ISBN 970-27-1045-6

LAS POLIAMINAS COMO INDICADORES DE ESTRÉS EN TILAPIA *(OREOCHROMIS SPP)*

Anne Santerre Lucas, Ramón Reynoso Orozco, Eneida Araceli López Arias.

Laboratorio de Biomarcadores y Genética Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular

Introducción

Las poliaminas son un grupo de sustancias básicas de bajo peso molecular que están presentes prácticamente en todas las células procarióticas, eucarióticas con muy pocas excepciones. Desempeñan múltiples funciones esenciales tanto en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como en la proliferación y diferenciación celular. Su flexible esqueleto alifático y su naturaleza policatiónica con cargas positivas distanciadas entre sí (Figura 1), les permite interactuar con diferentes regiones de macromoléculas o estructuras cargadas negativamente como el DNA, RNA, nucleoproteínas, fosfolípidos, partículas ribosomales y membranas celulares, lo que explica su participación en procesos tan diversos. La determinación de los niveles de poliaminas y de la Ornitina descarboxilasa (ODC) una de las enzimas limitantes, que cataliza el primer paso de su biosíntesis durante el ciclo celular indica que aumentan significativamente en la interfase G1/S y durante G2 del ciclo celular. Lo cual confirma su importancia en la fisiología de la célula[3].

$\mathbf{H_2N}$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$\mathbf{NH_2}$ Putrescina

$\mathbf{H_2N}$-CH_2-CH_2-CH_2-$\mathbf{NH}$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$\mathbf{NH_2}$ Espermidina

$\mathbf{H_2N}$-CH_2-CH_2-CH_2-$\mathbf{NH}$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$\mathbf{NH}$-CH_2-CH_2-CH_2-$\mathbf{NH_2}$ Espermina

Figura 1. Estructura de poliaminas Justificación

La síntesis de poliaminas en células eucarióticas, se inicia con la descarboxilación del aminoácido ornitina para producir putrescina en una reacción catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). La putrescina a su vez puede añadir uno o dos grupos aminopropilos formando espermidina o espermina, respectivamente (Figura 2). En estos casos el dador de grupos aminopropilos es el compuesto S-adenosil metionina descarboxilado que se forma a partir de S-adenosil metionina. Existe la degradación intracelular de poliaminas, que se inicia por un proceso de reconversión que consiste en dos etapas: acetilación y posterior oxidación, o una reacción directa de oxidación[3].

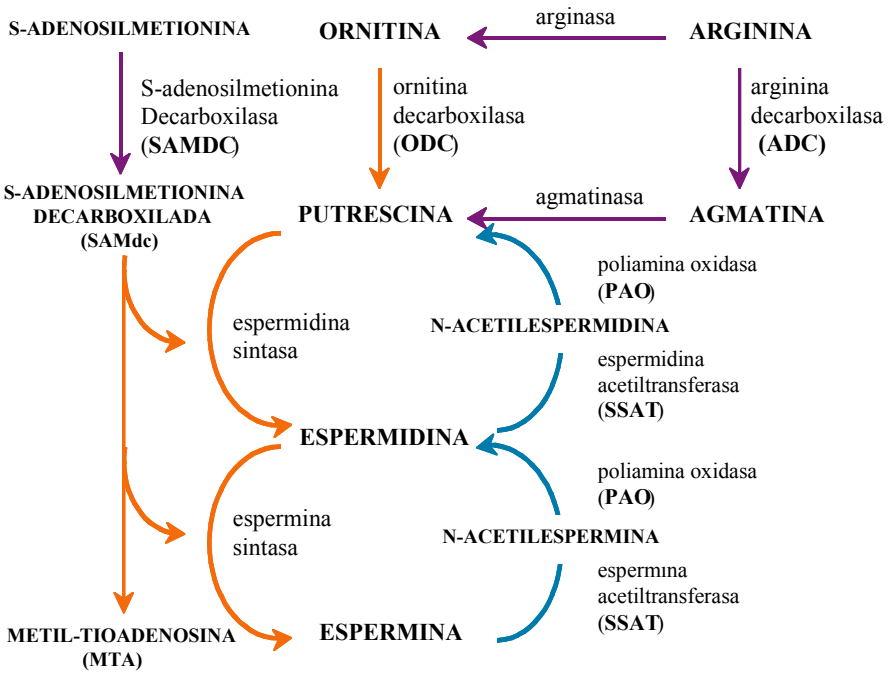


Figura 2. Metabolismo general de las poliaminas. Tomado de Algranati, 2006.

