

NOTA

**HEMOGLOBINAS MÚLTIPLES DE LA PAGUARA *CHAETODIPTERUS FABER*
(BROUSSONETT) (PISCES: EPHIPPIDAE) CULTIVADA EN JAULAS
FLOTANTES**

**MULTIPLE HEMOGLOBINES OF THE PAGUARA *CHAETODIPTERUS FABER*
(BROUSSONETT) (PISCES: EPHIPPIDAE) RAISED IN FLOATING CAGES**

Asmine Bastardo¹ y Raquel Salazar²

1. Estación de Investigación Hidrobiológica de Guayana. Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Carrera Alonso de Herrera, UD-104. San Félix, Estado Bolívar, Venezuela. Apartado 51. asmine.bastardo@fundacionlasalle.org.ve. 2. Departamento de Bioquímica. Escuela de Bioanálisis y Enfermería. Universidad de Oriente Núcleo Sucre. Avenida Universidad, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

RESUMEN

Se realizó una caracterización fenotípica de las hemoglobinas presentes en la sangre del teleosteo marino *Chaetodipterus faber* en condiciones de cultivo en jaulas flotantes. La separación de las hemoglobinas de 40 ejemplares se realizó mediante técnicas electroforéticas y se reveló la presencia de tres tipos de hemoglobinas señaladas como Hb I, Hb II y Hb III, para esta especie. También se separaron los componentes globínicos de la hemoglobina Hb I, la cual resultó un tetrámero compuesto por dos cadenas tipo alfa y dos cadenas tipo beta señaladas como a^a, a^b, b^a y b^b respectivamente, con diferentes velocidades de migración electroforética. La diferencia entre el número de hemoglobinas encontradas en este estudio y la señalada en un estudio anterior permite sugerir que el desarrollo de estas hemoglobinas ocurre por cambios ontogénicos, los cuales podrían estar relacionados con el cambio de hábitat y con variaciones en las condiciones ambientales.

SUMMARY

A Phenotypic characterization of the hemoglobines of the marine teleost *Chaetodipterus faber* under cultivation in floating cages was realized. The separation of the hemoglobines was done by electrophoresis. Samples of 40 fishes revealed the presence of three types of hemoglobines, Hb I, Hb II, and Hb. Hemoglobin HbI is a tetramer whose globinic components are two alpha-type chains and two beta chains, namely a^a, a^b, b^a, and b^b, all with distinct migration velocities. The difference between the number of hemoglobines reported here and those reported in a previous study suggest that the development of these hemoglobines takes place along with ontogenetic changes, which could in turn be related to habitat changes and variations in environmental conditions.

Palabras claves: Hemoglobinas, multiplicidad, *Chaetodipterus faber*, jaulas flotantes.

Key words: Hemoglobines, multiplicity, *Chaetodipterus faber*, floating cages.

INTRODUCCIÓN

Los peces presentan una serie de estrategias y mecanismos adaptativos que les permiten satisfacer sus requerimientos fisiológicos. La multiplicidad resulta de la combinación de un pequeño número de cadenas polipeptídicas en diversas formas para producir un gran número de componentes (Pérez, 1975). A este hecho se ha atribuido la multiplicidad

hemoglobínica en muchos peces tales como el salmón *Oncorhynchus nerka* (Sauer y Harrington, 1988) y el teleosteo antártico *Caygrodraeo mansonii* (Caruso y col., 1991) entre otros. La afinidad por el oxígeno de los componentes hemoglobínicos es fuertemente afectada por los cambios en el pH y la temperatura. La disminución del pH causa una reducción de la afinidad por el oxígeno (Powers, 1972), mientras que las altas temperaturas

disminuyen la concentración de oxígeno disuelto, la tasa metabólica aumenta proporcionalmente y disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Ante este problema, los peces han desarrollado varias estrategias adaptativas como son: 1) migrar a ambientes más fríos y aumentar la concentración de hemoglobina, como lo demostró Cameron (1970) en *Largodon rhomboids* y *Mugil cephalus*; o bien 2) desarrollar hemoglobinas que no son afectadas por cambios de temperatura, hecho demostrado por primera vez en el atún *Thunnus alalunga* (Rossi-Fanelli y Antonini, 1960). La capacidad de captar y transportar oxígeno de la hemoglobina difiere tanto entre especies, como durante el desarrollo ontogénico que ocurre en una misma especie.

