

Segregación de las variedades roja y Stirling de *Oreochromis niloticus* y del híbrido *O. aureus* x *O. niloticus* (Pisces: Cichlidae) mediante la lectina algal "Giraffina"

Sergio Alvarez-Hernández¹, Graciela De Lara-Isassi¹,
José Luis Arredondo-Figueroa², Ricardo Campos-Verduzco²

¹Laboratorio de Fisiología Aplicada y

²Planta Experimental de Producción Acuícola. Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-535. México, D. F., C. P. 09340.

Alvarez-Hernández, S., G. De Lara-Isassi, J. L. Arredondo-Figueroa y R. Campos-Verduzco, 2001. Segregación de las variedades roja y Stirling de *Oreochromis niloticus* y del híbrido *O. aureus* x *O. niloticus* (Pisces: Cichlidae) mediante la lectina algal "Giraffina". *Hidrobiológica* 11 (2): xx-xx.

RESUMEN

Se utilizó Giraffina, una lectina aislada de *Codium giraffa* (Chlorophyta), para separar dos variedades y un híbrido de tilapias del género *Oreochromis*: *O. niloticus* (variedad roja y Stirling) y rocky mountain, híbrido producto de *O. aureus* x *O. niloticus*. Se obtuvo la sangre de las tilapias por medio de punción cardíaca y los ensayos de aglutinación se realizaron con una suspensión al 2 % de esta sangre, mantenida en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.2. Se obtuvo aglutinación diferencial con Giraffina en el 100 % de los casos. El análisis de los resultados de la aglutinación mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los títulos de aglutinación en el ANOVA de una vía y la prueba de agrupación de medias de Newman mostró la agrupación de las variedades (roja y Stirling), logrando separar al híbrido rocky mountain de éstas. Concluimos que el uso de Giraffina permite segregar variedades de este género, importante recurso alimenticio en México. Por otro lado, la prueba de aglutinación con Giraffina, es sencilla y de bajo costo.

Palabras clave: lectina, Giraffina, segregación, *Codium giraffa*, *Oreochromis*.

ABSTRACT

In order to separate two strains of tilapia (genus *Oreochromis*) of *O. niloticus* (red and Stirling strains) and rocky mountain hybrid (*O. aureus* x *O. niloticus*) the lectin giraffine isolated from *Codium giraffa* (Chlorophyta) was used. Fish blood was obtained by cardiac puncture and prepared as a 2 % suspension in phosphate buffer 100 mM, pH 7.2. At all cases, the lectin giraffine agglutinated the fish blood. The statistical analysis of agglutination results showed significantly differences ($p \leq 0.05$) at single classification analysis of variance. Multiple comparisons among means SNK test shows overlapping between red and Stirling strains, and could separate the hybrid rocky mountain from this group. We can concluded that giraffine can be used as an easy and cheap test for grouping these fishes. This test can aid the researcher to follow correctly the progeny of this fishes, commercially valuable as a food source in Mexico.

Key words: lectin, Giraffine, segregation, *Codium giraffa*, *Oreochromis*.

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas de origen no inmune, en cuya estructura poseen sitios que ligan carbohidratos, lo cual les confiere importantes aplicaciones en diversos campos de la investigación bioquímica, biomédica y clínica (Pusztai, 1991). Las lectinas de fuentes no algales se usan en la tipificación de grupos sanguíneos; como matrices cromatográficas para aislamiento y purificación de moléculas de carbohidratos y otras moléculas que poseen sacáridos simples o complejos en su estructura química; inducción de mitosis en linfocitos humanos y de otros mamíferos; en el examen de los cambios que ocurren en la superficie celular por procesos fisiológicos, patológicos y como moléculas de reconocimiento celular en diversos procesos biológicos (Lis y Sharon, 1986 y 1998).

