

Universidad de Granada



**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
COMPONENTES ORGÁNICOS EN
CONCHAS DE MOLUSCOS**

Enero 2015

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Biología, Antonio José Osuna Mascaró, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada, dentro del programa de doctorado “Biología Fundamental y de Sistemas”.

Director:

Prof. Dr. D. Antonio Gerardo Checa González

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Antonio José Osuna Mascaró
ISBN: 978-84-9125-111-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40210>

El doctorando Antonio J. Osuna Mascaró y el director de la tesis Antonio G Checa Gonzalez garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada 23/03/2015

Director/es de la Tesis
Doctorando

Fdo.:



ANTONIO CHECA

Fdo.:



ANTONIO OSUNA MASCARÓ

El presente trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Estratigrafía y Paleontología, y en los laboratorios de Bioquímica y Parasitología Molecular del Departamento de Parasitología, de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por el Ministerio de Educación, mediante la concesión de una beca predoctoral FPI (conv.2008/2012), y por el proyecto “Biom mineralización en Invertebrados con énfasis en moluscos. Organización, génesis y evolución de microestructuras”, CGL2010.20748.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en varios congresos internacionales.

- COST Action TD0903 Meeting in Granada, Spain (2014) “Exposure and identification of chitin in the organic fraction of nacre shells”. A.J. Osuna, A. Checa
- COST Action TD0903 Meeting in Aarhus, Denmark (2012) “Exposure and identification of chitin in the organic fraction of nacre shells”. A.J. Osuna, A. Checa
- 3rd Workshop and 4th Management meeting of the COST Action TD0903-Understanding and Manipulating Enzymatic and Proteomic Processes in Biomineralization, Romania (2011). “Compositional ultrastructure of the interlamellar membranes of nacre”. Antonio José Osuna Mascaró, Julyan Cartwright, Carlos Manuel Pina Martínez, Marc-Georg Willinger, Antonio Checa González.
- EC FP7 COST Action TD0903 on Biomineralization.1st BioMineralix Workshop and 2nd Management Committee Meeting in Pula, Croatia - May 20th-22nd, 2010. Proteinaceous shell matrix components of the gastropod *Strombus gigas*. A.J.Osuna, T.Cruz, F. Marin, A.Checa. (2010)

Agradecimientos

El doctorando, Antonio José Osuna Mascaró, y el director de la tesis Dr. Antonio Gerardo Checa González, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que este trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Enero 2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Dr. Antonio G. Checa González

Fdo.:

Antonio J. Osuna Mascaró

“Sin los instrumentos y el saber acumulado de las ciencias naturales, los seres humanos están atrapados en una prisión cognitiva. Son como peces inteligentes que nacen en un estanque profundo y oscuro. Curiosos e inquietos, deseando salir, piensan en el mundo exterior. Inventan ingeniosas especulaciones y mitos sobre el origen de las aguas que los confinan, del sol y las estrellas que hay arriba, y del significado de su propia existencia. Pero se equivocan, siempre se equivocan, porque el mundo es demasiado ajeno a la experiencia ordinaria para ser siquiera imaginado.”

Consilience. Edward O. Wilson. 1998.

ÍNDICE

Índice de Figuras	XVII
Índice de Tablas	XXV
Abreviaturas	XXVI
Abstract	XXIX
Resumen	XXX
1.- INTRODUCCIÓN	9
2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	13
2.1.- IMPORTANCIA CIENTÍFICA Y EVOLUTIVA	13
2.2.- BIOMINERALIZACIÓN, EVOLUCIÓN EN MOLUSCOS	17
2.3.- MICROESTRUCTURAS	21
3.- LAMELAR CRUZADA	29
3.1- ANTECEDENTES LAMELAR CRUZADA	29
3.1.1.- PROPIEDADES.....	35
3.1.2.- LOBATUS GIGAS.....	46
3.2.- OBJETIVOS	55
3.3- MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.3.1.- MUESTRAS BIOLÓGICAS	53
3.3.2.- ESTUDIO DE LA LAMELAR CRUZADA	53
3.3.2.1.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA MATRIZ ORGÁNICA.....	53
3.3.2.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE PROTEÍNAS.....	54
3.3.2.3.- ELECTROFORESIS SDS-PAGE EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	55
3.3.2.3.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO	56
3.3.2.3.2.- PREPARACIÓN DE LOS GELES.....	56
3.3.2.4.- ELECTROFORESIS SDS-PAGE EN PHASTSYSTEM.....	58
3.3.2.5.- TINCIÓN DE LOS GELES.....	59
3.3.2.5.1.- TINCIÓN EN AZUL COOMASSIE.....	59
3.3.2.5.2.- TINCIÓN DE PLATA.....	59
3.3.2.5.3.- MÉTODO DE TINCIÓN DE PLATA GELES DE PHAST SYSTEM.....	60
3.3.2.5.4.- TINCIÓN ALCIAN BLUE.....	61
3.3.2.5.5.- TINCIÓN STAINS ALL (Calcium Binding Protein).61	

3.3.2.6.- ELECTROFORESIS PREPARATIVA.....	61
3.3.2.7.-ELECTROFORESIS 2-D	63
3.3.2.7.1.- ISOELECTROENFOQUE.....	63
3.3.2.8.-IDENTIFICACIÓN DE PROTEINAS.....	64
3.3.2.9.- LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	65
3.3.2.9.1.-OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	65
3.3.2.9.2.- ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	66
3.3.2.9.3.- WESTERN-BLOT	67
3.3.2.9.4- INMUNOLocalización.....	69
3.3.2.10.-ICP-MS.....	70
3.3.2.11.- ANÁLISIS DE AZÚCARES.....	71
3.3.2.11.1.- TINCIÓN PAS (Periodic Acid-Schiff).....	71
3.3.2.11.2.- DEGLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA	71
3.3.2.11.3.- FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	72
3.3.2.11.4.-HPAE-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography).....	73
3.3.2.12.-CRISTALIZACIÓN IN-VITRO.....	73
3.4.-RESULTADOS.....	77
3.4.1.-LAMELAR CRUZADA DE LOBATUS GIGAS.....	77
3.4.1.1.--EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ ORGÁNICA DE LA CONCHA DE <i>LOBATUS GIGAS</i>	77
3.4.2.-PURIFICACION DE PROTEÍNAS.....	81
3.4.2.1.-PURIFICACIÓN DE 1P3, 2P3 y 3P3.....	81
3.4.3.-OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	85
3.4.3.1.- ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS.....	85
3.4.3.1.1.- WESTERN-BLOT de 1P3.....	85
3.4.3.1.2.- WESTERN-BLOT de 2P3	86
3.4.3.1.3.- WESTERN-BLOT de 3P3	88
3.4.3.2.- INMUNOLocalización.....	89
3.4.3.3- ICP MASAS	99
3.4.4.-ANALISIS DE AZÚCARES	99
3.4.5.-CRISTALIZACIÓN IN VITRO.....	103
3.5.- DISCUSIÓN.....	107
3.5.1.- LAMELAR CRUZADA DE LOBATUS GIGAS	107
4.- NÁCAR.....	117
4.1.- ANTECEDENTES NÁCAR	117
2.3.2.1.- QUITINA.....	124
4.2.- OBJETIVOS.....	133
4.3.1.-MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	137

4.3.3.- ESTUDIOS EN EL NÁCAR.....	138
4.3.3.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO	138
4.3.3.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	138
4.3.3.3.- TRATAMIENTO Y OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIA CONFOCAL.....	139
4.3.3.4.- IMMUNOGOLD.....	140
4.3.3.4.1.- IMMUNOGOLD PARA QUITINA.....	140
4.3.3.4.2.- IMMUNOGOLD PARA QUITINA SOBRE POLVO.....	142
4.3.3.4.3.- DOBLE IMMUNOGOLD.....	142
4.3.3.5.- OBSERVACIÓN EN SEM.....	143
4.4.- RESULTADOS.....	147
4.4.1.- INMUNOLocalIZACIÓN DE LA QUITINA.....	147
4.4.1.1.-MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.....	147
4.4.1.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	149
4.4.1.2.1.- IMMUNOGOLD	156
4.4.1.2.2.- ESTRUCTURAS DE DISOLUCIÓN	168
4.5.- DISCUSIÓN	175
4.5.1.- DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE QUITINA EN NÁCAR.....	175
4.5.2.- ESTRUCTURAS DE DISOLUCIÓN	183
5.- CONCLUSIONES	189
5.1.- LAMELAR CRUZADA.	189
5.1.1- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA LAMELAR CRUZADA DE <i>L. GIGAS</i>	189
5.2.- NÁCAR.....	190
5.2.1.- DETERMINACIÓN DE QUITINA EN LAS MEMBRANAS INTERLAMELARES.....	190
5.2.2.- ESTRUCTURAS DE DISOLUCIÓN EN NÁCAR.....	191
6.- CONCLUSIONS	192
6.1.- CROSSED LAMELLAR.....	192
6.1.1- BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CROSSED LAMELLAR Of <i>L. GIGAS</i>	192
6.2.- NACRE.....	193
6.2.1.- CHITIN DETERMINATION IN INTERLAMELLAR MEMBRANES.....	193
6.2.2.- DISSOLUTION PATTERNS IN NACRE.....	194
6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196

Índice de Figuras

Fig. 1. Diversidad, composición y distribución estratigráfica de los restos biomineralizados de animales del Cámbrico-Ordovícico. Imagen tomada de [1], datos de esqueletos modificados de [2] y diversidad de familias de [3]....17

Fig. 2. Origen y filogenia del Phylum Mollusca. Basado en la proposición de Lecointre y Le Guyader ([4] en la cual Solenogastrea y Caudofoveata ocupan una posición basal. El punto 1 representa el Subphylum Eumollusca, el punto 2 representa la superclase Conchífera. A excepción de esas dos clases y de Scaphopoda, todos los eumoluscos aparecieron por primera vez en el Cámbrico. Tomado de [5].....18

Fig. 3. La concha se forma en lo que se conoce como espacio extrapaleal, una zona aislada del exterior y limitada por el manto y el periostraco del animal. El manto es un tejido polarizado; en la cara basal y en contacto con el medio ambiente se encuentra el epitelio interno del manto; en contacto con el periostraco encontramos el epitelio interno, que comprende tejidos conectivos, fibras nerviosas y músculos, y por último el epitelio externo, encargado de formar la concha, y limitar el espacio extrapaleal. La imagen no representa las proporciones reales, especialmente en cuanto al espacio extrapaleal que aquí se representa exageradamente aumentado. Tomada de [5].....22

Fig. 4. Disposición típica de las distintas capas de la concha en un bivalvo de la familia Veneridae. Modificado de Shimamoto (1986) [6].....23

Fig.5. Algunas microestructuras son fácilmente comparables con sus precipitados inorgánicos. A Biominerales. B Crecimientos inorgánicos.....24

Fig. 6. Algunas microestructuras de moluscos. Original de Currey & Taylor [7].....25

Fig. 7. Apariencia de la microestructura lamelar cruzada. Microscopía electrónica de barrido. Concha fracturada comarginalmente de un gasterópodo (*Conus striatus*). De A. Checa.....29

Fig. 8. Estructura interna de la lamelar cruzada. Microscopía electrónica de barrido. A. Representación de la microestructura lamelar cruzada de *Lobatus gigas*[8]. B. Fractura de *Conus omaria*. Se aprecian en la misma imagen las lamelas de primer, segundo y tercer orden. C. Fractura de *Conus omaria*. Detalle de una lamela de segundo orden; se aprecian las lamelas de tercer orden que la forman. A, tomado de A. Osuna-Mascaró[9], B y C fotografías de A. Checa.....31

- Fig. 9.** Transición entre capas. Microscopía electrónica de barrido. A. (Fractura de *Conus omaria*). B. (Fractura de *Conus striatus*). Las flechas muestran el recorrido de las lamelas de tercer orden y su adaptación entre capas, dando continuidad a las mismas. Fotografías de A. Checa.....33
- Fig. 10.** Relación entre el porcentaje medio de concha regenerada por día y el porcentaje de matriz orgánica. Tomada de Palmer (1983)[10].....37
- Fig. 11.** Cada punto representa una familia de bivalvos en combinación con el modo de vida y la microestructura implicada. Si una familia incluye animales con varios modos de vida, se encontrará repetida. c.l. lamelar cruzada; c.c.l. lamelar cruzada compleja. Tomado de Robert et al. (1990)[11].....40
- Fig. 12.** Scutum (derecha) y fotografía SEM de una fractura de concha de un gasterópodo (*Conus sp.*) (izquierda).....42
- Fig. 13.** Transición entre capas en lamelar cruzada. Microscopía electrónica de barrido de una fractura de la concha de *Lobatus gigas*.....43
- Fig. 14.** Cuando es sometida a acción mecánica, la concha de *Lobatus gigas* evita el desastre con dos mecanismos para disipar la energía. La fotografía **a** muestra una fractura en la concha, la fotografía **b** muestra la dificultad que encuentran las fracturas para prolongarse a lo largo de la concha, debido a su característica disposición. La fractura debe seguir un camino tortuoso, lo que otorga a la concha una resistencia superior a la que de por sí ya tiene el aragonito orgánico. Tomada de Ballarini & Heuer (2007)[8].....44
- Fig. 15.** Distribución de *Lobatus gigas*.....46
- Fig. 16.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido en base al análisis genético realizado por Latiolais et al. (2006)[12].....47
- Fig. 17.** Uso de un estrómbido (probablemente *Lobatus gigas*) como instrumento musical en la cultura azteca, Códice Magliabecchiano, siglo XVI.....50
- Fig. 18.** “Casa hecha de casas” en Isla Providencia, costa de Colombia. Fotografía de Macduff Everton/Corbis, tomada de Ballarini & Heuer (2007)[8].....51
- Fig. 19.** Gel SDS-PAGE 12 % en el que se muestran las proteínas totales de la fracción soluble (A) y de la insoluble (B) de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. M. Columnas marcadoras en ambos extremos. C. Gel teñido con azul de Coomassie, izquierda, fracción soluble 10 µg, derecha, insoluble 20 µg.....77

- Fig. 20.** Densitograma de la bandas obtenidas de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Eje vertical intensidad del gel, horizontal, posición en el gel.....78
- Fig. 21.** Densitograma de las proteínas obtenidas de la fracción insoluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Eje vertical intensidad del gel, horizontal, posición en el gel.....79
- Fig. 22.** Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales extraídas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Tinción: “Stainsall” capaz de detectar proteínas ligadoras de calcio. Proteínas marcadoras (M) Fracción soluble (S) Insoluble (Is). Las flechas señalan la bandas en tinción negativa, referidas en el texto.....80
- Fig. 23.** GelSDSPAGE 12% de las proteínas totales extraídas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Tinción con Alcian Blue. (M) Proteínas marcadoras, (S) Fracción soluble, (Is) Insoluble. Se aprecia débilmente una ligera banda con color específico de la tinción en ambas fracciones (flecha).....81
- Fig. 24.** Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa en los restantes carriles. La proteína señalada ha sido denominada como 1P3 y posee un peso molecular aproximado de 24 KDa.....82
- Fig. 25.** Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa. La proteína señalada ha sido denominada 2P3 y posee un peso molecular aproximado de 45 kDa.....82
- Fig. 26.** Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa. La proteína señalada ha sido denominada 3P3 y posee un peso molecular aproximado de 80 kDa.....83
- Fig. 27.** Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa: 1P3, 2P3 y 3P3 purificadas. Carriles: 1°- mezcla de las diferentes proteínas obtenidas. Carril 2°- 1P3. Carril 3°- 2P3. Carril 4°- 3P3. Carril 5°- mezcla de 1P3 y 2P3. Carril 6°- 1P3 purificada.....83
- Fig. 28.** Gel de electroforesis 2D de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. A Tinción de plata. B. Azul de Coomassie (Bio-Rad).....84
- Fig. 29.** Resultados obtenidos en el inmunoblot al enfrentar las proteínas separadas en SDS PAGE al inmunisero de rata frente a la fracción 1P3. Carril 1. (PRE) suero preinmunización. Carril 2 (1°).- Primera extracción del

suero (35 días).Carril 3 (2°). Segunda extracción de suero (55 días). Carril 4. (F) Suero al final de la inmunización. La flecha señala la banda positiva.....86

Fig. 30. Densitograma para el cálculo de la masa molecular relativa (22.27 kDa) de la banda reconocida por el inmunisero frente a 1P3.....86

Fig. 31. Resultados obtenidos en el inmunoblott al enfrentar las proteínas separadas en SDS PAGE al inmunisero de rata a la fracción 2P3.Carril 1. (P) Suero preimmune. Carril 2 (1). Primera extracción del suero (35 días). Carril 3 (2). Segunda extracción del suero (55 días). Carril 4 (F). Suero al final de la inmunización. La flecha señala la banda positiva.....87

Fig. 32. Densitograma para el cálculo de la masa molecular relativa de la banda de 20.21 kDa, reconocida por el inmunisero frente a 2P3.....87

Fig. 33. Resultados obtenidos en el inmunoblott al enfrentar las proteínas separadas en SDS PAGE al inmunisero de rata frente a la fracción 3P3.Carril 1 (PRE). Suero preimmune. Carril 2 (1). Primera extracción del suero (35 días).Carril 3 (2). Segunda extracción (55 días). Carril 4 (F). Suero al final de la inmunización.88

Fig. 34. Densitograma usado para el cálculo de la masa molecular relativa de las bandas de 88.34 y 76.49 kDa, reconocidas por el inmunisero frente a 3P3.....89

Fig. 35. Fractura de concha de *L. gigas* ligeramente descalcificada con EDTA.....89

Fig. 36. *L. gigas*. Pieza fracturada. Transición entre capas. A. Visión general. B. Detalle en el que se aprecia la curvatura de las lamelas de tercer orden en el paso entre capas.....90

Fig. 37. Comparación entre dos fragmentos enfrentados de *L. gigas*. A. Presuero 3P3 B. Final de 3P3. La señal obtenida mediante inmunogold es mayor en el suero final (arriba, B) que en el presuero para 3P3 (abajo, A).El tono blanquecino de la estructura superior se debe a las partículas de oro...91

Fig. 38. Fractura de concha de *L. gigas* usando la sangría "Final 2P3". La reacción obtenida es muy alta. A. Periostraco ligeramente separado de la concha. B. Capa lamelar cruzada.....92

Fig. 39. A. Fractura de *L. gigas* usando "Presuero 1P3". B. Fractura usando "Presuero 2P3". C. Fractura usando "Presuero 3P3". La reacción es excesiva para los sueros no inmunes, a tenor de los resultados obtenidos en las pruebas inmunológicas.....93

- Fig. 40.** Fractura de *Conus figulinus*, en control negativo con ensalzador de plata.....94
- Fig. 41.** Fractura de *Acanthocardia tuberculata* en control negativo con ensalzador de plata. Las esférulas de gelatina de unas 10µm se interpretan como artefactos del preparado de las muestras.....95
- Fig. 42.** Fractura de concha de *L. gigas* en control negativo con ensalzador de plata.96
- Fig. 43.** Fractura de concha de *S. decorus* en control negativo con ensalzador de plata.96
- Fig. 44.** SEM. Localización de la fracción 3P3 en la concha de *L. gigas* por inmunogold y usando anticuerpos policlonales frente a 3P3. A. Muestra experimental con anticuerpos anti-3P3. B. Control negativo con suero pre-immune.....98
- Fig. 45.** Análisis de FTIR de los azúcares de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*, con interpretación de los picos.....100
- Fig. 46.** Análisis de los azúcares de la fracción soluble. Tinción PAS. Columna 1, fracción soluble, columna 2, fracción insoluble (LS-AIM).....101
- Fig. 47.** Análisis de los azúcares de la fracción soluble de la matriz orgánica de *L. gigas*, tras su deglicosilación química. Gel de acrilamida al 15% (carriles 1 a 3), gel de acrilamida al 8% (carriles 4 a 6). Fracción soluble antes (carriles 2 y 5) y después (carriles 3 y 6) de la deglicosilación. Carriles 7 y 8, control positivo con fetuina sin deglicosilar (7) y deglicosilada (8). Las pequeñas bandas visibles en la parte superior del gel (indicadas mediante líneas al margen derecho de los carriles 3 y 6) corresponden al cóctel de enzimas y a sus subunidades, utilizados en la deglicosilación de la fracción soluble.....102
- Fig. 48.** Microscopía electrónica de barrido de cristales sintéticos de calcita crecidos *in vitro*. A. Control negativo:10 nM CaCl_2 .B₁-B₃. Adición de 1P3 a 1 µg/ml (B₁ y B₁*), a 5 µg/ml (B₂ y B₂*) y a 10 µg/ml(B₃ y B₃*). C₁-C₃. Adición de la fracción soluble a 1 µg/ml (C₁y C₁*) 5 µg/ml(C₂ y C₂*) y 10 µg/ml(C₃ y C₃*).Flecha señalando un cristal de vaterita.....104
- Fig. 49.** “Raven and the First Men” (The Story of Creation) por Lionel Samuels artista haida.....119
- Fig. 50.** Nácar comparado de bivalvo y gasterópodo. A. Vista oblicua del nácar en forma de terrazas del bivalvo *P. margaritifera*. B. Vista oblicua del nácar en torres del gasterópodo *Perotrochus caledonicus*. (Modificado de Checa 2009) [13].....122

- Fig. 51.** Microscopía SEM. Membrana interlamelar de *Gibbula pennanti* (gasterópodo), izquierda, y de *Anodonta cygnea* (bivalvo), derecha..... 123
- Fig. 52.** Distribución de *Pteria hirundo*..... 129.
- Fig. 53.** Microscopía confocal de la superficie pulida de la concha de *Haliotis sp.* Pieza experimental, tratada con lectinas (WGA) unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC)..... 148
- Fig. 54.** Microscopía confocal de la superficie pulida de la concha de *Haliotis rufescens*. Pieza tratada con quitinasa y lectina (WGA) unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC)..... 148
- Fig. 55.** Microscopía confocal de la superficie pulida de la concha de *Neotrigonia bednalli*. Pieza experimental, tratada con lectinas (WGA) unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC)..... 149
- Fig. 56.** *P. hirundo*. Marcaje obtenido con 0,02 g/ml de proteinasa K. Oro coloidal de 20 nm. A. In Lens; B. BSE..... 150
- Fig. 57.** *P. hirundo*. SEM. Marcaje obtenido con 0,05 g/ml de proteinasa K. Oro coloidal de 20 nm. A. In Lens; B. BSE..... 151
- Fig. 58.** *P. hirundo*. SEM. 0,2 g/ml de proteinasa K. Oro coloidal de 20 nm. La concentración de proteinasa K empleada origina el desarrollo de patrones de “reloj de arena” en las plaquitas de nácar..... 152
- Fig. 59.** Plaquitas de nácar de *P. hirundo*, membrana interlamelar y fibras de tipo 1..... 153
- Fig. 60.** *P. hirundo*. Membrana interlamelar entre plaquitas de nácar inmaduras, con abundantes fibras de tipo 1 visibles..... 154
- Fig. 61.** *P. hirundo*. Membrana interlamelar entre plaquitas, mostrando fibras de tipo 1. En el centro de la imagen se observa cómo una fibra de tipo 1 pierde grosor hasta quedar en una fibra de tipo 2..... 154
- Fig. 62.** *P. hirundo*. A Detalle. B Fibras de tipo 2 emergiendo del interior de una plaquita de nácar..... 155
- Fig. 63.** *P. hirundo*. Control 1. Piezas control tratadas con quitinasa. La quitinasa se añade al tratamiento normal de una muestra experimental, la desorganización obtenida es muy evidente. A y B. Fotografías SEM en modo In-Lens con distinto aumento. Se aprecia una gran desorganización así como

- corrosión en las plaquitas. C. Detalle (modo ESB) para poner de manifiesto la ausencia de partículas de oro.....156
- Fig. 64.** P. hirundo. Control 2a, sin anti-lectina. A In Lens, B ESB.....157
- Fig. 65.** P. hirundo. Control 2b, sin anti-lectina y sin proteinasa K. A InLens, B ESB.....158
- Fig. 66.** P. hirundo. Control 3. Sin proteinasa K, A InLens, B ESB.....159
- Fig. 67.** P. hirundo. Marcaje simple. A. In Lens. B. ESB, donde se aprecia el marcaje con oro coloidal de 20 nm.....160
- Fig. 68.** P. hirundo. Doble Immunogold. A y B. Extensión de la membrana interlamelar mostrando abundante marcaje para proteínas (partículas de oro de 10 nm), así como cierto marcaje para quitina (partículas de oro de 20 nm).A. In Lens; B. EBS.....162
- Fig. 69.** P. hirundo. Doble immunogold. A. In Lens. B. ESB, en que se marcan con líneas rojas las fibras de tipo 2 observadas en A.....163
- Fig. 70.** P. hirundo. Doble immunogold. A. In Lens. B. ESB, en que se marcan con líneas rojas las fibras de tipo 2 observadas en A.....164
- Fig. 71.** P. hirundo. Doble immunogold. A. In Lens. B. ESB, en que se marcan con líneas rojas las fibras de tipo 2 observadas en A.....165
- Fig. 72.** P. hirundo. Doble immunogold A. In Lens. B. ESB. Puntos de intersección en los cruces de fibras de tipo 1 marcados con partículas de oro de 20 nm. Se observan débilmente algunas fibras de tipo 2 en la membrana de la zona inferior izquierda de A, así como partículas de oro de 20 nm alineadas a lo largo de algunas de estas fibras. A. In Lens. B. ESB.166
- Fig. 73.** P. hirundo. Fibras de tipo 2 en un pequeño fragmento de nácar obtenido por raspado.....167
- Fig. 74.** P. hirundo. Fibras de tipo 2 emergiendo de un fragmento de nácar obtenido por raspado.....168
- Fig. 75.** P. hirundo tratada con proteinasa (0,2 g/ml, 1h). Con vermiculaciones muy evidentes, así como muescas triangulares en los bordes perpendiculares a la dirección de crecimiento de las vermiculaciones.....169
- Fig. 76.** Tabletas rectangulares de P. nobilis, tratadas con proteinasa (0,2 g/ml, 1 h). Patrones de reloj de arena formados tras el tratamiento.....170

Fig. 77. *Tableta de P. nobilis, tratada con proteinasa (0,2 g/ml, 1 h). Gránulos con aspecto cristalino en el margen central-derecho (flechas).....170*

Fig. 78. *Secuencia seguida en el marcaje mediante Immunogold para las muestras experimentales.....176*

Fig. 79. *Esquema que representa el aspecto del nácar deshidratado de Pteria hirundo. Muestra la membrana interlamelar superior descansando sobre la superficie del nácar, tal y como se observa en SEM. Los detalles resaltados son; A. Fibras de tipo 2 atravesando las placas de nácar. B. Membrana interlamelar entre placas con fibras de tipo 2 visibles. C. Membrana interlamelar inalterada. D. Fibras de tipo 1 entre placas. E. Fibras de tipo 2 en un fragmento obtenido mediante raspado. F. Zona en que la membrana interlamelar se deshace en fibras de tipo 1.....178*

Fig. 80. *Esquema de la ultraestructura de las membranas interlamelares del nácar. A. Estructura general del nácar de bivalvos. Las plaquitas se ordenan en terrazas y la membrana interlamelar se extiende por encima de la última lámina formada, más allá del frente de crecimiento de la propia lámina. B. Estructura general de una membrana interlamelar. Tiene aspecto fibroso, con fibras largas aparentemente desorientadas que se extienden por el interior de la membrana. C. Detalle de la ultraestructura de la membrana interlamelar. Se compone de fibras proteicas que rodean a un núcleo de quitina, formando un complejo quitina-proteína. La red está embebida en una matriz proteica adicional.....181*

Fig. 81. *Patrón de “reloj de arena” en Pinna nobilis. (Tratamiento con 0,2 g/ml de proteinasa K).....182*

Fig. 82. *Patrón de “reloj de arena” en Pinna nobilis. (Tratamiento con 0,2 g/ml de proteinasa K).....183*

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados de tensión, compresión, flexibilidad (unidad megapascal, Mpa), Módulo de Young (E) (expresado en gigapascuales, Gpa), para muestras de microestructuras columnar nacarada (Column. Nac., gasterópodos), nacarada (bivalvos), lamelar cruzada de gasterópodo (L.C. Gastrop.), lamelar cruzada de bivalvo (L.C. Bivalv.), foliada (bivalvos) y prismática calcítica (Prism. Calc.) de bivalvos. Modificada de Furuhashi et al (2009)[14].....	36
Tabla 2. Tabla de soluciones para la preparación de las diferentes concentraciones de gel separador.....	57
Tabla 3. Tabla para la preparación del gel concentrador.....	58
Tabla 4. Distintos pasos en el desarrollo de la electroforesis.....	59
Tabla 5. Pasos realizados en la tinción de plata para geles phast-system...60	
Tabla 6. Tabla de soluciones para la preparación del gel SDS-PAGE. Gel separador.....	62
Tabla 7. Tabla de soluciones para la preparación del gel SDS-PAGE. Gel concentrador.....	63
Tabla 8. Nomenclatura de los inmunisueros.....	65
Tabla 9. Masa molecular relativa de las proteínas obtenidas de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de L. gigas.....	78
Tabla 10. Masa molecular relativa de las proteínas obtenidas de la fracción insoluble de la matriz orgánica de la concha de L. gigas.....	79
Tabla 11. Análisis ICP-Masas para una muestra de L. gigas.....	99
Tabla 12. Análisis de los azúcares de la fracción soluble de la matriz orgánica de L. gigas.....	102

Abreviaturas

AgNO₃ (nitrato de plata)

APS (persulfato de amonio)

ASM (acid- soluble matrix)

AIM (acid-insoluble matrix))

BSE (back-scattered electrons)

CBMSO (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa)

CaCl₂ (cloruro cálcico)

CLSM (microscopía confocal)

CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)

Da (unidad de masa atómica unificada, dalton)

DAB (3',3' diaminobencidina tetrahidroclorada)

DO (densidad óptica)

DTE (ditioeritritol)

EDTA (Ácido etilen-diamino-tetraacético)

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Fc (fragmento cristalizable del anticuerpo)

FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy)

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

FITC (Isotiocianato de fluoresceína)

HAc (ácido acético)

HCL (ácido clorhídrico).