Un aumento en la actividad de la ODC significa un aumento en los niveles de poliaminas y debido a que se encuentran en todas las células, es factible el utilizarla como bio-indicadoras de estrés. Las células que son estimuladas para reproducirse muestran incrementos iniciales en las enzimas biosintéticas de las poliaminas y subsecuentemente elevación en los niveles de poliaminas. La concentración de las poliaminas en los fluidos extracelulares refleja los eventos intracelulares son útiles como indicadores rápidos en desórdenes fisiológicos que alteran el crecimiento (Jevanandam, 2001).

El pez tilapia (*Oreochromis spp.*) se cultiva en todos los continentes, a través de todo el mundo, entre ellos México y es una especie originaria de África e introducida en nuestro país en 1964. Es uno de los grupos de peces con mayor futuro económico en cultivos comerciales y para programas de subsistencia alimentaría (nutritiva por su alto contenido de omega 3 entre otras) en virtud a sus cualidades de fácil cultivo y rápido crecimiento; por sus hábitos alimenticios, ya que son omnívoros con buena taza de conversión de alimento, tienen gran resistencia física, sobre todo a enfermedades, elevada productividad, amplia tolerancia a desarrollarse en condiciones de alta densidad, habilidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno en aguas salinas, además de su capacidad de nutrirse a partir de una gran variedad de alimentos naturales y artificiales [4,5].

Las condiciones de estrés a las que algunas veces son sometidos pueden considerar modificaciones en sus actividades, tanto conductuales como de alimentación reproducción y capacidad de competencia. [6] Se ha reportado como marcador de estrés en Tilapia los niveles de cortisol y glucosa en plasma (Nolan, 1999). En el presente trabajo proponemos a las poliaminas Putrescina, Espermidina y Espermina como Biomarcadores de estrés en tilapias cultivadas en estanques, así como en presas del estado de Jalisco.

La cromatografía es el método analítico más utilizado para separar, identificar, y cuantificar rápidamente moléculas dentro de una muestra, y la de intercambio iónico para el análisis de poliaminas como Pu, Spd y Spm.

La cromatografía de intercambio iónico consiste en separar moléculas que difieren en carga neta de manera que los iones se fijan a la resina específica para la molécula blanco, desplazando así, a dichas moléculas, esta resina modificada contiene cadenas cubiertas por grupo amino ($NH3^+$) o carboxilo (COO^-) a pH neutro [1,2]. Dicha técnica ha demostrado su aplicación en el seguimiento de neoplásias, en el modelo de Linfoma murino L5178Y [7] y en pruebas preliminares ha mostrado factibilidad de análisis en el modelo de tilapia.

Objetivo

Establecer los niveles de poliaminas Putrescina, Espermidina y Espermina como marcadores de estrés en diferentes tejidos de tilapia.

General

Utilizar a las poliaminas como indicadores de estrés en tilapia por medio de la técnica cromatográfica de intercambio iónico.

Objetivos Particulares

Estandarizar el método para el análisis de las poliaminas en distintos tejidos de tilapia.
Determinar los niveles de poliaminas en Branquias, músculo, Bazo de tilapia.
Comparar los niveles de poliaminas en tilapia con y sin tratamiento.

