

## Análisis electroforético de las secreciones adhesivas de onicóforos del género *Epiperipatus* (Onychophora: Peripatidae)

Marielos Mora<sup>1,2</sup>, Alvaro Herrera<sup>1</sup> y Pedro León<sup>1,3</sup>

Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular<sup>1</sup>, Facultad de Microbiología<sup>2</sup> y Escuela de Medicina<sup>3</sup>, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

(Rec. 4-XI-1993. Rev. 25-XI-1994. Ac. 1-II-1995)

**Abstract:** Onychophorans use their adhesive secretion to capture prey and for defense. The protein composition of this secretion was studied in several species of *Epiperipatus* from Costa Rica, using polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE). A complex pattern of proteins appeared in aqueous extracts of the secretion after electrophoresis and staining with Coomassie Brilliant Blue. Many conserved high molecular weight bands are detected, and a few low molecular weight bands that are abundant and species-specific. Extracts from many different individuals of the abundant species *E. biolleyi* show identical patterns, while each of the four species analyzed had a unique band pattern. These specific patterns of small peptides may be useful for taxonomic identification in this phylum. The large variability in size and number of these peptides suggests that they play a general function such as gelation through disulfide bond formation, and not a specific catalytic function.

**Key words:** Onychophora, adhesive secretion, *Epiperipatus*, taxonomy.

En el curso de la evolución, diversos mecanismos de señalamiento químico han mediado la comunicación de los organismos, ya sea intraespecíficamente para regular el cortejo y apareamiento o para la transmisión de información entre especies (Eisner y Meinwald 1966). Los artrópodos utilizan sustancias químicas para resolver situaciones conflictivas depredador-presa; en particular los miriápodos han desarrollado mecanismos de defensa o caza que involucran la secreción de sustancias que inmovilizan la presa y con cierta frecuencia son irritantes y de alta toxicidad (Blum 1981). Los onicóforos, comparten esta estrategia depredadora con los artrópodos y miriápodos. Esto parece apoyar las propuestas aún controversiales de Sedgwick (1888), Anderson (1973) y Ballard (1992) que los relaciona filogenéticamente con los artrópodos y en particular con los miriápodos. Debido a su lenta movilidad, los onicóforos recurren al lanzamiento

de esta secreción adhesiva (Bouvier 1905) a distancias hasta de 50 cm (Cuénot 1949) lo cual les permite capturar e inmovilizar la presa. Según Ruhberg (1985) y Read & Hughes (1987), la excreción de saliva que contiene enzimas digestivas en las lesiones cuticulares digiere parcialmente los tejidos blandos y facilita su ingestión (Ruhberg 1985, Read & Hughes 1987).

Esta secreción de carácter proteico (Manton & Heatley 1937, Röper 1977) muestra propiedades adhesivas y se endurece rápidamente al ponerse en contacto con el aire (Bouvier 1905). Su exposición al agua dulce retarda dicho endurecimiento mientras que el agua de mar lo inhibe completamente, formando un mucílago que finalmente se disuelve (Monge-Nájera 1993). Estas observaciones apoyan la existencia de un mecanismo químico para este endurecimiento, probablemente por el establecimiento de puentes disulfuro (Röper 1977).

La elasticidad indica la presencia de una estructura micelar la cual ha sido confirmada por estudios de microscopía electrónica (Ruhberg & Storch 1977). Monge-Nájera *et al.* 1993 y Monge-Nájera & Morera 1994, describen la secreción adhesiva de *E. biolleyi* como incolora, carente de olor y aunque no es tóxica posee un sabor amargo que le confiere propiedades eméticas. Estos autores proponen que estas características adhesivas y eméticas son congruentes con una función primaria defensiva que probablemente derivó posteriormente en una función ofensiva.

Se han realizado muy pocos estudios analíticos de las secreciones de los onicóforos. Röper (1977) determinó que la secreción del peripatópsido sudafricano *Peripatopsis moseleyi* no contiene compuestos aromáticos volátiles ni carbohidratos, sino se compone de un 84% de agua, 16% de proteínas y aminoácidos libres (glicina, ácido glutámico, ácido aspártico y lisina). Resultados similares en cuanto al contenido de agua (85%) y presencia de proteínas fueron determinados por Read (1985) en la secreción de *Macroperipatus torquatus* (Peripatidae), además se informa de la presencia de carbohidratos y lípidos.