IFAT (inmunofluorescencia directa e indirecta)

IFD (inmunofluorescencia directa)

IFI (inmunofluorescencia indirecta)

Ig (inmunoglobulina)

KCl (cloruro de potasio)

kDa (kilodalton)

KH₂PO₄ (fosfato monopotásico)

k5087 (Anticuerpo obtenido frente a la matriz orgánica soluble al ácido acético) (ASM, acetic acid-soluble matrix) de *Pinctada margaritifera*)

K5089 (Anticuerpo obtenido frente a la ASM de *Pinna nobilis*)

k5090 (Obtenido frente a la ASM de *Pinna nobilis*)

K4952 (Obtenido igual que los anteriores, pero con respecto al bivalvo *Bathymodiolus*.)

LB (medio Luria-Bertani)
LEI-18S1 (cebador para ARN ribosómico 18S)

M (Unidad de masa Molar)
MALDI-TOF (Matriz-Assisted Laser Desorptionionisation/time-of-flight)
MgCl₂ (cloruro de magnesio)

NaCl (cloruro sódico)
NaCO₃ (carbonato de sodio)
NaHCO₃ (bicarbonato de sodio)
Na₂HPO₄ (fosfato disódico)
NaN₃ (azida sódica)

OPD (O-fenil diaminobenzidina)
OVA (ovoalbúmina)

PAS (Periodic Acid-Schiff)
PBS (tampón fosfato salino)
PBS-OVA (tampón fosfato salino con ovoalbúmina purificada)
PBST (PBS con tween 20)
PBSTG (PBST con gelatina)
PVDF (polifluoruro de vinilideno)

RNM (resonancia magnética nuclear)
RPM (revoluciones por minuto)

SDS (dodecilsulfato sódico)
SDS-PAGE ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis')
SEM (Scanning Electron Microscope/Microscopy)
SFB (suero bovino fetal)

TBS (tris-buffered saline)
TEM (Trasmission Electron Microscope/Microscopy)
TEMED (tetrametiletilendiamina)
TFA (ácido trifluoroacético)

U (unidades)
UGR (Universidad de Granada)
UV (ultravioleta)

WGA (Wheat Germ Agglutinin)

Abstract

In molluscs, the shell organic matrix comprises a large set of biomineral-occluded proteins, glycoproteins and polysaccharides, that are secreted by the calcifying mantle epithelium, and display several and fundamental functions related to the synthesis of the shell.

The study of biomineralization faces two major challenges, one is represented by the crossed-lamellar microstructure, the other by the nacre. The crossed-lamellar is the most abundant microstructure with difference, but nevertheless we have barely begun to reveal its secrets. Nacre, despite being the most studied microstructure, still harbors considerable uncertainties, not only in terms of its development, but also in regard to the structure itself.

In the present PhD Thesis, we have characterized biochemically the shell matrix associated to the crossed-lamellar structure of the giant queen conch *Lobatus gigas*. The acid-soluble (ASM) and acid-insoluble (AIM) matrices represent an extremely minor fraction of the shell. Both are constituted by a few discrete polidisperse proteins. Among which, three fractions, obtained by preparative SDS-PAGE and named 1P3, 2P3 and 3P3, are dominant and were further characterized. Compared to other matrices, the acid-soluble matrix is weakly glycosylated (3%) and among the discrete components, only 3P3 seems noticeably glycosylated. The monosaccharide composition of the ASM shows that mannose represents the main monosaccharide. To our knowledge, this is the first report of a high ratio of this sugar in a skeletal matrix. Furthermore, the ASM interacts with the *in vitro* crystallization of calcium carbonate, but this interaction is moderate. It differs from that of the isolated 1P3 fraction but is similar to that of the 2P3 and 3P3 fractions. At last, antibodies developed from the 3P3 fraction were used to localize this fraction within the shell by immunogold.

On the other hand, we have studied the chitin fibers in the interlamellar membranes of shell nacre. Although it is generally accepted that chitin is found as fibers in the interlamellar membranes of nacre, the disposition of these fibers has been discussed. So far most of the observations have been taken on previously demineralized shells, where the original structure

disappears. We, however, have applied different labeling techniques (direct immunofluorescence and immunogold) on non-demineralized nacreous shells. We have revealed the disposition and nature of the different fibers that can be observed on the surface of the nacreous shell of the bivalve *Neotrigonia* sp., *Haliotis rufescens* and *Pteria hirundo* by confocal microscopy and scanning electron microscopy (SEM). During the experimental development we found evidence of intracrystalline chitin in nacre platelets. They have helped to reveal the growth dynamics of nacre, through the interaction of organic matter with calcium carbonate.

Resumen

En moluscos, la matriz orgánica de la concha se compone de un gran número de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, que son secretados por el epitelio calcificante del manto, y que juegan un papel fundamental en las funciones de la síntesis de la concha.

El estudio de la biomineralización se enfrenta a dos grandes retos, uno de ellos está representado por la microestructura lamelar cruzada, el otro por el nácar. La lamelar cruzada es con diferencia la microestructura más abundante, pero pese a ello apenas hemos comenzado a desvelar sus secretos. El nácar, es la microestructura más estudiada pero aun alberga muchas incógnitas, no solo en cuanto a su desarrollo, sino también en lo que respecta a la propia estructura.

En este estudio, se ha caracterizado bioquímicamente la matriz asociada a la estructura lamelar cruzada de la concha reina, *Lobatus gigas*. Las matrices orgánicas soluble e insoluble representan una fracción minoritaria de la concha. Ambas están compuestas por una pequeña proporción de proteínas. De ellas se han purificado tres fracciones dominantes mediante electroforesis SDS-PAGE preparativa, denominadas como 1P3, 2P3 y 3P3, y posteriormente han sido caracterizadas. Comparada con otras matrices, ésta está débilmente glicosilada (3%). Sólo la fracción 3P3 se presenta notablemente glicosilada. La composición de azúcares muestra que la manosa es el monosacárido principal. Siendo la primera vez que se constata este dato. Las proteínas purificadas interaccionan con el carbonato cálcico durante el proceso de

cristalización *in vitro*, pero esta interacción es moderada. Se empleó el anticuerpo obtenido frente a 3P3 se usó para localizar a estas proteínas en las conchas mediante inmunogold.

Se han estudiado las fibras de quitina en conchas con estructura nacarada. Aunque de manera general se acepta que las fibras de quitina se presentan en las membranas interlamelares del nácar, la disposición de estas fibras ha sido discutida. Hasta ahora la mayoría de las observaciones se habían realizado en conchas desmineralizadas, donde la estructura original se pierde. En nuestro estudio hemos aplicado diferentes técnicas de marcaje (inmunofluorescencia directa e inmunogold) de las fibras de quitina en conchas no desmineralizadas. Hemos puesto así de manifiesto la disposición y la naturaleza de las diferentes fibras en la superficie del nácar sin desmineralizar, de los bivalvos *Neotrigonia* sp., *Haliotis rufescens* y *Pteria Hirundo*, trabajando con microscopía confocal y con microscopía electrónica de barrido (SEM). Durante el desarrollo experimental se encontraron evidencias de la presencia de quitina intracristalina en las plaquitas de nácar. Las observaciones realizadas, y los resultados experimentales, nos han ayudado a desvelar las dinámicas de crecimiento del nácar, mediante la interacción de la materia orgánica con el carbonato cálcico.

1.-Introducción

1.- INTRODUCCIÓN

Los biomateriales son tan sorprendentemente variados como abundantes en nuestro mundo. La biomineralización (regulación biológica de la mineralización) comenzó hace más de 500 millones de años, siendo sin duda uno de los factores clave en el desarrollo de la vida en este planeta.

El estudio de los procesos de biomineralización es de una importancia y complejidad tal que es imposible abordarlo desde un solo campo de la ciencia, precisando un enfoque multidisciplinar. Es importante para la ciencia que se dedica al estudio de materiales, para la medicina reparativa, e igualmente sustancial en investigaciones evolutivas, filogenéticas, estratigráficas y por supuesto ecológicas. Es muy difícil (si no imposible) abarcar la amplitud y significación de la biomineralización con la mente. Es un fenómeno biológico donde confluye el mundo vivo con el mundo mineral; ambos se unen, se asocian, y conducen a materiales híbridos.

La parte de la ciencia que aborda el estudio de la biomineralización se centra en la interacción entre los componentes inorgánicos de estas estructuras con su fracción orgánica. Gracias a ésta última adquieren las propiedades y cualidades que han hecho a los biominerales tan variados y exitosos evolutivamente. ¿Cómo puede la materia viva dirigir la formación de minerales? ¿Cómo se controlan la composición, la forma, la localización y hasta la reparación si se hace precisa?

En los últimos años, el abordaje multidisciplinar del proceso está revolucionando, como quizás era esperable, campos muy diferentes de la ciencia, desde la biología básica hasta la geología, pasando por ingenierías y las nacientes ciencias de investigación en nuevos materiales. Se especula, y se trabaja en ello desde hace varias décadas, en la consecución de productos industriales muy superiores a los usados en la actualidad, pero se hace preciso previamente desvelar la complejidad del proceso.

En el Phylum Mollusca (el segundo más numeroso de todo el reino animal, tras los artrópodos) sus biominerales se revelan día a día como sumamente complejos y fascinantes. Las microestructuras que constituyen las conchas de moluscos pueden ser de diversos tipos. Dos destacan por encima del resto por su importancia; este

estudio se ha centrado en ambas. La microestructura lamelar cruzada es una de ellas, la más abundante en las especies actuales, pero que, sin embargo, apenas ha comenzado a estudiarse desde un enfoque molecular. La otra es el nácar, microestructura de unas propiedades estructurales tan complejas como interesantes, en ella los estudios proteómicos sí están avanzados, pero continúan existiendo importantes lagunas en cuanto a su estructura y al proceso de su formación.

Este trabajo es una aproximación, desde las técnicas microscópicas y moleculares, al conocimiento de los componentes orgánicos que otorgan a estas dos microestructuras sus peculiares características. Es un pequeño avance que abre camino a investigaciones posteriores. Se precisarán muchos años de estudio para desvelar por completo los secretos mecanismos de interacciones surgidas, y seleccionadas, a lo largo de cientos de millones de años.

2.-Antecedentes Bibliográficos

2.-ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1.- IMPORTANCIA CIENTÍFICA Y EVOLUTIVA

"Tengo un amigo artista que suele adoptar una postura con la que yo no estoy muy de acuerdo. Él sostiene una flor y dice: «Mira qué bonita es», y en eso coincidimos. Pero sigue diciendo: «Ves, yo, como artista, puedo ver lo bello que es esto, pero tú, como científico, lo desmontas todo y lo conviertes en algo anodino».

Y entonces pienso que él está diciendo tonterías. Para empezar, la belleza que él ve también es accesible para mí y para otras personas, creo yo. Quizá yo no tenga su refinamiento estético, pero puedo apreciar la belleza de una flor.

Pero al mismo tiempo, yo veo mucho más en la flor que lo que ve él. Puedo imaginar las células que hay en ella, las complicadas acciones que tienen lugar en su interior y que también tienen su belleza. Lo que quiero decir es que no sólo hay belleza en la dimensión que capta la vista, sino que se puede ir más allá, hacia la estructura interior.

También los procesos, por ejemplo, el hecho de que los colores hayan evolucionado para atraer a los insectos significa que los insectos pueden apreciar el color. Y entonces se crea la pregunta: ¿El sentido de la estética también lo tienen las formas de vida menores de la naturaleza? ¿Por qué razón les resulta estético?

Toda clase de interesantes cuestiones de la ciencia que no hacen sino sumarle misterio e interés a la impresión que deja una simple flor, no entiendo cómo podría restárselo"

Richard Feynman, entrevistado para la BBC en 1981.

Es innegable que hay belleza en la ciencia, pues la ciencia no sólo es un método, sino también todo aquello que hemos llegado a conocer sobre la naturaleza gracias al método. La naturaleza es bella, y lo es más a medida que se incrementa su conocimiento.

Sostener en la mano una concha de un molusco como *Lobatus gigas* es similar al ejemplo de la flor utilizado por Feynman; ambas son maravillas de la naturaleza. Pero: ¿qué nos dice una concha de *Lobatus gigas*?

Es difícil transmitir la importancia de la ciencia básica a los profanos a ella, y es muy difícil también incluso convencer a muchos científicos que podríamos llamar “prácticos”. Para transmitir la importancia, o la belleza, de un experimento es necesario situarse en el contexto en el que éste se realiza. En ocasiones (para la ciencia directamente práctica) ello no es necesario. Casi todo el mundo puede entender, por ejemplo, la necesidad de estudiar las células madre, pero para la ciencia básica, la transmisión del contexto se hace sumamente importante. Además, esta acción se convierte en mucho más compleja pues conlleva transportar al lector, o al público en general, al escenario en el que el investigador especializado se mueve con soltura, cuando probablemente el puente que permitió el acceso del investigador a ese lugar del conocimiento desapareció hace mucho tiempo.

Es en el conocimiento mismo donde se encuentra la importancia de un estudio. Puede que de él no se vayan a extraer consecuencias beneficiosas directas. La sociedad se ha acostumbrado a la recompensa rápida y fácil, corriendo el riesgo de olvidar el camino ya recorrido por muchas generaciones anteriores.

Para transmitir la importancia de este trabajo debería remontarme muy atrás en el tiempo. ¿Cuánto? Depende del espacio del que disponga y de la paciencia o interés del lector. Si fuera posible este estudio empezaría por el principio conocido (¡catorce mil millones de años al pasado!), para así poder relatar desde el origen de los principales elementos con los que trabajamos en este proyecto, hasta los procesos evolutivos que los han convertido en lo que son.

Decir que las conchas de los moluscos están formadas por carbonato cálcico no es decir nada, a no ser que tengamos en cuenta que el calcio que forma parte de ellas proviene necesariamente del interior de antiguas y gigantescas estrellas rojas, enormes condensaciones gaseosas formadas por nubes de hidrógeno que, actuando como hornos de fusión atómica, unieron un átomo de

helio con otro de argón, a una temperatura cercana a los dos mil quinientos millones de grados centígrados. El oro que hemos utilizado en las técnicas de marcaje de anticuerpos tiene su origen más probable en la explosión de una supernova, o en el choque de dos estrellas de neutrones [15]. Estas consideraciones cambian sin duda nuestra visión de las cosas; desde esta perspectiva se amplía drásticamente el escenario, pero sólo es el principio.

Vamos a tratar de introducir al lector en el contexto de este trabajo y, aunque no podemos perdernos en los detalles, sí que vamos a comenzar comentando la existencia de un cierto paralelismo entre la cosmología, o más concretamente la teoría del Big Bang, y la teoría evolutiva.

Como puntos en común podemos destacar por una parte el hecho de que casi todo el mundo cree comprender perfectamente ambas teorías, siendo lo habitual el que muchos estén muy lejos de hacerlo, al menos fuera del ámbito estrictamente académico. Además ambas son teorías que sirven para explicar el presente a través del pasado, usando para ello las observaciones y datos que podemos conseguir en la actualidad. Esto en ocasiones supone tener que enfrentarse a grandes dificultades; algunas de las cuales se han creído insalvables (es el caso actual del Big Bang), pues la física actual no sirve para explicar un universo en el que las leyes de la física podrían ser distintas. De igual modo ha ocurrido durante muchos años con el llamado Big Bang de la vida, la que muchos han considerado como la mayor explosión de diversidad y probablemente de disparidad (Gould en *La vida maravillosa*): la explosión cámbrica de hace unos 540 millones de años.

“A la pregunta de por qué no encontramos ricos depósitos fosilíferos, correspondientes a estos supuestos períodos antiquísimos anteriores al sistema cámbrico, no puede darse respuesta alguna satisfactoria.”

“El origen de las especies por medio de la selección natural”. Charles Darwin.

Capítulo 10: 245.

De acuerdo con el trabajo de Conway Morris[16], podemos resumir (casi caricaturizando) las distintas opiniones científicas respecto a la explosión cámbrica en dos vertientes. Por un lado

están aquellos que consideran que no hubo tal explosión de diversidad, siendo un mero artefacto, consecuencia de factores como la escasez de información fósil, el incremento en el tamaño de los organismos, y el del uso de la biomineralización. Los restantes creen que sí se dio una verdadera explosión de biodiversidad, pues aunque el registro fósil pueda estar inevitablemente sesgado, es muy difícil que lleve a equívocos artefactuales del calibre de la explosión cámbrica.

Con independencia de a qué lado se incline más la balanza, la realidad probablemente se encuentre en una combinación de ambas perspectivas, ya que centrarnos en una sola de ellas, cerrándonos a los argumentos aportados por la contraria, probablemente sólo nos llevaría a retrasar más aun la resolución de los problemas que la explosión cámbrica nos ha planteado.

Desde una perspectiva parcial difícilmente resolveríamos la enorme radiación adaptativa que la explosión cámbrica supuso. Son varios los factores clave a tener en cuenta, y aunque quizá no debemos buscar un único desencadenante (como puedan ser los genes *hox*, las células nerviosas, o la predación y competencia), sí es cierto que algunos cambios o factores debieron ser cruciales, y uno de ellos, quizá uno de los más importantes, fue la biomineralización. Para apreciarlo nos basta con observar el “corto” periodo temporal en el que tuvo lugar por primera vez la biomineralización en gran cantidad de metazoos (Fig. 1).

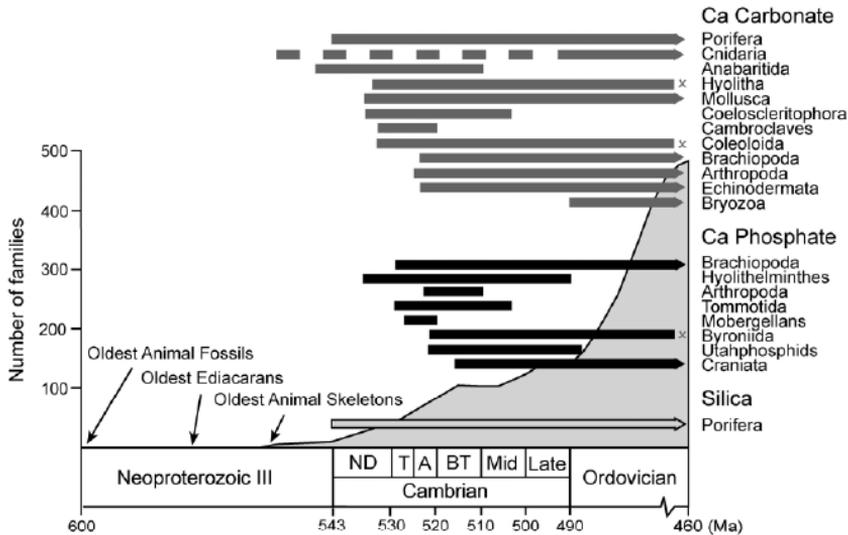


Fig. 1. Diversidad, composición y distribución estratigráfica de los restos biomineralizados de animales del Cámbrico-Ordovícico. Imagen tomada de [1], datos de esqueletos modificados de [2] y diversidad de familias de [3].

2.2.- BIOMINERALIZACIÓN, EVOLUCIÓN EN MOLUSCOS

Biomíneralización es un término que, al igual que los más importantes de la vida, tiene varios significados. Se refiere tanto al proceso dinámico y fisiológico por el cual los seres vivos son capaces de formar estructuras minerales, como al producto final de estos procesos, y al estudio de dichos sólidos inorgánicos de procedencia orgánica.

Los biominerales tienen múltiples utilidades en los organismos vivos. Pueden formar parte de detectores de la posición del cuerpo, gracias a la gravedad o a campos magnéticos, constituyen también el soporte de otras estructuras, sirven para la alimentación, para la protección frente a rayos UV, y pueden ser también estructuras protectoras y defensivas.

Las conchas de los moluscos son compuestos orgánico-minerales formados por carbonato cálcico. El carbonato cálcico es el mineral más común de los originados en los metazoos y el más abundante, desde las espículas de ciertas esponjas marinas hasta

los equinodermos [5], pasando por los moluscos. Asombra conocer el amplio uso que éstos últimos hacen de él: gránulos intracelulares de detoxificación, espículas epiteliales, opérculos, dardos del amor, perlas, estatolitos y, por supuesto, sus conchas.

Se ha creído durante mucho tiempo que los moluscos, uno de los Phyla de mayor importancia paleontológica, tuvieron su origen con la explosión cámbrica, pero probablemente se originaron en el Precámbrico, ya que ejemplares de la fauna de Ediacara, como es el caso de *Kimberella quadrata* (que data de hace unos 555 millones de años), se han identificado como posibles moluscos ancestrales. Según se deduce de diversas reconstrucciones y de análisis como el del ADNr 18s, el origen de los moluscos se remonta al Precámbrico, sufriendo una gran diversificación en el extremo final del Proterozoico, Eón previo al Cámbrico (Figura 2), aunque estudios recientes, apuntan a que esta diversificación pudo darse después [17].

Son varias las conclusiones que podemos extraer de esto, siendo una de ellas particularmente importante. Parece ser que los moluscos, al igual que otros taxones, desarrollaron la capacidad de formar conchas mucho tiempo después de desarrollarse como Phylum, explotando tras ello, y rápidamente, todas las posibilidades de desarrollo de la concha [18].

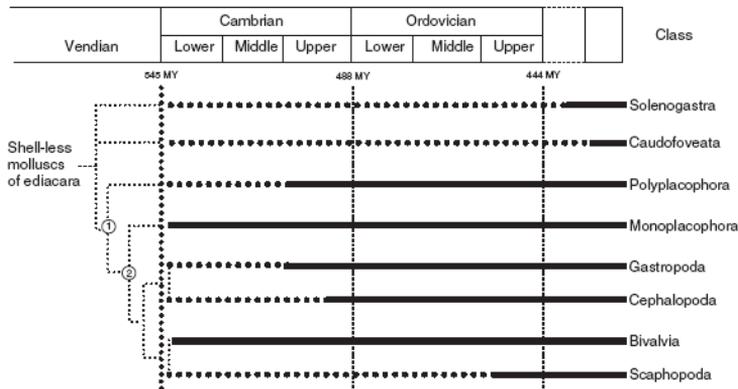


Fig. 2. Origen y filogenia del Phylum Mollusca. Basado en la proposición de Lecointre y Le Guyader ([4] en la cual Solenogastrea y Caudofoveata ocupan una posición basal. El punto 1 representa el Subphylum Eumollusca, el punto 2 representa la superclase Conchífera. A excepción de esas dos clases y de

Scaphopoda, todos los eumoluscos aparecieron por primera vez en el Cámbrico. Tomado de [5].

“Las especies relacionadas variarán en direcciones similares y estarán sujetas a influencias selectivas similares. Por ello cabrá esperar que evolucionen en paralelo”

(J.B.S. Haldane, 1932 *The Causes of evolution*, [19]).

Bivalvos, gasterópodos, escafópodos, polioplacóforos, cefalópodos, monoplacóforos, caudofoveados y solenogastos son los actuales representantes del Phylum Mollusca. Tienen su origen en lo que se cree pudo haber sido un molusco de aspecto similar a un monoplacóforo. Al menos bivalvos, gasterópodos y monoplacóforos (junto con otros grupos ya extintos) se desarrollaron rápidamente formando parte de la explosión cámbrica. Al igual que sucedió en otros Phyla, los moluscos probablemente desarrollaron la biomineralización tiempo después de tener características para ser considerados como un Phylum.