Aún cuando se han estudiado numerosas familias de peces, cada día aumenta la importancia de conocer mejor las características biológicas propias de las especies con importancia comercial. *Chaetodipterus faber* (Brossonet), comúnmente conocida como Paguara, es la única especie de la familia Ehippididae que habita en el Atlántico occidental (Gómez, 1984). En el oriente de Venezuela, estos peces se consumen en fresco y salados, son aptos para el cultivo, llegando a alcanzar una talla de 90 cm y un peso de 10 kg (Cervigón y Gómez, 1987). Los estudios hasta ahora realizados en esta especie han permitido analizar el crecimiento y cultivo en jaulas flotantes (Gómez y Lárez, 1984), desove y desarrollo embrionario larval (Gómez, 1984), perspectivas de cultivo en el Caribe Sur y Noreste de Sudamérica (Cervigón y Gómez, 1987) y sus hábitos alimentarios, edad, crecimiento y reproducción (Haysse, 1990). Otras investigaciones realizadas abordan el metabolismo de monoaminas en el hipotálamo de juveniles (Marcano y col., 1995) y el recambio serotoninérgico en el cerebro (Cardillo y col., 1995).

En este estudio se realizó la caracterización fenotípica de las hemoglobinas de *Chaetodipterus faber* en condiciones de cultivo en jaulas. En los peces, la presencia de hemoglobinas múltiples con diferentes afinidades al oxígeno se ha relacionado con la capacidad para adaptarse a ambientes muy variables (Pérez, 1986; Brittain, 1991). El conocimiento detallado de las hemoglobinas múltiples de la Paguara podría ser de gran utilidad para su manejo como especie de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *C. faber* se obtuvieron de una reserva de cultivo en jaulas flotantes 2 m² suspendidas a 1.5 m de profundidad, ubicadas en la Estación de Investigaciones Científicas Marinas (FUNDACIENCIAS) en Mochima, Estado Sucre.

El estudio se realizó en 40 ejemplares juveniles con una longitud total y peso promedio de 142 mm y 131 g, respectivamente, mantenidos en cautiverio desde su nacimiento bajo condiciones ambientales óptimas (pH 8.2; oxígeno disuelto 8.1 mg/l; salinidad 37‰; temperatura del agua 24°C). Cada pez fue anestesiado con MS222 (ácido etil-ester-3-aminobenzoico, 100 mg/l) en agua de mar y se le extrajo la muestra sanguínea mediante punción cardíaca usando jeringas de 3cc previamente lavadas en citrato de sodio al 5%. Las muestras se colocaron en viales rotulados de plástico, se les añadió 0.5 ml de citrato de sodio al 5% y se almacenaron a 4°C durante su traslado al laboratorio, donde posteriormente se analizaron. Para la obtención de las hemoglobinas se lavó cada muestra sanguínea tres veces con cloruro de sodio al 9% en partes iguales y se centrifugó a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos, descartándose el sobrenadante mediante aspiración. El residuo de células rojas (sedimento) fue lisado con tetracloruro de carbono y centrifugado para obtener como sobrenadante la porción de hemoglobina pura.

El fenotipo electroforético de cada hemoglobina se determinó mediante electroforesis horizontal en membranas de acetato de celulosa en Buffer Barbital Sódico (Tris barbital sodio Helene laboratorio) a pH 8.6 y con placas de agar citrato en Buffer citrato (0.005 M) a pH 6.2 conducido a 150 voltios, 8 mA durante treinta minutos y a 100 voltios, 47 mA durante sesenta minutos a temperatura ambiente, respectivamente, según describen Robinson y col. (1957). Para la coloración de las bandas separadas se utilizó Rojo Ponceau al 3%. La identificación de las cadenas globínicas se realizó por separación electroforética del bemolizado (para romper los enlaces intra-globínicos), tratado con b-mercap-toetanol en acetato de celulosa y Buffer Tris-EDTA-Borato (EDTA Ácido 0.0063 mM, Ácido Bórico 0.0005 Mm, Trisma base 0.009 Mm) a pH 8.6 y corrido a 100 voltios y 47mA

