

3. - ANALISIS ELECTROFORETICO DE PROTEINAS

3.1. - Introducción

La elección de las técnicas electroforéticas en el estudio que nos ocupa se basó fundamentalmente en los siguientes criterios:

- Posibilidad de utilización de un número bajo de individuos por población a condición de estudiar un número suficientemente elevado de loci. Este punto es fundamental en nuestro caso al incluir en el análisis especies como *Alytes muletensis*, consideradas en peligro por los organismos nacionales e internacionales de conservación (ver por ejemplo Corbett 1989).
- Adecuación del poder resolutivo de la técnica a los niveles taxonómicos de interés en nuestro caso. Nei (1987) señala que la mayor efectividad de las técnicas electroforéticas en el estudio de la diferenciación entre taxa, se encuentra en los análisis a nivel específico o entre géneros estrechamente relacionados. Las relaciones entre grupos que muestren una distancia de $D_{Nei} > 1$ no pueden ser adecuadamente valoradas como consecuencia de la elevada frecuencia de mutaciones paralelas o regresivas.
- Posibilidad de análisis simultáneo de un elevado número de individuos y poblaciones, reduciendo la posibilidad de errores de interpretación.
- Posibilidad de obtención de marcadores genéticos que puedan ser utilizados con posterioridad para el acotamiento de los límites geográficos entre taxa morfológicamente afines.
- Posibilidad de utilización de los datos obtenidos tanto para el cálculo de distancias genéticas como para la realización de análisis filogenéticos. A este nivel se puede añadir la posibilidad de discusión de los datos en el plano temporal.

Por último cabe señalar la buena relación existente entre gastos económicos y resultados obtenidos, que en muchos casos posibilita su utilización sin necesidad de disponer de un equipo especialmente costoso y delicado, exceptuando la necesidad de un adecuado sistema de almacenaje de muestras a bajas temperaturas.

3.1.1. - Fundamento y utilidad

Las técnicas electroforéticas se basan en las diferencias de movilidad existentes entre diferentes moléculas sometidas a la influencia de un campo eléctrico, como consecuencia de la existencia de diferencias en su carga neta o en su tamaño.

El proceso consiste básicamente en la inclusión de las moléculas a analizar en una matriz porosa (especialmente tamponada para evitar cambios de pH durante el proceso y reducir la interacción entre grupos cargados de la molécula y los de la matriz), la aplicación de un campo eléctrico sobre la matriz, que provoque la migración diferencial de las moléculas y un revelado posterior, que permita la visualización de las moléculas tras la migración.

Existen diferentes métodos de electroforesis que difieren esencialmente en el tipo de moléculas objeto de estudio y en los soportes físicos. Centrándonos en la electroforesis de proteínas, los cuatro métodos primarios de uso generalizado, que difieren en la naturaleza de la matriz soporte (Murphy et al. 1990) son: geles de almidón (horizontales o verticales), geles de poliacrilamida, geles de agar y geles de acetato de celulosa. Una descripción amplia de estos diferentes tipos y las ventajas y desventajas de su aplicación han sido resumidos en Murphy et al. (1990). Otros métodos menos utilizados han sido descritos en Harris y Hopkinson (1976), Hames & Rickwood (1981) y Freifelder (1982).

Tratándose de proteínas, la migración puede verse afectada intrínsecamente por la estructura primaria de la proteína (secuencia de aminoácidos unidos por enlaces covalentes, genéticamente determinada) que afecta especialmente a la carga de la molécula, o por las estructuras secundaria, terciaria y ocasionalmente cuaternaria, que afectan

especialmente al tamaño y forma de la molécula y en menor medida a la carga (como consecuencia de las interacciones entre aminoácidos adyacentes). Como factores extrínsecos que afectan a la migración se pueden señalar el tipo de sustrato utilizado (que incluye el tipo y tamaño de los poros a través de los cuales las moléculas han de desplazarse), los tampones iónicos, la temperatura, la intensidad y voltaje de la corriente eléctrica utilizada y la duración de la electroforesis.

Si bien pueden utilizarse proteínas no enzimáticas para su análisis electroforético, la mayor parte de los análisis electroforéticos se efectúan sobre proteínas enzimáticas, debido a la amplia gama de enzimas susceptibles de análisis y su relativa facilidad de revelado.