Las lectinas algales han sido poco estudiadas, en contraste con las casi 500 lectinas purificadas de plantas vasculares (Van Damme *et al.*, 1998), solamente se han purificado y caracterizado parcialmente 22 lectinas de algas de la División Rhodophyta, 13 de Chlorophyta y solo una de Phaeophyta (Álvarez-Hernández *et al.*, 1999). Esta misma carencia de estudios es patente en la investigación de las aplicaciones de lectinas algales. Se ha demostrado la actividad inductora de mitosis de varias lectinas algales sobre los linfocitos de animales y humanos (Criado y Ferreiros, 1983; Hori, *et al.*, 1987; Hori *et al.*, 1988; Lima *et al.*, 1998), aplicaciones bioquímicas (Fabregas *et al.*, 1988a), su interacción con bacterias, hongos y espermatozoides de peces (Fabregas *et al.*, 1988b; Fabregas *et al.*, 1989; Muñoz *et al.*, 1989; Llovo *et al.*, 1993; Melo *et al.*, 1997) y la separación de subespecies o variedades de peces (Muñoz *et al.*, 1987a y b). Esta última aplicación es importante debido a que permite el agrupamiento de algunas especies con similares sitios antigénicos en la superficie de sus eritrocitos.

Los primeros trabajos que utilizaron lectinas de plantas vasculares para identificar diferencias en la aglutinación de varias especies de peces, ha sido comentado por Cushing (1970), refiriéndose a los resultados del trabajo que realizaron Van y Cushing (1966) con el bonito de California (*Sarda chilensis* Cuvier), quienes encontraron diferencias en los títulos de aglutinación utilizando la lectina de la leguminosa *Dolichos biflorus* Linnaeus, este mismo modelo fue aplicado por Utter *et al.* (1964) en eritrocitos de varias especies de *Oncorhynchus*, encontrando variabilidad antigénica. Esta variabilidad también ha sido reportada por Kuhns y Chuba (1986) en varias especies de Ictalúridos. El primer trabajo con lectinas algales que demostró la presencia de receptores sobre la superficie de eritrocitos fue realizado en la carpa común (*Cyprinus carpio* Linnaeus), por Shiomi *et al.* (1981) utilizando la lectina de la Rhodophyta *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. Resultados similares fueron obtenidos

por Fabregas *et al.* (1992) con lectinas algales y 16 especies de peces marinos. El trabajo más reciente sobre separación de subespecies de peces, usando el título de aglutinación fue realizado por Muñoz *et al.* (1987b) con las variedades del lábrido *Labrus bergylta* Ascanius.

Esta aplicación resulta atractiva, desde el punto de vista práctico, debido a que esta prueba constituye un método simple de aplicar, en el que no hay necesidad de sacrificar al animal como es el caso de los estudios de isoenzimas.

Las tilapias introducidas en México son fuente de proteína de fácil adquisición para la población y se consumen con regularidad durante todo el año. Su importancia radica en que esta especie ocupa el tercer lugar en las pesquerías mexicanas con una producción estimada anual de 100,000 toneladas.

Arredondo-Figueroa *et al.* (1994) exponen la problemática de las tilapias en México, afirmando que la producción actual deriva de 75 ejemplares que fueron introducidos a México en diferentes etapas, además comentan que el manejo reproductivo de los organismos no ha sido el adecuado. Hasta el momento se carece de un programa correcto de manejo, las actuales poblaciones presentan problemas de hibridación no controlada, así como un alto índice de endogamia. Esta actividad reproductora sin control provoca una reducción crítica en el intercambio genético de las especies presentes en los cuerpos de agua y tiene como consecuencia una alta probabilidad de producir organismos con deformaciones y más propensos a enfermedades. Lo cual, sin duda puede afectar en corto tiempo sus rendimientos pesqueros y acuícolas.

En el presente trabajo se utilizó la lectina aislada de *Codium giraffa* Silva como una herramienta de carácter inmunológico, para separar dos variedades de tilapia y un híbrido del género *Oreochromis*, cultivadas por varias generaciones en la Planta Experimental de Producción Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa. Es importante destacar que el presente trabajo representa la primera experiencia con peces de la tribu Tilapinií en el mundo.