Análisis cuantitativos de la producción de secreción, revelan que ésta puede representar hasta un 7.4% del peso corporal en *E. biolleyi* y *E. istimicola* (Monge-Nájera 1994) y un 9.7-12.9 % en *Macroperipatus torquatus* (Read 1985). Debido a su valor proteico y su aparente alto costo energético de producción, esta secreción es frecuentemente reingerida después de devorar la presa (Read & Hughes 1987) o por las formas juveniles después del parto (Morera Brenes *et al.* 1988).

Este artículo describe los patrones peptídicos de la secreción defensiva de varios miembros del género *Epiperipatus* y discute su valor como una herramienta taxonómica.

## MATERIAL Y METODOS

**Recolección de especímenes:** Se utilizaron en este estudio organismos miembros del género *Epiperipatus* pertenecientes a las siguientes especies costarricenses: *Epiperipatus biolleyi* de Cascajal de Coronado, San José (quince especímenes); *Epiperipatus istimicola* de Turrialba, Cartago (cinco especímenes) y dos especímenes pertenecientes al género en estudio pero

que no corresponden a especies descritas previamente y cuya identificación se encuentra en proceso. Estos especímenes fueron recolectados en localidades distantes y se identifican como *Epiperipatus sp. 1* (Pital, San Carlos, Alajuela) y *Epiperipatus sp. 2* (Finca La Dibujada, Buenos Aires, Puntarenas). Especímenes testigos se depositaron en el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica.

**Extracción de la secreción adhesiva:** La secreción adhesiva fue obtenida en forma individual de cada espécimen. La técnica de extracción consistía en introducir el organismo en un tubo de microcentrifuga, lo que era interpretado como un estímulo agresor y provocaba la ejecución de la secreción defensiva. Durante esta manipulación el organismo no sufría daño alguno, lo cual permitía la repetición del proceso de extracción.

El tubo era posteriormente centrifugado por treinta segundos a 12 000 g con la finalidad de sedimentar la secreción que fue almacenada a -20 C hasta su utilización.

### Análisis electroforético:

**Preparación de la muestra:** Debido a las propiedades adhesivas de estas secreciones se utilizó una estrategia de extracción que incluía la adición de un tampón (20 veces el volumen original de secreción) que contenía SDS 3%, glicerol 20%, tris-base 0.005%, trisHCl 0.6%, mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 5%. La mezcla era sometida a ebullición (95 C) en baño María por 15 min. para ser posteriormente clarificada por centrifugación (12 000 g X 2 minutos). Se utilizaron aproximadamente 30 ul del sobrenadante para el análisis electroforético.

**Separación electroforética:** La separación electroforética fue realizada en geles discontinuos (20 X 20 cm) de poliacrilamida-SDS (gel separador 4 %/ gel espaciador 16%) (Laemmli 1970) durante una hora a un voltaje constante de 200 voltios. Los geles fueron teñidos con azul Coomassie, secados al vacío sobre papel de filtro y fotografiados.

La determinación del peso molecular de los péptidos se realizó comparando la migración relativa de las proteínas utilizadas como marcadores: ovalbúmina (43 000), mioglobina (17 200) y lisozima (14 300).

## RESULTADOS

La separación electroforética de las secreciones adhesivas del género *Epiperipatus* en geles discontinuos de poliacrilamida-SDS, demuestra un patrón peptídico complejo.

En las cuatro especies, se observa una fracción muy abundante de péptidos de alto peso molecular (mayor a 20 000), los cuales aparentemente se encuentran en menor concentración pero revelan una mayor conservación entre las diferentes especies. Se detecta también una segunda fracción peptídica de bajo peso molecular (menor a 20 000), que presenta mayor variabilidad lo cual posibilita un análisis comparativo interespecífico (Fig. 1A). Esta fracción de bajo peso molecular presenta un número variable de bandas prominentes según la especie (una banda en *Epiperipatus sp. 2* y al menos cinco bandas en *E. biolleyi*). A pesar de que algunas de estas bandas coinciden en peso molecular en más de una especie (*e.g* los péptidos de P.M 11 190 y 15 300 están presentes en *E.*

*biolleyi* y *E. istmicola*), la existencia de otras bandas no compartidas permite establecer un patrón particular para cada especie (Fig.2). Es evidente que existen diferencias marcadas de concentración entre los péptidos que conforman estos patrones; en el caso de *Epiperipatus sp.1* el péptido de P.M. 11 400 es sin ambigüedad el más abundante, mientras que las tres bandas restantes son menos perceptibles. Debido a que en casos extremos de dilución de las secreciones muchas bandas apenas perceptibles pudieran desaparecer, consideramos que el patrón de cada especie podría definirse diagramáticamente según la Fig. 2, que incluye solamente los péptidos principales. Este patrón peptídico específico no presenta variabilidad intraespecífica como se desprende de la Fig. 1B, que demuestra la separación electroforética de las secreciones de siete especímenes de *E. biolleyi*. En la totalidad de los organismos se presentó el patrón característico y únicamente el péptido de P.M. 15 300 varía ligeramente en concentración.

