

Identificación de componentes de las burbujas protectoras producidas por el macho del pez betta (*Betta splendens*)

Identification of bubble's protective components produced by male betta fish (Betta splendens)

Laura Elena Borrego-Enríquez, Fernando García-Gil de Muñoz,
José Pablo Orduña-Villalobos, David Villeda-Cuevas,
Esthepania Rustrián-Fernández y Dilan Rogelio Ramírez-Martínez
Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México
lborrego@bolivar.usb.mx
fgarcia@bolivar.usb.mx
peblo66@gmail.com
dorovis@hotmail.com
estephania08@gmail.com
dyl_retrovirus@hotmail.com

Recepción: 28 de junio de 2013
Aceptación: 07 de noviembre de 2013
(pp. 145 - 149)

Resumen

El pez betta (*Betta splendens*) pertenece a la familia Anabantidae y se encuentra dentro de las 20 especies de ornato más vendidas en todo el mundo. Los machos cuando llegan a su madurez sexual producen por medio de la saliva un nido de burbujas cuya composición y función biológica aún se desconocen. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar algunos componentes que conforman las burbujas y relacionarlos con moléculas descritas en otras especies para encontrar posibles funciones. Las muestras de las secreciones se aislaron a partir de 6 machos en condiciones de cultivo, se lisaron en presencia de un amortiguador con detergente SDS al 10%. Las muestras se corrieron por electroforesis unidimensional en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas identificadas poseen un peso molecular entre 63-65 kDa, las cuales se analizaron por el método de espectrometría de masas. Los resultados fueron analizados por herramientas bioinformáticas disponibles en el portal www.expasy.org. Los resultados del análisis mostraron similitud con 2 proteínas, la proteína intracelular de 63.8 kDa que tiene función de regulación genética "Zinc-finger"; y la proteína Amiloride de canales catiónicos, intramembranal de 62.4 kDa que funciona como canal de transporte de iones de sodio, afines con una especie de la familia Ciprinidae, *Danio rerio*.

Palabras clave: *Betta splendens*, burbujas, proteínas

Abstract

Betta fish (Betta splendens) is a member of the Anabantidae family, and it is found among the 20th more sold ornate species around the world. When males reach sexual maturity, produce through their spit a nest made of bubbles which composition and biological function remain unknown. The objective of this work is to identify some of the components that build up the bubbles and relate them with molecules previously identified in other species to find their possible functions. Samples of 6 male's secretions were taken in culture

conditions. They were lysed immediately in a buffer containing a 10% SDS detergent, and ran under denaturalizing conditions in electrophoresis. The identified proteins have a molecular weight between 63-65 kDa, which were analyzed using the mass spectrometry method. The obtained results were analyzed using bioinformatics tools available at www.expasy.org. The analysis showed a similarity with 2 proteins, the 63.8 kDa intracellular protein "Zinc finger" and the intramembranal "cationic channels Amiloride" protein, which function is to transport sodium ions, alike with a member of the Ciprinidae family, *Danio rerio*.

Keywords: *Betta splendens*, bubbles, proteins

Introducción

La Acuicultura ornamental es una actividad productiva que ha tenido un gran crecimiento en los últimos 15 años. En México se comercializan más de 43 millones de peces de agua dulce que producen aproximadamente mil 650 millones de pesos al año (Carabias, Landa, Collado y Martínez, 2005).

De las más de 4 mil especies de ornato que se comercializan a nivel mundial, los peces betta se encuentran dentro de las 20 especies más vendidas (Ramírez, Mendoza y Aguilera, 2010).

El pez betta (*Betta splendens*) pertenece a la familia Anabantidae, los machos cuando llegan a la madurez sexual fabrican por medio de la saliva un nido de burbujas, 48 horas después de la puesta el macho toma cada huevecillo y lo coloca en el nido hasta el momento de la eclosión. Las burbujas producidas por el pez presentan gran tensión superficial y ofrecen protección física a los huevecillos (Axelrod, 2007).

El bajo porcentaje de infección que los huevecillos presentan, hace suponer que las burbujas pudieran contener algunas sustancias antibacteriana o anti-fúngica e incluso estar relacionadas con la inmunidad natural de la especie.