MATERIAL Y MÉTODO

La recolecta, aislamiento y purificación de la lectina giraffina, se realizó en el laboratorio de Ficología Aplicada de la UAM-Iztapalapa y en el laboratorio de Bioquímica y Bioestructura del Instituto de Química de la UNAM (Álvarez-Hernández *et al.*, 1999). Para los ensayos de aglutinación con eritrocitos de tilapia se trabajó con dos variedades la especie *Oreochromis niloticus*, proveniente del Centro de Investigaciones y Estudios Tropicales de la UNAM "El Clarín", ubicado

en Martínez de la Torre, Veracruz; la línea pura de *Oreochromis niloticus*, conocida como variedad *stirling* proveniente del centro acuícola de Temascal, Oaxaca y *rocky mountain*, un híbrido producto de la cruce entre *O. aureus* x *O. niloticus*, donado por el Centro Acuícola de Zacatepec en el estado de Morelos, México.

Diez ejemplares de cada grupo se mantuvieron en estanques de recirculación contruidos con fibra de vidrio de 1 m³, con biofiltro, bajo condiciones de estabilidad por un período de un mes antes de realizar la prueba. La alimentación, con balanceado comercial, se realizó dos veces al día hasta saciedad y un día antes de la toma de muestra, se suspendió la misma. La sangre de los peces se obtuvo por medio de punción cardíaca, según la técnica publicada por Llovo *et al.* (1987) para *Onchorynchus mykiss* Smith y Stearly. El ángulo de entrada sugerido entre 80 a 90 grados se modificó a 70-80 grados con respecto al plano dorsal, con punto de entrada en el primer cuarto resultante de dividir en cuatro la distancia entre la V opercular y el inicio de las aletas ventrales. También se ajustó la penetración de la aguja en consideración al tamaño del pez. La sangre fue recogida directamente en una jeringa estéril de polipropileno, usando como anticoagulante 1 ml de citrato de sodio al 3 % en solución amortiguadora de fosfatos (PB) 100 mM, pH 7.2.

Para los ensayos de aglutinación se utilizaron eritrocitos nativos (sin tratamiento enzimático) con los cuales se realizó una suspensión al 2 %, siguiendo las recomendaciones de Bennet (1976). Las pruebas se efectuaron por triplicado en placas de microtitulación, realizando diluciones dobles seriadas de 20 µl de lectina en el mismo volumen de PB, finalmente se añadieron 20 µl de la suspensión de eritrocitos. Las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente por dos horas y seguidamente se registró el título de aglutinación bajo el microscopio óptico.

Los resultados fueron sometidos a la Prueba de Bartlett (Steel y Torrie, 1988), posteriormente se realizó un ANOVA de una vía, para enseguida agrupar medias con la prueba de Newman. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica, versión 4.5 para Windows.

RESULTADOS

En la tabla 1 se reportan los resultados de la prueba de aglutinación de los eritrocitos de las variedades y el híbrido mencionados frente a la lectina giraffina. En esta tabla se observan los resultados como la media de tres repeticiones de la máxima dilución que aglutinó los eritrocitos y como título (recíproco de la máxima dilución doble). No se presentaron diferencias en los títulos de aglutinación de ninguna de las tres repeticiones.

Tabla 1. Media de los resultados de las pruebas de aglutinación con eritrocitos de tilapias. Los resultados se muestran en forma de título (izquierda) y en la dilución correspondiente (derecha).