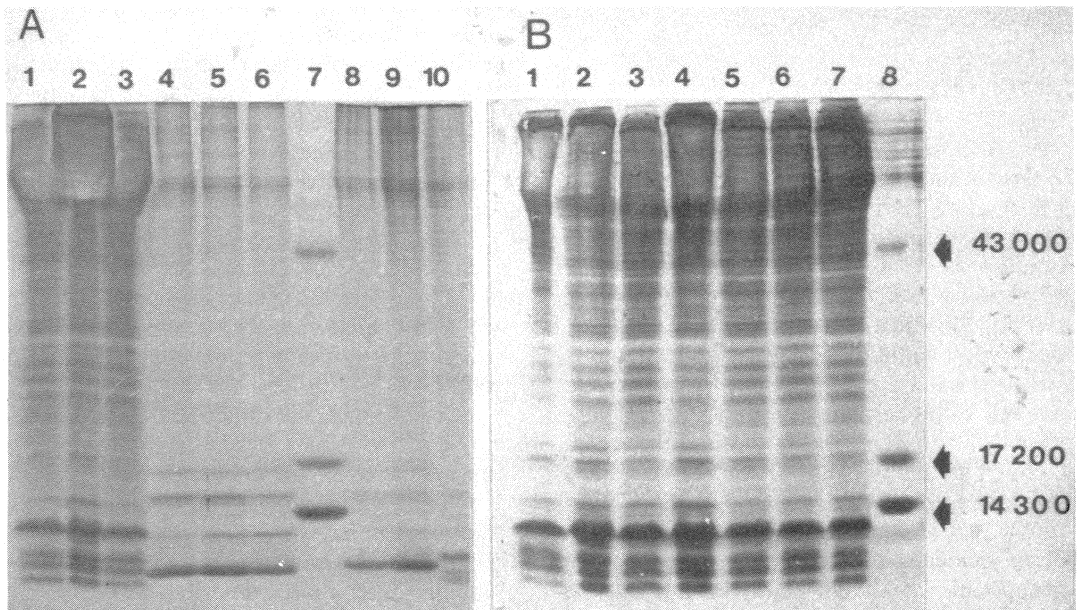


Fig. 1. Separación electroforética de las secreciones adhesivas del género *Epiperipatus* en geles de poliacrilamida al 16 % : A) Carriles 1,2,3 *Epiperipatus biolleyi*; 4,5,6 *Epiperipatus istmicola*; 7 Marcadores de peso molecular ; 8,9, *Epiperipatus sp. 1*; 10 *Epiperipatus sp.2*. (B) Carriles 1 al 7, diferentes individuos de *Epiperipatus biolleyi* ; carril 8 Marcadores de peso molecular.

Fig. 1. Electrophoretic separation of adhesive secretions of several species of *Epiperipatus* from Costa Rica in 16 % polyacrylamide gels: (A) lines 1,2,3 *Epiperipatus biolleyi* ; 4,5,6 *Epiperipatus istmicola* ; 7 Molecular weight markers (M.W.M.) ; 8,9 *Epiperipatus sp. 1*; 10 *Epiperipatus sp.2*. (B) lines 1-7, *Epiperipatus biolleyi* specimens; 8, M.W.M.

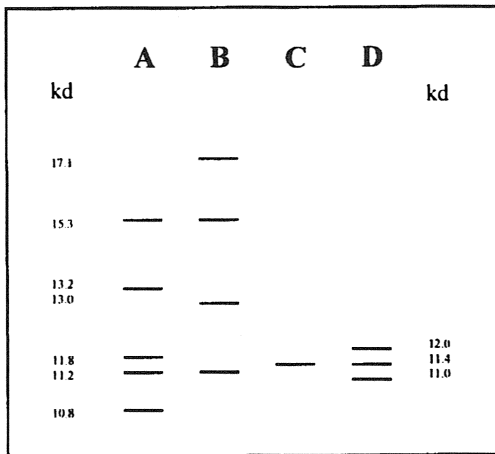


Fig.2. Patrones peptídicos específicos de las secreciones adhesivas (fracción de bajo P.M.) de algunas especies de *Epiperipatus* de Costa Rica. A. *Epiperipatus biolleyi*; B. *Epiperipatus istmicola*; C. *Epiperipatus sp.1*; D *Epiperipatus sp.2*.

