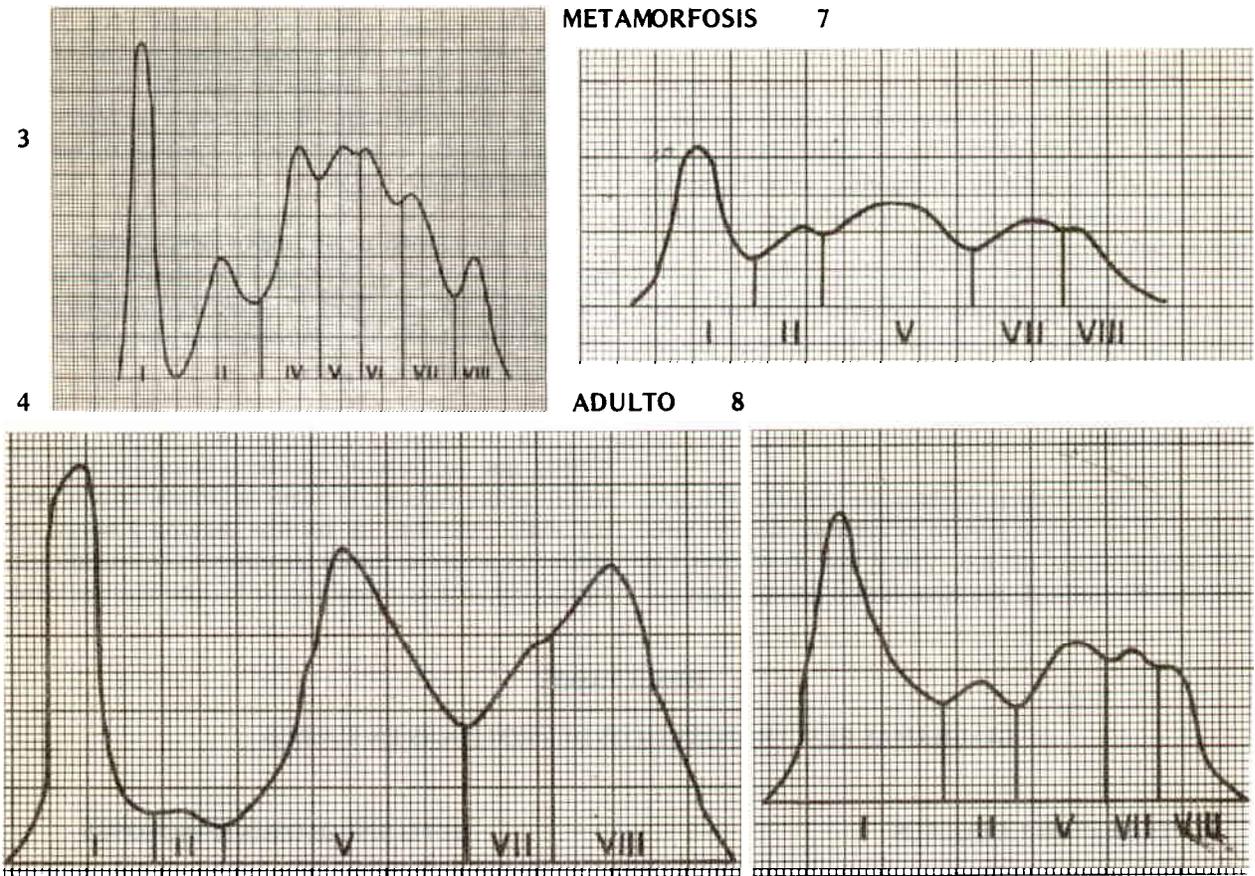
#### BUFO SPINOLOSUS SPINOLOSUS

##### PERIODO LARVARIO ESTADO U



##### PERIODO LARVARIO ESTADO V



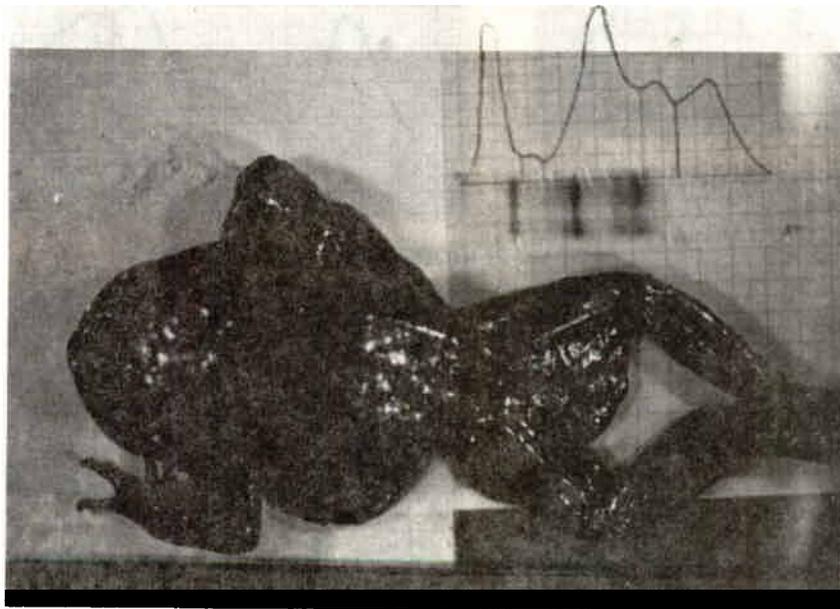


Los diagramas electroforéticos muestran diferencias significativas en ambas especies, en cuanto al número de picos y el desarrollo de los mismos. En la especie *Telmatobius* máximo por electrofóresis en acetato de celulosa se detectaron, 8 proteínas en el estado U y de

metamorfosis.

Contrariamente en la especie *Bufo spinolosus* se encontraron, máximo 6 proteínas en el estado U y V, alcanzando a 5 proteínas en la metamorfosis y estado adulto.

Figura 1



*Telmatobius culeus*, del Lago Titicaca, su electrofóresis se destaca por una proteína III francamente elevada.

CUADRO No. III

## VALORES RELATIVOS DE PROTEINAS

FRACCIONES DE PROTEINAS	LARVARIO U		LARVARIO V		METAMORFOSIS		ADULTO	
	TELMATOBIUS	BUFO	TELMATOBIUS	BUFO	TELMATOBIUS	BUFO	TELMATOBIUS	BUFO
I	12.71 ± 3.1	14.93 ± 6.7	13.99 ± 3.81	19.96 ± 5.8	19.30 ± 2.24	21.19 ± 4	23.94 ± 5.82	33.02 ± 6.60
II	5.40 ± 1.8	19.93 ± 5.7	15.86 ± 6.03	9.00 ± 4.47	9.76 ± 3.30	9.00 ± 5.10	5.03 ± 2.3	11.12 ± 2.90
III	—	—	12.41 ± 2.98	—	—	—	—	—
IV	—	17.58 ± 2.53	13.22 ± 6.52	28.74 ± 9.8	21.82 ± 4.3	—	—	—
V	20.16 ± 5.2	22.31 ± 7.2	14.12 ± 3.8	12.61 ± 3.68	14.37 ± 4.5	38.63 ± 8.20	—	14.01 ± 4.48
VI	21.00 ± 1.5	—	11.14 ± 2.05	—	13.09	—	—	—
VII	20.00 ± 3.6	—	14.29 ± 2.63	—	14.16 ± 1.23	16.50 ± 4.10	12.09 ± 3.66	17.13 ± 5.81
VIII	13.44 ± 2.1	12.94 ± 4.7	11.22 ± 5.67	11.29 ± 2.36	14.67 ± 6.63	13.69 ± 3.01	22.70 ± 4.16	12.45 ± 6.10