Los estudios electroforéticos de enzimas se basan en la existencia de un amplio polimorfismo estructural detectable por cambios en la carga neta y tamaño de la molécula. Dicho polimorfismo estructural enzimático puede ser debido a modificaciones post-traduccionales (causas secundarias) o consecuencia de causas genéticas (causas primarias). Las variantes de un mismo enzima (funcionalmente similares) producidas por causas genéticas se denominan en sentido amplio "isoenzimas ó isozimas" (Markert 1975; 1983). Dentro de éstas últimas pueden considerarse las variantes producidas por la existencia de varios loci codificadores para el mismo tipo de enzima (isozimas en sentido estricto) y las variantes producidas por la existencia de alelos múltiples en un mismo locus (aloenzimas ó alozimas) (Rider & Taylor 1980). Los diferentes tipos enzimáticos producidos por la acción de alelos múltiples en un locus (alozimas), se diferencian unos de otros por pequeñas alteraciones, como por ejemplo la sustitución de aminoácidos causada por mutaciones puntuales en la secuencia nucleotídica del ADN. Los tipos enzimáticos producidos por múltiples loci (isozimas s. str.) suelen diferir extensamente como consecuencia de numerosas sustituciones de aminoácidos, y deleciones y adiciones de residuos que pueden modificar el tamaño de la molécula (Rider & Taylor 1980).

Desde los orígenes de la electroforesis en geles de almidón (Smithies 1955), el establecimiento de los procesos para la visualización histoquímica de los enzimas sobre los geles (Hunter & Markert 1957) y sus primeras aplicaciones iniciadas en los trabajos clásicos de Hubby & Throckmorton (1965), Harris (1966), Hubby & LeWontin (1966), Lewontin & Hubby (1966), que sentaron las bases para un rápido desarrollo de las técnicas electroforéticas de proteínas, se han venido sucediendo innumerables estudios en los que la electroforesis de proteínas ha supuesto un importante avance en la comprensión de fenómenos micro y macroevolutivos, desde la estimación de la variabilidad genética en poblaciones naturales hasta el estudio de flujo génico o fenómenos de hibridación (ver por ejemplo las revisiones de Avise 1974; Lewontin 1974; Avise & Aquadro 1982; Nevo et al. 1984; Buth 1984; Murphy et al. 1990).

La aplicación del análisis aloenzimático en el campo de la zoología y especialmente en el de la sistemática se ha extendido considerablemente, destacándose su utilidad en el establecimiento de filogenias, en el reconocimiento de especies morfológicamente similares, o en el análisis de las zonas de contacto o hibridación entre taxones estrechamente emparentados. De esta forma la electroforesis de proteínas puede ser considerada como una de las metodologías para investigar fenómenos genéticos a nivel molecular, con una mejor relación entre costes y eficacia (Murphy et al. 1990).

3.1.2. - Condiciones y supuestos previos

La principal suposición previa en el análisis aloenzimático es que las diferencias en movilidad detectadas reflejan cambios en la secuencia de ADN codificante. Por lo tanto las diferencias detectadas están genéticamente establecidas y son heredables (Murphy et al. 1990). Por otra parte la expresión enzimática es codominante (Rider & Taylor 1980) lo que implica que los dos alelos de un locus se expresan simultáneamente.

La aplicación correcta de los datos obtenidos por electroforesis depende esencialmente de la correcta interpretación de los patrones de bandas observados. Para una correcta interpretación es necesario conocer aspectos como el número de subunidades del enzima, o su variabilidad en función del tejido estudiado (Murphy & Matson 1986), sin descartar la posibilidad de aparición de fenómenos no heredables (Richardson et al. 1986). Si los datos de las frecuencias genotípicas esperadas de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg no coinciden con las observadas, puede considerarse que la variación fenotípica detectada no posee una base genética o que una o más de los requisitos de la ley de Hardy-Weinberg (ausencia de selección, deriva o migración) no se cumple en las poblaciones estudiadas.

Un importante aspecto en el uso de datos de frecuencias alélicas es el supuesto de que los alelos de un mismo locus son equivalentes desde un punto de vista selectivo, es decir neutros (Kimura 1983 a, b). Sin embargo se conocen varias excepciones y apenas se dispone de datos reales para la mayor parte de los alelos de los sistemas estudiados. En cualquier caso Allendorf & Phelps (1981) sugieren que a falta de evidencia de selección en un locus

determinado, la neutralidad puede ser aceptada inicialmente.

Una cuestión a considerar en los análisis electroforéticos es que las bandas que aparecen en los geles representan variaciones fenotípicas del enzima y cada una de estas variantes puede no corresponderse con una única variante alélica. Es decir un mismo electromorfo, entendiendo por tal el conjunto de variantes alélicas con idéntica movilidad, puede incluir diferentes productos alélicos codificados por lo tanto por diferentes secuencias de ADN, bien como consecuencia de la redundancia del código genético, bien porque la sustitución de un aminoácido por otro no siempre supone un cambio de carga (Shaw 1965; Ayala 1983). Por consiguiente, en los electromorfos el carácter de homología debe mantener siempre un carácter condicional (Hubby & Lewontin 1966; King & Ohta 1975; Allendorf 1977; Johnson 1977; Murphy et al. 1990). Este problema, cuyo principal inconveniente es una subestimación de la variabilidad real, ha sido objeto de numerosos estudios que han tratado de cuantificar la proporción de alelos que quedan sin detectar en los análisis convencionales (alelos crípticos). La conclusión generalizable es que los métodos convencionales resuelven adecuadamente la mayor parte de la variabilidad en los loci conservadores (poco variables) pero no en los que habitualmente se muestran más polimórficos. En estos loci polimórficos parece que el número de alelos crípticos es considerablemente mayor que en los poco variables (Coyne 1982; Aquadro & Avise 1982 a; 1982 b; McLellan 1984). En cualquier caso cabe señalar que las diferencias alélicas fijadas entre poblaciones detectadas por métodos convencionales son reales, y que las comparaciones entre poblaciones serán siempre apropiadas cuando el grado de subestimación sea el mismo al utilizarse la misma metodología (Murphy et al. 1990).