El sistema inmune ha desarrollado diferentes métodos para discriminar moléculas propias de moléculas extrañas (Rojo, Castelruiz, Estonba y Pardo, 2005). En los peces el sistema inmunitario se constituye en la sangre, piel y la mucosa gastrointestinal en donde el pH ácido impide la proliferación de microorganismos.

En el pez *Betta splendens*, las burbujas son formadas en el sistema gastrointestinal, particularmente en los órganos faríngeos (Kang y Lee, 2010) y si bien se reconocen como el elemento fundamental del nido, la com-

posición y función biológica de las burbujas producidas por el macho de esta especie aún son desconocidas.

Por tanto, el propósito de este trabajo fue el de identificar algunos de componentes de estas burbujas. Los resultados de este estudio podrían iniciar otros trabajos enfocados a la elaboración de sustancias, que puedan proteger y optimizar el desarrollo de las crías de otras especies de importancia en la acuicultura.

Objetivo

Identificar algunos componentes de las burbujas protectoras que produce el macho, de la especie *Betta splendens* y relacionarlos con moléculas descritas en otras especies para encontrar posibles funciones inmunológicas.

Método

Los peces betta machos y hembras se aclimataron durante 4 días en acuarios separados, durante este periodo y el de experimentación los peces se mantuvieron sin aereación a pH neutro, temperaturas entre 24 y 26 °C, con luz artificial por 8 horas y se alimentaron con alimento balanceado.

Para la obtención de las burbujas se permitió a los machos visualizar a las hembras, sin tener contacto directo con ellas. Las burbujas se retiraron de manera mecánica en dos etapas, en la primera a partir de 4 machos y en la segunda de dos. Inmediatamente después de colectadas las muestras se lisaron en presencia de un amortiguador con detergente SDS

al 10%; se centrifugaron y se recuperaron los empastillados a los cuales se les agrego 2 µl de DTT 0.1 M (pH 8.0). Se corrieron las muestras por electroforesis unidimensional en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se identificaron las bandas de proteínas en geles de acrilamida para su caracterización.

Las bandas más representativas fueron enviadas al CISEI en Cuernavaca y a la universidad nacional de Colombia en su unidad de proteómica para realizar pruebas de MALDI-TOF- Fingerprinting.

Los resultados fueron analizados con herramientas bioinformáticas disponibles en el portal www.expasy.org. (web.expasy.org/findpept).

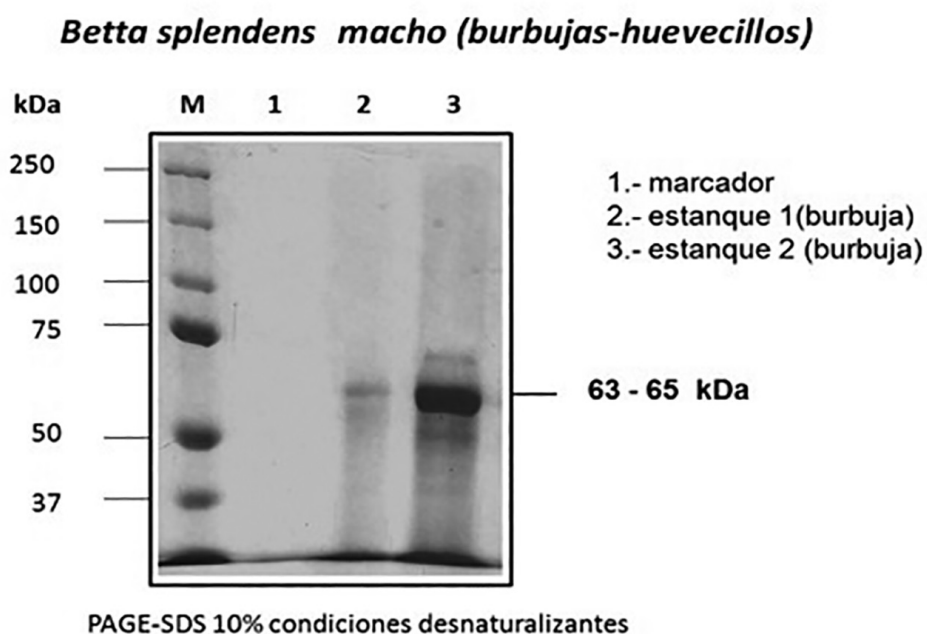
Resultados y discusión

En la acuicultura ornamental se presenta alrededor del 10% de pérdidas económicas producidas por enfermedades infecciosas en las crías de peces (Damo, 2005), un método para reducir el impacto de estas enfermedades es aumentar la resistencia del hospedero (Rojo, 2005). Esta resistencia del hospedero se puede observar en las burbujas producidas por el macho del pez betta, que ofrecen doble protección a los huevecillos, por un lado, protección física debida a la alta tensión superficial que presentan y por otro lado por el bajo porcentaje de infección con hongos y bacterias que se registra en los huevecillos hasta el momento de la eclosión.