Las proteínas séricas del cuadro 3, muestran valores relativos muy irregulares excepto la proteína III correspondiente a la albumina, que se incrementa conforme transcurre el desarrollo del batracio.

El mayor porcentaje de albumina se registra en el Bufo spinolosus spinolosus. El mayor o/o de gammaglobulinas (fracción VII) corresponde al telmatobius culeus.

CUADRO No. IV

## ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS

	PERIODO LARVARIO ESTADO U	PERIODO LARVARIO ESTADO V	PREMETA-MORFOSIS	METAMORFOSIS	ADULTO
HEMOGLOBINAS	(+) I II III IV (-)	I II III IV	I II III IV	I II III IV	III
TELMATOBIUS CULEUS					
BUFO SPINOLOSUS SPINOLOSUS					

En este cuadro se ponen en evidencia las distintas hemoglobinas encontradas en los diversos estados de desarrollo.

I y II representan las hemoglobinas de corrida rápida; III y IV constituyen las hemoglobinas de migración lenta.

En el periodo larvario (estado U), en la especie *Telmatobius culeus* se encuentran 3 hemoglobinas a diferencia de la especie *Bufo Spinolosus Spinolosus* que presenta en este mismo estado 4 hemoglobinas.

En el estado V, en la especie *Bufo spinolosus spinolosus* se detectan 3 hemoglobinas por la supresión de

la Hb I, en la especie *Telmatobius culeus* persisten 3 Hbs. (II, III, IV).

En la metamorfosis ocurren dos cambios:

- En la especie del lago Titicaca se nota la ausencia de la Hb II de migración rápida.
- Por el contrario, en la especie *Bufo* se suprime la Hb I y de migración lenta.

En el periodo de la metamorfosis ambas especies presentan una Hb III correspondiente a la adulta.