Al no heredar los metazoos la biomineralización directamente de sus ancestros comunes[1], podemos considerar dichas estructuras como análogas, representando por ello un buen ejemplo de homoplasia.

La similitud evolutiva por homoplasia puede darse por tres caminos distintos. Por reversión sería la “vuelta” de un carácter a un estado ancestral; como es evidente, éste no es el caso. Por convergencia es cuando se da la aparición de un nuevo carácter de forma independiente, y por paralelismo cuando organismos emparentados desarrollan un rasgo común bajo presiones selectivas similares, según lo que podemos suponer.

El desarrollo de las conchas en general es entonces un ejemplo de homoplasia evolutiva, pero, ¿a qué nivel?, ¿de qué tipo?

Para explicar cómo los metazoos en general, o los moluscos en particular, desarrollaron la capacidad de producir biominerales, podemos dibujar dos posibles escenarios.

Lowenstam y Margulis sugirieron en 1980 [5] que la maquinaria necesaria para la calcificación ya se encontraba perfectamente pulida cuando los primeros animales comenzaron a calcificar. Se especula que la calcificación pudo ser resultado de la utilización de mecanismos que ya estaban presentes en el Precámbrico, que fuesen heredados y reutilizados (exaptados), cambiando su función original. Es algo que podríamos considerar un paralelismo, puesto que los elementos necesarios para la biomineralización serían en este caso de herencia común en todos los moluscos.

Pero también es posible que la calcificación sea el resultado de algo más cercano a una convergencia evolutiva que a un paralelismo. Podría considerarse de este modo si los procesos necesarios para la biomineralización de las conchas hubiesen evolucionado de forma similar, no como resultado de una herencia común, sino por el “creodo” formado por las constricciones evolutivas, resultando en una convergencia a nivel molecular.

Se habría favorecido así el desarrollo de un sistema basado en proteínas ácidas extracelulares para la formación de puntos de nucleación, y de inhibidores del crecimiento de cristales para favorecer que se dieran las estructuras requeridas, a partir de dichos puntos de nucleación.

Lo cierto es que no tenemos una respuesta clara a esta pregunta. Pudiera ser, y así apuntan los resultados, que ambas hipótesis tuvieran su porción de verdad.

Apoyando a lo que se ha llamado “herencia antigua”, sabemos que en el inicio del Cámbrico las conchas de moluscos ya eran complejas, y se encontraban bien diversificadas. De hecho se han descrito reacciones cruzadas de anticuerpos entre vertebrados y equinodermos, y entre moluscos y braquiópodos, así como también se ha dado un cierto apoyo a la idea de Lowenstam y Margulis, estudiando dominios de proteínas [5]. Ello nos lleva a suponer que la maquinaria requerida para llevar a cabo los procesos propios de la biomineralización pudiera haber estado ya presente en los ancestros de estos grupos. A favor de la hipótesis de “herencia reciente o evolución rápida”, podemos decir que los análisis de los genes y proteínas implicadas en la formación de biominerales han

demostrado que, al menos en algunos casos, la biomineralización ha sido un invento independiente en distintos grupos (en equinodermos y vertebrados), y que las diferencias en cuanto al secretoma entre moluscos taxonómicamente cercanos puede llegar a ser enorme.

El origen evolutivo de la biomineralización es aún por tanto un misterio por resolver. Alguien puede llegar a pensar que este problema es, de algún modo, predecible, teniendo en cuenta que estamos abordando un tema que data de hace unos 540 millones de años, pero si nos centramos en los moluscos, descubriremos que tanto las incógnitas como los retos, no se quedan aquí.

2.3.- MICROESTRUCTURAS

En el borde del manto existen unos pliegues, tres o más en bivalvos y dos en gasterópodos. El surco entre los pliegues externo y medio del manto (Fig. 3) se encarga de segregar una membrana rica en tiroxina, esta membrana rápidamente se vuelve insoluble y se esclerotiza, formando el periostraco. Este tejido tiene diversas utilidades: camufla y protege al animal, actúa como estabilizador en el sustrato y protege la concha de soluciones pobres en CaCO_3 [21, 22]. Su principal función, sin embargo, junto con la región externa del manto, es delimitar el espacio extrapaleal, el lugar en el que se da la formación de la concha, donde se secretarán iones de bicarbonato, calcio, proteínas y los polisacáridos de la matriz. La transición de los precursores, líquidos o amorfos, hasta la estructura ordenada y sólida que es la concha, es un proceso complejo que aún se resiste a ser dilucidado.

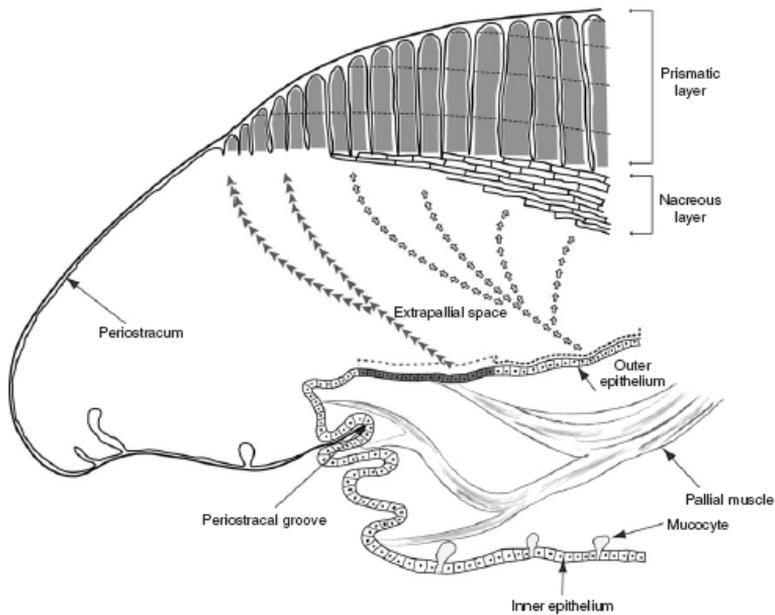


Fig. 3. La concha se forma en lo que se conoce como espacio extrapaleal, una zona aislada del exterior y limitada por el manto y el periostraco del animal. El manto es un tejido polarizado; en la cara basal y en contacto con el medio ambiente se encuentra el epitelio interno del manto; en contacto con el periostraco encontramos el epitelio externo, que comprende tejidos conectivos, fibras nerviosas y músculos, y por último el epitelio interno, encargado de formar la concha, y limitar el espacio extrapaleal. La imagen no representa las proporciones reales, especialmente en cuanto al espacio extrapaleal que aquí se representa exageradamente aumentado. Tomada de Marin et al., 2007 [5]

Sin lugar a dudas, este sería un asunto mucho más fácil de resolver si las conchas fuesen simplemente el bloque de carbonato cálcico que todos hemos creído alguna vez que son, pero están muy lejos de ser tan sólo eso. Las conchas de los moluscos son estructuras complejas, constituidas por cristales de calcita, de aragonito, o en el menor de los casos de vaterita. Son formas (polimorfos) en las que el carbonato cálcico puede mineralizar en función de las condiciones ambientales (externas e internas), dando lugar con ello a cristales con distintas estructuras y propiedades.

A su vez los cristales se organizan en microestructuras concretas, y sorprendentemente diversas, (categorizadas por primera vez en 1930 por el científico danés O. B. Bøggild [23]), siendo el

nácar, o madreperla, la más conocida de todas y quizás la más fácil de reconocer a simple vista.

En una misma concha pueden encontrarse varios tipos de microestructuras, se organizan normalmente en capas, siendo su número muy variable (entre dos y tres).

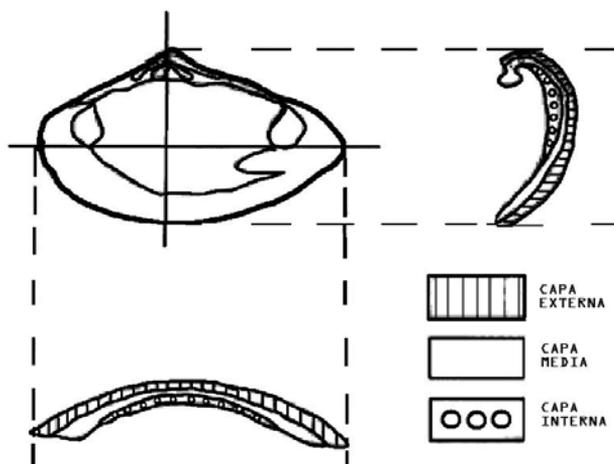


Fig. 4. Disposición típica de las distintas capas de la concha en un bivalvo de la familia Veneridae. Modificado de Shimamoto (1986) [6]

Pero aquí no acaba la complejidad estructural de las “casas” de los moluscos. La concha es un compuesto orgánico-mineral (“*biocomposite*”), en el que la microestructura cristalina se encuentra íntimamente asociada a una matriz orgánica formada por proteínas, glicoproteínas y polisacáridos ácidos. Esta matriz orgánica, segregada durante la formación de la concha, se cree sumamente importante en la formación y diferenciación de las distintas microestructuras, aunque supone únicamente entre un 0,1 y un 7% del peso total seco de la concha [5]. Al comparar los cristales de carbonato cálcico formados en condiciones abióticas con los que forman parte de las conchas, podemos apreciar fácilmente la diferencia, y la importancia de las condiciones de crecimiento (mediadas por la matriz orgánica) en la formación de dichas microestructuras.

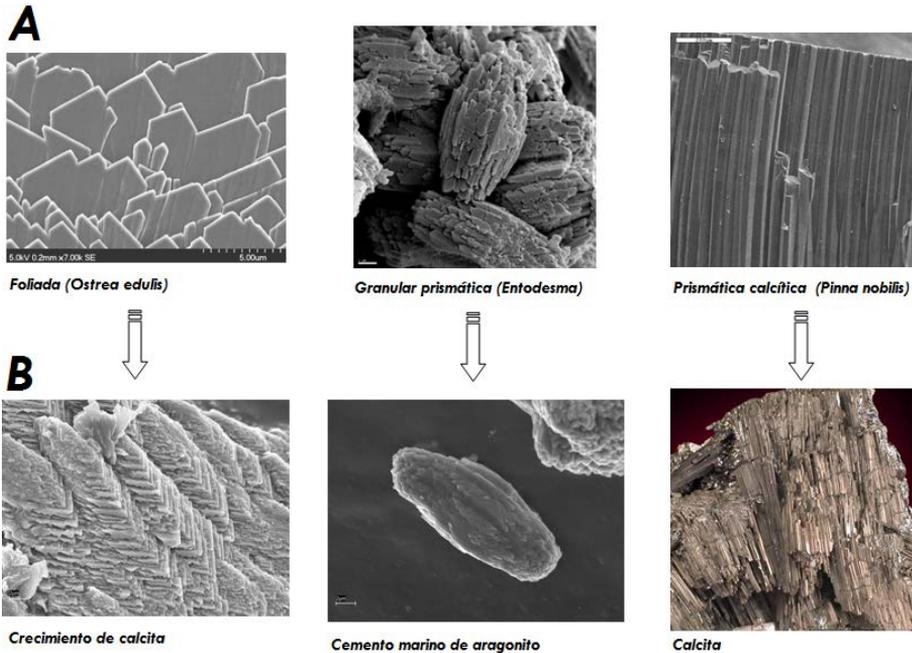


Fig.5. Algunas microestructuras son fácilmente comparables con sus precipitados inorgánicos. A. Biominerales. B. Crecimientos inorgánicos.

Esta asociación órgano-mineral es la que otorga a las conchas las propiedades mecánicas que las hacen tan especiales. Las láminas de duro, pero frágil, carbonato cálcico están separadas y embebidas en una finísima matriz proteica flexible, gracias a la cual su resistencia aumenta considerablemente.

Los materiales compuestos (*composites*) deben sus propiedades a la interacción de materiales complementarios. Para ejemplificar la relación entre el carbonato cálcico y la materia orgánica de la matriz, podemos recurrir a las construcciones humanas. El barro como elemento estructural es muy débil en tensión pero muy fuerte en compresión. La paja posee precisamente las propiedades inversas, es fuerte en tensión y débil en compresión. La combinación de ambos materiales es el conocido adobe, mezcla de barro con paja en las proporciones adecuadas, técnica de construcción de edificaciones que se remonta al neolítico (Çatalhöyük, 7000 A.C., en la actual Anatolia), y sigue usándose por sus cualidades de dureza y elasticidad. De hecho, ahí no acaban las similitudes, pues el adobe ha tenido orígenes independientes en

culturas no comunicadas, siendo también sin duda un buen ejemplo de convergencia evolutiva, aunque en este caso cultural.

Entre las distintas microestructuras, el nácar es la que posee la mayor proporción de materia orgánica [24], y es también la más conocida.

El nácar se forma por finas láminas de carbonato cálcico intercaladas entre láminas de “pegamento” orgánico, que confieren a la estructura una resistencia a la fractura 3000 veces mayor a la que posee el aragonito [25, 26]. Históricamente el nácar se ha utilizado con gran cantidad de fines, destacando su uso como elemento decorativo, ya sea partiendo de conchas o en forma de perlas. Pero el nácar sólo es la microestructura más fácil de reconocer y la que más ha interactuado con nosotros históricamente. En realidad son muchas las microestructuras que podemos encontrar en las conchas, y que de alguna forma las restricciones evolutivas han permitido desarrollar.

El carbonato cálcico puede presentarse principalmente en forma de aragonito o de calcita, y cada mineral da lugar a distintas microestructuras (Fig. 6). Mientras que entre las de calcita encontramos la microestructura prismática, foliada o la llamada “chalk”, entre las microestructuras de aragonito existen: nacarada, prismática aragonítica, lamelar cruzada, granular prismática, foliada y homogénea (siendo ésta última objeto de debate).

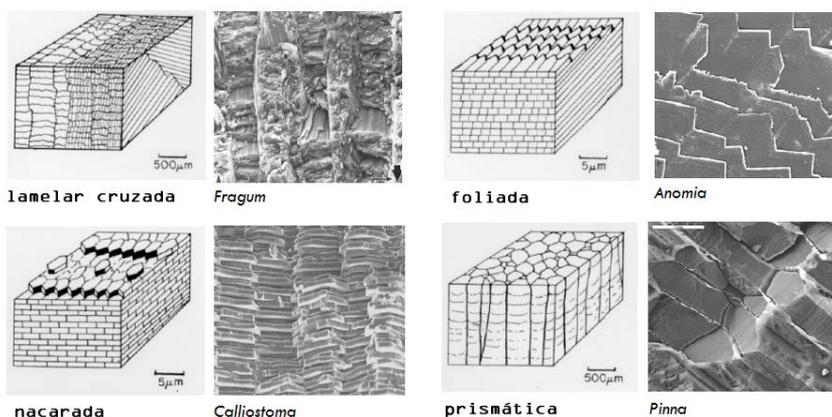


Fig. 6. Algunas microestructuras de moluscos. Original de Currey & Taylor [7].

Aunque es mucho lo que queda por saber sobre todas estas microestructuras, hay dos de ellas que destacan especialmente sobre el resto. Una de ellas, el nácar, como ya se ha comentado, es muy resistente a la fractura, tiene una arcaica y estrecha relación con nuestra cultura por su belleza y es, hasta ahora, la única microestructura que se ha utilizado con fines médicos substituyendo al hueso. Desde nuestro punto de vista la otra microestructura destacable es la lamelar cruzada (la más abundante en la actualidad), que también es objeto de estudio en esta investigación.

3.- LAMELAR CRUZADA

3.- LAMELAR CRUZADA

3.1- ANTECEDENTES LAMELAR CRUZADA

La microestructura lamelar cruzada es, con diferencia, la más abundante en la actualidad. Está presente en todas las clases de moluscos a excepción de los cefalópodos. En bivalvos es característica del orden Arcoïda (Taxodontia) y de la subclase Heterodontia, el taxón más diverso, pero también la encontramos de forma mayoritaria en gasterópodos (Vetigastropoda), escafópodos y polioplacóforos. Esta microestructura presenta algunas características peculiares que la hacen única y muy interesante.

Se compone de láminas entrecruzadas de aragonito (diversos Patellogastropoda presentan una variante calcítica cargada de incógnitas [27]), que están separadas entre sí por membranas proteicas, dando lugar a una estructura que puede recordar a lo que conocemos como madera contrachapada (Fig. 7).

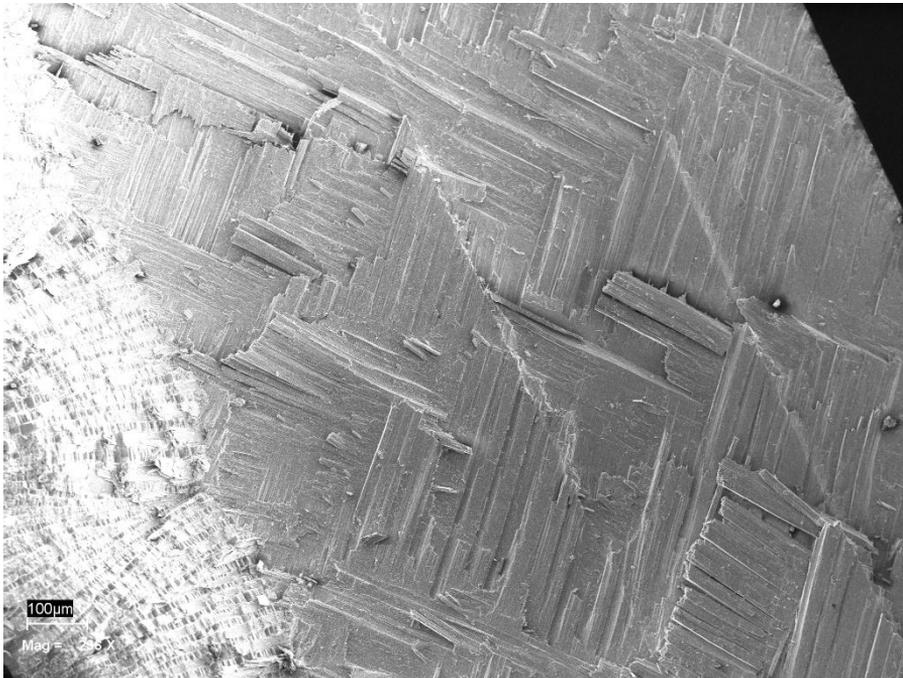


Fig. 7. Apariencia de la lamelar cruzada. Microscopía electrónica de barrido. Concha fracturada comarginalmente de un gasterópodo (Conus striatus). De A. Checa.

Un diseño de tipo contrachapado se utiliza con la finalidad de dotar de resistencia a la estructura elaborada. Los egipcios, cuando carecían de buenos materiales, lo utilizaban para dar resistencia a sus útiles de madera.

La microestructura lamelar cruzada puede considerarse la más compleja entre las de moluscos. Su organización interna ha favorecido su éxito evolutivo actual, así como también ha permitido que se desarrollen conchas enormes en algunos grupos de moluscos, por los motivos que más adelante vamos a abordar. Está formada por pequeñas bandas de cristales de aragonito (de menos de 0,5 μm de grosor) embebidas en una matriz orgánica de grosor nanométrico. Dichas láminas se encuentran unidas y ordenadas en capas llamadas lamelas, y éstas se disponen igualmente amontonadas en paralelo, de forma que dan lugar a bloques fácilmente reconocibles de un grosor que varía entre 10 y 40 μm , y una longitud mucho mayor, que oscila de unas lamelas a otras. Estos bloques son las llamadas lamelas de primer orden.

El resultado, mucho más fácil de entender visualizándolo que leyendo ésta o cualquier otra descripción (ver figura 8), es una estructura en la que las lamelas de primer orden están constituidas por lamelas de segundo orden, apiladas y ordenadas en bloques e inclinadas unos 90° - 130° con respecto a las lamelas adyacentes de primer orden. A su vez, estas lamelas secundarias están formadas por pequeñas agujas de aragonito llamadas lamelas de tercer orden. Todo ello da lugar a una estructura fácilmente reconocible. Una variante de esta microestructura es la conocida como lamelar cruzada compleja, cuya organización es similar pero no llega a alcanzar los tres niveles de ordenación de la lamelar cruzada. Posee lamelas de tercer orden que se agrupan en lamelas de segundo orden, pero éstas no llegan a formar las lamelas de primer orden.

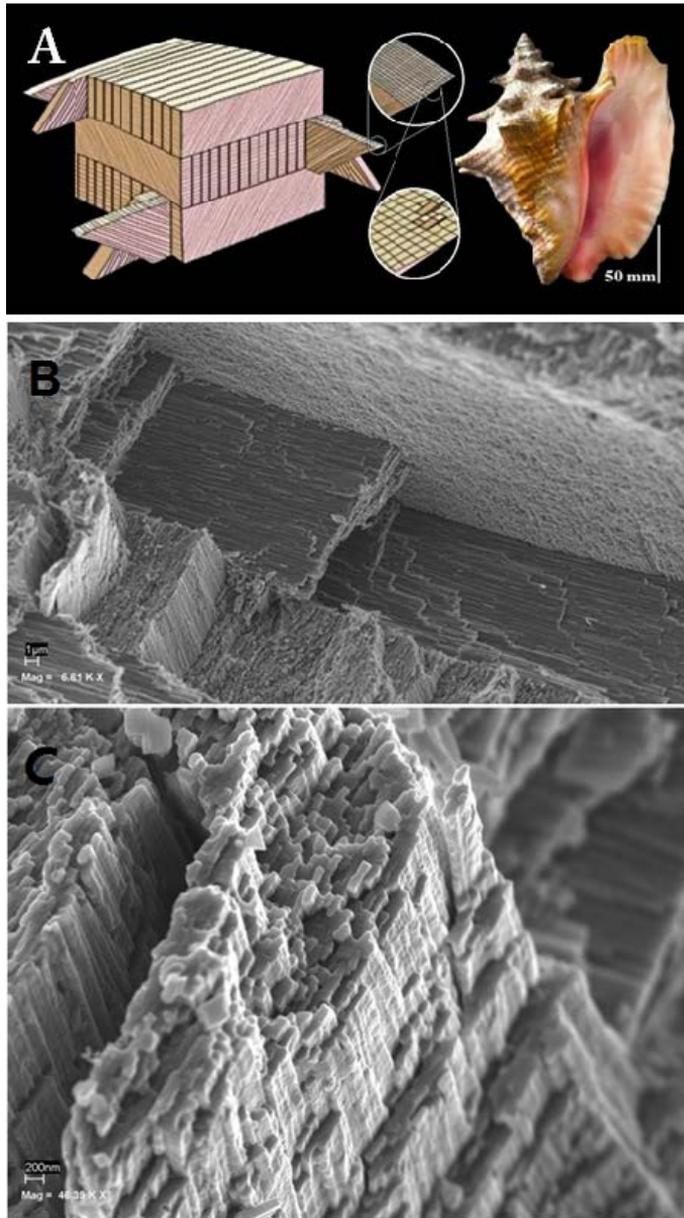


Fig. 8. Estructura interna de la lamelar cruzada. Microscopía electrónica de barrido. A. Representación de la microestructura lamelar cruzada de *Lobatus gigas*[8]. B. Fractura de *Conus omaria*. Se aprecian en la misma imagen las lamelas de primer, segundo y tercer orden. C. Fractura de *Conus omaria*. Detalle de una lamela de segundo orden. Se aprecian las lamelas de tercer orden que la forman. A tomado de Osuna-Mascaró et al. [9], B y C, fotografías de A. Checa.

Una característica destacable es el drástico cambio en la orientación (unos 90°) de las lamelas, que podemos observar en los límites entre capas en aquellas especies que presentan varias capas de lamelar cruzada (Fig. 9). Por ejemplo, algunos representantes del género *Conus* presentan tres capas formadas por lamelar cruzada. Tanto la capa interna como la externa están ordenadas de forma que el eje corto de las lamelas (el grosor) está orientado en la dirección longitudinal, mientras que la capa media ordena sus lamelas con el eje corto en dirección axial (comarginal), aunque esta disposición puede variar entre especies. Parece ser que, pese a lo que pueda parecer a primera vista, al menos algunas de las lamelas de tercer orden se conservan de unas capas a otras, existiendo continuidad entre las distintas capas, siendo únicamente un cambio de orientación (rotación según un eje perpendicular a la superficie de la concha) lo que diferencia unas capas de otras (observación personal de A. Checa). La complejidad de la estructura 3D que encontramos en estas conchas dificulta bastante su observación y comprensión.

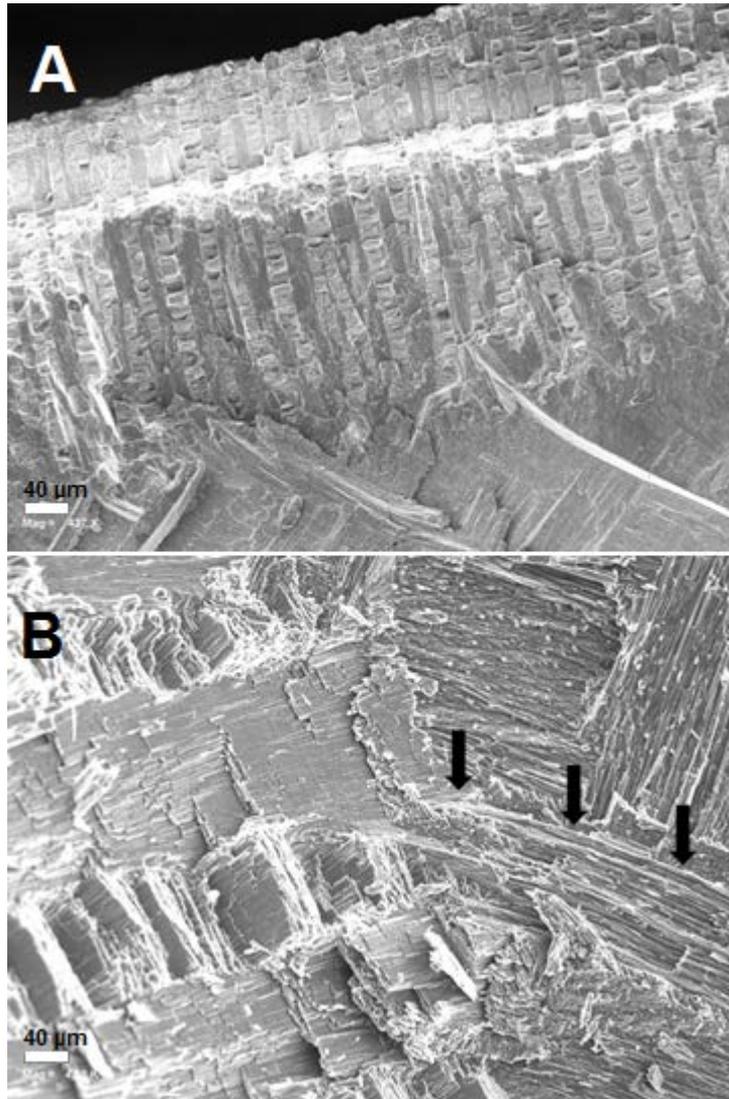


Fig. 9. Transición entre capas. Microscopía electrónica de barrido. A. (Fractura de Conus omaria). B. (Fractura de Conus striatus). Las flechas muestran el recorrido de las lamelas de tercer orden y su adaptación entre capas, dando continuidad a las mismas. Fotografías de A. Checa.