Fig.2. Specific patterns of adhesive secretions (low M. W) of several species of *Epiperipatus* from Costa Rica: A. *Epiperipatus biolleyi*; B. *Epiperipatus istmicola*; C. *Epiperipatus sp.1*; D *Epiperipatus sp.2*.

## DISCUSION

Existe una cantidad muy limitada de publicaciones referentes al análisis bioquímico y electroforético de las secreciones adhesivas de onicóforos (Manton & Heatley 1937, Röper 1977, Read 1985). Con certeza uno de los factores que incide a este respecto, es la dificultad de manipulación de las secreciones debido a sus propiedades agregantes. En nuestra experiencia, el procesamiento de la muestra juega un papel importante en el éxito de la separación, en particular la utilización del mercaptoetanol, que produce la ruptura de enlaces disulfuro y permite una solubilización más efectiva de la secreción. La observación anterior apoya la suposición de que la adhesividad de estas secreciones se debe a la formación de enlaces disulfuro (Röper 1977) y no es producto del secado mecánico como proponen Read & Hughes (1987). Evidentemente queda mucho por investigar al respecto.

Los resultados del estudio electroforético de las secreciones adhesivas de onicóforos del gé-

nero *Epiperipatus* (Peripatidae), concuerdan con los análisis de las secreciones de *Peripatopsis moseleyi* (Peripatopsidae), en lo que se refiere a su contenido proteico y a su organización en varias fracciones de diferente peso molecular (Röper 1976).

Lo anterior podría ser interpretado, como producto de una limitada divergencia bioquímica de esta secreción en los cientos de millones de años de separación entre las familias, que se conjetura ocurrió aún antes de la separación del supercontinente de Gondwana (Ghiselin 1974). Sin embargo, los experimentos de Röper que incluyeron electroforesis de alto voltaje en papel y filtración en gel, no revelan los péptidos de la fracción de bajo peso molecular, que hubieran permitido una comparación directa y la posibilidad de determinar el grado de divergencia. La presencia de péptidos de similar peso molecular en los patrones electroforéticos de *E. biolleyi* y *E. istmicola* parece apoyar la suposición de Bouvier (1905) de que son parientes cercanos.

Un análisis comparativo de las secreciones de onicóforos con las secreciones defensivas de miriápodos hace notar diferencias y convergencias interesantes. En miriápodos, las secreciones son generalmente tóxicas e irritantes y están constituidas químicamente por compuestos aromáticos de peso molecular menor a los 300. Aunque, en general mantienen su consistencia fluída luego de ser descargados, algunos milrripodos (*Glomeris marginata* y *Polyzonium rosalbum*) presentan secreciones viscosas y elásticas debido a su composición proteica (Blum 1981). Filogenéticamente, se advierte un patrón de distribución de ciertos componentes químicos restringidos a determinados órdenes de miriápodos.

Considerando que los eventos de evolución convergente pudieron haber sido frecuentes entre miembros de las diferentes líneas de artrópodos, la utilización de estos compuestos bioquímicos como elementos taxonómicos diagnósticos, debe ser muy cautelosa y usarse en conjunción con otros descriptores taxonómicos (e.g. características morfológicas, embriología, etc.), pero presentan la ventaja de no causarle daño al organismo. La escasa variabilidad intraespecífica y la alta variabilidad interespecífica de los patrones peptídicos, parecen sugerir que estos se encuentran sujetos a una menor presión selectiva, tal vez debido a que cumplen

funciones generales y no de catálisis tradicional. Una posibilidad es que estos péptidos abundantes formen una trama elástica por medio de puentes disulfuro. La predicción de esta sugerencia es que estos péptidos son ricos en cisteína, lo cual podría ser sometido a prueba experimental.

La realización de un estudio electroforético similar incluyendo otros géneros pertenecientes a las dos familias de onicóforos podría evaluar los alcances taxonómicos reales de esta metodología.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las familias Castillo de Las Nubes de Coronado y Villalobos de la finca La Dibujada, por su cooperación en la recolección de especímenes y a Bernal Morera por la identificación y colaboración en el laboratorio. Esta investigación fue financiada por el CONICIT (231-87) y la Vicerrectoría de Investigación (801-87010) de la Universidad de Costa Rica.