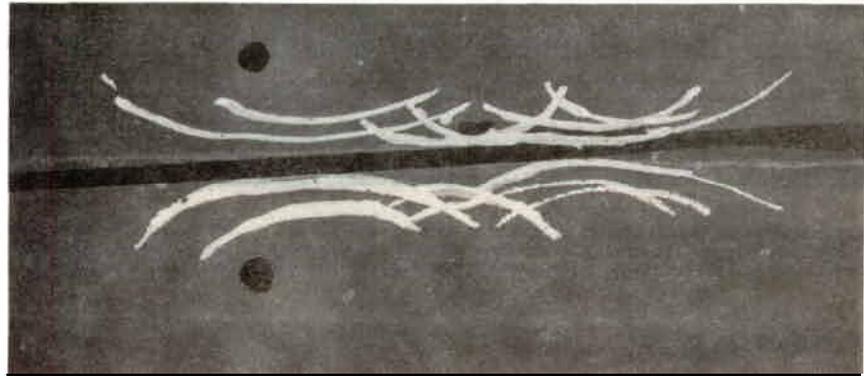
Figura 2

Especie, *Telmatobius culeus*.



Figura 3

Especie, *Bufo spinolosus spinolosus*.



La fig. No. 2, muestra la presencia de 11 arcos de proteínas; en cambio la fig. No. 3, nos muestra la presencia de 8 fracciones de proteínas.

En el lado catódico correspondiente a las gammaglobulinas, en la especie *telmatobius culeus* se manifiestan 4 arcos de inmunoglobulinas, por su parte el *Bufo spinolosus spinolosus* solo presenta en este sector, 2 inmunoglobulinas.

En lado catódico correspondiente a las gammaglobulinas, en la especie *telmatobius culeus* se manifiestan 4 arcos de inmunoglobulinas, por su parte el *Bufo spinolosus spinolosus* solo presenta en este sector, 2 inmunoglobulinas.

A nivel del arco correspondiente a la albumina, se advierten dos fracciones de proteínas en la especie *Telmatobius culeus* y casi ninguna proteína en el *Bufo spinolosus spinolosus*.

CUADRO No. V

PROTEINAS RESUELTAS E IDENTIFICADAS

	TELMATOBIOUS CULEUS	BUFO SPINOLOSUS SPINOLOSUS
No. DE PROTEINAS RESUELTAS	11	8
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ALBUMINA</li> <li>- HAPTOGLOBINA</li> <li>- TRANSFERRINA</li> <li>- BETAL IPOPROTEINA</li> <li>- IgG, IgM (TENTATIVO)</li> <li>- 2 Ig SIN IDENTIFICAR</li> <li>- Y 3 OTRAS FRACCIONES NO IDENTIFICADAS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ALBUMINA</li> <li>- HAPTOGLOBINA</li> <li>- TRANSFERRINA</li> <li>- BETAL IPOPROTEINA</li> <li>- IgG</li> <li>- 1, Ig NO IDENTIFICADA</li> <li>- Y 2 OTRAS FRACCIONES NO IDENTIFICADAS</li> </ul>

CUADRO No. VI

SUERO	ANTISUERO	No. DE PROTEINAS	PROTEINAS IDENTIFICADAS
TELMATOBIOUS CULEUS	BUFO SPINOLOSUS SPINOLOSUS	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ALBUMINA</li> <li>- BETAL IPOPROTEINA</li> <li>- TRANSFERRINA</li> <li>- IgG Y UNA</li> <li>- Ig NO IDENTIFICADA</li> </ul>

El cuadro 6, nos demuestra que las especies *Telmatobius culeus* y *Bufo spinolosus spinolosus*, inmunolectroforéticamente son idénticos en 5 proteínas séricas.

### DISCUSION

Los periodos de desarrollo de la especie *Bufo spinolosus spinolosus* y *Telmatobius culeus*, involucra el cese de la biosíntesis de hemoglobinas de un modo muy diverso. Así por ejemplo en el periodo larvario (estado U) en la especie *Bufo spinolosus spinolosus*, determinamos 4 hemoglobinas, en cambio en el *telmatobius* por la misma técnica encontramos 3 hemoglobinas, esta diferencia puede deberse a una temprana conclusión de la biosíntesis de la HbI en uno de los intervalos del período larvario de la especie *Telmatobius culeus*. Otra diferencia significativa se establece a nivel de biosíntesis de Hbs lentas y rápidas, mientras en la especie *telmatobius* se nota la ausencia de la Hb II de migración rápida en el *Bufo spinolosus spinolosus* la ausencia es a nivel de la Hb IV de migración lenta.