Las burbujas son producidas en el sistema gastrointestinal, particularmente en los órganos faríngeos (Kang y Lee, 2010) del pez betta por lo que se infiere que el porcentaje bajo de infección de los huevecillos está relacionado con la inmunidad natural del pez. No se cuenta con información que describan los componentes de las burbujas, por lo que este trabajo se enfocó a caracterizar los componentes presentes en ellas.

Los resultados de la caracterización de las proteínas presentes en las burbujas producidas por el macho del pez betta, se muestran en la figura 1, se puede observar que las proteínas identificadas tienen un peso molecular entre 63-65 kDa.

Figura 1. Patrón de proteínas de las burbujas del pez betta separadas por Electroforesis en geles de acrilamida bisacrilamida 10% (PAGE-SDS)



Carril 1.- Marcador de Peso Molecular (M). Carril 2 y 3.- lisado de burbujas de dos diferentes estanques

Las pruebas de MALDI-TOF/MS (figuras 2 y 3) mostraron que las proteínas presentes en las burbujas tienen similitud con 2 proteínas, la proteína intracelular de 63.8 kDa que tiene función de regulación genética "Zinc-finger"; y la proteína Amiloride de canales catiónicos, intramembranal de 62.4 kDa que funciona como canal de transporte de iones de sodio, afines con una especie de la familia Ciprinidae, *Danio rerio*.

Figura 2. Resultados de las pruebas de MALDI-TOF en muestras de burbujas del pez betta. Se muestra en negrilla la secuencia de residuos de aminoácidos que fueron identificados por MALDI-TOF/MS

Nombre de la Proteína	Submitted name: Chromosome 10 SCAF15019, whole genome shotgun sequence. EMBL CAG10732.1
Nombre del Gen	ORF Names: GSTENG00032454001 EMBL CAG10732.1
Organismo	<i>Tetraodon nigroviridis (Spotted green pufferfish) (Chelonodon nigroviridis)</i>

MNGDRVQAGSITVQADVILHAVTSDLTRPDKGPGYVQDFLKDEQGSAFGKEYLLDGKVMENNRVDHQRGSSCVSRSDPPLVSNHVAGARQNSETHDGSAGAKMSNDVDPPEAKESDGA VSRPGLGCQDGANASSTRETDLVIEVGGQTIKAHKA VLAEKSDYFKARQSRNILKVKGVTYKTLSTLVDIYTSQMNVS KDNVVDVITGAKVIQVPCAVQAAVDSMATQLTAAN CYEILSI AKKQRLNELKETAYAFMSDNFLQIFKDPAVYGR LTGSRDLILKRMDGRK TLMVAEINDVFDRVGS RPPSR CGS R PQSPLSVGSLEESHMIYSFNEAEDDWRPLTSLPEDISTKGCIGCTMYNYLFVAGGIKGYGDKGKVS DRVFCYNPVTNHW AEVKPLNQARAQLKLVSM DGHLYAIGGECLFTVEKYDPRTDRW TNVAPLPKGAFAVAHEATTCSGELYVSGGSLFYRL LKYDARRDEWQECYPYNN SRKKSSDMVAFK SFLYRFDVDREEGITVVKYNTIVKMWQDCASQKPGNHSPFRCAV VGNRIYCVNKS KTLKFVVEDEDAYFHQEPLVAPLET KGVLPFPVLTLP E

Figura 3. Resultados de las pruebas de MALDI-TOF en muestras de burbujas del pez betta. Se muestra en negrilla la secuencia de residuos de aminoácidos que fueron identificados por MALDI-TOF/MS

Nombre de la Proteína	LOC563332 protein EMBL AAI34106.1
Nombre del Gen	Nombre: phf20a ZFIN ZDB-GENE-070912-270 LOC563332 EMBL AAI34106.1
Organismo	<i>Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio) EMBL</i>