No. de Ejemplar	<i>Oreochromis niloticus</i> (variedad roja)	<i>O niloticus</i> x <i>O. aureus</i> (híbrido Rocky Mountain)	<i>O. niloticus</i> (Stirling)
1	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁸ 256
2	2 ⁹ 512	2 ¹¹ 2048	2 ⁸ 256
3	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁹ 512
4	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁹ 512
5	2 ¹⁰ 1024	2 ¹¹ 2048	2 ⁹ 512
6	2 ¹⁰ 1024	2 ¹² 4096	2 ⁹ 512
7	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁸ 256
8	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁸ 256
9	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁸ 256
10	2 ⁹ 512	2 ¹² 4096	2 ⁸ 256

La prueba de homogeneidad de varianzas permitió concluir que los datos presentaron una distribución normal, por lo que se procedió a aplicar el ANOVA usando como vía de clasificación las medias de aglutinación. Este análisis mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$). En la figura 1 se muestra la gráfica de agrupación de medias obtenida en la prueba de Newman ($p \leq 0.05$), donde se destacan los grupos con medias similares y los que se separaron, particularmente el híbrido *rocky mountain* el cual se segregó totalmente de las dos variedades de *Oreochromis niloticus* (roja y *stirling*).

DISCUSIÓN

En coincidencia con los resultados obtenidos por Fabregas *et al.* (1992), donde reporta la aglutinación de los eritrocitos de 16 especies de peces marinos con extractos de 70 macroalgas y destaca la acción aglutinante de *Codium tomentosum* (Hudson) Stackhouse, esto los llevó a purificar y

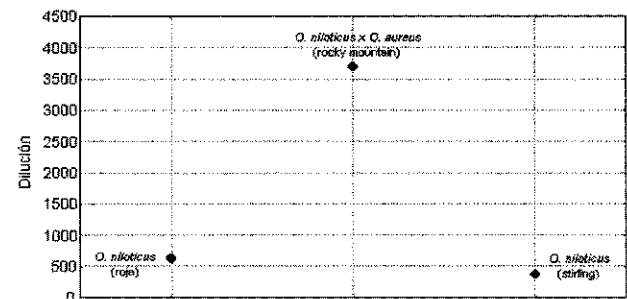


Figura 1. Gráfica del promedio de aglutinación de cada grupo. $F(2, 18) = 117.75$; $p > .0000$

caracterizar la glicoproteína "tomentina" (Fabregas *et al.*, 1988c), ambas con características morfológicas similares, hecho discutido en Alvarez-Hernández *et al.* (1999). En nuestro caso, al igual que la tomentina en España, la giraffina aglutinó diferencialmente y en todos los casos a los eritrocitos de las variedades de *Oreochromis* sp. Cabe destacar que solamente las proteínas aisladas de *C. tomentosum* y *C. giraffa* han sido usadas con este propósito, no obstante que en 10 especies del mismo género han sido aisladas y caracterizadas lectinas (Alvarez-Hernández *et al.*, 1999).

La separación del híbrido rocky mountain con respecto a las variedades roja y stirling fue estadísticamente significativa, éstas últimas formaron un grupo con similares títulos de aglutinación, por lo que la lectina falló en segregarlas. Lo anterior puede deberse a que estas dos variedades están relacionadas estrechamente en cuanto a sus características genéticas, por lo que comparten similares sitios antigénicos sobre la superficie de sus eritrocitos.

Tong y Wu (1993), afirman que al utilizar sueros heteroinmunes y lectinas, se facilita el reconocimiento de grupos sanguíneos en los peces. Sin embargo, en algunos casos, estos reactivos son incapaces de reaccionar con la sangre de estos vertebrados. Por su parte, Ingram (1985) y Fabregas *et al.* (1985) exponen que las diferencias en el contenido aglutinante de las macroalgas pueden deberse a los estadios de maduración o de las diferentes fases del ciclo de vida del alga, esto no ha sucedido con las dos lectinas comentadas anteriormente, su propiedad de aglutinación permanece constante. En los resultados obtenidos con la giraffina se observa constancia en el fenómeno de aglutinación, no solo con eritrocitos de peces, sino también con los de origen humano de los grupos O, A, B, AB positivos y de conejo (De Lara-Isassi *et al.*, 1996). Esta propiedad puede permitir que la giraffina pudiera ser considerada como un reactivo complementario de aplicación en la investigación de la variabilidad antigénica de los eritrocitos de las tilapias, la detección de las modificaciones de los sitios antigénicos debida el estado de madurez o condiciones del ambiente en el que se desarrollan estas variedades y fundamentalmente en la agrupación de organismos que compartan características similares de respuesta en su sangre frente a la lectina.

