

Hospital Municipal de Infecciosos
Departamento de Investigación. - Sección de Inmunoquímica. - Barcelona
(Director: J. Gras)

Estudio sobre las proteínas plasmáticas de peces de agua dulce (*Barbus fluviatilis*, Cuv. y *Leuciscus cephalus*, L.)

por

J. Planas* y J. Gras

(Recibido para publicar el 4 de diciembre de 1956)

Las investigaciones sobre proteínas plasmáticas en el hombre y en otros mamíferos, son sumamente numerosas, dada su importancia en clínica humana en el primer caso, y en el segundo, por ser animales muy asequibles y de uso corriente en investigaciones experimentales. Por el contrario, los estudios llevados a cabo sobre proteínas séricas en los vertebrados inferiores son bastantes escasos. Sin embargo, los trabajos de MOORE (9), y de DEUTSCHE y col. (2, 3) con electrofóresis libre, y los de ANTONINI y PIVA (1), DRILHON (4), GLEASON y FRIEDBERG (5), PLAGNOL y VIALARD-GOUDOU (10) utilizando electrofóresis en papel, han sido suficientes para poder apreciar las notables diferencias que presentan estos animales en comparación con los mamíferos o, más concretamente, con el hombre.

En el presente trabajo hemos estudiado las proteínas del suero de dos peces dulceacuícolas, no hallados en la bibliografía (3, 4), mediante el análisis con la técnica de electrofóresis en papel, y con el método de fraccionamiento con hiposulfito sódico.

* Con una beca del Instituto de Investigaciones Pesqueras.
Dirección actual: Laboratorio de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad, Barcelona

Material y métodos

Las muestras de sangre han sido obtenidas de las especies *Barbus fluviatilis*, Cuv. y *Leuciscus cephalus*, L., pertenecientes, ambos, a la familia de los Ciprínidos, y capturados en el río Tordera, a la altura de Breda (Gerona). La sangre ha sido recogida por punción cardíaca, a peces vivos todavía, y por su reducido tamaño (de 10 a 20 cm. de longitud) han sido necesarios unos 50 ejemplares para obtener un volumen de suero suficiente, en cada una de las veces.

El estudio de las proteínas séricas por electrofóresis en papel se ha efectuado según la técnica de SCHNEIDER (11), con papel Munktell n.º 20, en tiras de 7×34 cm., empleando 0,2 c. c. de suero en cada una de ellas. Las experiencias se han llevado a cabo a 125 voltios, durante unas 12 horas. El revelado de las tiras se ha hecho con azul de bromo-fenol y las lecturas, realizadas con un electrofotómetro EVANS, de los eluidos correspondientes a las fracciones globulínicas, no se han multiplicado por ningún factor.

Han sido determinadas curvas para cada especie, efectuando las lecturas de los eluidos, en dicho caso, con un espectrofotómetro Unicam.

La proteinemia total se ha determinado por un refractómetro Galileo.

Se ha empleado igualmente para el estudio de los sueros de las especies indicadas, el método de fraccionamiento proteico con hiposulfito sódico (6, 7, 8) descrito para los sueros humanos.

Resultados

Los sueros de las dos especies estudiadas presentan una proteinemia que oscila entre los 27 a 38 gr. por 1.000, valores que están de acuerdo con los dados en la bibliografía para los peces de agua dulce.

Han sido obtenidos 5 fraccionamientos proteicos con diferentes muestras de suero (cada una de ellas mezcla de unos 50 sueros) de *Leuciscus*, cuyos resultados pueden apreciarse en el Cuadro I.

El promedio de los valores del proteinograma es de : Alb. = 20,16 ; glob. α = 8,03 ; glob. β = 1,78 ; glob. γ = 2,43.

Los diagramas electroforéticos obtenidos también con distintas muestras de sueros de *Leuciscus* y *Barbus*, nos han permitido apreciar la distribución de las proteínas séricas en estos peces, así como la notable diferencia que existe entre ambas especies.

CUADRO I

Fraccionamiento con hiposulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) de varias muestras de suero de *Leuciscus*. Cada muestra es mezcla de 50 ejemplares

Suero	Prot. total gr./1.000	Albúmina	Globulinas		
			α	β	γ
L ₁	34,50	19,39	9,70	3,02	2,39
L ₂	27,54	16,20	7,29	0,98	3,07
L ₄	32,88	22,19	8,10		2,59
L ₇	32,95	22,81	7,10	1,35	1,69
Promedios	31,96	20,16	8,03	1,78	2,43

En *Barbus* se observa la presencia de 5 fracciones que, por su disposición pueden equipararse a las que se observan en los sueros humanos, es decir : albúmina, α_1 , α_2 , β y γ globulinas (Fig. 1).