MSKRPPNRRGIKFEVGASLEARDSLKNWYVANIEKIDYENEKVLVHYRQWSHRYDEWFDWASPYLRPVERVQLRREARQ DDSFIPGFHVNDRLASWSDCRFYPAKVLAVNKDASYTVKFDYDGVVQTVKGIHVKPFKERRKKLSDQNGEKPVIQQ TEKEIQESEANGDKQAAGQTNCFPEKDEDGISEVNGEEGEQM QIKVENESVKEERDLEEIQHNYSKSLVKKGSGFEEKEE EVMVKMQDSALFDSNVNFSESMVKRNETEETDVLAAQKKEEVEEQCLVHDKKARRQRIKRKRRLSMARRSSKKNK TDS EKSHNDCKPNNQQTQGKEPDSLHLTQPSNGTSASQAQCQSETFKPTAVRKQAFHNPNRFSREPLYRVIRNQPPVLSINLD HNLYKCNTPGCSKSRFKLLHYHMKYYHGEECPIEQTREMDKKTLLNSHDGSKKRCVTSRECARVTVKNRSLAPPVAS TQNYQQWPLPKDKTRENQLDDTMQRCYDKERDRRFMEMESVKERNRLKEKQRRDFLRILKKKKKKK

Hasta el momento los resultados sugieren que la proteína reguladora "Zinc-finger", no tiene significancia debido a que está relacionada con procesos de regulación genética, y por otro lado la proteína "Amiloride de canales catiónicos", puede estar relacionada con la regulación de sales de sodio.

Los resultados obtenidos en este trabajo marcan el inicio para realizar más estudios con relación a la identificación de componentes de las burbujas y ensayos para evaluar resistencia a enfermedades que afectan a los peces en edades tempranas.


Conclusión

Las burbujas secretadas por el macho del pez betta (*Betta splendens*) poseen una proteína de alrededor de 63-65 kDa.

Las proteínas que componen las burbujas presentan un 25% de identidad con la proteína Q4RLKO_TETNG (AMICOIDE), perteneciente al pez puffer verde (*Tetraodon nigroviridis*).

La proteínas presentan también un 16% de afinidad con la proteína A3KP05 perteneciente al pez cebrá (*Danio rerio*).

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas en la Unidad de Secuenciación del CISEI de Cuernavaca y al M. en C. Gerardo Hurtado Sil por la obtención de los resultados. 

Referencias

- Axelrod, R. H. (2007). *Peces y Acuarios*. Barcelona, España: Editorial Hispano Europea, S.A.
- Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L., Gratacap, R.M.L. y Nikoskelainen, S. (2007). "Seasonal variatio and the immune response: a fish perspective". En: *Fish & Shellfish Immunology* (22) 695-706.

Carabias, J., Landa, R., Collado, J. y Martínez, P. (2005). *Agua, medio ambiente y sociedad: hacia la gestión integral de los recursos hídricos de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Dalmo, R.A. (2005). "Ontogeny of the fish immune system". En: *Fish & Shellfish Immunology*. (19): 395-396.

ExPASy Bioinformatics Resource Portal. (s/d). "FindPept tool". En: <http://web.expasy.org/findpept/>

Kang, CH. y Lee, T. (2010). "The Pharyngeal Organ in the Buccal Cavity of the Male Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*, Supplies Mucus for Building Bubble Nests". En: *Zoological Science*. (27): 861-866.

Martínez, D. I. (2008). "Comportamiento agresivo en el pez luchador de Siam (*Betta splendens*)". En: *Anales Universitarios de Etología*. (2) 98-105.

Ramírez, M.C., Mendoza, A.R. y Aguilera, G.C. (2010). *Estado actual y perspectivas de la producción y comercialización de peces de ornato en México*. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Randelli, E., Buonocore, F. y Scapigliati, G. (2008). "Cell markers and determinants in fish immunology". En: *Fish & Shellfish Immunology*. (25) 326-340.

Rojo, I., Castelruis, Y., Estonba, A. y Pardo, M.A. (2005). "Identificación de genes asociados con la resistencia a *Listonella anguillarum* en el modelo animal pez cebrá *Danio rerio* (Hamilton, 1822) mediante el análisis de perfiles de expresión diferencial". En: *Bol. Inst. Esp. Oceanogr*. (21): 131-135.