En cuanto a la cristalografía de esta microestructura, la disposición de los cristales está en parte regida por relaciones de macla entre los cristales de aragonito. Concretamente, las fibras de aragonito, o fibras de tercer orden, internamente consisten en maclas polisintéticas unidas por planos especulares (110) [28]. Los

cristales de aragonito (polisintéticamente maclados) muestran además una orientación cristalográfica constante con respecto a los cristales de aragonito en las lamelas de primer orden adyacentes. Puede verse como otra ley de macla (no conocida en aragonito) en la que los cristales de las lamelas adyacentes están unidos por planos (110), pero con sus ejes-c rotados dentro del plano unos 30°. De esta manera, hay dos grupos de leyes de macla que relacionan las unidades cristalinas en diferentes escalas (baja en las lamelas de tercer orden y alta en las de primer orden). Estas relaciones jerárquicas juegan un papel crucial en la construcción, la organización y en las propiedades finales de esta estructura tan compleja.

La matriz orgánica embebida en la lamelar cruzada no se encuentra distribuida en capas, como ocurre en el nácar. Está compuesta en su mayor parte, a diferencia también del nácar, por materia orgánica soluble intracristalina. Mientras que la cantidad de proteínas y azúcares varía con el taxón, por norma general se encuentra poca cantidad de azúcares en todos ellos, y las proteínas son en su mayoría ácidas [27].

Pese a que las estructuras nacaradas han sido y son las favoritas de la comunidad científica, lo cierto es que la importancia ecológica y evolutiva de la lamelar cruzada puede llegar a superarlas. Esta microestructura, como ya hemos indicado, se encuentra en cuatro clases de moluscos: bivalvos, gasterópodos, polioplacóforos y escafópodos. Su éxito evolutivo ha sido enorme, ya que ha ido siendo cada vez más frecuente durante la evolución de los moluscos; pese a ello apenas sabemos nada sobre ella. La microestructura lamelar cruzada es como el simul del elefante en la habitación, enorme, pero que nadie o casi nadie puede ver.

Sabemos por el registro fósil que con el paso del tiempo la lamelar cruzada se ha impuesto progresivamente al nácar. Durante mucho tiempo se ha creído que esta microestructura tenía su origen en el mismo nácar, pues se creía que el nácar era plesiomórfico en moluscos, dando lugar a otras estructuras de forma progresiva. Así, Frýda et al., en el 2004 [29] proponían que el nácar era homólogo entre vetigasterópodos y cefalópodos, mientras que Hedegaard en 1997 [30] propuso que la lamelar cruzada debía ser basal para todos los gasterópodos. El caso es que existen fósiles de bivalvos en los

que se han encontrado ambas a la par; nácar y lamelar cruzada [31-33]. También coexisten ambas en la mayor parte de los vetigastropodos actuales. El estudio de algunas especies actuales de gasterópodos sugiere que la lamelar cruzada podría derivar de microestructuras aragoníticas fibrosas (observación personal).

En cualquier caso, el éxito de la lamelar cruzada parece deberse a sus peculiares características.

Pero: ¿Qué características son éstas? ¿De dónde procede el éxito de esta microestructura?

3.1.1.- PROPIEDADES

A partir del proceso de descalcificación, podemos diferenciar dos fracciones orgánicas en la matriz. Una soluble, que varía relativamente poco en función de la especie estudiada, desde un 0,03%, hasta un 0,5% del peso total de la concha, y otra insoluble, que varía enormemente de unos organismos a otros. Si pesamos la fracción insoluble de la matriz orgánica de la concha de un *Nautilus*, encontraremos una proporción cercana al 5% del peso total [5].

En cambio, en lo que respecta a la lamelar cruzada, si siguiésemos los mismos pasos en un neogasterópodo (poseen lamelar cruzada), en lugar de en un *Nautilus*, encontraríamos que sólo un 0,01% del peso total de la concha forma parte de la fracción insoluble de la matriz orgánica [5].

Esta materia orgánica aporta al aragonito lo que la paja al barro en el adobe (la paja es fuerte en tensión y débil en compresión), es por ello que el nácar es la estructura más difícil de romper por tensión, compresión, impactos y flexión [11] (Tabla 1).

Robert et al. [11] describían el nácar como la microestructura más resistente a la tensión y flexión, pero a la lamelar cruzada como la estructura más dura y al mismo tiempo la menos elástica. La razón de ello es la escasez de materia orgánica en la concha, lo poco abundante de su matriz.

Tipo	Tensión (Mpa)	Compresión	Flexibilidad	E (Gpa)	Dureza
Column. Nac.	78-116	320-401	193-267	47-64	122-211
Nacarado	35-86	304-419	117-211	31-58	106-221
L.C. Gastrop.	31-60	198-336	58-165	30-58	162-270
L.C. Bivalv.	9-43	163-336	35-106	50-82	242-298
Foliada	40-42	73-133	44-110	29-34	11-110
Prism. Calc.	60-62	210-295	139	21-39	162

Tabla 1. Resultados de tensión, compresión, flexibilidad (unidad megapascal, Mpa), Módulo de Young (E) (expresado en gigapascales, Gpa), para muestras de microestructuras columnar nacarada (Column. Nac., gasterópodos), nacarada (bivalvos), lamelar cruzada de gasterópodo (L.C. Gastrop.), lamelar cruzada de bivalvo (L.C. Bivalv.), foliada (bivalvos) y prismática calcítica de bivalvos) (Prism. Calc.) Modificada de Furuhashi et al (2009) [14].

El hecho de que el nácar presente propiedades mecánicas superiores al resto de las microestructuras (incluyendo a la lamelar cruzada), puede parecer extraño, si tenemos en cuenta que la lamelar cruzada es considerada la microestructura “más avanzada” evolutivamente (al menos a nivel cristalográfico), dada su complejidad estructural, y más extraño aún si consideramos su gran éxito pues ha ido sustituyendo al nácar a lo largo de la evolución [7, 25, 34].

François Jacob, Premio Nobel de Medicina (1965), afirmó: “*La naturaleza es una magnífica chapucera, no un divino artífice*”

Dado que nuestra experiencia como moluscos es nula, y nos sería difícil ponernos en la piel, o mejor, en el periostraco de uno de ellos, nada mejor para entenderlo que cambiar la pregunta por otra: si los Ferrari son tan buenos, ¿por qué no los conduce todo el mundo? La respuesta es obvia; por los costes. Así a la cita de F. Jacob bien podría añadirse una coletilla para entender el porqué del éxito de la lamelar cruzada “*ningún chapucero derrocha en materiales*”.

John Taylor y Martin Layman concluían así su artículo “*Mechanical properties of bivalve shell structures* (1972) [24].

“*Es generalmente sabido por aquellos que trabajan en moluscos que las conchas nacaradas representan la condición “primitiva”, y hay*

evidencias convincentes para apoyar esta idea; por ejemplo la presencia de nácar en monoplacóforos (Erben et al 1968). Parece, por tanto, que la estructura más fuerte ha evolucionado muy temprano; es difícil de ver por qué han evolucionado otras estructuras que parecen ser mejores sólo en dureza. Los tipos de estructuras tienen una larga historia geológica y parecen haberse diferenciado muy pronto en la radiación de los bivalvos (Morris & Taylor, sin publicar). Es posible que los materiales de construcción originales de las conchas se hayan seleccionado por razones distintas a la fuerza mecánica; por ejemplo requerimientos bajos en energía para la secreción o la deposición. En este momento no tenemos datos acerca de los posibles factores.”

Palmer (1983) [10], en su artículo: “Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods”, midió la velocidad de reparación de distintos tipos de conchas de gasterópodos (Fig. 10).

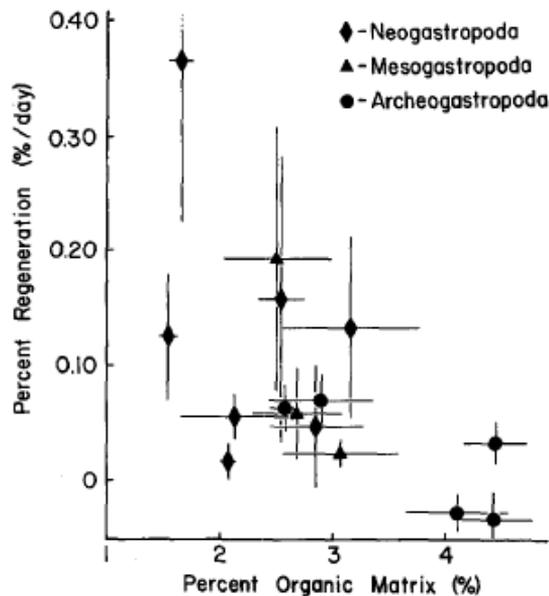


Fig. 10. Relación entre el porcentaje medio de concha regenerada por día y el porcentaje de matriz orgánica. Tomada de Palmer (1983) [10].

Palmer constató cómo la velocidad de regeneración para los neogasterópodos es significativamente mayor que para los meso

(aproximadamente Caenogastropoda, menos Neogastropoda) y arqueogasterópodos (aproximadamente Vetigastropoda) (siendo estos últimos en su mayoría nacarados), algo que se correlaciona con la cantidad de materia orgánica presente en la matriz. Concluyó, por tanto, que los costes de producción de los dos componentes estructurales de las conchas de los moluscos no son equivalentes metabólicamente, estando la balanza claramente inclinada hacia la matriz orgánica. El coste de producción del CaCO_3 (1-2 J/mg) es considerablemente menor que el coste para las proteínas (29 J/mg) (incluyendo los costes metabólicos de su síntesis). A consecuencia de ello, la matriz orgánica precisa aproximadamente un 22% del total de la energía utilizada para formar la concha, constituyendo sólo un 1,5% de la misma. El coste llega a ser cercano al 50% para aquellas conchas que poseen un 5% de matriz orgánica [35].

El alto coste de producción de la matriz orgánica podría ser el motivo por el cual las estructuras con alta proporción de materia orgánica han sido abrumadoramente superadas a lo largo de la evolución de los invertebrados. Pudo ser la causa por la que a lo largo del Paleozoico temprano desaparecieron gran cantidad de grupos de braquiópodos, con conchas quitino-fosfáticas (“chitinophosphatic”), estructuras que poseían mucha más materia orgánica si las comparamos con las de braquiópodos calcáreos actuales [10]. De igual modo, en lo que respecta a los moluscos, son las microestructuras prismáticas y nacaradas las que han sido sustituidas [24, 36], siendo ambas las que mayor proporción de matriz orgánica poseen [24].

Experimentos en cierta medida similares a estos también han arrojado algunos datos acerca de la importancia de los componentes de la lamelar cruzada. Los entresijos de la formación de esta microestructura durante el crecimiento de la concha continúan siendo un misterio, pues carecemos de un modelo científico adecuado para esta microestructura. Algunos intentos de esclarecer la forma en la que se autoconstruyen este tipo de conchas están basados en la reconstrucción de las mismas en el periodo posterior a una fractura. El proceso suele consistir en arrancar una porción de la concha y esperar a que se repare, observando detenidamente las distintas fases de recuperación por las que pasa la estructura. Estas experiencias han ayudado a constatar la importancia de la matriz orgánica en la reconstrucción de la concha

dañada. Parece ser que el periostraco es clave en el desarrollo normal de la microestructura lamelar cruzada [37]. Cuando la fractura se realiza en una región alejada del borde de la concha (donde el periostraco no se puede reparar), la estructura formada diferirá de aquella que se forme tras una fractura cercana al borde de la concha. Sólo tras la aparición de una capa inicial de colágeno, y bajo algunas capas de aragonito dispuesto de forma desordenada, la concha puede reconstruirse tras una fractura en ausencia del periostraco.

Para tratar de dilucidar la forma en la que se desarrolla esta microestructura se ha optado también por la que quizás sea la opción más obvia; el estudio de individuos juveniles en desarrollo [38]. Se ha destacado la importancia del periostraco (siempre precediendo a la formación de la concha), así como de las membranas orgánicas que cubren los cristales de aragonito. Existen ciertos paralelismos entre los trabajos de este estilo, y aquellos en los que se estudia la reparación de la concha, como el hecho de que en primera instancia (bajo el periostraco) se forman cristales alargados de aragonito, que posteriormente se orientarán resultando en la conformación típica de la lamelar cruzada.

Dado que podemos hablar de las distintas cualidades de cada microestructura, también podemos hacerlo sobre los ambientes más favorables para ellas. Con el ánimo de demostrar que la evolución ha seleccionado distintas microestructuras para ambientes diferentes, bien favoreciendo su aparición o desarrollo, o seleccionando entre las que ya existían (recordemos que las constricciones evolutivas que llevaron a su diferenciación pudieron ser muy fuertes), algunos investigadores se plantearon relacionar las microestructuras y catalogarlas en función de la actividad de las familias de bivalvos que las segregan (ver figura 11) [36].

TABLE 4.3 Mode of Life and Shell Structure Combinations for Bivalve Families^{a,b}

	Aragonite Prisms and Nacre	Calcite Prisms and Nacre	Foli- ated	Composite Prisms c.l. and c.c.l.	Crossed- Lamellar and Com- plex c.l.	Homoge- neous
Free-living epifaunal			••			
Byssate		•••••	•••		•••••	
Cemented	•••		•••		•	
Boring		•			•••••	•
Shallow bur- rowing	•••••			•	•••••	•••••
	•••••				•••••	•
					•	
Deeper bur- rowing	••••			••••	•••	••••
				•		

Fig. 11. Cada punto representa una familia de bivalvos en combinación con el modo de vida y la microestructura implicada. Si una familia incluye animales con varios modos de vida, se encontrará repetida. c.l. lamelar cruzada; c.c.l. lamelar cruzada compleja. Tomado de Robert et al. (1990) [11].

Las distribuciones de los organismos podrían explicarse en parte por medio de las microestructuras que presentan en sus conchas. De este modo, sería esperable que los *Nautilus* posean conchas nacaradas, dadas las presiones hidrostáticas que han de soportar a la profundidad a la que viven. En los bivalvos que viven adheridos a rocas mediante el biso, como es el caso del género *Mytilus*, también sería esperable, pues deben soportar tanto el envite constante del oleaje como los ataques de depredadores. También en bivalvos excavadores superficiales de agua dulce, que se exponen a ambientes escasos en CaCO_3 , la gran cantidad de materia orgánica presente en la matriz ayudaría a aislar el carbonato del contacto directo con el agua [11]. Pero pese a la aparente simplicidad y elegancia de estas explicaciones (posiblemente hiperseleccionistas), son asunciones que no se corresponden totalmente con la realidad, pues hay abundantes excepciones que las contradicen.

La estructura lamelar cruzada, en combinación con estructuras prismáticas, se encuentra fuertemente asociada al modo de vida de los excavadores de grandes profundidades [36]. En cambio, aquellos que poseen lamelar cruzada en combinación con lamelar cruzada compleja, se hallan distribuidos en una gran variedad de hábitats, con una representación especial de la

categoría de bivalvos perforadores y excavadores superficiales, pues en ellos la dureza de la concha debe jugar un papel primordial en la resistencia contra la abrasión [11, 36].

A la vista de estos datos, y dada la variedad de ambientes en los que se encuentra, pudiera parecer que la lamelar cruzada está mejor adaptada a determinados tipos de hábitats que el nácar. Los Heterodonta, gran grupo de excavadores sifonados, poseen todos lamelar cruzada), pero quizá sea ésta tan sólo una visión parcial. En contraposición, hemos visto que el nácar es mecánicamente superior como microestructura, siendo la lamelar cruzada únicamente más económica, y por tanto más rápida de producir. ¿Qué otra ventaja adaptativa puede tener la lamelar cruzada que haya favorecido su éxito?

Para responder a esta pregunta vamos a centrarnos en el modelo de molusco que se ha utilizado de forma principal en este estudio, *Lobatus gigas*. Es éste un gasterópodo gigante que habita en las praderas de fanerógamas del mar del Caribe. Posee una concha enteramente formada por lamelar cruzada que consta de tres capas; interna, media y externa, con el eje corto de las lamelas orientado de forma longitudinal, comarginal y longitudinal, respectivamente. Puede ser que en la dificultad para romper su concha esté la pieza del puzzle que faltaba para entender el porqué del éxito de esta microestructura.

Algo que ya sabemos es que las conchas con microestructura lamelar cruzada carecen de la elasticidad que posee el nácar, pues la materia orgánica de su matriz es mucho más escasa, pero sí que son bien resistentes. De hecho, la resistencia es clave a la hora de defenderse de los depredadores [8], y viene determinada por la microarquitectura de la concha. El modo en el que las lamelas se disponen puede ayudar y mucho a hacer la vida de los depredadores de *L. gigas* un poquito más difícil.

La clave para hacer una concha más resistente a los ataques está en “saber” disipar la energía mecánica de las roturas. El primer mecanismo de defensa a este nivel lo constituyen las proteínas de la matriz que, aunque son escasas, permiten que se den microfracturas entre los cristales de aragonito, roturas que evitan que dichos cristales lleguen a romperse fácilmente.

La segunda barrera la constituyen las mismas lamelas de la capa media. Para entenderla bien podemos recurrir al *scutum*, o escudo romano, pues su disposición en capas es ligeramente similar a la de la concha de *L. gigas* (Fig. 12). El *scutum* o escudo romano se construía con una base de contrachapado, siendo evidente que su finalidad era la de resistir embestidas.



Fig. 12. Scutum (derecha) y fotografía SEM de una fractura de concha de un gasterópodo (Conus) (izquierda).

En la disposición alternante en la dirección de las lamelas está la clave de esta segunda barrera por disipación de energía (Fig. 13).

Cuando la concha recibe un golpe, la primera de las tres capas que posee tiene las separaciones entre las lamelas de primer orden orientadas verticalmente, de forma que las microfracturas se pueden producir fácilmente. La concha “absorbe” el golpe y las roturas avanzan con facilidad, separando las lamelas primarias entre sí.

Esta “absorción” del golpe permitida tiene un límite: el momento en el que las fracturas alcanzan la segunda capa de la concha; la capa media.

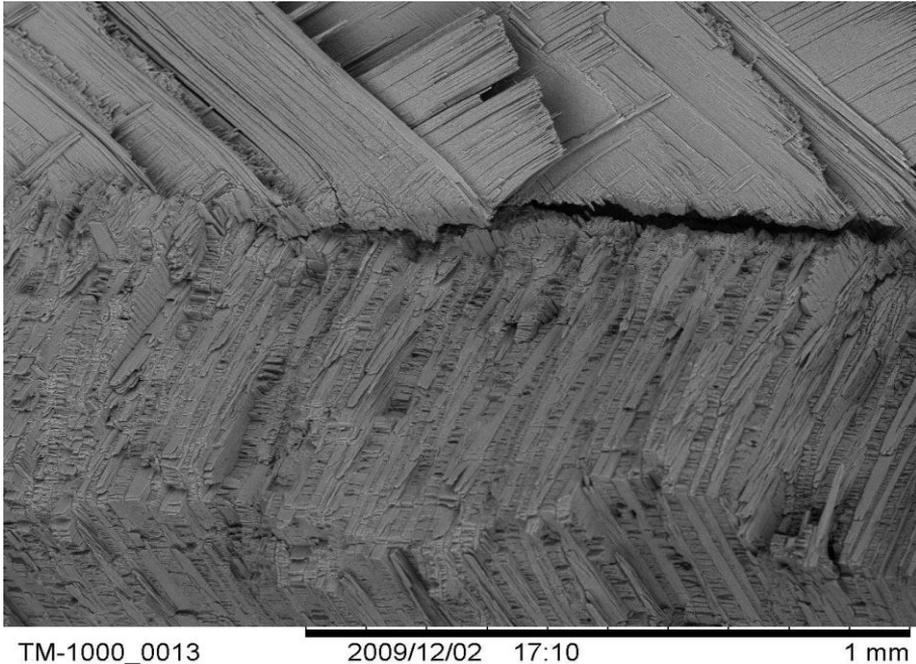


Fig. 13. Transición entre capas en lamelar cruzada. Microscopía electrónica de barrido de una fractura de la concha de Lobatus gigas

Sólo el trabajo necesario para poder romper la primera capa de la concha y llegar a la capa media, es de por sí unas 20 veces superior al precisado para romper el aragonito [8]. El problema se complica aún más para una tortuga, por ejemplo, que tratara de darse un banquete rompiendo nuestro caracol reina, ya que las microfracturas han de adaptarse al cambio de orientación que la concha presenta en la capa media. El trabajo necesario para romper la concha a este nivel sería muy superior al requerido para romper el aragonito inorgánico [8]. La progresión de las roturas se enfrenta no sólo a un cambio de orientación enorme (que orienta la fractura casi en dirección paralela a la superficie de la concha) sino también a la alternancia en la dirección de las lamelas, lo que hace casi imposible el avance. Para no extinguirse rápidamente, la rotura debe seguir el tortuoso camino que se aprecia en las siguientes imágenes tomadas del trabajo de Ballarini y Heuer [8] (Fig. 14).

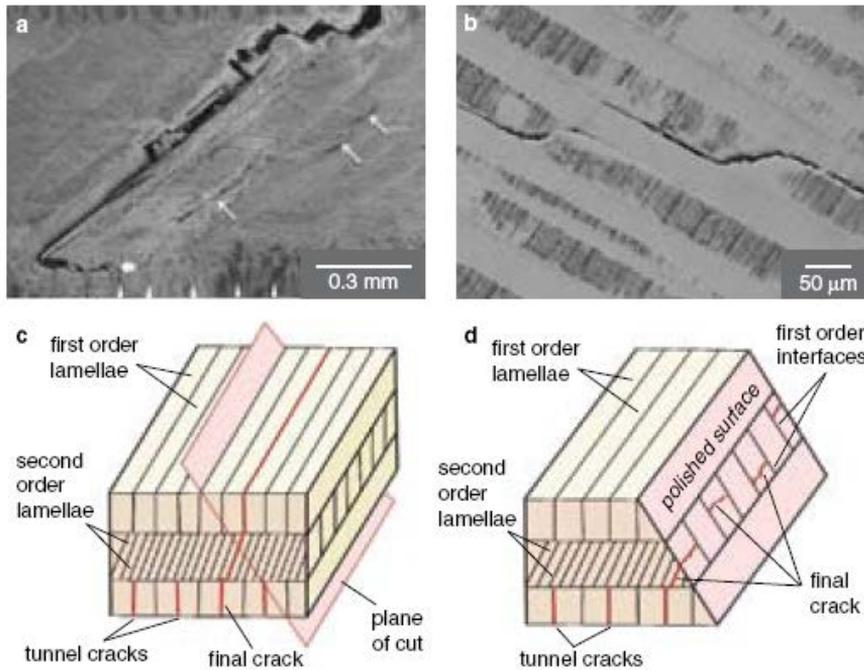


Fig. 14. Cuando es sometida a la acción mecánica, la concha de *Lobatus gigas* evita el desastre con dos mecanismos para disipar la energía. La fotografía **a** muestra una fractura en la concha y la fotografía **b** muestra la dificultad que encuentran las fracturas para prolongarse a lo largo de la concha, debido a su característica disposición. La fractura debe seguir un camino tortuoso, lo que otorga a la concha una resistencia superior a la que de por sí ya tiene el aragonito orgánico. Tomada de Ballarini & Heuer (2007) [8]

La disposición de las lamelas convierte a la lamelar cruzada en una microestructura fuertemente anisotrópica. Sus propiedades varían en función de la dirección en la que aplicamos la fuerza, lo que permite que la energía se disipe antes de llegar a provocar una fractura peligrosa para la estructura de la concha. Es más, pese a estos datos hay algo que se nos escapa, pues los resultados obtenidos experimentalmente nos indican que el trabajo requerido para romper la concha de *Lobatus gigas* es más de 300 veces superior al precisado para el aragonito inorgánico, (en algunos experimentos los resultados indican una superioridad próxima a 1000 veces) [8]. Resulta evidente que deben existir además otros mecanismos disipadores de energía aún no desvelados.

Ésta es obviamente una causa importante de éxito evolutivo. A ella se anexionan los bajos costes de producción dada la escasa matriz orgánica, contribuyendo a dilucidar el hecho de que los moluscos con lamelar cruzada se hayan impuesto a los nacarados.

Hay un dato especialmente interesante, que afecta a todos y cada uno de los aspectos que hemos tratado hasta ahora. Está relacionado tanto con la formación de la estructura, como con el subsiguiente éxito evolutivo que parece haber conferido a los organismos que la han desarrollado.

Si estudiamos la historia evolutiva de los bivalvos, por ejemplo descubriremos que la aparición de la lamelar cruzada se ha producido de forma independiente en distintos taxones. Así, Taylor describía en 1973 [36] cómo esta microestructura se ha desarrollado, por un lado en los grupos Pectinacea, Limacea y Anomiacea, y por otro en Myacea, Pholadacea y Gastrochaenacea, además de en Arcoida y en Heterodonta.

Cabe esperar que los bivalvos incluidos en Arcoida (que pertenece a Pteriomorphia), hayan desarrollado esta microestructura de forma independiente a los Heterodonta. Ahora sabemos que ambos grupos poseen características cristalográficas diferentes (Ío Almagro, sin publicar), lo cual solo hace aún más interesante el paralelismo.

Puede parecer sorprendente el paralelismo evolutivo para esta microestructura dentro de la clase Bivalvia, pero la sorpresa aumenta al compararla con la convergencia entre las distintas clases de moluscos pues, como ya se ha comentado, también los escafópodos, gasterópodos y poliplacóforos poseen conchas construidas con esta microestructura.

En este proyecto tratamos de aumentar nuestro conocimiento acerca de esta microestructura, para así conocer los procesos que hacen posible su formación.

3.1.2.- LOBATUS GIGAS

Lobatus gigas es un gasterópodo marino gigante que habita las praderas de fanerógamas a lo largo y ancho del mar Caribe, entre los 0,3 y 18 metros de profundidad. Su distribución incluye un área atlántica que se extiende desde las islas Bermudas hasta el norte de Brasil, estando presente en Norte, Centro y Sudamérica.