En el caso del *Leuciscus*, se observa en la gran mayoría de los casos, que en el diafragma electroforético puede diferen-

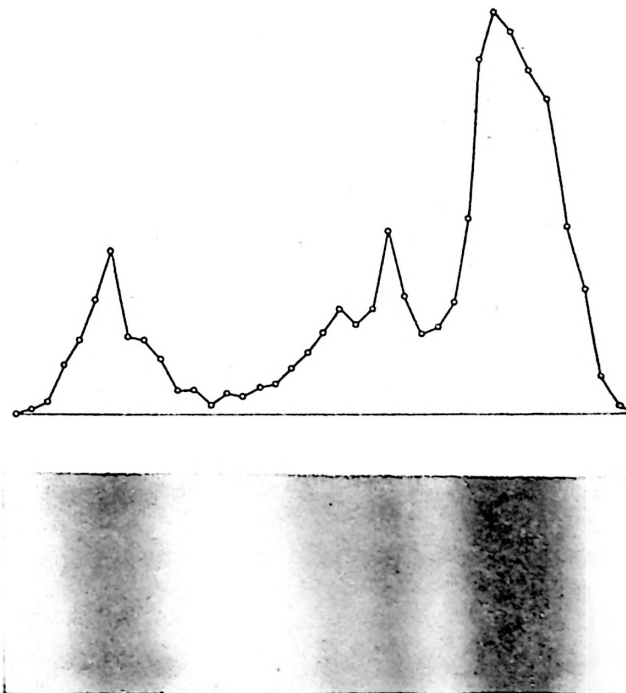


Figura 1
Diagrama de electroforesis en papel correspondiente a suero de *Barbus fluviatilis*. Se individualizan 5 fracciones equiparables a las que se presentan en el suero humano. El contenido en globulina γ es superior al de la albúmina.

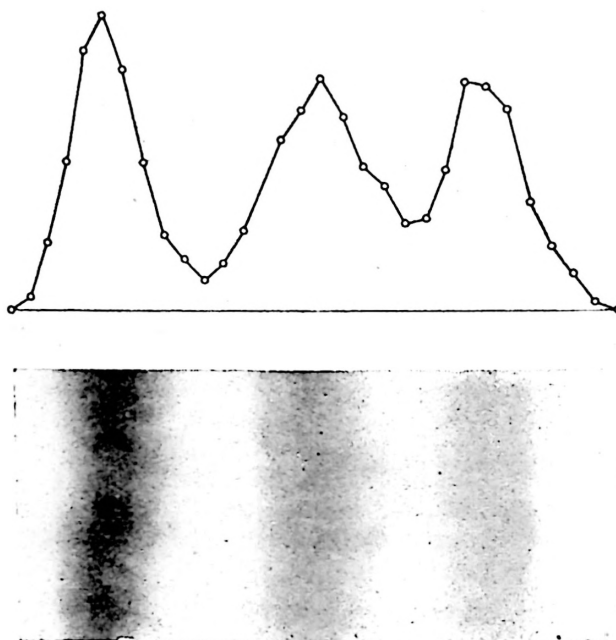


Figura 2

Diagrama de electroforesis en papel correspondiente a suero de *Leuciscus cephalus*. En el mismo no se individualizan las 5 fracciones observables en *Barbus*. En este caso, las fracciones α_2 y β emigran conjuntamente; en algún caso aparece la tendencia a individualizarse en dos fracciones. El contenido en albúmina es superior al de globulina γ , contrariamente a lo que ocurre en *Barbus*.

ciarse la albúmina, la zona del α_1 , y la globulina γ , mientras que las α_2 y β se presentan como si fuesen una sola fracción (Fig. 2), aunque en algún caso parece insinuarse su resolución en dos; por esto creemos lógico aceptar la existencia también en esta especie de las globulinas α_2 y β , que serían más difíciles de diferenciar entre sí por razones que ahora se nos escapan.