A la hora de cuantificar distancias genéticas basadas en datos electroforéticos parece conveniente incluir un amplio espectro de loci con diferentes tasas de cambio evolutivo. De esta forma se pueden evitar sesgos en la interpretación de los resultados. Como ejemplo se puede señalar que muchos de los sistemas enzimáticos que intervienen en la glicólisis tienden a ser particularmente conservadores (Gillespie & Kojima 1968; Gottlieb 1982a). Adicionalmente se ha señalado que al estudiarse mayoritariamente proteínas hidrosolubles, codificadas por genes estructurales, se podría incurrir en errores de muestreo genético (Avise 1980).

Por último parece conveniente indicar que la movilidad de los electromorfos puede verse afectada por la alteración de las enzimas a consecuencia de la acción de proteasas. Acción que puede producirse tras sucesivas descongelaciones o tras un prolongado almacenamiento de las muestras (Harris & Hopkinson 1976; Kobayasi et al. 1984; Richardson et al. 1986). Sin embargo Moore & Yates (1983) señalan que la expresión de muchos de los loci no experimenta cambios de movilidad hasta transcurridas 12 horas de la muerte del animal.

3.1.3. - Objetivos. Estudios previos

Dentro del campo que nos ocupa las técnicas de electroforesis de proteínas se vienen aplicando con diferentes objetivos, que varían desde la estimación de los tiempos de divergencia entre linajes, hasta el establecimiento de los límites de distribución geográfica y de zonas de hibridación entre especies morfológicamente afines. En nuestro caso el objetivo que pretendemos alcanzar en este capítulo es la caracterización genética de la especie de *Alytes* de las Sierras Béticas. Los datos electroforéticos obtenidos en este capítulo se utilizarán posteriormente para establecer la distribución geográfica de los diferentes taxa y para estimar el grado de aislamiento existente entre estos.

Existen numerosos trabajos en diversos grupos de anfibios en los que se presentan datos, basados en análisis electroforéticos de proteínas, sobre la caracterización genética de diversos taxa y de la diferenciación genética entre poblaciones. Los trabajos realizados en este campo cubren aspectos muy variados, desde el estudio de la evolución poblacional (Kalezic & Tucic 1984; Arntzen 1990) y el análisis de modelos de especiación (Larson et al. 1984; Wake & Yanev 1986; Nishioka et al. 1987), hasta el establecimiento y estudio de la diferenciación entre especies crípticas (Jacobs 1987) o la detección de fenómenos de hibridación (Uzzell & Berger 1975). Asimismo, diferentes trabajos han tratado de relacionar los datos electroforéticos obtenidos con datos geográficos o temporales (Busack 1977; Sbordonni et al. 1982; Lanza et al. 1982; Rafinski & Arntzen 1987; Good et al. 1987; Highton 1989), o bien se han utilizado para la caracterización de taxa o para la detección de variación geográfica intraespecífica (Case 1978; Hayashi et al. 1992) y el establecimiento de relaciones filogenéticas (Highton & Webster 1976; Bogart et al. 1985; Green 1986; Hayashi y Matsui 1988; Arntzen 1989)

Dentro de la familia Discoglossidae la electroforesis de proteínas ha sido utilizada tanto para caracterizar nuevos taxa (Busack 1986; Lanza et al. 1984; Cappula et al 1985) como para analizar problemas de hibridación e introgresión genética (Szymura 1976; Gollmann 1984; Szymura & Barton 1986). En cuanto al género *Alytes* los trabajos realizados varían desde la caracterización genética de las diferentes especies (Crespo 1976; Crespo 1979; Crespo et al. 1984) basadas en la utilización de sistemas proteicos plasmáticos, hasta el estudio de la diferenciación interpoblacional entre poblaciones aisladas o entre especies geográficamente próximas (Viegas & Crespo 1985;

Rosa et al. 1990), pasando por el análisis de la variación geográfica puntual en amplias zonas (Arntzen & Szymura 1984).

El Ministerio de Medio Ambiente agradece sus comentarios. Copyright © 2006 Ministerio de Medio Ambiente