Con los resultados obtenidos, reforzamos la hipótesis de Sindermann (1962), que señala que éstas proteínas pueden ser consideradas para formar parte de una batería de herramientas serológicas aplicables en la investigación de pesquerías y de utilidad en la acuicultura, para identificar demoes o variedades de peces.

Además, es importante considerar que con esta prueba no hay necesidad de sacrificar a los organismos y por tanto,

se puede tener un seguimiento de las variedades genéticas de los mismos durante varias generaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores hacen patente el agradecimiento al M. en C. Kurt Dreckmann por su asesoría y valiosos comentarios que permitieron mejorar el contenido fundamental del presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- ALVAREZ-HERNÁNDEZ, S., G. DE LARA-ISASSI, R. ARREGUÍN-ESPIÑOZA, P. ARREGUÍN, A. HERNÁNDEZ-SANTOYO y A. RODRÍGUEZ-ROMERO, 1999. Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. *Botanica Marina* 42: 573-580.
- ARREDONDO-FIGUEROA, J. L., V. F. FLORES-MUÑOZ, F. H. GARDUÑO-ARGUETA y R. CAMPOS-VERDUZCO, 1994. *Desarrollo Científico y Tecnológico del banco de genoma de tilapia*. Convenio SEPECSA/UAMI. México, 89 p.
- BENNET, D. L., 1976. *Serología clínica*. Editorial Panamericana, Argentina, 224 p.
- CRIADO, M. T. y C. M. FERREIROS, 1983. Immunomodulatory effect produced in mice by a complex-carbohydrate specific lectin-like mucopolysaccharide from *Fucus vesiculosus*. *IRCS Med. Sci.* 11(3): 286-287.
- CUSHING, J. E. 1970. Immunology of Fish. En: NEUHAUS O. W. y HALVER J. E. (Eds.). *Fish Physiology*. Vol. IV. Academic Press. Londres, pp. 465-500.
- DE LARA-ISASSI, G., S. ALVAREZ-HERNÁNDEZ y K. DRECKMANN, 1996. Hemagglutinating activity in extracts of some marine Mexican algae. *Cryptogamie, Algologie* 17(4): 265-267.
- FABREGAS, J., J. LLOVO y A. MUÑOZ, 1985. Hemagglutinins in red seaweeds. *Botanica Marina* 28: 517-520.
- FABREGAS, J. A. MUÑOZ, J. LLOVO y A. CARRACEDO, 1988a. Tomentine: A lectin for the detection of glycoprotein polymorphism. *Medical Science Research* 16: 819-820.
- FABREGAS, J., J. LLOVO y A. MUÑOZ, 1988b. Agglutination activity of algal extracts against spermatozoa of the fish *Dilodus sargus* L. *Nippon Suisan Gakkaishi* 45(12): 2121-2126.
- FABREGAS, J., A. MUÑOZ, J. LLOVO y A. CARRACEDO, 1988c. Purification and partial characterization of tomentine. An N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 124: 21-30.