Otra diferencia interesante es el menor contenido en albúmina y mayor en globulina γ del *Barbus* en relación con *Leuciscus* (Fig. 1 y 2). En valores relativos esta diferencia resulta muy destacada. Si tenemos en cuenta un valor de proteinemia total más bajo para el barbo, estas diferencias en valores absolutos pueden no apreciarse tan acentuadas, pero se ponen también claramente de manifiesto estableciendo el cociente Alb./glob. γ .

En el Cuadro II se expresan los resultados cuantitativos obtenidos con la elución de las distintas fracciones.

El promedio de los valores en g. $^{\circ}/_{100}$ para las distintas fracciones es el siguiente:

Leuciscus: Alb. = 12,40; glob. $\alpha_2 + \beta$ = 12,67; glob. γ = 10,49.

Barbus: Alb. = 6,29; glob. α_1 = 0,35; glob. α_2 = 2,58; glob. β = 4,35; glob. γ = 16,09.

CUADRO II

Valores de las distintas fracciones obtenidas por electroforesis
con sueros de *Leuciscus* y *Barbus*

Suero	Prot. total (gr./1.000) refractómetro	Albumina	Globulinas					Alb. Glob. γ
			α_1	α_2	β	$\alpha_2 + \beta$	γ	
L ₁	37,40	13,18	2,10			11,88	10,22	1,28
*L ₁	37,40	12,77	—			13,75	10,80	1,18
L ₂	30,60	8,90	1,89			10,80	7,98	1,11
L ₆	37,90	13,67	—			13,79	10,43	1,31
**L ₂	38,20	15,48	—			9,60	13,03	1,18
Prom.	36,30	12,40	—			12,76	10,49	1,20
B ₃	29,90	8,23	0,06	3,16	4,36		14,05	0,58
**B ₃	29,90	4,81	0,76	2,52	4,04		17,66	0,27
B ₁	28,90	7,09	0,07	2,70	4,12		15,00	0,47
B ₆	30,20	5,06	0,62	1,96	4,91		17,64	0,28
Prom.	29,72	6,29	0,35	2,58	4,35		16,09	0,40

* Cada muestra es mezcla de sueros de 50 ejemplares.

** Valores calculados del estudio de la curva total.

Los valores que se obtienen en la elución están en desacuerdo con los obtenidos con el fraccionamiento proteico con el hiposulfito sódico, como puede apreciarse al comparar los resultados alcanzados con *Leuciscus*, siguiendo uno u otro método.

Hemos tenido ocasión de estudiar también electroforéticamente el suero de anguila, apreciando cierto parecido con el *Barbus*, por su poca albúmina, y su globulina γ bastante elevada, así como en algún diagrama se observa la división del complejo $\alpha + \beta$ en dos fracciones.

Discusión

Las notables diferencias que se observan al comparar los valores de las fracciones indicadas en los cuadros I y II, nos sugieren la idea de que la curva de fraccionamiento con hiposulfato sódico establecida para los sueros humanos (6, 7, 8), no es aplicable a los peces, pues son distintos seguramente los puntos de inflexión.

Parece acertada la nomenclatura aplicada a las distintas frac-

ciones por varios autores (1, 9,) numerándolas, según su movilidad sin definir las. Sin embargo, para una más fácil interpretación y por la semejanza de los diagramas obtenidos (en cuanto a la distribución de las fracciones) con los sueros humanos, nosotros utilizamos la denominación usual en el hombre, sin que ello presuponga identidad entre las fracciones.

Nos ha sorprendido en gran manera la notable diferencia cuantitativa existente respecto a las proteínas plasmáticas entre dos especies sumamente próximas, pertenecientes a la misma familia.

Estas diferencias observadas no pueden atribuirse a diferencias individuales dentro de cada especie, que deben descartarse en nuestro caso, puesto que cada muestra de sangre constituye la mezcla de sangres de varios ejemplares (promedio de unos 50). Igualmente, las diferencias observadas en la carpa por DRILHON (4) referentes a sexo, ayuno y época de recolección, no pueden ser observadas en nuestro estudio por idéntico motivo, y porque las muestras de las dos especies han sido recogidas paralelamente en un período de 5 meses (de junio a octubre); por lo tanto, debemos considerar como específicas las diferencias que hemos hallado entre los sueros de ambas especies.