Al abarcar su distribución tantísimas naciones y culturas, ha recibido gran cantidad de nombres comunes: botuto (Venezuela), caracol rosa (Méjico), cambombia (Panamá), cobo (Cuba), carrucho (Puerto Rico), caracol (Nicaragua), caracol pala (Colombia), caracol gigante (Honduras), cambute (Costa Rica). Los anglosajones lo conocen como “queen conch”, y los franceses lo llaman “strombegeant”, aunque en Guadalupe y Martinica lo llaman lambí (al igual que en la República Dominicana y en Haití).



Fig. 15. Distribución de *Lobatus gigas*

En el ámbito científico se ha conocido tradicionalmente como *Strombus gigas*, desde que Linneo lo describiese en 1758 en su “Systema naturae”, haciendo referencia a su enorme tamaño. Ha sido hace apenas unos años cuando se ha revisado su posición filogenética. En el año 2000 fue revisada la filogenia de la familia *Strombidae*, a la que pertenece, catalogándolo como *Eustrombus*

gigas. Landau [39], basándose en el trabajo de Simone [40], y Latiolais et al. [12], volvieron a revisar la filogenia y la nomenclatura, renombrándolo como *Lobatus gigas*.

El trabajo de Latiolais et al. [12] fue la primera filogenia a nivel de especie para la familia *Strombidae*. Se basaron en los géneros más ricos en especies, que eran por aquel entonces *Strombus* y *Lambis*.

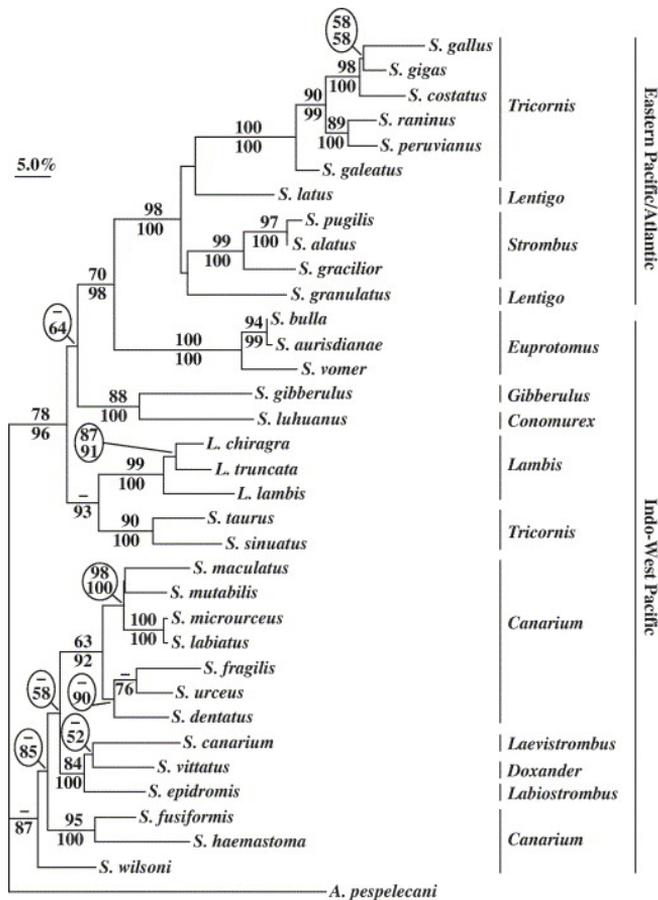


Fig. 16. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido en base al análisis genético realizado por Latiolais et al. (2006) [12].

Lo primero que llama la atención al ver a *L. gigas* es su impresionante tamaño (rondando los 30 cm). Cuanto más grande es,

mayor es también su tasa de supervivencia, ya que llega a vivir 20 años en fondos profundos. ¡Se estima que podría incluso llegar a los 40 años de edad!

El ciclo de vida de cada *Lobatus gigas* comienza como un huevo más, de los cerca de 400.000 que constituyen cada puesta. Forman parte de una masa gelatinosa y bentónica, que queda enrollada en una forma alargada de unos 15 cm (desenrollada alcanzaría los 30 m). La larva veliger sale del huevo cinco días después, y ya cuenta con su propia concha no calcificada, de una espira y media. Se desplaza nadando gracias a los lóbulos ciliados del velum, que le permiten respirar y alimentarse mientras forma parte del plancton. Después de unas tres semanas como larva veliger, la concha es lo suficientemente densa como para hacer caer al *Lobatus gigas* al fondo oceánico, momento en el que sufrirá una metamorfosis. Con este cambio pierde el velum, al tiempo que se desarrollan el pie y la rádula, ésta le permitirá alimentarse raspando la superficie de rocas y algas.

A partir de este momento, el *Lobatus gigas* de apenas tres semanas de vida, y con una concha aún no lo suficientemente fuerte, se enterrará hundiéndose en la arena durante todo un año, saliendo al agua sólo durante la noche para conseguir alimento.

Pasado este período de un año, la concha ha dejado de ser blanca y comienza a insinuarse en ella el color rosado típico de esta especie. También se han desarrollado ya en la concha los cuernos que le valieron el nombre de *Strombus lucifer* (Linneo, 1758) [41], hoy considerado un sinónimo de *Lobatus gigas*. De hecho, los cuernos de estos individuos jóvenes son mucho más agudos que los de los adultos. Con el tiempo van quedando romos y van cubriéndose de algas y epibiontes, tanto que los más ancianos poseen nombres específicos, diferentes a los otorgados a ejemplares jóvenes en algunos lugares del Caribe, “samba conch” o “stoneconch”.

De igual modo, cuando abandona la vida subterránea, desarrolla en su pie un opérculo duro muy característico de su grupo. Como todo opérculo le permite esconderse protegido dentro de la concha, pero su forma alargada, que recuerda vagamente a un

gancho o a una uña, tiene otra función, una que llama poderosamente la atención, su locomoción.

L. gigas para desplazarse estira el pie y fija el opérculo al substrato, después contrae el músculo con fuerza y se propulsa salvando obstáculos y depredadores. Es un modo de locomoción exclusivo de los estrómbidos, fue descrito por primera vez en 1922 por el zoólogo George Howard Parker, en un artículo titulado “*The leaping of the stromb*” [42].

Después de su primer año de vida, pasará el resto de su existencia alimentándose de fanerógamas, pero continuará creciendo y enrollando su concha. Es a los tres años de edad cuando *Lobatus gigas* comienza a desarrollar el característico labio rosa propio de su especie, pero no será hasta medio o incluso un año después, cuando termine de desarrollarse, y muestre el labio engrosado característico de la madurez sexual en esta especie.

A lo largo de la historia los *Lobatus gigas* y otros estrómbidos no han pasado desapercibidos a las culturas humanas con las que han coexistido. *Lobatus gigas* es considerado un manjar en todo el mar del Caribe, aunque no se lo pone fácil a sus captores. Según Ballarini & Heuer (2007) [8], la concha de este animal debería ser frustrante para cualquier apasionado del cebiche. Únicamente un pulpo usando sus neurotoxinas, una raya grande, o una tortuga marina con sus fortísimas mandíbulas, podrían acabar con él. De hecho los pescadores y recolectores de conchas, si no disponen de un martillo o de un machete, recomiendan usar únicamente otra concha de *Lobatus gigas*, ya que, de otro modo, sería imposible superar las defensas físicas de este animal.

Pese a ello esta especie ha sido explotada de forma asombrosa durante presumiblemente miles de años. Se han encontrado conchas de estrómbidos (concretamente de *Lobatus galeatus*) convertidas en “instrumentos musicales” de hace cerca de 3000 años, grabadas con dibujos del arte Chavin, y utilizadas como instrumentos de viento, con un propósito aún desconocido pero probablemente religioso. En las Islas Vírgenes, en tiempos de la esclavitud, las conchas de *Lobatus gigas* se usaban como cuerno trompeta para marcar los tiempos de trabajo y descanso de los esclavos. Con el tiempo, sin embargo, según el historiador Glenn

Davis, acabó convirtiéndose en un símbolo “de esperanza y mucho más”, tanto que en Septiembre del 2013 se debatió la posibilidad de convertir a *Lobatus gigas* (el caracol Reina) en símbolo oficial de las Islas Vírgenes.

Actualmente aún hay músicos que siguen utilizando a *Lobatus gigas* como instrumento; es el caso del trombonista y compositor de jazz Steve Turre.



Fig. 17. Uso de un estrómbido (probablemente *Lobatus gigas*) como instrumento musical en la cultura azteca, Códice Magliabecchiano, siglo XVI.

Pese a la importancia histórica de su concha, probablemente el principal desencadenante de su uso como instrumento no sean las particulares propiedades que le da la microestructura lamelar cruzada, sino el hecho de que sea consumido en gran cantidad en todas las culturas del Caribe y sus proximidades. En los años 90 se consumían cerca de 7.000 toneladas de carne de *L. gigas* al año, con un beneficio que en 2003 alcanzó los 60 millones de dólares [43].

La sobreexplotación ha llevado a *L. gigas* al borde de la extinción, estando ahora controlado su consumo. En 2009 se consumieron “únicamente” 387 toneladas, habiéndose reducido su captura en un 80% en solo 12 años. En 2012 el NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration de los EEUU) contabilizó la captura de unas 434 toneladas de *Lobatus gigas* sólo en ese año.

Dada su importancia cultural es poco esperable que deje de consumirse, de modo que probablemente el futuro del caracol reina depende de una explotación controlada, bajo la presión cada vez más intensa de turistas y países extranjeros.



Fig. 18. “Casa hecha de casas” en Isla Providencia, costa de Colombia. Fotografía de Macduff Everton/Corbis, tomada de Ballarini & Heuer (2007) [8].

3.2.-Objetivos

3.2.- OBJETIVOS

Lobatus gigas es un excelente modelo para el estudio de la microestructura lamelar cruzada. Pese a que se ha estudiado ampliamente desde el punto de vista biomecánico, muy rara vez se ha hecho desde el análisis bioquímico. Ésta es la primera vez que se analiza desde esta perspectiva. Asimismo, la microestructura lamelar cruzada, de una importancia ecológica y evolutiva enorme, se encuentra de algún modo subestimada por la comunidad científica, especialmente desde el punto de vista bioquímico. Tanto *Lobatus gigas*, como más generalmente, la microestructura lamelar cruzada, merecen nuestra atención, al menos desde las perspectivas mecánica y evolutiva. Nuestros Objetivos se han centrado en:

- 1- Búsqueda e identificación de las proteínas solubles e insolubles presentes en la matriz orgánica de la concha de *Lobatus gigas*.
- 2- Caracterización molecular e inmunolocalización de las proteínas seleccionadas.

3.3.-Materiales y Métodos

3.3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1.-MUESTRAS BIOLÓGICAS

1. *Lobatus gigas*

Clase: *Gastropoda*
Superfamilia: *Stromboidea*
Orden: *Neotaenioglossa*
Familia: *Strombidae*
Género: *Eustrombus*
Especie: *Lobatus gigas* (Linnaeus, 1758)



Lugar de origen: Guayana Francesa
Fecha de recolección: 2008

2. *Strombus decorus*

Clase: *Gastropoda*
Superfamilia: *Stromboidea*
Orden: *Neotaenioglossa*
Familia: *Strombidae*
Género: *Strombus*
Especie: *Strombus decorus* (Röding, 1798)



3.3.2.-ESTUDIO DE LA LAMELAR CRUZADA

3.3.2.1.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA MATRIZ ORGÁNICA

Al objeto de poder realizar la extracción de las proteínas de las conchas de *Lobatus gigas*, éstas fueron trituradas y pulverizadas, siguiendo un proceso que suele comenzar con la fracturación de la concha en pequeños trozos, y que continúa con el uso de un pulverizador mecánico.

El polvo (aproximadamente unos 20 g), fue suspendido en 20 ml de agua mili-Q. Tras ello, gota a gota y cada 10 s, se le iba añadiendo ácido acético al 5%, para ir disolviendo el carbonato cálcico, sin que el pH de la muestra llegara a ser inferior a 4,3, pues una solución demasiado ácida influiría negativamente sobre las proteínas. Cuando la mayor parte del triturado había sido disuelto y el pH alcanzaba el valor 4,3, la disolución fue centrifugada a 1500 g durante 30 min, para separar la fracción soluble (disuelta en el agua y el ácido acético) de la fracción insoluble de la matriz orgánica. Una vez centrifugada la muestra, la fracción soluble, representada por el sobrenadante, se filtró a través de un filtro Millipore de 5 μm mediante presión negativa, al objeto de retirar las partículas no disueltas superiores a ese tamaño de poro.

Los componentes de la fracción solubilizada con peso molecular superior a 6000 Da, entre los que se suponía deberían encontrarse las proteínas procedentes de las conchas, fueron concentrados mediante concentradores "Ultrafiltration Cells" (Amicon), por centrifugación a 1500 g durante 90 min.

El resultado de dicha concentración fue dializado frente a agua a 4°C durante 2 días, con cambios repetidos de la misma, al objeto de eliminar el ácido acético de la muestra. Una vez terminada la diálisis la muestra fue liofilizada y conservada a -20°C hasta los ensayos posteriores.

3.3.2.2.-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó siguiendo el método de Bradford, con albúmina bovina como proteína estándar. Este método comporta la formación de un complejo de color azul entre los residuos de aminoácidos de las proteínas, y los grupos ácido sulfónicos del colorante azul brillante de Coomassie G-250, en solución ácida.

Para ello se realizó una curva estándar partiendo de concentraciones conocidas de albúmina bovina, con una concentración base de 1 mg/ml. A partir de ella se prepararon alícuotas desde 2 a 32 μl en 1 ml de tampón fosfato, más 1 ml de

Reactivo de Bradford. Asimismo, se preparó una dilución de 2 µl de la solución de proteínas purificadas, en 1 ml de tampón fosfato, más 1 ml de Reactivo de Bradford.

Seguidamente se agitaron todos los tubos, y se dejaron interaccionar a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, en un espectrofotómetro de Mitton Roy (Spectronic 3000).

Con los valores de densidad óptica de la curva estándar, se construyó una recta de regresión para representar densidades ópticas a 595 nm frente a la concentración de proteínas. Con esos datos, y la ecuación de la recta, se obtuvieron los valores de la concentración de proteínas de la fracción purificada.

3.3.2.3.- ELECTROFORESIS SDS-PAGE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Este tipo de electroforesis SDS PAGE (SD-Polyacrilamide Gel Electrophoresis), descrito por Laemmli en 1970, permite separar las proteínas en geles formados por la copolimerización (reacción de vinil adición-polimerización) de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida).

El SDS (Lauril Sulfato sódico), por su naturaleza de detergente, permite la solubilización de las proteínas convirtiéndolas en más hidrófilas, y en complejos proteicos fuertemente negativos. De este modo la movilidad de estos complejos en una solución depende únicamente de su tamaño molecular. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante, donde las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de beta-mercaptoetanol. Éste rompe los puentes disulfuro, permitiendo la linearización de las proteínas y la separación de las cadenas que forman la estructura de muchas de ellas. El SDS desnaturaliza y se une a las proteínas proporcionando cargas netas negativas homogéneas [44].

La electroforesis SDS-PAGE en sistemas discontinuos, permite una mayor resolución en la separación de las bandas de proteínas. Se usa un gel separador que permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular, y un gel almacenador que permite concentrar la muestras y minimizar la exclusión

molecular. Las diferentes características y la composición del tampón de desarrollo de ambos geles producen un estrecho apilamiento de las proteínas en el gel, que acceden a la interfase de ambos geles formando una estrecha banda que aumenta la resolución. Las variaciones en este método fueron discutidas por Andrew [45], Gordon [46] y Dunbar [47].

3.3.2.3.1.-PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

Las muestras fueron tratadas con Tampón de muestra (100 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 2.5% SDS, 0.01% azul de bromofenol, pH=8 con 5%β-mercaptoetanol) [48], mezclando (1/1) el tampón con la solución de las proteínas extraídas, y desnaturalizando por ebullición a 100°C durante 5 min, permitiendo así la homogenización de las cargas por el SDS.

3.3.2.3.2.- PREPARACIÓN DE LOS GELES

Se usaron geles de poliacrilamida al 12,5% y al 20%, permitiendo un rango de separación desde los 14 a los 250 kDa. Dichos geles están compuestos de gel almacenador y gel separador como se describe más adelante. Este tipo de geles y de electroforesis utiliza dos tipos de concentraciones de poliacrilamida en el mismo gel. Una es de poro pequeño con mayor concentración del polímero bis-acrilamida, gel separador, en el que se realiza la separación de los polipéptidos. El gel almacenador, de poro grande, tiene una concentración del polímero que llega como máximo al 5%; se sitúa en la parte superior de la placa, y tiene como finalidad concentrar los polipéptidos permitiendo así su entrada en el gel separador.

Las proteínas quedan desnaturalizadas mediante calentamiento en tampón, conteniendo SDS y β-mercaptoetanol, así como también se rompen los puentes disulfuro. A partir de ese momento los polipéptidos resultantes poseen una relación uniforme carga/masa proporcional a su peso molecular.

Para preparar el gel separador, y previo a la polimerización, se vierten 3,25 ml entre las dos láminas de vidrio de las cubetas de electroforesis Mini Protean 3 (Bio Rad), previamente lavadas y

desengrasadas con etanol al 70% y enjuagadas con agua. Una vez añadida la mezcla que formará el gel separador se añade inmediatamente sobre la superficie superior 1-propanol (creando así un ambiente anóxico, que favorece la polimerización), dejándose polimerizar 30 min. Tras la polimerización se elimina el propanol, mediante absorción con papel de filtro, y se agrega el gel concentrador o “stacking gel” colocándose el peine que moldea los pocillos de aplicación de la muestra, dejándose nuevamente polimerizar durante 10 min. Una vez polimerizado el gel se monta sobre la cubeta de manera vertical, rellenando con tampón de corrido (“Running Buffer” pH 8,3, constituido por: Trizma 15 g, glicina 72 g y SDS 5 g para 0,5 l). En cada uno de los pocillos formados en el gel se cargan 15 µl de la muestra de las proteínas problema, y 5 µl de las proteínas marcadoras, en tampón de la muestra. El desarrollo electroforético se realizó a un voltaje constante de 150 V, manteniéndose éste hasta que la línea de color formada por el azul de bromofenol, procedente del tampón de la muestra, alcanza las proximidades del final del gel, considerándose en este momento terminado el desarrollo electroforético.

SOLUCIONES	Gel 7%	Gel 12%	Gel 15%	Gel 20%
Agua Mili Q (ml)	5,1	3,4	2,4	0,7
Acrilamida/bisacrilamida(ml)	2,3	4,0	5,0	6,7
Tampón de gel* (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS 10% (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
Persulfato de amonio 10% (APS) (µl)	100	100	100	100
TEMED (µl)	10	10	10	10

* Tampón de gel separador: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 y Tampón de gel concentrador: 0,5 M Tris- HCl pH 6,8. Tanto el persulfato de amonio como el TEMED se añaden después de desgasear los geles.

Tabla 2. Tabla de soluciones para la preparación de las diferentes concentraciones de gel separador.

<i>SOLUCIONES</i>	<i>VOLUMEN</i>
30% Acrilamida/0,8%Bisacrilamida	0,8 ml
Tris-HCl 1,25M	0,5 ml
Agua Destilada	3,6 ml
SDS 10%	50 µl
Persulfato de amonio (APS) 10%	25 µl
TEMED	7,5 µl

Tabla 3. Tabla para la preparación del gel concentrador.

3.3.2.4.- ELECTROFORESIS SDS-PAGE EN PHASTSYSTEM

Además de las separaciones electroforéticas realizadas en el equipo Mini-protean® 3 Cell Bio-Rad, parte de las electroforesis se han llevado a cabo utilizando el sistema de electroforesis compacto Phast System de General Electric (GE, USA) donde los geles se adquieren preparados a diferentes concentraciones como 12,5%, 20%, o en un gradiente que oscila desde el 5% al 25% de poli(acrilamida). En este equipo, dado que los geles no van sumergidos en el tampón de corrido, la conexión del gel a los electrodos se realiza mediante unos bloques de agarosa (compuesta de tampón de electrodos en un 2% de agarosa), que se colocan en los extremos superior e inferior del gel (PhastGel SDS Buffer Strip GE.)

El desarrollo electroforético en este equipo implica la aplicación de no más de 1 µl de tampón de la muestra, lo que supone un ahorro sustancial de material biológico, y un tiempo de desarrollo de aproximadamente 20 min. Las condiciones del corrido se efectúan con un primer paso de algunos minutos a 250 V y 10 mA. Ello permite la eliminación de las sales e impurezas del gel. La posterior aplicación de la muestra y el corrido de la misma a 250V y 1 mA hasta que alcanza el gel separador, y un corrido ulterior hasta alcanzar el final del gel a 250 V y 10 mA de potencia, dan fin al proceso.

PASOS	VOLTAJE	AMPERAJE	POTENCIA	TEMPERATURA	VOLTIOS HORA
1	250 V	10,0 mA	3,0 W	15°C	1 Vh
2	250 V	1,0 mA	3,0 W	15°C	1 Vh
3	250 V	10,0 mA	3,0 W	15°C	70 Vh

Tabla 4. Distintos pasos en el desarrollo de la electroforesis.

3.3.2.5.- TINCIÓN DE LOS GELES

Terminada la separación electroforética y al objeto de poder visualizar y estudiar el peso molecular de las proteínas separadas, la posible glicosilación de las mismas, o su capacidad de ligar iones Calcio, los geles fueron teñidos mediante diferentes técnicas.

3.3.2.5.1.-TINCIÓN EN AZUL COOMASSIE

Esta técnica de tinción es una de las más usuales entre las empleadas para la tinción de proteínas en geles. Implica:

- ❖ Sumergir el gel durante una hora y media en una solución de azul Coomassie (0,25% azul Coomassie, 40% metanol y 10% ácido acético)
- ❖ Desteñir el gel con la solución de: 30% metanol, 10% ácido acético y 60% agua destilada.

3.3.2.5.2.- TINCIÓN DE PLATA

Esta tinción se desarrolló como técnica en el siglo XIV para colorear superficies de cristal. El color producido en las primeras tinciones variaba desde el amarillo hasta un naranja rojizo. Camillo Golgi perfeccionó la tinción, pero no fue hasta 1972, cuando Kerenyi y Gallyas [49] la introdujeran como un procedimiento sensible para detectar cantidades traza de proteínas en geles. La técnica se extendió al estudio de otras macromoléculas biológicas, tras su diversificación empleando diferentes soportes.

Está muy recomendada por su alta reproductividad y sensibilidad. El método es aproximadamente 20 a 60 veces más sensible que la tinción con Azul Coomassie (es capaz de detectar

concentraciones de 0,3 a 0,5 ng de proteínas) y permite la visualización y detección de las proteínas en geles SDS-PAGE. El método de tinción consta básicamente de una fijación, lavado, reducción con nitrato de Plata de los grupos reductores de la proteína, revelado, como si de una película impresionada se tratara, y fijación “fotográfica”. Para ello se siguen los siguientes pasos:

- ❖ Fijar el gel durante 30 min en una solución de: 50% metanol, 50% agua y 12% tricloroacético.
- ❖ Realizar tres lavados de 10 min con una solución de DTE (5 mg/1L)
- ❖ Teñir con AgNO₃ 0,2% durante 30 min en oscuridad.
- ❖ Revelar con una solución que contiene 3% NaCO₃ y formaldehído 37% en agua.
- ❖ Detener la reacción con ácido cítrico 2,3 M.

3.3.2.5.3.- MÉTODO DE TINCIÓN DE PLATA GELES DE PHAST SYSTEM

Para la tinción de los geles de SDS-PAGE, procesados en el sistema de electroforesis compacto Phast System de General Electric (GE, USA), se empleó el método de tinción recomendado por la casa comercial que presenta la ventaja de rapidez y buena resolución.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Soluciones</i>
2	50% Etanol, 10% HAc 1,5 ml
6	8,3% Glutaraldehído
2	Agua Mili Q
2	Agua Mili Q
13	0,25% Nitrato de Plata
30 s	Agua Mili Q
30 s	Agua Mili Q
30 s	2,5 g Na ₂ CO ₃ , 40 µL formaldehído
4	2,5 g Na ₂ CO ₃ , 40 µL formaldehído
2	5% HAc
3	5% HAc, 5% Glicerol

Tabla 5. Pasos realizados en la tinción de plata para geles phast-system.

3.3.2.5.4.- TINCIÓN ALCIAN BLUE

La tinción permite detectar la presencia de oligosacáridos de manera óptima en muestras de 5 a 10 µg por banda. Es capaz de detectar y teñir oligosacáridos a partir de hexasacáridos [50].
Protocolo:

- ❖ Fijar con 50% metanol, 7% ácido acético durante 1 h en agitación.
- ❖ Lavar con agua 2-3 min
- ❖ Repetir los pasos 1 y 2.
- ❖ Teñir con 0,2% Alcian Blue 8 GX3%, 3% ácido acético y 0,05% MgCl₂ durante toda la noche.
- ❖ Desteñir con 3% ácido acético y 0,05% MgCl₂.

3.3.2.5.5.-TINCIÓN STAINS ALL (Calcium Binding Protein)

Se ha señalado que el colorante metacromático “Stains all” es capaz de generar una coloración diferencial para proteínas que se ligan al calcio. [51]. El procedimiento incluye:

- ❖ Fijar con isopropanol al 25% durante 30 min.
- ❖ Teñir 48 h en oscuridad y a 4°C en una solución de: isopropanol 25%, formamida 7%, tris-HCL 30 mM, pH 8,8 y 0,0025% Stains all.
- ❖ Desteñir en 25% isopropanol.

3.3.2.6.- ELECTROFORESIS PREPARATIVA

Para la purificación de las proteínas de interés utilizamos la técnica de la electroforesis preparativa, que separa en fracciones todas las proteínas de la muestra, en función de su peso molecular.