### RESUMEN

Los onicóforos utilizan sus secreciones adhesivas para la defensa y captura de presas. La composición proteica de la secreción adhesiva de varias especies costarricenses de onicóforos del género *Epiperipatus*, fue estudiada utilizando geles discontinuos de poliacrilamida-SDS. Los resultados obtenidos de la electroforesis de extractos acuosos de esta secreción teñidos con Azul de Coomassie, revelan la presencia de un patrón peptídico complejo, con muchas bandas conservadas de alto peso molecular y unas pocas bandas específicas de bajo peso molecular. El análisis de extractos provenientes de diferentes individuos de la especie más abundante (*E. biolleyi*) muestra patrones idénticos, mientras que las 4 especies analizadas poseen un patrón único. Estos patrones específicos podrían ser utilizados para la identificación taxonómica en este filo. La gran variabilidad en tamaño y número de estos péptidos sugiere que podrían cumplir una función general (e.g gelación a través de la formación de puentes disulfuro) y no una función catalítica específica.

### REFERENCIAS

- Anderson, D. T. 1973. Embryology and phylogeny in Annelids and Arthropods. Pergamon, Oxford.
- Ballard, J.W.O., G.J. Olsen, D.P. Faith, W.A. Odgers, D.M. Rowell, & P.W. Atkinson. 1992. Evidence from 12 S Ribosomal RNA Sequences that onychophorans are modified Arthropods. *Science* 258 :1345-1348.
- Blum, M.S. 1981. Chemical Defenses of Arthropods. Academic, Nueva York.
- Bouvier, E.L. 1905. Monografie des Onychophores. I. *Ann. Sci.Nat. Zool.* (Ser.9) 2: 1-383.
- Cuénot, I. 1949. Les Onychophores. In: P. Grassé, ed., *Traité de Zoologie*, Masson et Cie., Paris, 6:3-37.
- Eisner, T. & J. Meinwald. 1966. Defensive Secretions of Arthropods. *Science* 153:1341-1350.
- Eisner, T., D. Alsop, K. Hicks & J. Meinwald. 1978. Defensive Secretions of Millipeds, p.41-72. In S. Bettini (ed.). *Arthropod Venoms*. Springer, Berlín.
- Ghiselin, M.T. 1974. The economy of nature and the evolution of sex. Univ. of California Press, Berkeley.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Manton, S.M. & N.G. Heatley. 1937. Studies on the Onychophora. II-The Feeding, Digestion, Excretion, and Foodstorage of *Peripatopsis*. with Biochemical Estimations and Analyses. *Phil. Trans. Royal Soc. London* 227: 411-464+pl.38-40.
- Minelli, A. 1978. Secretions of Centipedes, p.73-83. In S.Bettini (ed.). *Arthropod Venoms*. Springer, Berlin.
- Monge-Nájera J., Z. Barrientos & F. Aguilar. 1993. Behavior of *Epiperipatus biolleyi* (Onychophora: Peripatidae) under laboratory conditions. *Rev. Biol. Trop.* 41: 689-696.
- Monge-Nájera J. & B. Morera. 1994. Measurement of some morphological and physiological characteristics of two species of *Epiperipatus* from Costa Rica (Onychophora: Peripatidae). *Rev. Biol. Trop.* 42: 181-188.
- Morera B., J. Monge-Nájera & R. Sáenz. 1988. Parturition in Onychophorans: new record and a review. *Brenesia* 29:15-20.
- Read, V.M.St.J. 1985. The ecology of *Macroperipatus torquatus* (Kennel) with special reference to feeding and taxonomic review. Ph.D. Thesis, University College of North Wales, Bangor.
- Read, V.M.St.J. & R.N. Hughes. 1987. Feeding behavior and prey choice in *Macroperipatus torquatus* (Onychophora). *Proc. R. Soc. Lond. B* 230: 483-506.

- Röper, H. 1977. Analytical Investigations of Defensive Secretions from *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora). *Nature* 32:56-60.
- Ruhberg, H. & V. Storch. 1977. Über Wehrdrüsen und Wehrsekret von *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora). Elektronenmikroskopische Untersuchungen und lebendbeobachtungen. *Zool. Anz.* 198:9-19.
- Ruhberg, H. & Inst. Wiss. 1985. Film: Morphologie und Lebensweise von Onychophoren. Film C1554 des IWF. Publ. Wiss.Film. Göttingen. Sekt Biol., 17 : 1-19.
- Sedgwick, A. (1888). The development of the cape species of *Peripatus*. II and IV. *Quart.J.Micro.Sci.* 26:175.