durante sesenta minutos. Las hemoglobinas separadas y eluidas del acetato se trataron individualmente con b-mercaptoetanol en partes iguales y finalmente se sometieron a electroforesis en membranas de acetato de celulosa en buffer Tris-EDTA-borato-urea (0.007 Mm) con b-mercaptoetanol conducida durante 60 minutos a 300 voltios y 3-6 mA. Se utilizaron controles humanos AS, SS y A para la identificación de las cadenas globínicas en el fenotipo electroforético obtenido, según metodología descrita por Bucci y Fonticelli (1965).

RESULTADOS

Los patrones electroforéticos obtenidos en el estudio hemoglobínico de 40 ejemplares de *Chaetodipterus faber* revelaron la presencia de tres tipos de hemoglobinas denominados Hb I, Hb II y Hb III (Figura 1). Las tres bandas hemoglobínicas mostraron un comportamiento de migración anódico igual en las corridas electroforéticas realizadas con el buffer barbital sódico y Tris-EDTA-Borato a pH 8.6 (Figura 1 A y B) y un comportamiento de migración catódico en la electroforesis con el buffer citrato a pH 6.2 (Figura 1C). Sólo se logró separar los componentes globínicos para la hemoglobina señalada como HbI, la cual mediante identificación con los patrones humanos empleados, es un tetrámero compuesto por dos cadenas tipo alfa (α) denominadas α^a , α^b y dos cadenas beta (β)^{2a}, ^{2b} (figura 1D), todas con un comportamiento migratorio anódico.

DISCUSIÓN

Este estudio permitió evidenciar multiplicidad hemoglobínica en juveniles de *Chaetodipterus faber* con un total de tres hemoglobinas. Algunos autores (Pérez y MacLean, 1976; Pérez, 1986, Landidni y col., 2002) evidenciaron que en muchas especies de peces las diversas hemoglobinas presentan diferencias funcionales, lo cual hace suponer que estos pigmentos respiratorios representan una estrategia adaptativa a la vida acuática. Según Pérez y MacLean (1976), los organismos acuáticos que están sujetos a cambios en la concentración de oxígeno disuelto pueden responder a ellos de tres formas: modificando los niveles de hemoglobinas

circulantes; modificando las proporciones de hemoglobinas múltiples (mediante un aumento en la concentración de la que mejor funcione en la nueva situación ambiental); o bien modificando la afinidad por el oxígeno en las hemoglobinas múltiples según cambien las condiciones de pH, niveles de electrolitos o concentración de organo-fosfato sanguíneo. Sin embargo, los trabajos de Guillén y Riggs (1972, 1973) no concuerdan con esta explicación ya que estos autores no hallaron diferencias funcionales en las hemoglobinas de *Cyprinus carpio cyanoguttatum*. Kimura (1989) sostiene que en algunas especies de peces, las hemoglobinas múltiples son ejemplos de mutaciones neutrales que han sido fijadas por deriva genética. En un estudio de especies silvestres, Pérez y Rylander (1985) reportaron a *C. faber* como un pez de hábitat marino, respiración branquial y con cinco hemoglobinas. Según Pérez (1975) las bandas múltiples separadas por electroforesis pueden surgir de varias formas pero no necesariamente representan hemoglobinas múltiples, sino que pueden ser compuestos producidos durante la preparación de las muestras o separaciones. Sin embargo, la diferencia entre el número de hemoglobinas observado en *C. faber* y el encontrado en el presente estudio permite inferir el desarrollo de estas hemoglobinas por cambios ontogénicos de la especie posiblemente relacionados con el cambio de hábitat, disponibilidad de oxígeno en el medio y variaciones en las condiciones ambientales, como lo sugieren Pérez y col. (1995). Wilkins e Illes (1966) reportaron resultados similares en el arenque *Clupea barenques* y encontraron dos hemoglobinas en juveniles, tres en adultos de 4 años y cinco en adultos de más de 4 años. En el salmón *Oncorhynchus nerka*, Tsuyubi y Ronald (1971) evidenciaron que los adultos poseían seis hemoglobinas y los juveniles sólo cinco. Pérez y MacLean (1974) hallaron que los adultos de *Rutilus rutilus* y *Scordinus erythrophthalmus* poseen dos hemoglobinas y tres los juveniles.