La identidad de las distintas fracciones encontradas en estos peces con las correspondientes de los sueros humanos, es un problema que se nos ha planteado a lo largo de este trabajo y cuya solución creemos que puede tener cierto interés. Pensamos abordar esta cuestión en un futuro próximo, obteniendo globulina gamma por fraccionamiento con hiposulfito (previa corrección de dicha curva de fraccionamiento) y observando su comportamiento electroforético, así como llevando a cabo su estudio inmunológico frente a sueros con anti-gamma humana.

Resumen

Se han estudiado varias muestras de suero de dos especies de peces de agua dulce (*Leuciscus cephalus*, L. y *Barbus fluviatilis*, Cuv) siguiendo las técnicas de electroforesis en papel y fraccionamiento con hiposulfito sódico, descritas para las proteínas plasmáticas humanas. Se observa una clara discrepancia entre los resultados obtenidos con ambos métodos.

Son notables las diferencias cuantitativas entre los diagramas electroforéticos obtenidos con los sueros de las dos especies, hecho que destaca en gran manera, dada la afinidad taxomónica entre las mismas.

Se discute la identidad de las fracciones halladas en estos peces con las usuales en un suero humano, y se sugiere una forma para investigar dicho problema.

Summary

Study on serum proteins of fresh-water fishes, *Leuciscus cephalus*, Cuv. and *Barbus fluviatilis*, L.

A study was made on the plasma proteins of two fresh-water fish (*Leuciscus cephalus*, Cuv. and *Barbus fluviatilis*, Cuv.) belonging to the family of Ciprinides. Schneider's technique (11) for paper electrophoresis was utilized, and also a method of protein fractionation with sodium hyposulphite both described for use in human sera.

The blood was collected by cardiac puncture for each sample 50 specimens were needed (their size was 10-20 cms.) to obtain a sufficient volume of serum.

The sera of the two species studied show a blood protein oscillating between 27 and 38 grammes per 1000, which agrees with the values given in the bibliography.

In the fractionations with hyposulphite as in the electrophoretic diagrams, we have used the denomination of fractions usual in man, although without assuming that they are identical.

On the *Leuciscus* serum protein fractionation with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Table I), was realized in five samples of serum (each one is a mixture of 50 sera), the average values being : Alb. = 20'16 ; α glob. = 8'03 ; β glob. = 1'78 ; γ glob. = 2'43.

In the electrophoretic pattern obtained on the serum of *Leuciscus* the albumin, the α zone, and the γ globulin can be differentiated, while the α_2 and β are shown as one fraction (figure 2) although in some cases they appear to show the beginning of a separation into two.

In the patterns of *Barbus*, 5 fractions are observed : albumin, α_1 , α_2 , β and γ (figure 1).

The average values for the different fractions in the two species are the following :

Leuciscus : Alb. 12'40 ; $\alpha_2 + \beta$ glob. = 12'67 ; γ glob. = 10'49.

Barbus : Alb. = 6'29 ; α_1 glob. = 0'35 ; α_2 glob. = 2'58 ; β glob. = 4'35 ; γ glob. 16'09.

Marked quantitative differences between the two species can be clearly appreciated by the albumin/gamma globulin relation (Table II) which is rather unexpected in species of such taxonomic affinity.

Values of the fractions obtained by the protein fractionation method with hyposulphite (Table I) do not agree with those obtained by electrophoresis (Table II), which indicates that the fractionation curve is not applicable to fish without previous correction.

Bibliografía

- (1) ANTONINI, F. M. y PIVA, G. : *Bol. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **28**, 1887, 1952.
- (2) DEUTSCH, H. F. y GOODLOE, M. B. : *J. Biol. Chem.* **161**, 1, 1945.
- (3) DEUTSCH, H. F., MCSHAN, W. H. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 219, 1949.
- (4) DRILHON, A. : *Compt. rend.*, **237**, 1779, 1953.
- (5) GLEASON, Th. L. y FRIEDBERG, F. : *Physiol. Zool.*, **26**, 95, 1953.
- (6) GRAS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **7**, 265, 1951.
- (7) GRAS, J. y SALAZAR, M. : *R. esp. Fisiol.*, **6**, 113, 1950.
- (8) GRAS, J. y SALAZAR, M. : *Laboratorio* **13**, 201, 1952.
- (9) MOORE, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **161**, 21, 1948.
- (10) PLAGNOL, H. y VIALARD-GOUDOU, A. : *Ann. Ins. Pasteur*, **90**, 276, 1956.
- (11) SCHNEIDER, G. : *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1021, 1951.