- FÁBREGAS, J., A. MUÑOZ, J. LLOVO y T. G. VILLA, 1989. Differentiation of *Candida guilliermondii* varieties by lectin-like substances from marine algae. *Research in Microbiology* 140: 373-378.
- FÁBREGAS, J., A. LÓPEZ, J. LLOVO y A. MUÑOZ, 1992. A comparative study of seafish erythrocytes and agglutinins from seaweeds. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103A(2): 307-313.
- HORI, K., H. MATSUDA, K. MIYAZAWA y K. ITO, 1987. A mitogenic agglutinin from the red alga *Carpopeltis flabellata*. *Phytochemistry* 26(5): 1335-1338.
- HORI, K., S. IKEGAMI, K. MIYAZAWA y K. ITO, 1988. Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Soliera robusta*. *Phytochemistry* 29(7): 2063-2067.
- INGRAM, G. A., 1985. Lectins and lectin-like molecules in lower plants. I. Marine algae (review). *Development in Comparative Immunology* 9: 1-11.
- KUHNS, W. J. y J. CHUBA, 1986. Intrageneric blood group differences between Ictalurids (fresh water catfishes). *Federation Proceedings* 27: 491.
- LIMA, H. C., F. H. F. COSTA, A. H. SAMPAIO, S. A. NEVES, N. M. B. BE-NEVIDES, D. I. A. TEIXEIRA, D. J. ROGERS y A. L. P. FREITAS, 1998. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. *Journal of Applied Phycology* 10: 153-162.
- LIS, H. y N. SHARON, 1986. Biological properties of lectins. En: LIENER I. E., N. SHARON y I. J. GOLDSTEIN (Eds.). *The lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine*. Academic Press. Orlando, pp. 265-291.
- LIS, H. y N. SHARON, 1993. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Review* 93: 637-674.
- LLOVO, J., A. MUÑOZ, M. ROMARIS y J. FÁBREGAS, 1987. Obtención de sangre de peces mediante punción cardíaca. *Cuadernos Marisqueros. Publicación Técnica* 12: 261-266.
- LLOVO, J., A. LOPEZ, J. FÁBREGAS y A. MUÑOZ, 1993. Interaction of lectins with *Cystosporidium parvum*. *The Journal of Infectious diseases* 167: 1477-1480.
- MELD, V.M.M., D.A. MEDEIROS, F.J.B. RIOS, L.I.M. CASTELAR y A.DE E.F.U. CARVALHO. 1997. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux. *Botanica Marina* 40: 281-284.
- MUÑOZ, A., J. LLOVO, M. ROMARIS y J. FÁBREGAS, 1987a. Presencia de receptores para aglutininas algales sobre la superficie de eritrocitos de peces. *Cuadernos Marisqueros. Publicación Técnica* 12: 245-250.
- MUÑOZ, A., J. LLOVO, M. ROMARIS y J. FÁBREGAS, 1987b. Utilización de aglutininas de algas marinas como un nuevo criterio de diferenciación de las libreas de *Labrus bergylta* Ascanius. *Cuadernos Marisqueros. Publicación Técnica* 12: 251-256.
- MUÑOZ, A. C., J. T. LLOVO y J. C. FÁBREGAS, 1989. Lectinas: reactivos de diagnóstico en Microbiología Clínica. *Revista Española de Microbiología Clínica* 4(7): 409-416.
- PUSZTAI, A., 1991. *Plant lectins*. Cambridge University Press. Cambridge, 263 p.
- SHIOMI, K., H. YAMANAKA y T. KIKUCHI, 1981. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47(8): 1079-1084.
- SINDERMANN, C., 1962. Use of plant hemagglutinins in serological studies of clupeoids fishes. *Fishery Bulletin* 63: 137-141.
- STEEL, R. D. y J. H. TORRIE, 1988. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Segunda edición. McGraw-Hill/Interamericana. México, D. F., 622 p.
- TONG, J. y C. WU, 1993. Study on the blood type factors in red crucian carp (*Carassius auratus* var.). *Aquaculture* 111: 129-138.
- UTTER, F. M., G. J. RIDWAY y H. O. HODGINS, 1964. Use of plant extracts in serological studies of fish. U. S. *Fish and wildlife service, special scientific report, Fisheries No.* 472: 1-6.
- VAN, D. C. y D. E. CUSHING, 1966. Reactions of the lectin from *Dolichos biflorus* with erythrocytes from California bonito, *Sarda chilensis*. *Federation Proceedings* 25: 437.
- VAN DAMME, J. M. E., W. J. PEUMANS, A. PUSZTAI y S. BARDOZ, 1998. *Handbook of plant lectins*. John Wiley & Sons, Inglaterra, 452 p.

Recibido: 26 de septiembre de 2000.

Aceptado: 7 de febrero de 2001.