El sistema utilizado está diseñado para purificar proteínas de mezclas complejas, mediante una continua elución de electroforesis. Durante el curso de la electroforesis las muestras pasan a través de un gel cilíndrico. Las moléculas migran a través de la matriz del gel, separándose en bandas con forma de anillo que rodean al gel. Dichas bandas migran individualmente fuera de la base del gel, donde pasan directamente a la cámara colectora de la elución. La cámara colectora consiste en un fino filtro de membrana de

polietileno. Una diálisis de membrana, directamente debajo del filtro de elución, atrapa a las proteínas dentro de la cámara. El tampón de elución se introduce en la cámara alrededor del perímetro de una junta especialmente diseñada. El diseño de la junta resulta en un flujo de tampón hacia la membrana de elución. El tampón es enviado radialmente hacia el interior de un tubo de elución, en el centro del núcleo de refrigeración. Las moléculas purificadas son impulsadas, por una bomba peristáltica, a través del tubo colector de elución del centro del núcleo de refrigeración. La bomba peristáltica conduce las proteínas separadas a través de un monitor UV hacia un colector de las distintas fracciones. Para asegurar que las moléculas separadas migren de forma compacta, en bandas paralelas, se necesita minimizar el gradiente de temperatura a lo largo del gel. Las temperaturas de las superficies interna y externa del gel son igualadas por una bomba continua de tampón de electroforesis, a través del núcleo central de refrigeración, en un circuito cerrado. Las proteínas diluidas se recogen en decenas de pequeños tubos, para ser más tarde concentradas y etiquetadas en función de su peso molecular.

SOLUCIONES (gel separador)	VOLUMEN
30% Acrilamida/0,8% Bisacrilamida	18 ml
Tris-HCl 1,875 M, pH 8,8	9 ml
Agua Destilada	17,4 ml
SDS 10%	450 µl
Persulfato de amonio (APS) 10%	300 µl
TEMED	15 µl

Tabla 6. *Tabla de soluciones para la preparación del gel SDS-PAGE. Gel separador.*

SOLUCIONES (gel concentrador)	VOLUMEN
30% Acrilamida/0,8% Bisacrilamida	2,4 ml
Tris-HCl 1,25 M, pH 6,8	1,5 ml
Agua Destilada	10,8 ml
SDS 10%	150 μ l
Persulfato de amonio (APS) 10%	150 μ l
TEMED	22,5 μ l

Tabla 7. Tabla de soluciones para la preparación del gel SDS-PAGE. Gel concentrador.

3.3.2.7.-ELECTROFORESIS 2-D

La electroforesis en gel bidimensional, o 2-D, es una forma de electroforesis utilizada comúnmente para analizar mezclas de proteínas. Éstas son separadas por diferentes propiedades, como son el punto isoelectrónico y su tamaño molecular. La técnica fue descrita por primera vez de forma independiente por O'Farrell y Klose en 1975 [52, 53].

El proceso comienza separando en primer lugar las proteínas en una dimensión, mediante la técnica del isoelectroenfoque, y luego separándolas en la otra dimensión con un ángulo de 90°, mediante electroforesis SDS-PAGE (ya descrita en 4.2.3).

3.3.2.7.1.- ISOELECTROENFOQUE

El isoelectroenfoque se encarga de separar las proteínas en función de su punto isoelectrónico, en lugar de separar las proteínas en función de su carga a un pH dado, como la electroforesis SDS-PAGE. El punto isoelectrónico (pI) se define como el punto en el que la carga neta de la proteína es nula a un determinado pH, y éste depende de la composición aminoacídica de la proteína. Cada proteína va a migrar en una tira de gel, que presenta un gradiente de pH mediante anfólitos, que se van a encargar de estabilizar el pH a lo largo del gel. Cuando la proteína alcanza su pI precipita quedándose retenida en ese punto.

Para llevar a cabo la electroforesis 2D, las tiras de gel (IPG strips; ReadyStrip™, BioRad) fueron cargadas con 188 µg de proteínas totales de la fracción soluble, disueltas en 180 µl del tampón de rehidratación (6 M urea, 2 M tiourea, 4% Chaps, 20 mM ditiotreitol, 0,1% anfolitos, 0,001% azul de bromofenol) y fue rehidratado durante 16 h a 50 V (25°C) en el Protean® IEF cell (BioRad). La separación fue llevada a cabo al día siguiente aplicándose un potencial eléctrico sobre el gel, éste hace que un extremo sea positivo y el otro negativo; las proteínas aplicadas se mueven a lo largo del gel y se acumulan según su pI. Las condiciones del potencial eléctrico que se siguieron fueron: primera fase (rampa lineal) 250 V durante 15 min, seguidas de 4000 V durante 2 h, tercera fase (rampa rápida) 4000 V hasta 10000 V/h y, por último, cuarta fase, o fase de mantenimiento, con rampa rápida a 500 V hasta un máximo de 50 µA/gel.

A continuación las tiras de gel fueron equilibradas introduciéndolas durante 10 min en 1 ml del tampón de equilibrado I (6 M urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 20% glicerol con 2% ditiotreitol). Tras ello se introdujeron 10 min en el tampón de equilibrado II (6 M urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 20% glicerol con 2,5% de yodoacetamida). Las tiras de gel fueron lavadas en el tampón de lavado TGS (25 mM Tris, 192 mM glicina and 0,1% SDS).

Una vez terminada la migración de las proteínas en la primera dimensión, las tiras fueron colocadas en un gel SDS-PAGE del 12.5%. El desarrollo electroforético y la posterior tinción del gel se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

3.3.2.8.-IDENTIFICACIÓN DE PROTEINAS

La identificación de proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, de Madrid (CBMSO), y en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. Las bandas de interés se recortaron de forma manual, minimizando la cantidad de gel, que se digirió “in-situ” de modo automático (empleando un robot-digestor Bruker) mediante tripsina, tal y como se ha descrito previamente [54]. El sobrenadante de la digestión (que contiene los péptidos) se acidificó con TFA al 0,1%, secándose en un Speedvac, para resuspenderlo en 5 ml de Tampón

TA. Una pequeña alícuota (0,5 ml), se depositó en una placa “Anchor-chip” (Bruker), empleando DHB (ácido 2,5-Dihydroxybenzoico), como matriz, a una concentración de 5 g/L mediante el método “fastevaporation”. La placa fue medida en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (matriz-assisted laser desorption/ionisation/time-of-flight), modelo autoflex (Bruker), equipado con reflector.

Los espectros de masas obtenidos se utilizaron como “huella peptídica”, para la identificación de proteínas en las bases de datos, utilizando los motores de búsqueda accesibles en la red (Mascot, Profound).

3.3.2.9.- LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

3.3.2.9.1.-OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Con la fracción proteica purificada se siguió un protocolo de inmunización de 81 días, inmunizando dos ratas con cada proteína. Se obtuvieron seis sueros, uno por cada rata inoculada, como se muestra en la siguiente tabla.

Proteína / P.M.	Nomenclatura de los inmunisueros
Banda 1 25 Kda	0,03 1P3 0,04 1P3
Banda 2 45 Kda	0,05 2P3 0,06 2P3
Banda 3 80 Kda	0,07 3P3 0,08 3P3

Tabla 8. Nomenclatura de los inmunisueros

Los anticuerpos policlonales obtenidos se utilizarían posteriormente para los ensayos de inmunolocalización, tanto en las separaciones electroforéticas como en las preparaciones microscópicas.

Para el proceso de inmunización se siguió el siguiente protocolo (Eurogentec):

Las proteínas purificadas, fueron utilizadas para inmunizar a ratas Wistar mediante inoculación intraperitoneal de 50 µg de proteína, junto a adyuvante completo de Freund (Sigma) en la

primera inoculación, y 25 µg más de adyuvante incompleto de Freund en el resto de las inoculaciones. El volumen total inoculado fue de 500 µl por inmunización. Tres semanas después de la primera inoculación se evaluó el título de anticuerpos, tras la obtención del suero por sangrado de los animales de la vena submandibular, y empleando como método inmunológico la técnica de ELISA indirecta, como se describe más adelante. Los niveles de anticuerpos se evaluaron semanalmente. A los 7 días de la última inyección, se sacrificaron los ratones desangrándolos por punción cardíaca, y depositando la sangre así extraída en tubos (BD Microtainer ®). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C, tras ello se mantuvieron 3 h a 4°C a fin de favorecer la retracción del coágulo, y obtener así el máximo de suero. Recogido el suero se centrifugó a 5000 g durante 5 min, almacenándose a -20°C, valorando su título y especificidad, así como las posibles reacciones cruzadas con otras proteínas.

Al objeto de examinar la especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos en los animales inmunizados, primero titulamos los sueros mediante la técnica de ELISA, empleando como antígenos las fracciones de proteínas obtenidas de la electroforesis preparativa. Posteriormente, para determinar la especificidad, se empleó la técnica de inmunoblot en membranas de nitrocelulosa.

3.3.2.9.2.- ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

La técnica ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), es un método sencillo y sensible capaz de detectar y cuantificar antígenos o anticuerpos. Es un técnica de ensayo inmunoenzimático, concebida en 1971 en Suecia y Holanda, y que consiste en la fijación de un componente de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) a un soporte inerte, que luego es expuesto a una fase fluida que contiene el reactivo complementario.

Existen varias formas de este tipo de ensayo, siendo las más importantes: ELISA indirecta, ELISA competitiva, ELISA tipo SANDWICH y el Dot-ELISA. Todas se basan en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo sobre la fase sólida, y en la detección del mismo mediante ensayos enzimáticos, con una enzima

previamente acoplada bien a los anticuerpos o al propio antígeno. La enzima reacciona específicamente con el sustrato correspondiente, en presencia de un cromógeno capaz de producir un color. Es detectable visualmente, y además cuantificable con un espectrofotómetro (lector de ELISA) a determinada longitud de onda, y en unidades de densidad óptica (DO).

El procedimiento para la ELISA indirecta utiliza el fondo de la cavidad de las placas de microtitulación, u otro componente de fase sólida, recubierto con el antígeno. Para ello se diluyen los antígenos en una solución de acoplamiento hasta una concentración final de 1 µg. Se depositan en los pocillos de la placa de microtitulación (placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos tipo Maxisorp) (Nunc®, Denmark), y se dejan en incubación a 4°C durante toda la noche al objeto de que se adsorban en el plástico. En el segundo paso se lavan tres veces los pocillos con solución de lavado (Tween 0,3% en PBS, 0,15 M NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl y 10 mM Na₂HPO₄ a un pH 7,4) para eliminar los antígenos libres. Después de los lavados se incuba la placa con 100 µl por pocillo de solución de bloqueo (Tween 0.1% en PBS, Leche en polvo 2%), durante 1 h a 37°C. Se elimina la solución de bloqueo, y se incuban ya los pocillos, por triplicado, con 100 µl de cada dilución del suero a ensayar en diluciones seriadas desde 1:100 hasta 1:12800 en PBS, durante 1,5 h, y a 37°C. Una vez incubadas y lavadas con solución de lavado, al objeto de arrastrar los restos del suero, se añaden 100 µl del inmunoconjugado diluido 1:1000 en PBS, incubándose durante 2 h a temperatura ambiente. Tras ello se lava de nuevo como anteriormente. Finalmente, se añaden a cada pocillo 50 µl de la solución de sustrato de peroxidasa (12,5 ml de Tampón citrato 0,1 M a pH 5, 12,5 ml de agua desionizada y una pastilla de O-fenil diaminobenzidina u OPD), quedando a una concentración de 0,4 mg/ml (Sigma), y 10 µl de peróxido de hidrógeno, dejándose que reaccione durante 30 min. La reacción se interrumpe con HCl 1N. La absorbancia se determina a 495 nm en un lector de ELISA Multiskan Spectrum (Thermo).

3.3.2.9.3.- WESTERN-BLOT

Esta técnica, descrita y desarrollada por primera vez por Towbin en 1979 [55], está basada en la transferencia de las proteínas

a una membrana inerte, cargada electropositivamente donde se realiza la identificación de las proteínas (Nylon, Nitrocelulosa, PVDF como es nuestro caso y cuya capacidad de electrotransferencia es de hasta 100 μg de proteína/ cm^2). Es una técnica inmunoenzimática mixta, con la capacidad analítica de la Electroforesis en gel y la sensibilidad del inmunoanálisis, que permite la detección antigénica de las proteínas inmovilizadas en la membrana tras la separación electroforética de las bandas.

El inmunobloting se aplica para el análisis inmunoquímico de las fracciones de antígenos obtenidos mediante:

1. Electroforesis en SDS- PAGE.
2. Isoelectroenfoque en PAGE o agarosa [56].
3. Electroforesis bidimensional según O'Farrel [57].
4. Electroforesis en gradiente del PAGE [58].
5. Cromatografía de capa fina en gel de sílice [59].

De este modo el inmunobloting combina la gran eficacia de los métodos de fraccionamiento con una alta sensibilidad y especificidad de reacciones inmunes [60].

Siguiendo el método de Towbin [55] se procedió a separar electroforéticamente las proteínas purificadas en geles de SDS-PAGE al 12%, para luego transferirlas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, Nitrocellulosae, GE), previamente sensibilizadas en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanol, pH 8,3), a temperatura ambiente y durante 10 min.

A continuación, se preparó un sándwich con la membrana y el gel con la siguiente distribución: cuatro hojas de papel de filtro del tamaño del gel, la membrana de nitrocelulosa, el gel, y otros cuatro trozos de papel de filtro. El desarrollo de la transferencia se llevó a cabo bajo 350 mA durante 1 h a 4°C, en la cubeta de electroforesis, y en tampón de transferencia. Después de la transferencia, la membrana se incubaba con la solución de bloqueo PBSTG (Tween 0,1% en PBS, gelatina de teleósteo 1%), durante 90 min, en agitación a 37°C, o bien durante toda la noche a 4°C. Tras efectuar varios lavados en tampón de lavado PBST (PBS + 0,5% Tween-20), la membrana se incubó con los inmunisueros, obtenidos de los animales inmunizados. Se usaron los sueros a una dilución de

1/50 en PBST, durante 2 h en agitación y a 37°C. Se lavaron 3 veces durante 10 min con PBST. Las tiras se incubaron después con el inmunoc conjugado con peroxidasa (Dako), a una dilución 1/1000, durante 2 h en agitación, y a 37°C. Finalizada la incubación se lavó por tres veces con tampón de incubación, a temperatura ambiente, durante 10 min cada lavado, y se reveló con CDP-Star, Chemiluminescent Substrate (Sigma), durante 15 a 30 min, en agitación y oscuridad, parando la reacción con agua desionizada, o con solución de parada. Las membranas fueron reveladas exponiéndolas durante 1 min en un cassette X-OMAT KODACK.

3.3.2.9.4- INMUNOLocalización

La localización de las proteínas mediante la técnica de inmunogold se llevó a cabo mediante inmunolocalización en microscopía electrónica de barrido (Hitachi TM 1000 Table top).

Una vez fracturadas las conchas en trozos de unos 5 mm se lavaron con agua, y se sonicaron posteriormente en una solución de EDTA al 1% durante 3 min, al objeto de eliminar el polvo y los fragmentos que pudieran interferir en el posterior reconocimiento de los anticuerpos, y posterior observación, así como para descalcificar ligeramente y favorecer con ello la exposición de los antígenos. Tras este tratamiento, se lavaron al menos tres veces con abundante agua y se secaron en estufa a 55°C.

Las piezas pulidas se sumergieron 30 min en lejía al 10%, al objeto de eliminar las posibles proteínas contaminantes durante el tratamiento. Se lavaron tres veces con abundante agua y se trataron con EDTA de la misma manera que las fracturadas.

Las muestras así tratadas eran incubadas después en tampón de bloqueo 1% TBS de gelatina (TBS con Tween 20 al 0,05%, pH 7,5), durante 2 h a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C. Tras eliminar el tampón de bloqueo, las muestras se incubaban con el suero a una dilución de 1/100, durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente. El control negativo se realizaba por incubación de uno de los fragmentos en una dilución 1:100 de un suero de rata no inmunizada durante una hora, y de unas preparaciones de concha que se incubaron

exclusivamente en tampón de bloqueo. Todas las incubaciones fueron realizadas por inmersión a temperatura ambiente, y lavadas posteriormente en las mismas condiciones referidas arriba. Una vez incubadas frente al inmunisero, las preparaciones fueron incubadas con el inmunoconjugado marcado con oro, a una dilución de 1/30000 durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados con TBS las preparaciones fueron secadas para retirar el exceso de líquido, y tratadas posteriormente con el potenciador “Silver Staining Kit for Light and Electron Microscopy” durante 10-15 min. Previamente a la observación microscópica las muestras fueron secadas sobre papel en estufa a 55°C, y fijadas tras ello a los portamuestras.

Se utilizó un método alternativo para evitar el uso del “ensalzador de plata”, pues este daba una respuesta inespecífica muy alta en los ensayos preliminares. La incubación con el anticuerpo secundario fue sustituida por una incubación con proteína A. Las muestras fueron incubadas durante 2 h con proteína A diluida 1:100 y unida a oro coloidal (10 nm Ø). Las muestras fueron finalmente lavadas y secadas, antes de ser fijadas al soporte para SEM y ser bombardeadas con carbono. Las muestras fueron observadas en SEM usando electrones retrodispersados (BSE, back-scattered electrons).

3.3.2.10.-ICP-MS

La Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo o ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), es una técnica que permite el análisis inorgánico, siendo capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos que componen la tabla periódica. Como características principales posee unos límites de detección de unas pocas ppb-ppt, la posibilidad de análisis multielemental semicuantitativo y cuantitativo, y un rango dinámico lineal de 8-9 órdenes de magnitud (ng/l-mg/l). Las muestras sólidas se deben presentar secas y molidas. Para ello se pesaron 0,1 g de concha triturada de *L. gigas* con un tamaño máximo de grano de 75 µm, para asegurar la homogeneidad de la muestra. Las muestras fueron digeridas mediante digestión ácida, con HNO₃ y HF (1:3 v/v en agua Mili-Q), y concentradas bajo presión, en un horno microondas, diluyéndose posteriormente el extracto obtenido con 100 ml de una solución al

4% de HNO₃ para el análisis de elementos traza en el equipo PE SCIEX ELAN-5000 (Perkin Elmer). Como control interno se usó Rh.

3.3.2.11.- ANÁLISIS DE AZÚCARES

La presencia de azúcares en las fracciones soluble e insoluble se estudió desde cuatro técnicas diferentes: Caracterización cuantitativa por FTIR, por tinción PAS en gel SDS-PAGE, por deglicosilación enzimática y mediante HPAE-PAD.

3.3.2.11.1.- TINCIÓN PAS (Periodic Acid-Schiff)

Esta técnica es muy utilizada en observaciones histológicas bajo microscopía óptica, también puede resultar muy útil a la hora de teñir geles. Se utiliza para poner en evidencia la presencia de grupos aldehído, formados por oxidación previa de los hidratos de carbono de la muestra. Se basa en la aplicación de un ácido para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas). Después se utiliza el reactivo de Schiff, que reacciona con los grupos aldehídos resultando en una característica coloración rojo-púrpura.

Se incubó el gel en ácido acético al 7,5%, durante 60 min a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C. Sin lavar se eliminó el ácido y se añadió una solución de ácido periódico al 2% durante 45 min, y en oscuridad. De nuevo, sin lavar, se descartó el líquido remanente y se incubó durante 45 min en oscuridad junto con el reactivo Schiff. Finalmente se destiñó con ácido acético al 10% durante toda la noche a 40°C, realizándose varios cambios del reactivo en el proceso.

3.3.2.11.2.- DEGLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA

Se realizó el estudio de la deglicosilación enzimática empleando el kit “Enzymatic CarboRelease” (ref. KE-DG01, QA-Bio, VistaMonte, CA, USA), el cual incluye las enzimas y tampones necesarios para la eliminación de todos los oligosacáridos (y muchos azúcares), unidos a 2 mg de glicoproteína en una incubación de 3 h.

Las enzimas incluidas fueron:

- PNGase F (*Chryseobacterium meningosepticum*)
- O-Glycosidase (*Streptococcus pneumoniae*)
- Sialidase (*Arthrobacter ureafaciens*)
- Beta-Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*)
- Glucosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*)

Se mezclaron 10 μ l del tampón de reacción (5X) con 35 μ l de agua destilada, que contenía cerca de 100 μ g de glicoproteínas en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. La muestra contenía realmente 87,5 μ g de proteína por cada 35 μ l. Completamos con el control positivo.

Después se añadieron 2,5 μ g del tampón desnaturizante y se mezcló con suavidad. Se calentó la muestra a 100°C durante 5 min para después pasar a enfriarla en hielo. Se añadieron 2,5 μ l de Tritón X, incluido en el kit. Éste es un tensioactivo no-iónico que se suele utilizar como detergente, así como auxiliar de disolución. Se añadió 1 μ l de cada una de las enzimas incluidas en el kit, (PNGasa F, Sialidasa, Beta-Galactosidasa, Glucosaminidasa y O-Glicosidasa), y se incubó durante 3 h a 37°C.

3.3.2.11.3.- FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Para la identificación de los distintos compuestos orgánicos que forman parte de la muestra se puede utilizar esta técnica basada en la radiación infrarroja. El término FTIR proviene de la “Transformada de Fourier”, necesaria para poder transformar los datos obtenidos en un espectro legible. Para identificar los compuestos que forman parte de la muestra, ésta es sometida a una radiación infrarroja, lo que da lugar a la emisión de un espectro característico. Las moléculas reaccionan de forma distintiva a su exposición a los infrarrojos, de tal modo que puede reconocerse su “firma” en el espectro, y ser por ello fácilmente identificables.

3.3.2.11.4.-HPAE-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography)

Los contenidos de azúcares de las muestras hidrolizadas fueron determinados mediante esta técnica, en una columna CarboPac PA100 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). Es un proceso que permite la separación de iones y moléculas polares, basado en las propiedades de carga de las moléculas. Es posible usarla con gran cantidad de moléculas cargadas, incluyendo ácidos orgánicos y azúcares. Se utiliza normalmente en el análisis de aguas y de extractos acuosos (vegetales y minerales), así como en controles de calidad de diversos procesos. Es muy útil en el ámbito medioambiental así como en la industria agroalimentaria. Funciona mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico, con detección amperométrica de pulsos de 50 mV (PAD). Las muestras no hidrolizadas fueron analizadas de forma similar, para tratar de detectar los monosacáridos libres que pudieran contaminar la muestra durante el proceso de extracción.

3.3.2.12.-CRISTALIZACIÓN IN-VITRO

Se valoró el efecto de la fracción soluble de la matriz orgánica, y de las distintas fracciones proteicas (1P3, 2P3 y 3P3) en la cristalización *in vitro*. La cristalización se realizó siguiendo el proceso descrito por Albeck [61]. En esencia, los cristales de calcita se hicieron crecer por difusión lenta de vapores de bicarbonato de amonio, en una solución de CaCl_2 10 nM (200 μl por pocillo), colocados en unas placas de microtitulación de 16 pocillos (Lab-Tekm Nunc). Se probaron tres cantidades diferentes de los componentes (1, 5 y 10 μg). Las placas se cerraron con su tapa de plástico y después fueron selladas con parafina. La difusión del bicarbonato de amonio se realizó a través de pequeños agujeros (de aproximadamente 1 mm de diámetro) realizados en mitad de cada uno de los pocillos, de forma previa al experimento. Una vez cubiertas las placas, fueron colocadas en un desecador cerrado de 5 l, que contenía cristales de bicarbonato de amonio. Allí fueron incubadas a 4°C durante 48 h. Los controles, sin matriz alguna, fueron realizados de manera similar. Las placas de cultivo fueron separadas de sus coberturas de plástico, y observadas en un microscopio SEM Hitachi TM1000.

3.4.-Resultados

3.4.-RESULTADOS

3.4.1.-LAMELAR CRUZADA DE LOBATUS GIGAS

3.4.1.1.--EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ ORGÁNICA DE LA CONCHA DE LOBATUS GIGAS

Nuestro primer objetivo fue determinar cualitativa y cuantitativamente las proteínas presentes en la matriz orgánica de *L. gigas*. Empleamos como primera metodología la electroforesis en SDS-PAGE, una vez obtenidas las dos fracciones de la matriz, soluble e insoluble. La Figura 19 muestra los geles obtenidos con ambas fracciones tras tinción de plata, y con azul de Coomassie. Las proteínas usadas como marcadoras (carriles M en la figura) tenían pesos moleculares comprendidos entre 15 y 200 KDa.

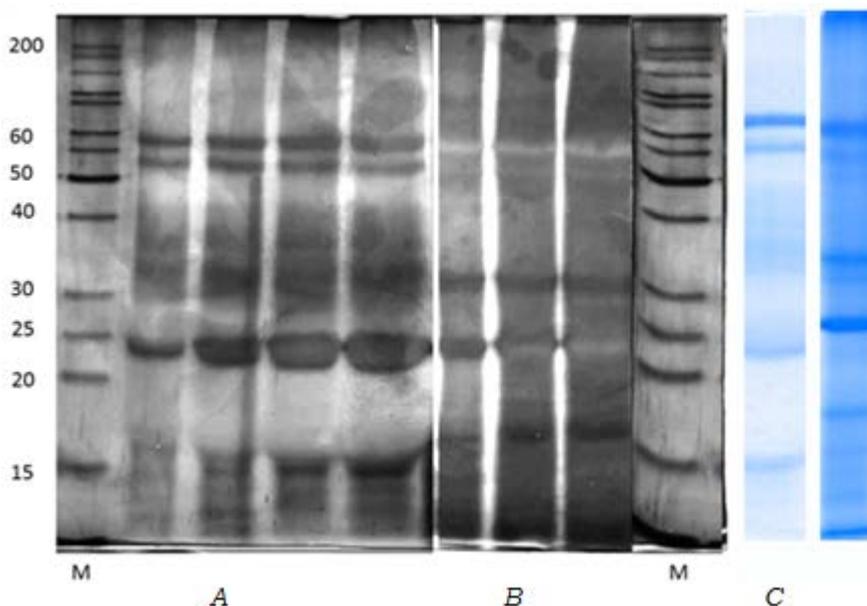


Fig. 19. Gel SDS-PAGE 12 % en el que se muestran las proteínas totales de la fracción soluble (A) y de la insoluble (B) de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. M. Columnas marcadoras en ambos extremos. C. Gel teñido con azul de Coomassie (izquierda, fracción soluble 10 µg, derecha, insoluble 20 µg).

Las bandas correspondientes a la fracción soluble (A en la Figura 19) corresponden a cuatro concentraciones diferentes de la misma muestra, y las correspondientes a la fracción insoluble (B en la Figura 19) a tres concentraciones. Ambas fracciones presentan patrones proteicos muy similares, con algunas bandas comunes, es decir de similar peso molecular. En la fracción soluble se aprecian cuatro bandas principales con mayor concentración de proteínas, y prácticamente las mismas con menor intensidad en la insoluble.