La presencia de cuatro cadenas globínicas en la HI de *C. faber* encontradas en el estudio, indica la expresión de al menos cuatro genes que codifican la hemoglobina de esta especie, dos alfa (α^a y α^b) y dos beta (β^a y β^b). Es posible que las otras dos hemoglobinas (Hb II y Hb III) de la especie sean el resultado de una combinación de estas cuatro cadenas. En el caso de la Hb III, quizás las

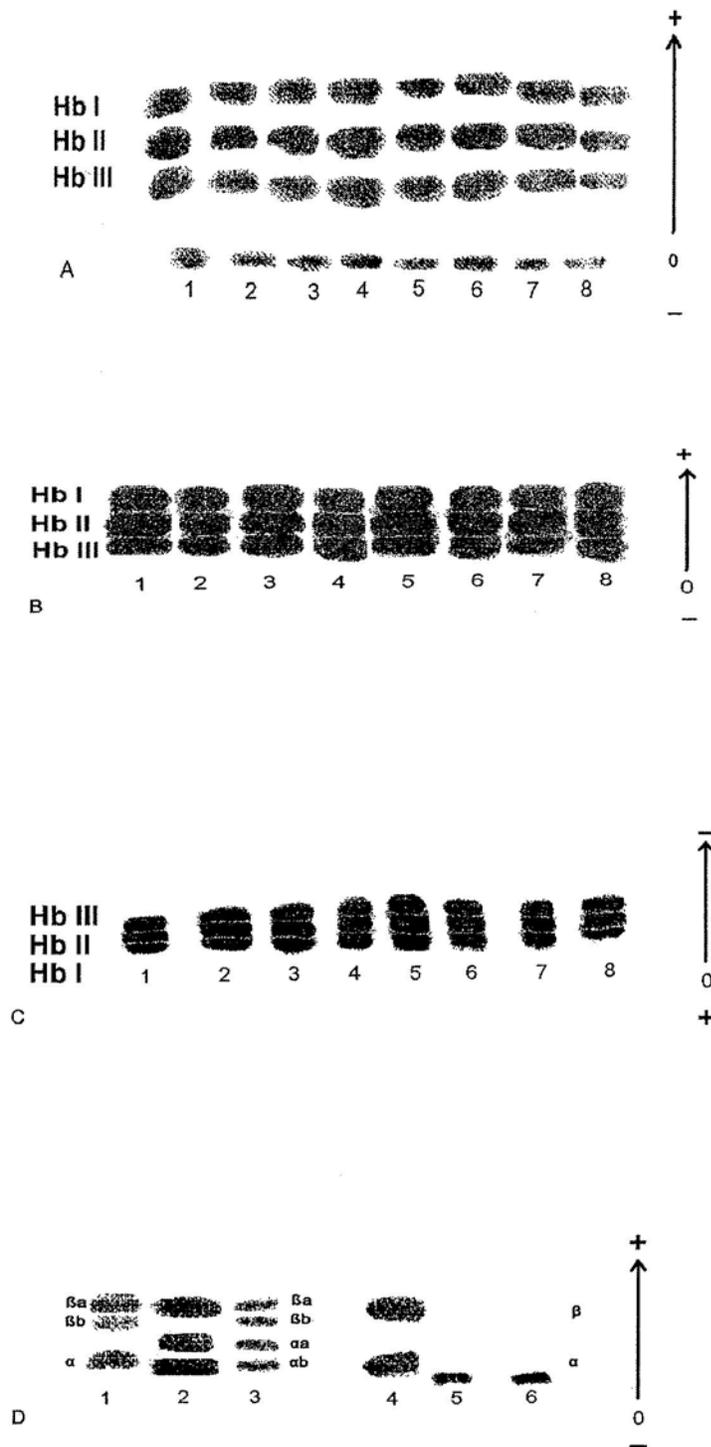


Figura 1. Fenotipo electroforético de las hemoglobinas de *Chaetodipterus faber*. (A) muestras sanguíneas (1-8) en buffer barbital sódico a pH 8.6. (B) Hemolizado sanguíneo (1-8) en buffer barbital sódico a pH 8.6. (C) Hemolizados sanguíneos (1-8) en buffer citrato pH 6.2. (D) Cadenas hemoglobínicas: 1, 2 y 4 controles humanos, 3 hemoglobina I *C. faber*; 5 y 6 Hemoglobinas II y III *C. faber*. (+): Anodo; (-): cátodo; (-): dirección de migración; (0): origen de corrida; (±): cadena hemoglobínica tipo alfa (α); (²): cadena hemoglobínica tipo beta (β).

dos cadenas alfa (α) y las dos beta (β) son lentas, lo que explicaría su poca movilidad anódica a pH 8.6 y su mayor movilidad catódica a pH 6.2. La hemoglobina Hb II podría estar constituida por dos cadenas α lentas y por una β rápida y otra lenta o viceversa, lo cual conferiría esa migración intermedia entre Hb I y Hb III. En *Fundulus heteroclitus* (Mied y Powers, 1987) se presentan dos hemoglobinas compuestas por dos subunidades α y dos subunidades β cada una, formando cuatro cadenas globínicas diferentes. En esta especie, la hemoglobina I es un homotetrámero compuesto por las cuatro cadenas α^a y dos cadenas β^b ; la hemoglobina IV es también un homotetrámero pero compuesto de dos subunidades (α^a y dos β^b), las