Material y Métodos

Grupos de estudio

Las tilapias son traídas de estanques naturales, así como de presas ubicadas en distintas regiones de nuestro estado, con una n de 5 animales por grupo donde el grupo 1 corresponde a animales sacrificadas de manera inmediata, grupo 2 peces que se sacrifican al llegar al laboratorio (efecto del traslado), grupo 3 peces que se conservan durante algunos días en peceras (aclimatación) y posteriormente sacrificadas y grupo 4 peces sometidas a tratamientos de estrés con pesticidas (Atrazina); utilizando los tejidos de las branquias, músculo y bazo.

Una vez que son sacrificadas se obtienen muestras de Branquias retirando el cartílago, músculo sin la piel y el bazo, se pesa cada muestra y se macera en un mortero con una solución de TCA-HCL en una proporción de 1 L TCA-HCL/1 mG de muestra.

Una vez obtenido el macerado se somete a centrifugación, 13000rpm/20min a una temperatura de 4oC para extraer el sobrenadarte centrifugarlo nuevamente en la centrifuga rápida por 2 min más.

La inyección de la muestra se realiza con 80 L de muestra y 20 L de TCA-HCl para un total de 100 L. Las inyecciones se realizan en duplicado.

Parámetros cromatografitos

Se utiliza un analizador automático con dos bombas de flujo continuo y controlado, fluorometro (Shimatzu) y muestreador automático con bucle de 100 L de volumen (Spectra Physics).

El análisis de PAs se realizará por cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna con ortoftalaldehído (OPA). La resina de intercambio catiónico (BC X-12, marca Benson, Reno, Nevada, USA) fue cargada con el catión litio (Li^+), e introducida a la columna con el amortiguador a base de hidróxido de litio (LiOH). El Li^+ ocupa los sitios de unión en la resina y será desplazado por las PAs. Las PAs entrarán en contacto con el grupo funcional de la resina mezcladas con el amortiguador de citratos, a un pH de 8.4 (amortiguador I) el cual favorecerá el desplazamiento del Li^+ y la interacción de las PAs. Al hacer pasar a través de la columna al amortiguador con pH de 6.1 (amortiguador II, el cual es bajo en pH y alto en concentración de sales) se introducirá una gran cantidad de protones (Li^+) que desplazarán a las PAs al competir por los mismos sitios de interacción en la resina. Las moléculas (PAs) abandonaron serialmente la columna y se mezclarán con el OPA para entrar al detector de fluorescencia. La reacción entre PAs y el OPA forma un producto químico isoindol sustituido llamado 1-alkiltio-2-alkil, el cual es fluorescente y es detectado en la celda del fluorómetro, que trabaja a una longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión de 452 nm. La técnica utilizada fue validada (Delgado-Saucedo, 2003) y el límite de cuantificación se determinó entre 50 y 500 *p*moles.

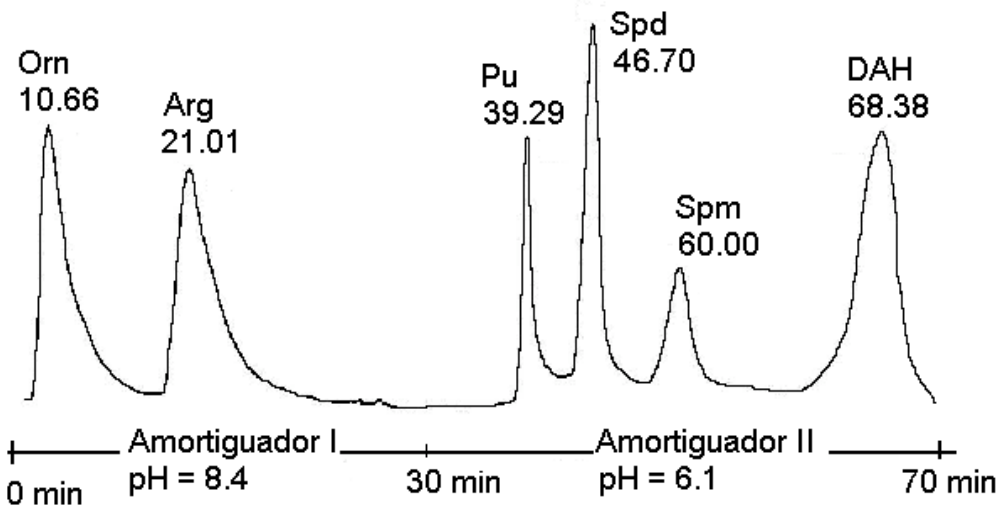
La separación de las poliaminas se realizará en una columna de vidrio con temperatura controlada (73 ^{0}C) que contiene una resina de intercambio catiónico BENSON BC X-12 (0.4 cm de diámetro x 9 cm de altura) y utilizando 2 amortiguadores de elusión (tabla x). La primer solución eluyente (solución I) a base de citratos (citrato de litio 0.4 N + ácido bórico 0.3 N + cloruro de potasio 0.12 N + ácido caprílico al 0.01% + 2.5% de etanol) con un pH final de 8.45, se pasó a través de la columna durante 30´. La segunda solución amortiguadora también a base de citratos (citrato de litio 0.6 N + cloruro de potasio 2 N + 5.5% de etanol) con un pH final de 6.1, se hará pasar por 40 min. La resina se lavará y regenerará durante 10 min con una solución de hidróxido de litio 0.3 N. Finalmente la columna se reequilibrará con la solución I durante 10 min.