A diferencia de la rana catesbiana y *Triturus viridescens*, cuyas Hbs larvarias son reemplazadas por la Hb adulta durante el climax de la metamorfosis y del *Bufo* bufo cuya Hb adulta aparece después del primer año de vida en las especies *Telmatobius culeus* y *Bufo spinolosus spinolosus* la Hb adulta ya se manifiesta en el periodo larvario.

El contraste de resultados de un anuro a otro, no solo se plantea a nivel de Hbs, sino también a nivel de proteínas séricas y plasmáticas. En las especies *Dermaphis costaricensis* y *Rhinophrynus dorsalis*, en el estado adulto se detectaron 7 y 10 bandas de proteínas plasmáticas, siendo una de ellas el fibrinogeno.

En las especies *Bufo woodhousei*, *Bufo* americanos en el estado adulto por electroforesis en papel, se revela-

ron 6 proteínas séricas. Nosotros por electroforesis en acetato de celulosa en ambas especies estudiadas en este trabajo (estado adulto) encontramos máximo 5 proteínas séricas.

La electroforesis de proteínas en el curso del periodo larvario y metamorfosis de la rana *Telmatobius culeus* y del sapo *Bufo spinolosus spinolosus*, muestra marcadas diferencias en cuanto se refiere al número de proteínas y el modo como desaparecen las distintas fracciones de proteínas.

Al igual que otras especies los valores relativos de albúmina se incrementan gradualmente, conforme transcurre el desarrollo de estos batracios andinos.

El *Bufo spinolosus spinolosus* en todas las etapas de desarrollo siempre registra valores superiores de albúmina en relación al *telmatobius culeus*, esta diferencia parece estar relacionada por el tipo de vida, tal como plantea, Feldhoff (1971), el incremento de los niveles de albúmina son mayores conforme transcurre el paso de una vida acuática a una vida terrestre, y que desde luego este paso debe implicar un sistema vascular más eficiente y una sofisticada regulación osmótica.

A nivel de inmunoglobulinas también surgen interesantes diferencias. En el *telmatobius culeus* revelamos la presencia de 4 inmunoglobulinas, dos de los cuales por la forma del arco y por su ubicación, tentativamente corresponden a la IgG e IgM. En el *Bufo spinolosus spinolosus* de las 2 inmunoglobulinas encontradas, una corresponde a la IgG.

Las 4 inmunoglobulinas del *Telmatobius culeus*, nos sugiere que esta especie exclusivamente de vida acuática, cuenta con un sistema inmunológico más desarrollado.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- BAGLIONI C. ET SPARKS C. (1983) *Devel Biol*, 8 p 272.
- 2.- CALLEGARINI C., SALVATORELLI G. (1971). Observations sur l'ontogenese des hemoglobines chez Bufo bufo. *C.R. Acad. SC*, pp 632 - 634, Paris.
- 3.- CHEN P.S. (1970) Patterns and metamorphic changes of Serum proteins in amphibia, *Wilhelm Raux Archiv*. 165, pp 132-149.
- 4.- DESSAUER H.C. y FOX. W. (1964). Electrophoresis in Taxonomic Studies illustrated by analysis of blood proteins. In *Taxonomic Biochemistry and serology* (Edited by Leone C.A.) pp. 625-647. Ronald, press, New York.
- 5.- DRABKIN (1949) *Arch Biochem*. 21, pp 224. Frieden E. Humer A. Fish L y Lewis E. (1957) Changes in serum protein in Amphibian metamorphosis. *Science* 126, pp 556-650.
- 6.- FELDHOFF R. (1971) Quantitative Change in plasma Albumine During Bull frog Metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol vol 40 B*, pp 733 a 739.
- 7.- GALARZA M. (1979) Hemoglobinas en el periodo larva rio y de metamorfosis del Bufo spinolosus spinolosus. *IBBA* 23, pp 47-48.
- 8.- GRABAR ET BURTIN P. (1960) *Analyse immunoelectrophoretique*. Masson, Paris.
- 9.- HAMADA Y. TSUCHMA K. et SHUKUYA J. (1976) *Biochem*, pp 39-41 Japan 60.
- 10.- HERNER A. Y FRIEDEN E. (1960) Biochemistry of anuran metamorphosis VII. Changes in serum protein during spontaneous and induced metamorphosis. *J. Biol. Chem.* 235, pp 2845-2851.
- 11.- MOSS B. IGRAM V.M. (1968) *J. Mol Biol.* 32, pp, 493-50
- 12.- MICHELL M. FRANCOIS M. CLAUDE J. (1972) Etude electrophoretique des modifications de l'hemoglobine au cours du developement post embryonnaire chez l'urodele pleurodeles Walthi Michan, *C.R. Acad. S - C*, pp 2411-2414, Paris.
- 13.- VELLARD J. (1951). Estudios sobre batracios andinos - grupo Telmatobius y formas afines - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Lima.