hemoglobinas II y III son heterotetrámeros compuestos por las cuatro cadenas. En *Anguilla japonica*, Takashi y col. (1980) determinaron seis tipos de hemoglobinas constituidas por tetrámeros asimétricos de tres tipos de cadenas globínicas (α , β y γ). En *Catostomus clarkii* se reportaron doce isohemoglobinas compuestas por dos cadenas alfa (α^a y α^b) y cuatro cadenas beta (β^a , β^b , β^c y β^d). Tamburini y col., (1992) señalan que aún cuando la composición de aminoácidos de las distintas cadenas de hemoglobinas son significativamente diferentes, los grupos terminales de las cadenas homólogas son idénticas y precisamente ésta es la diferencia que confiere una función fisiológica importante a la hemoglobina.

LITERATURA CITADA

BRITAIN, N.

1991. Cooperativity and allosteric regulation in non mammalian vertebrate hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99(B): 731-740.

BUCCI, E. Y C. FONTICELLI

1965. A new method for the preparation of A and B subunits of human haemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 240: 551-552.

CAMERON, J.

1970. The influence of environmental variables on the haematology of pinkfish *Lagodon* and striped mullet *Mugil cephalus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 257-272.

CARDILLO E., N. GAGO, H. GUERRERO, M. REQUENA, L. RUIZ Y D. MARCANO

1995. Serotonin metabolism in the brain of juvenile marine teleost *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae). En: Proceedings of the Fifth International Symposium on the reproductive physiology of fish. F. Goetz and P. Thomas (eds). University of Texas, Austin, 71 p.

CARUSO, C. B. NUTIGLIANO, M. ROMANOI Y G. DI PRISCO

1991. The haemoglobins of the cold-adapted Antarctic teleost *Cygnodraco mansonii*. *Biochem. Biophys. Acta*, 107(B): 273-282.

CERVIGÓN, F. Y A. GÓMEZ

1987. Perspectivas del cultivo de peces marinos en el Caribe sur y noreste de Sudamérica. *Rev. Lat. Acuicult.*, 34: 43-52.

GÓMEZ, A. Y F. LÁREZ

1984. Crecimiento de la Paguara *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae) durante un año de confinamiento en jaula flotante. *Bol. Inst. Oceanog. Venez.*, 23: 157-161.

GÓMEZ, A.