Los amortiguadores se prepararán con agua tipo III (Elix 5. Millipore) filtrada sobre membrana Millipore (tipo HA 0,45 m, Millipore, Francia). Se llevarán al pH deseado con HCl concentrado (12N) o con una solución de hidróxido de litio 3M. El etanol se añade después de la filtración.

*El pH fue modificado del método original utilizado por Villanueva et al. (1978), con el fin de obtener una buena separación de las poliaminas en el cromatograma, encontrando el indicado en este caso de 6.10.

El reactivo de fluorescencia se preparará al disolver 800 mg de ortoftalaldehido (Sigma, St Louis-Missouri-USA) en 10 ml de etanol y 2 ml de 2-mercaptoetanol. La mezcla se lleva a un litro de solución de ácido bórico 0.2 M y el pH se ajusta 10.4 finalmente se le adicionará 3 ml de Brij 35 (Sigma, St Louis-Missouri-USA) al 30%. El sistema fue calibrado y validado (Delgado-Saucedo, 2003) utilizando estándares comerciales. El primer amortiguador eluye a los aminoácidos ornitina (Orn) y arginina (Arg), el segundo amortiguador eluye, la putrescina, la espermidina, la espermina, así como el estándar interno el 1-7 diaminoheptano (Merck, Darmstadt, Alemania). Los otros componentes químicos utilizados para la preparación de los amortiguadores y reactivos son comercializados por Merck, Darmstadt, Alemania.

Los resultados se expresarán en nanomoles por mg de tejido según sea el caso.



Cromatograma del sistema cromatográfico con los picos representativos de los estándares.

Bibliografía

Harvey Lodis et all., Biología celular y molecular. Ed. Panamericana 4ta edición.
Robert Roskosky Jr. 1998. Bioquímica. Ed. McGraw Hill.
I.D.Algranati, M.P.Serra, C.Carrillo y N.S.González. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*., *http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/algranati.htm* Publicación: 9/08/06 (consulta: 23/10/06)
Martin N. Ramirez Dávila. 1995. Estudio de la respuesta inmune celular *in Vitro* de 2 especies de tilapia *Orechromis niloticus O.mossambicus*. Tesis de licenciatura.
N. Maclean et all. 2002. Transgenic tilapia and the tilapia genome. Gene (265, 266).
Luis Ocampo. 1999 Diagnóstico de estrés en peces. Articulo de revisión
Ramón Reynoso.2004. Las poliaminas como biomarcadores del desarrollo neoplásico y el efecto de *Bursera fagaroides* sobre su metabolismo. Tesis doctoral.
D.T. Nolan. 1999. ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Orechromis mossambicus* (Peters), to net confinement. Aquaculture.
Jeevanandam, 2001. current opinión in clinical nutrition an metabolic care. Review article