El densitograma de las bandas obtenidas a partir de la fracción soluble se muestra en la Figura 20. Se detectaron un total de 10 picos entre 83,64 y 6,86 kDa (Tabla 9)

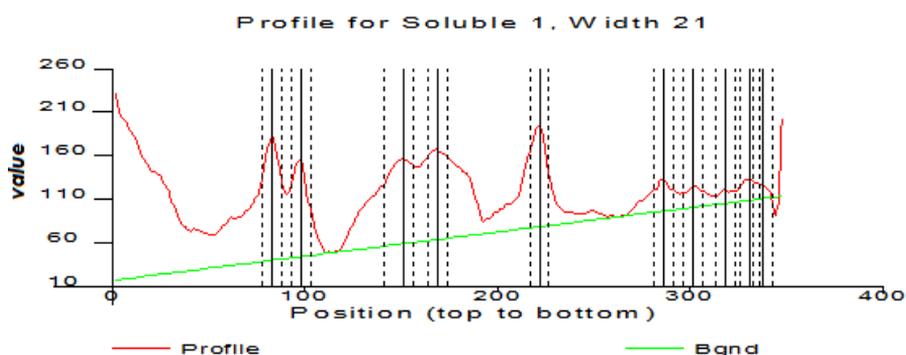


Fig. 20.-Densitograma de la bandas obtenidas de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Eje vertical intensidad del gel; eje horizontal, posición en el gel.

	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5
Mr (KDa)	83,64	74,5	50,47	44,6	29,7
	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9	Pico 10
Mr (KDa)	15,7	13,0	10,1	7,84	6,86

Tabla 9. Masa molecular relativa de las proteínas obtenidas de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*.

El densitograma de la fracción insoluble mostró un total de 12 picos (Fig. 21), con una masa molecular relativa comprendida entre 104,36 y 15,02 kDa (Tabla 10).

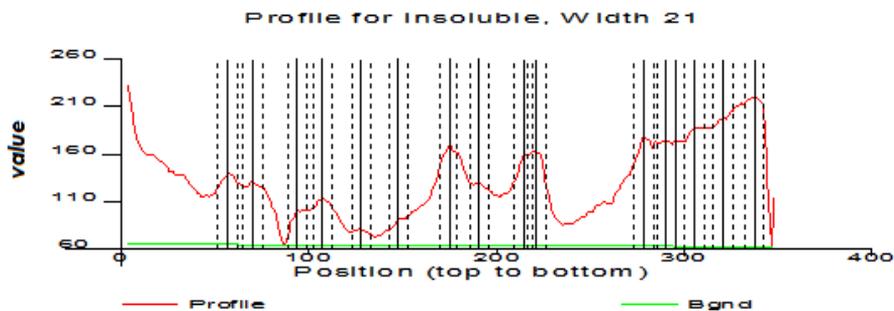


Fig. 21. Densitograma de las proteínas obtenidas de la fracción insoluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Eje vertical intensidad del gel; eje horizontal, posición en el gel.

	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6
Mr(KDa)	104,36	93	76,8	69,1	59,8	51,9
	Pico 7	Pico 8	Pico 9	Pico 10	Pico 11	Pico 12
Mr(KDa)	42,7	37,9	31,5	30	17,32	15,02

Tabla 10. Masa molecular relativa de las proteínas obtenidas de la fracción insoluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*.

Con el fin de evidenciar la posible naturaleza de las proteínas de la matriz soluble se emplearon distintas técnicas de tinción. Con la tinción “Stains-all”, un colorante metacromático, pretendimos poner en evidencia las posibles proteínas ligadoras de calcio, tal y como ya se expuso anteriormente en Material y Métodos. Las proteínas ligadoras de calcio conducen a una tinción del gel con colores violeta o fuertemente azulado, mientras que las restantes generalmente quedan coloreadas en tonos rojos o rosas [51]. Ocasionalmente la tinción puede ser negativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22. Se aprecia una banda mayoritaria en la fracción soluble con el color específico de la tinción para proteínas que no se unen al calcio (masa molecular relativa

aproximadamente de unos 24 kDa), y dos bandas superiores de color violeta teñidas en ambas fracciones que denotan la unión al calcio.

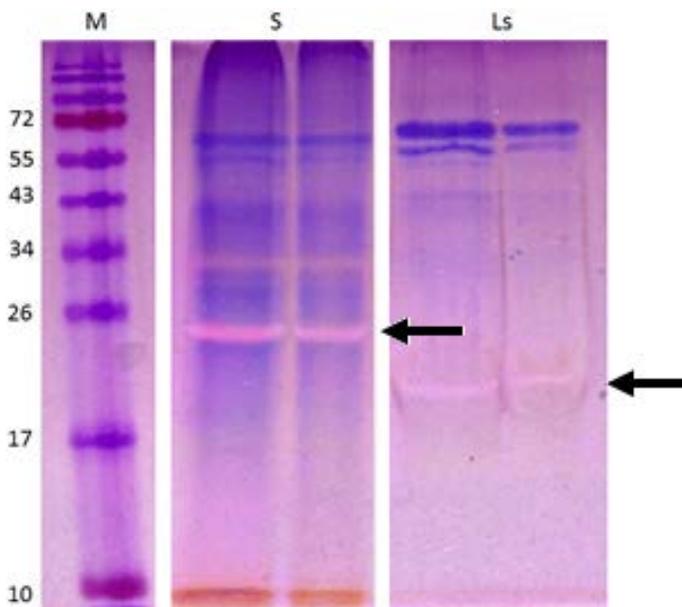


Fig. 22. Gel SDS-PAGE 12% de las proteínas totales extraídas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Tinción “Stainsall” capaz de detectar proteínas ligadoras de calcio. Proteínas marcadoras (M) Fracción soluble (S) Insoluble (Ls). Las flechas señalan la bandas en tinción negativa referidas en el texto.

Para determinar la proporción de oligosacáridos presentes en las fracciones obtenidas, se optó por realizar la tinción de “Alcian Blue”. Esta técnica se utiliza comúnmente en la detección de polisacáridos ácidos de cadena larga o corta. Los resultados se aprecian en la Figura 23. En ambas fracciones se evidenció una banda ligeramente teñida, apreciable en tinción negativa, con masas moleculares relativas de 23 y 20 kDa (flecha en la Figura 23).

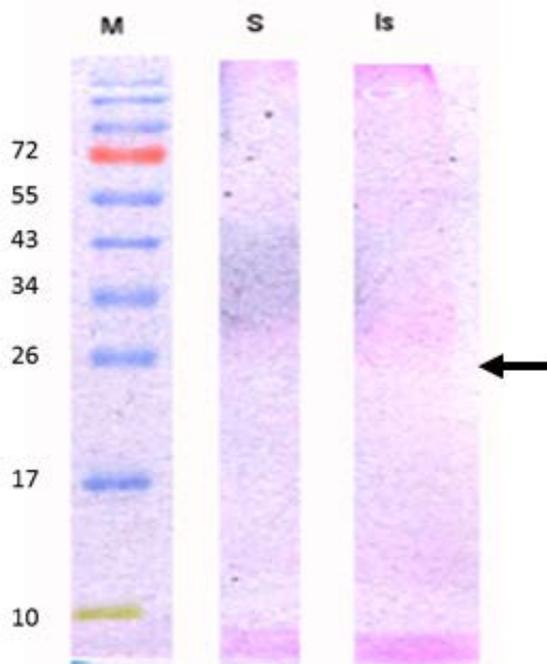


Fig. 23. GelSDSPAGE 12% de las proteínas totales extraídas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Tinción con Alcian Blue. (M) Proteínas marcadoras, (S) Fracción soluble, (Is). Insoluble. Se aprecia débilmente una ligera banda con color específico de la tinción en ambas fracciones (flecha)

3.4.2.-PURIFICACION DE PROTEÍNAS

3.4.2.1.-PURIFICACIÓN DE 1P3, 2P3 y 3P3

La purificación de las proteínas de la fracción soluble se realizó mediante electroforesis preparativa, separando los extractos proteicos en función de su peso molecular (véase Material y Métodos). Se obtuvieron tres fracciones, tal y como se muestra en la Figura 24, podemos observar en ella las proteínas totales en el carril izquierdo, y las purificadas en los restantes carriles. En el tercer carril se aprecia una banda intensamente teñida. Denominamos a esta proteína 1P3; su peso molecular es de unos 24 kDa y, acorde con los resultados anteriores, puede ser ligeramente ligadora de calcio e incluir polisacáridos ácidos en escasa proporción. Esta proteína fue una de las escogidas por estar presente en cantidad considerable.

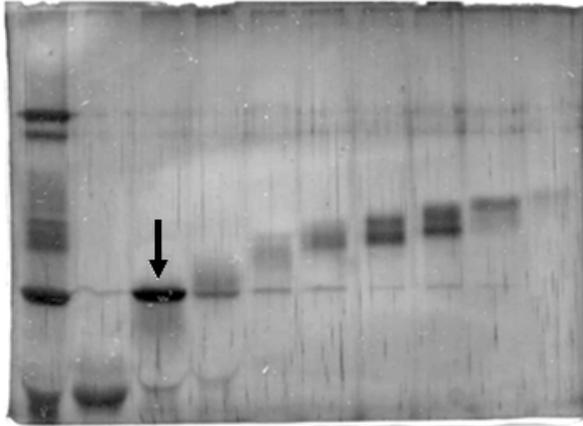


Fig. 24. Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa en los restantes carriles. La proteína señalada ha sido denominada como 1P3 y posee un peso molecular aproximado de 24 KDa.

Sucesivamente, se identificaron las otras dos proteínas mayoritarias, 2P3 (Fig. 25), con un peso molecular aproximado de 44 kDa, y 3P3, con un peso molecular aproximado de unos 80 kDa (Fig. 26).

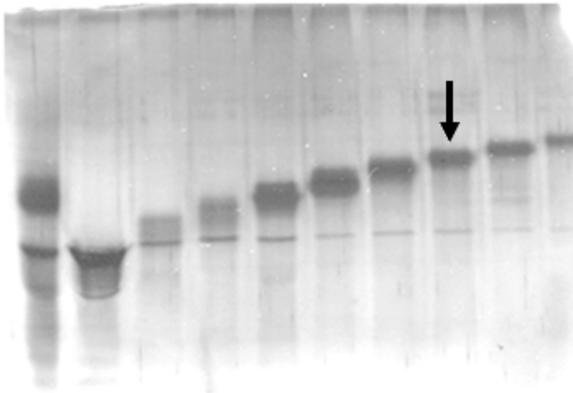


Fig. 25. Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDSPAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa. La proteína señalada ha sido denominada 2P3 y posee un peso molecular aproximado de 45 kDa.

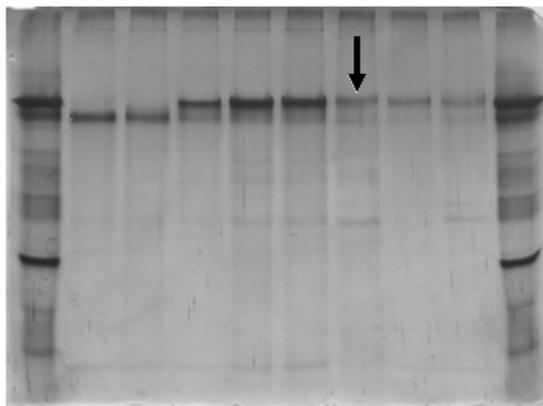


Fig. 26. Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDS-PAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa. La proteína señalada ha sido denominada 3P3 y posee un peso molecular aproximado de 80 kDa.

Se procedió tras ello a extraer esas bandas proteicas de las electroforesis preparativas para su purificación. Los resultados se muestran en la Figura 27 donde figuran aisladas 1P3 (carril 2), 2P3 (carril 3) y 3P3 (carril 4).

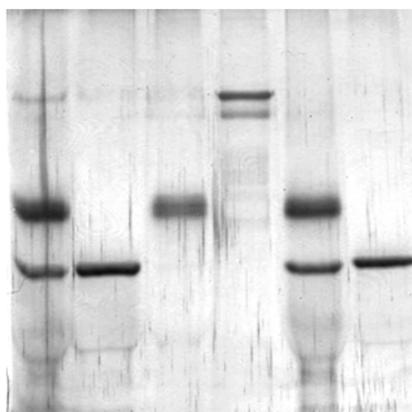


Fig. 27. Proteínas de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. Gel SDS-PAGE 12% de las proteínas totales (carril n°1) y de las proteínas purificadas y extraídas en la electroforesis preparativa: 1P3, 2P3 y 3P3 purificadas. Carriles: 1°- mezcla de las diferentes proteínas obtenidas. Carril 2°- 1P3. Carril 3°- 2P3. Carril 4°.- 3P3. Carril 5°.- mezcla de 1P3 y 2P3. Carril 6°- 1P3 purificada.

Se consideró analizar también las proteínas de la fracción soluble mediante una electroforesis en 2D, y comparar los resultados de la tinción de plata con la de azul Coomassie, ello nos permitiría conocer el punto isoelectrico de las proteínas seleccionadas. Los resultados tras tinción con plata (A) y con azul de Coomassie (B) se muestran en la Figura 32.

El punto isoelectrico varía ampliamente de un valor de 3 hasta superior a 10. La mayor parte de los constituyentes de la matriz migran con un pI entre 4,5 y 6,5. Se aprecian dos bandas difusas con un pI inferior a 4 y tres con pI superior a 10.

La fracción 1P3 no se detecta en la electroforesis bidimensional, mientras que sí es patente una fracción con bajo peso molecular que no era visible en el gel en una dimensión. La fracción 2P3 no aparece como una banda, sino como varios puntos contiguos con alto pI, la 3P3 es un área difuminada (Fig. 32).

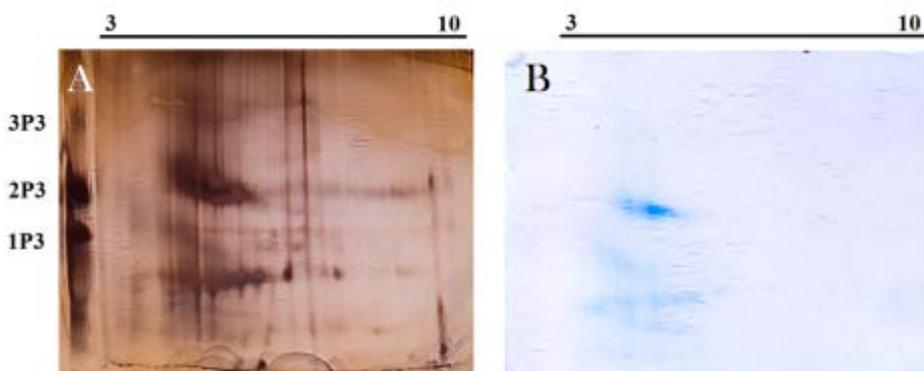


Fig. 28. Gel de electroforesis 2D de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*. A Tinción de plata. B. Azul de Coomassie (Bio-Rad).

Como último paso se procedió a la secuenciación de las tres proteínas de interés. Dicha secuenciación se realizó, como se ha indicado en Material y Métodos, en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) en Madrid y en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. Para ello se envió un gel SDS-PAGE al 12% que incluía la fracción soluble, tiñendo previamente las bandas mediante tinción Sypro-Ruby de cara a la selección de las proteínas de interés. La identificación proteica se realizó tras la digestión tripsica de dichas bandas, mediante la técnica de MALDI-

TOF, y análisis mediante trampa iónica en modo de exclusión dinámica, y posterior identificación de los péptidos en las bases de datos, utilizando el programa Mascot (véase sección 4.2.8). De las bandas enviadas a analizar, ninguna de ellas presentaba homología con ninguna proteína descrita en las bases de datos analizadas (mediante TurboSequest y SwissProt).

3.4.3.-OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Tras conseguir una cantidad suficiente de cada una de las proteínas (4,43 mg de 1P3, 1,07 mg de 2P3 y 0,33 mg de 3P3) se procedió a la obtención de anticuerpos policlonales en ratas, y a su posterior valoración empleando una prueba de ELISA indirecta. Tal y como se explicitó en Material y Métodos (sección 3.3.2.9.1) usamos dos animales para la obtención de cada suero, un total de seis para las tres proteínas.

3.4.3.1.- ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

La valoración con ELISA proporcionó evidencia de que la inmunización fue efectiva. Los títulos obtenidos fueron 1:400, 1:200 y 1:400 para anti-1P3, anti-2P3 y anti-3P3 respectivamente.

3.4.3.1.1.- WESTERN-BLOT de 1P3

Para el reconocimiento de las proteínas inmunogénicas se usó la técnica de Western-blot, indistintamente para cada antisuero. Se valoraron el suero preinmune, el obtenido a los 35 días postinmunización, el obtenido a los 55 días y el suero final.

Los resultados obtenidos en el Western-blot para la proteína 1P3 se muestran en la Figura 29. Se observa cómo la reacción es evidente en el suero obtenido a los 55 días, y muy patente en el suero final, donde se aprecia una banda muy teñida con una masa molecular relativa de unos 22,27 kDa.

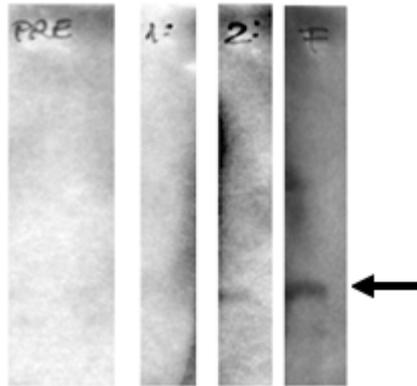


Fig. 29. Resultados obtenidos en el inmunoblot al enfrentar las proteínas separadas en SDS PAGE al inmunisero de rata frente a la fracción 1P3. Carril 1. (PRE) suero preinmunización. Carril 2 (1°).- Primera extracción del suero (35 días). Carril 3 (2°). Segunda extracción de suero (55 días). Carril 4. (F) Suero al final de la inmunización. La flecha señala la banda positiva.

En el densitograma del gel (Fig. 30) se evidencia también esta banda con claridad, con una masa molecular relativa de 22,27 kDa.

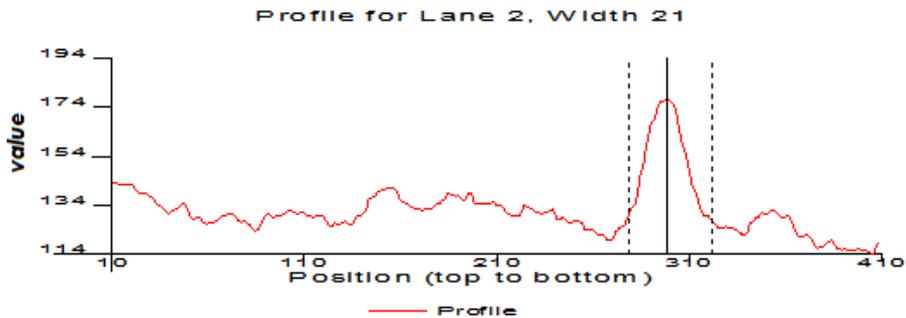


Fig. 30. Densitograma para el cálculo de la masa molecular relativa (22.27 kDa) de la banda reconocida por el inmunisero frente a 1P3.

3.4.3.1.2.- WESTERN-BLOT de 2P3

Se procedió igualmente con la proteína 2P3; los resultados se muestran en la Figura 31. Podemos constatar la inexistencia de bandas teñidas en el carril 1, correspondiente al presuero (P), una

banda neta en la primera extracción del suero (1), la misma aún más patente en la segunda extracción (2), y mucho más intensa con el suero final.

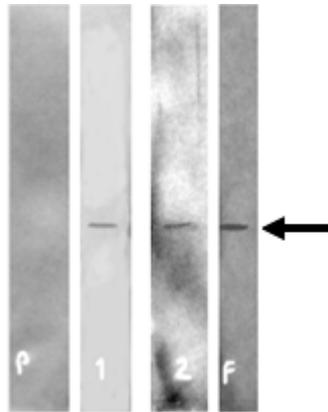


Fig. 31. Resultados obtenidos en el inmunoblott al enfrentar las proteínas separadas en SDS PAGE al inmunisero de rata a la fracción 2P3. Carril 1. (P) Suero preimmune. Carril 2 (1). Primera extracción del suero (35 días). Carril 3 (2). Segunda extracción del suero (55 días). Carril 4 (F). Suero al final de la inmunización. La flecha señala la banda positiva.

El densitograma (Fig. 32) muestra un pico correspondiente a la banda positiva del Western-blot. Su masa molecular relativa es de 20,21 kDa.

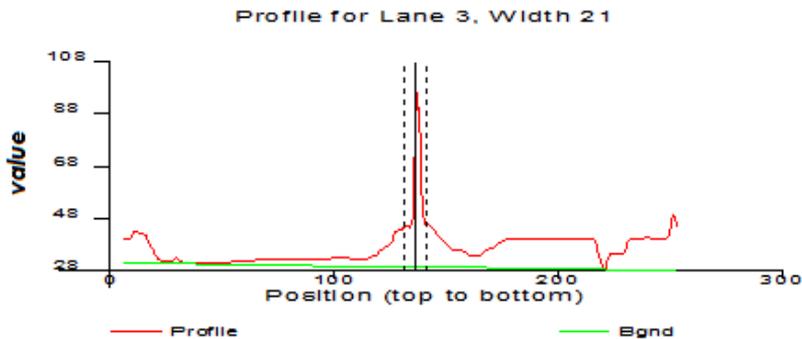


Fig. 32. Densitograma para el cálculo de la masa molecular relativa de la banda de 20,21 kDa, reconocida por el inmunisero frente a 2P3.

3.4.3.1.3.- WESTERN-BLOT de 3P3

Los resultados relativos a la proteína 3P3 se muestran en la Figura 33: no existen bandas en el carril relativo al suero preinmune (PRE); sí hay dos bandas tenues en la primera extracción (1), algo más intensas en la segunda (2), y aún más patentes en el suero final (F).

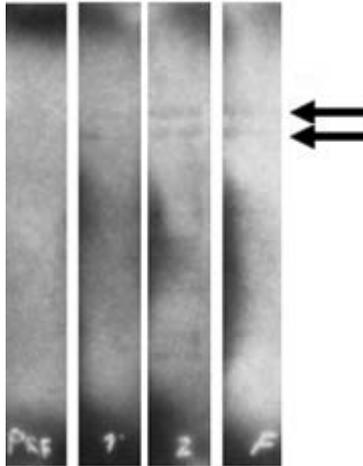


Fig. 33. Resultados obtenidos en el inmunoblott al enfrentar las proteínas separadas en SDS PAGE al inmunisero de rata frente a la fracción 3P3. Carril 1 (PRE), suero preinmune. Carril 2 (1), primera extracción del suero (35 días). Carril 3 (2), segunda extracción (55 días). Carril 4 (F), suero al final de la inmunización.

El densitograma mostró que estas bandas reconocidas mediante el inmunisero tienen masas moleculares relativas de 88,34 y 76,49 kDa, lo que no es sorprendente ya que se había constatado previamente que la fracción 3P3 estaba formada por dos bandas muy próximas (Figs. 33 y 34).

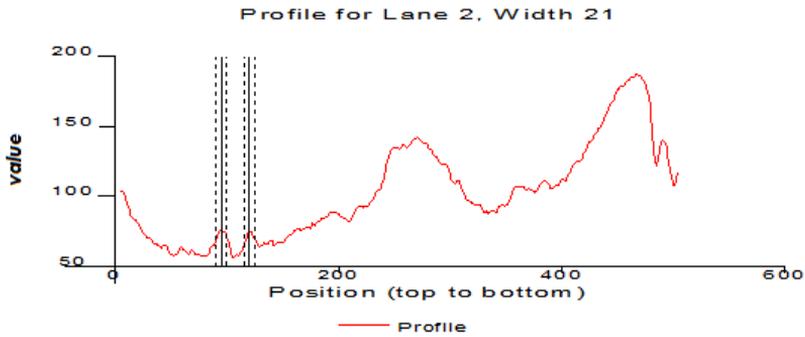


Fig. 34. Densitograma usado para el cálculo de la masa molecular relativa de las bandas de 88,34 y 76,49 kDa, reconocidas por el inmunisero frente a 3P3.

Cumplimentada esta parte ya disponíamos de anticuerpos frente a las tres proteínas seleccionadas.

3.4.3.2.- INMUNOLocalIZACIÓN

La inmunolocalización de las proteínas 1P3, 2P3 y 3P3 se abordó mediante inmunomarcaje con oro, para tratar de determinar su ubicación en la microestructura lamelar cruzada de *Lobatus gigas*. La Figura 35 muestra en SEM una fractura de la concha de *L. gigas* ligeramente descalcificada, usada como control negativo en las pruebas de inmunolocalización.

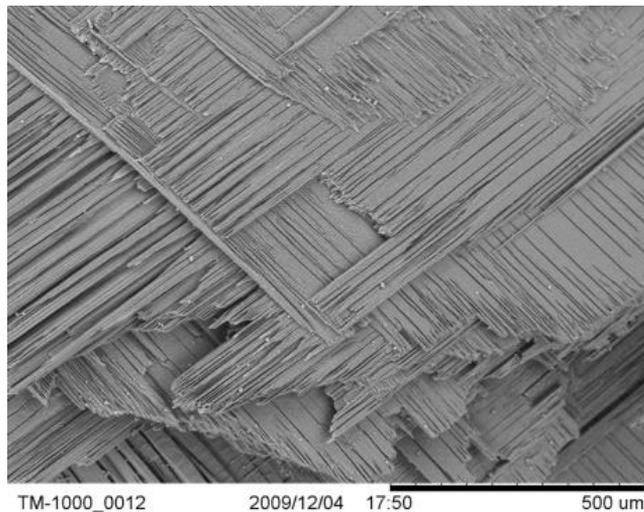


Fig. 35. Fractura de concha de *L. gigas*, ligeramente descalcificada con EDTA.