1984. Inducción al desove, desarrollo embrionario y larval de *Chaetodipterus faber* (Broussonet) (Pisces: Ehippidae) en la Isla de Margarita, Venezuela. *An. Ins. Mar. Punta Betin.*, 14: 85-104.

GUILLÉN, R. Y A. RIGGS

1972. Structure and function of the haemoglobin of the carp *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 247: 6039-6046.

1973. The haemoglobins of a freshwater teleost *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird & Girard). II: Subunit structure and oxygen equilibria of the isolated components. *Arch. Biochem. Biophys.*, 154: 75(A): 348-359.

HAYSSE, J.

1990. Feeding habits, age growth, and reproduction of Atlantic spadefish larvae, *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae) in South Carolina. *Fish Bull.*, 88: 67-83.

KIMURA, M.

1989. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome*, 31: 24-31.

LANDINI, G., A. SCHWANTES Y M. SCHWANTES

2002. Hemoglobinas de *Astyanax scabripinis* (Pisces: Characidae): estrutura e função. *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 595-599.

MARCANO, D., H. GUERRERO, N. GAGO, E. CARDILLO, M. REQUENA Y L. RUIZ

1995. Monoamine metabolism in the hypothalamus of the juvenile teleost fish *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae). En: Proceedings of the Fifth International Symposium on the reproductive physiology of fish. F. Goetz and P. Thomas (eds). University of Texas, Austin. 71 p.

MIED, P. AND D. POWERS

1978. Haemoglobins of the killifish *Fundulus heteroclitus*. Separation, characterization, and a model for the subunit composition. *J. Biol. Chem.*, 253: 3521-3528.

PÉREZ, J., RYLANDER, K., AND M. NIRCHIO

1995. The evolution of multiple haemoglobins in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5: 304-319.

PÉREZ, J.Y.M. RYLANDER

1985. Hemoglobin heterogeneity in Venezuelan fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80(B): 6-41.

PÉREZ, J.Y.N. MACLEAN

1976. The haemoglobins of the fish *Sarotherodon mossambicus* Peters. Functional significance and ontogenic changes. *J. Fish Biol.*, 8: 447-455.

1974. Ontogenic changes in haemoglobins in roach *Rutilus rutilus* and rudd *Sardinus erythrophthalmus*. *J. Fish Biol.*, 6: 479-455.

PÉREZ, J.

1975. Hemoglobinas múltiples en peces. *Lagena*, 35-36: 3-7.

1986. Haemoglobin polymorphism in the toad fish *Thalassophryne maculosa* (Gunther). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 100: 97-287.

POWERS, D.

1972. Haemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in sympatric catostomid fishes. *Science*, 117: 360-362.

ROBINSON, A., M. ROBSON, A. HARRISON, AND W. ZUELGA

1957. A new technique for differentiation of haemoglobins. *J. Lab. Clin. Med.*, 50: 7.

ROSSI-FANELLI, A. Y E. ANTONINI

1960. Oxygen equilibrium of haemoglobin from *Thunnus thynnus*. *Nature* 186: 895-896.

SAUER, J. AND J. P. HARRINGTON

1988. Haemoglobins of the sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91(A):109-140.

TAKASHI, S. Y. OKIHAMA, T. OKASAKI, AND R. SHUKUYA

1980. The multiple haemoglobins of the japanese eel *Anguilla japonica*. Molecular basis for multiplicity and the subunit interactions. *J. Biol. Chem.*, 225: 7912-7917.

TAMBURINI, M., A. BARUCACCIO, R. IPPOLITI AND G. DI PRISCO

1992. The aminoacid sequence and oxygen-binding properties of the single haemoglobin of the cold-adapted Antarctic teleost *Gymnodraco acuriceps*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292: 295-302.

TSUYUBI, H. AND A. RONALD

1971. Molecular basis for multiplicity of Pacific Salmon haemoglobins: Evidence for *in vivo* existence of molecular species with up to four different polypeptides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 39(B): 503-522.

WILKINS, N. AND T. ILLES

1966. Haemoglobin polymorphism and its ontogeny in Herring *Clupea harengus* and Sprat *Sprattus sprattus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 17: 1141-1158.