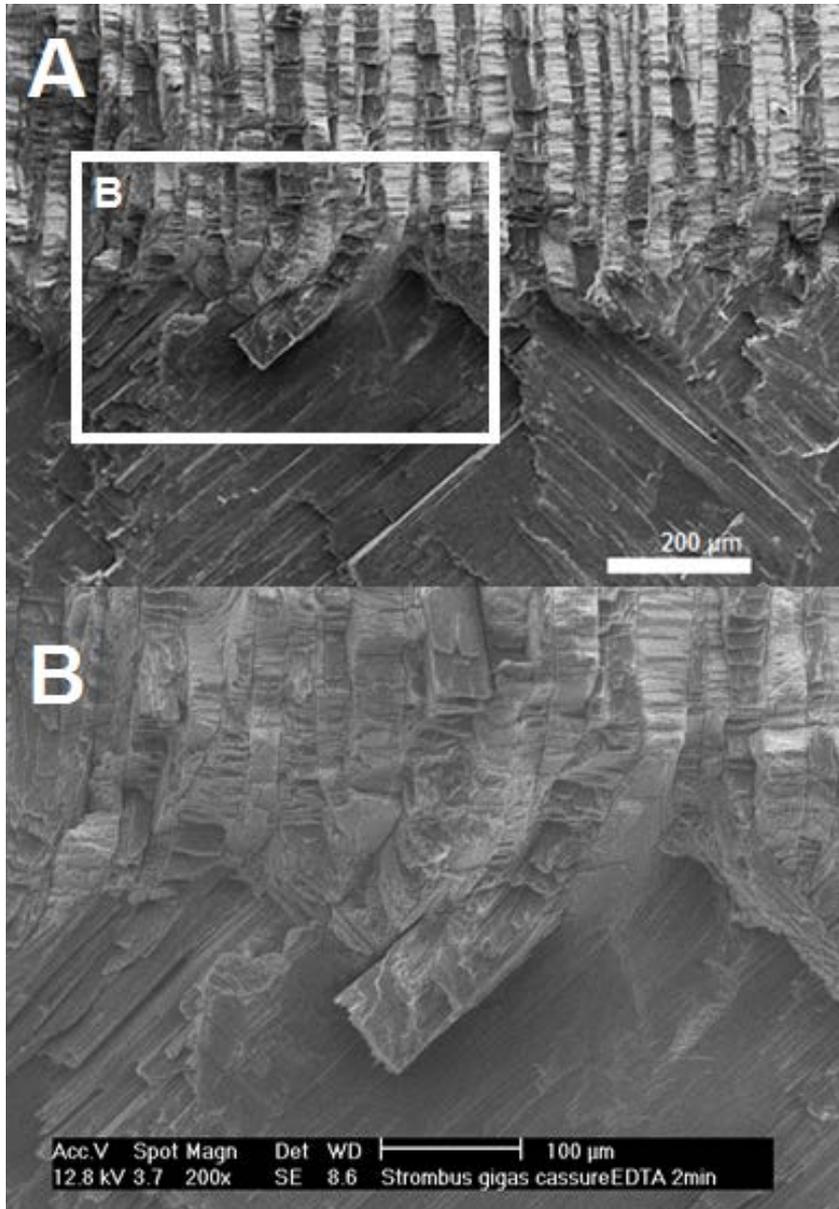


Fig. 36. L. gigas. Pieza fracturada. Transición entre capas. A. Visión general. B. Detalle en el que se aprecia la curvatura de las lamelas de tercer orden en el paso entre capas.

Pasamos tras ello a valorar los inmunisueros obtenidos frente a la proteína 3P3 con inmunogold, acorde con la metodología expuesta previamente. En la Figura 41 se muestra un ejemplo de las primeras muestras que obtuvimos. En la muestra A se ha valorado el suero no inmune (el pre-suero), y en B, el suero inmune final, frente a 3P3. Al observar estas imágenes, en principio, podríamos deducir que la señal de marcaje obtenida es más elevada al valorar el suero inmune (B).

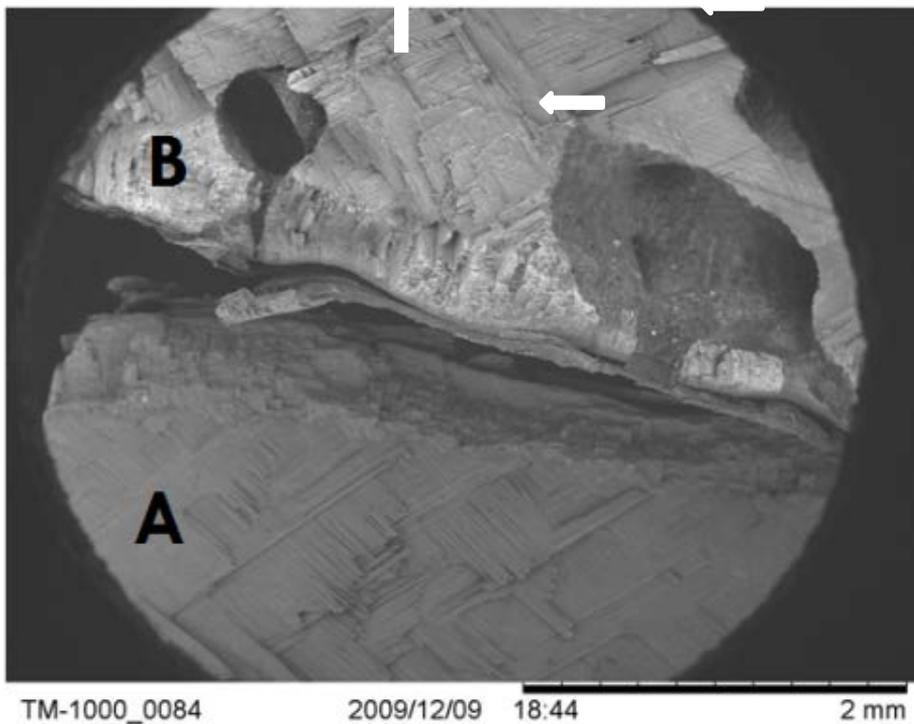


Fig. 37. Comparación entre dos fragmentos enfrentados de L. gigas. A. Presuero 3P3 B. Final de 3P3. La señal obtenida mediante inmunogold es mayor en el suero final (arriba, B) que en el presuero para 3P3 (abajo, A). El tono blanquecino de la estructura superior se debe a las partículas de oro.

Posteriormente, al valorar el suero inmune frente a 2P3 obtuvimos una reacción que podría calificarse de exagerada (Fig. 39). Nos pareció una respuesta excesiva, ya que era imposible que 2P3 estuviera presente en una cantidad tan alta.

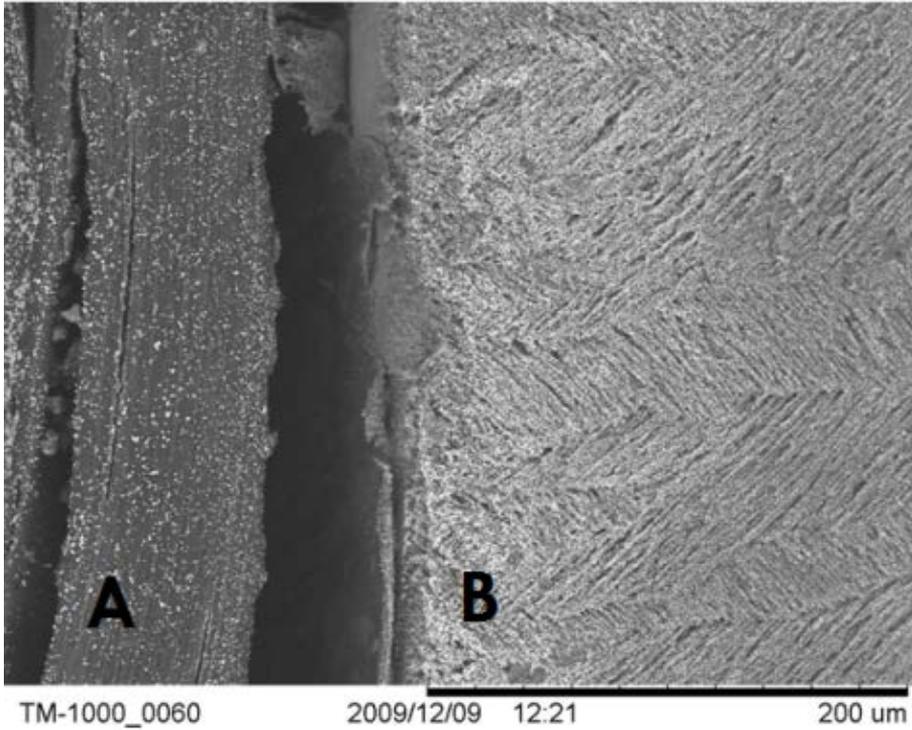


Fig. 38. Fractura de concha de L. gigas usando la sangría "Final 2P3". La reacción obtenida es muy alta. A. Periostraco ligeramente separado de la concha. B. Capa lamelar cruzada.

A continuación pasamos a valorar como controles las reacciones debidas a los sueros no inmunes frente a las tres proteínas. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 43. Sorprendentemente, encontramos marcaje en el inmunogold frente a las tres proteínas. Dedujimos de ello que algún factor no controlado estaba interfiriendo en nuestros resultados.

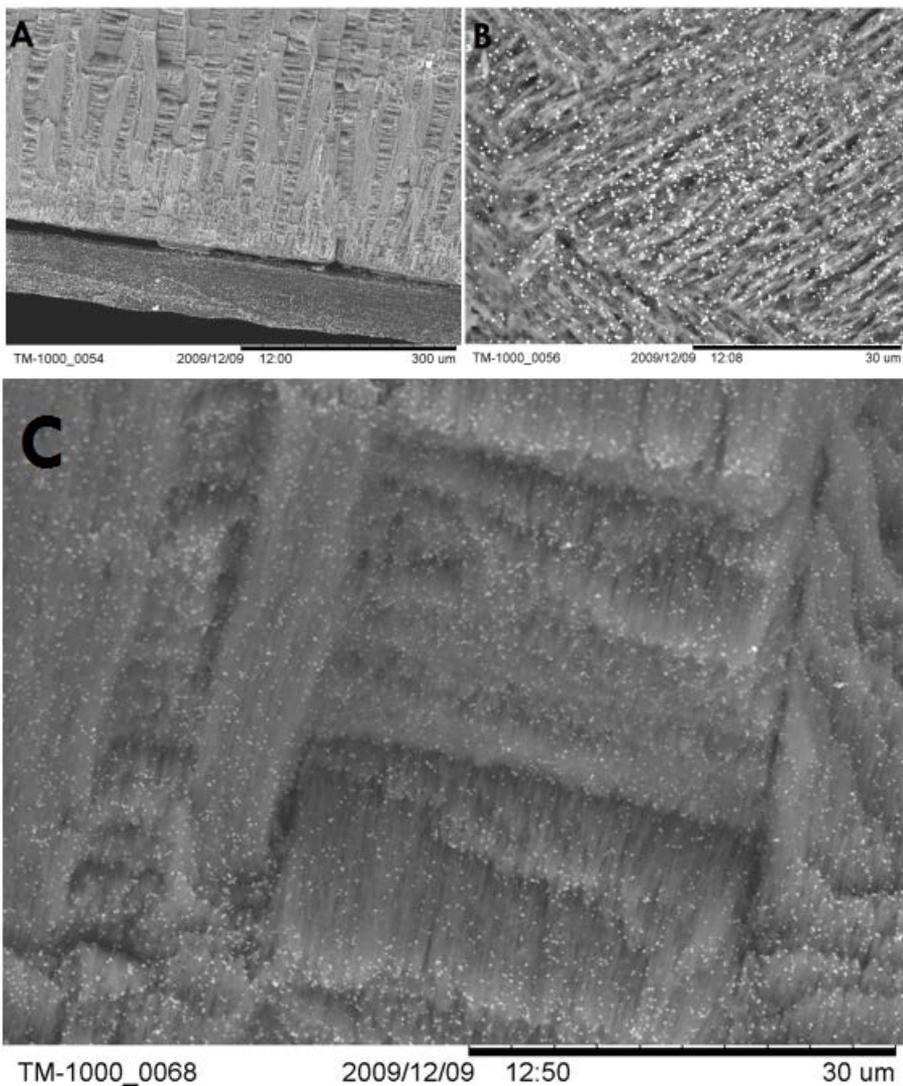


Fig. 39. A. Fractura de L. gigas usando "Presuero 1P3". B. Fractura usando "Presuero 2P3". C. Fractura usando "Presuero 3P3". La reacción es excesiva para los sueros no inmunes, a tenor de los resultados obtenidos en las pruebas inmunológicas.

Es por ello que decidimos poner a prueba la técnica empleada usando muestras de otras especies de moluscos. Comenzamos la pesquisa poniendo a prueba el ensalzador de plata que se utiliza en la preparación del inmunogold, utilizando otros modelos junto a *L. gigas*, como *Conus figulinus* y *Acanthocardia tuberculata*.

La preparación de estas muestras incluía todos los pasos necesarios para la realización de la prueba de inmunogold, a excepción de los anticuerpos y de las partículas de oro. Con *C. figulinus* el resultado fue el esperable para un protocolo en el que no se habían utilizado ni anticuerpos ni partículas de oro, pues el ensalzador de plata no dejó restos apreciables (Fig. 40).

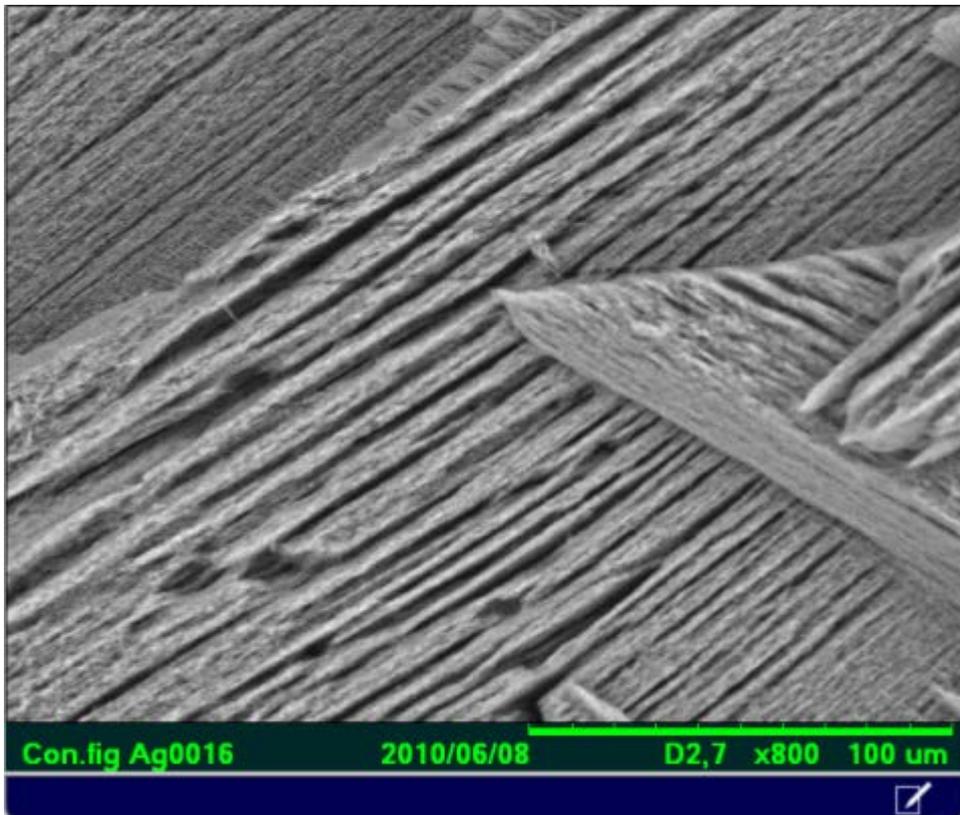


Fig. 40. Fractura de *Conus figulinus*, en control negativo con ensalzador de plata.

Obtuvimos resultados similares al hacer la misma prueba con *Acanthocardia tuberculata* (Fig. 45), ya que no se observaron partículas de plata, que era lo esperado al no haber tratado con anticuerpos.

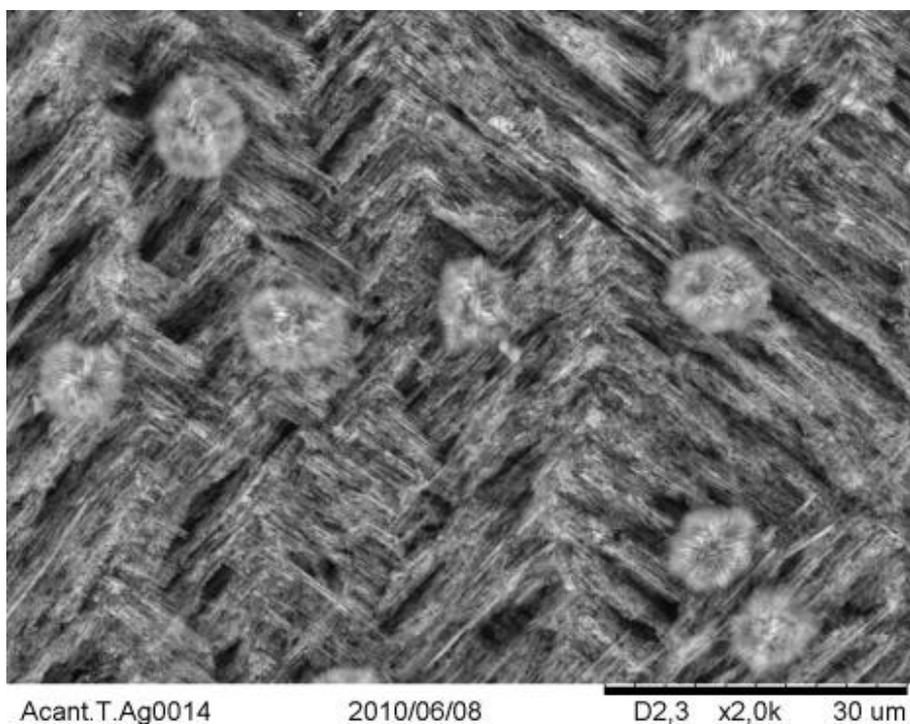
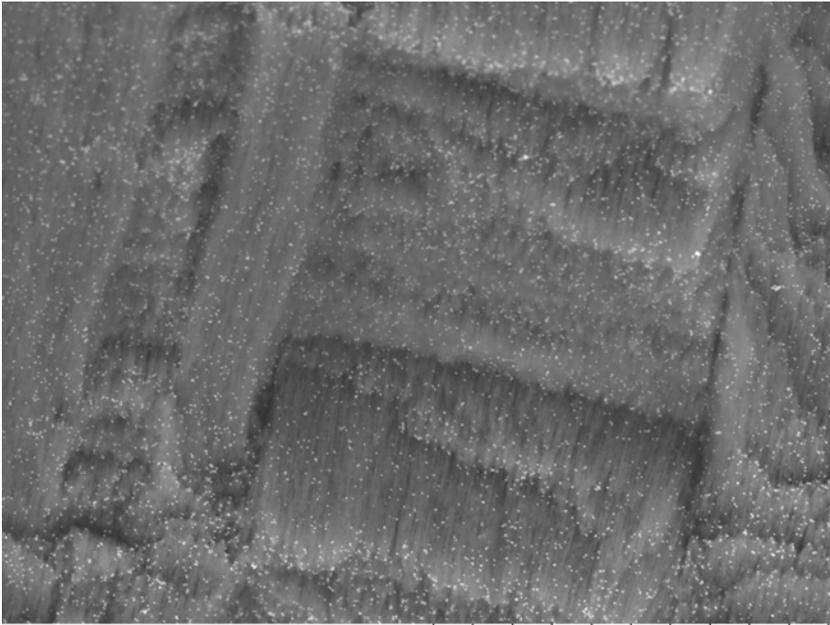


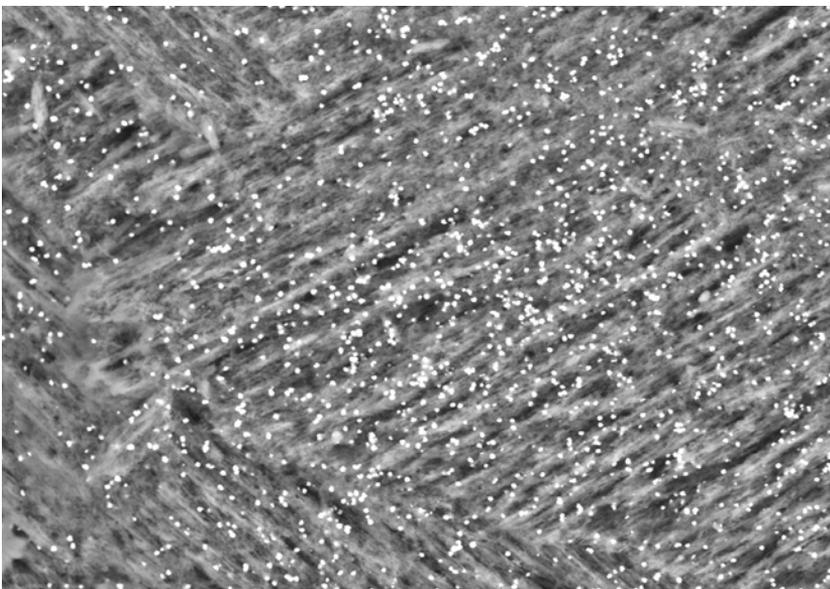
Fig. 41. Fractura de *Acanthocardia tuberculata* en control negativo con ensalzador de plata. Las esférulas de gelatina de unas 10 μm se interpretan como artefactos del preparado de las muestras.

Restaba examinar las muestras de *L. gigas* con la misma metodología. El resultado (Fig. 42) muestra claramente que esta respuesta inespecífica se encuentra sólo en *L. gigas*, y no en las otras dos especies ensayadas. Basta la adición del ensalzador de plata para que aparezcan marcas en la microestructura. No perdimos la oportunidad de probar con otra muestra de un organismo cercanamente emparentado, en este caso *Conomurex decorus* (Fig. 43), clasificado anteriormente dentro del género *Strombus*, al que también pertenecía *Lobatus gigas* (ITIS, Species 2000, Catalogue of Life, Abril 2013).



TM-1000_0068 2009/12/09 12:50 30 um

Fig. 42. Fractura de concha de L. gigas en control negativo con ensalzador de plata.



TM-1000_0056 2009/12/09 12:08 30 um

Fig. 43. Fractura de concha de C. decorus en control negativo con ensalzador de plata.

Sin el uso del ensalzador de plata las preparaciones tenían que ser observadas a una elevada magnificación (X38.000), para poder detectar las partículas de oro de tan solo 10 nm.

Usando el modo de electrones retrodispersados se evidenciaron pequeños puntos (complejos anti-3P3), que ubicaban a la fracción 3P3 (Fig. 44B). Se obtuvieron señales extremadamente bajas con los otros dos anticuerpos (anti-1P3 y anti-2P3), por lo que nos centramos en las conseguidas frente a 3P3.

Nuestras imágenes sin ensalzador de plata muestran que los antígenos 3P3 están repartidos por la superficie de las lamelas de tercer orden, sin mostrar alineaciones específicas, así como tampoco una señal continua como ocurre en otras preparaciones. Las estimaciones superan la docena de partículas de oro por cada 25 μm^2 . En la Figura 44 se muestra una preparación control para su valoración comparativa; el escasísimo marcaje observado se debe a reacciones inespecíficas.

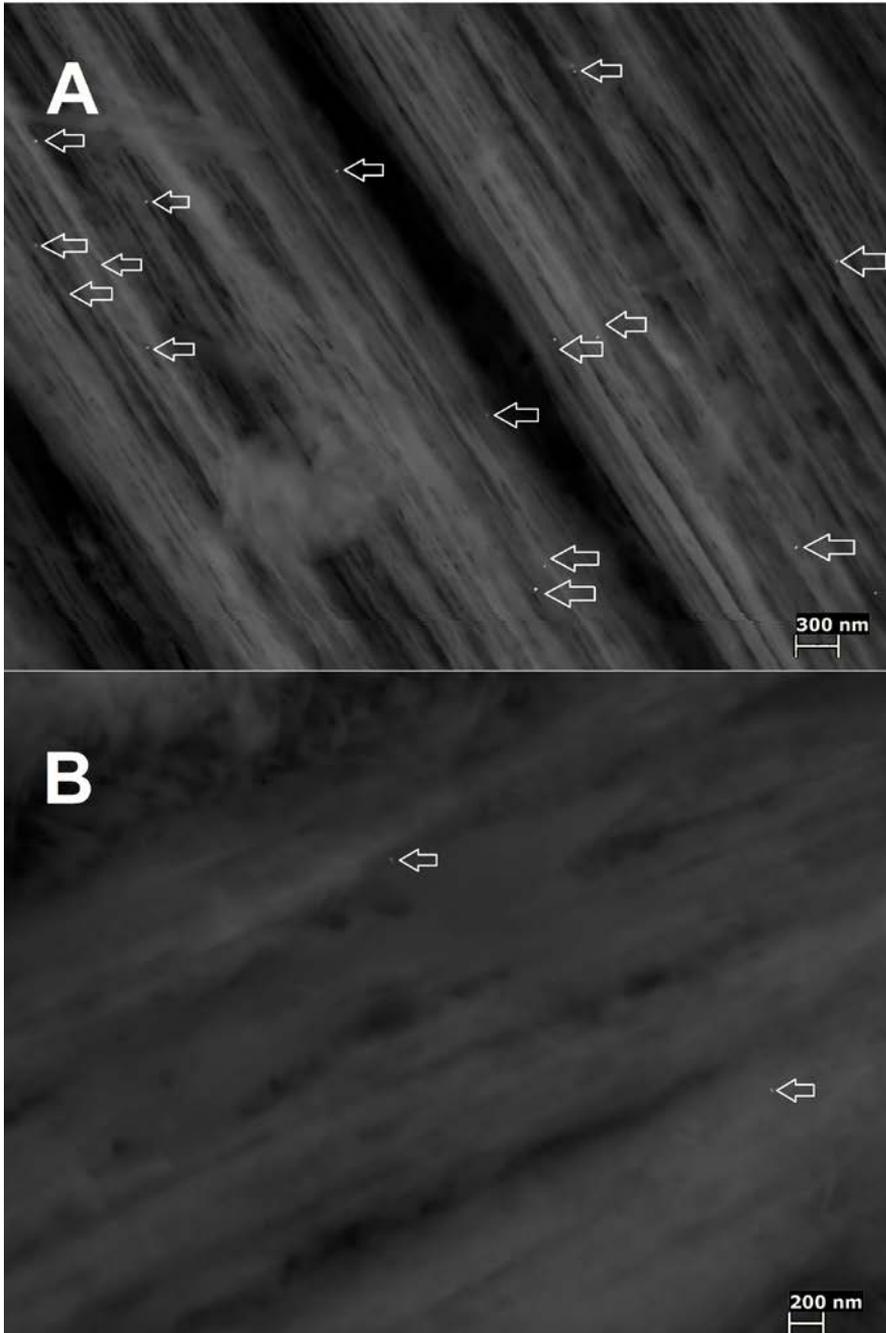


Fig. 44. SEM. Localización de la fracción 3P3 en la concha de *L. gigas* por inmunogold y usando anticuerpos policlonales frente a 3P3. A. Muestra experimental con anticuerpos anti-3P3. B. Control negativo con suero pre-inmune

3.4.3.3- ICP MASAS

Como ya hemos indicado pensamos que la reacción inespecífica del ensalzador de plata pudiera ser debida a la existencia de metales en la microestructura. Realizamos por ello un ICP masas en muestras de *L. gigas*, confirmando así la presencia de diversos metales, entre ellos metales pesados.

Elemento/Unidad: ppm

Be	Sc	V	Cr	Mn	Co	Ni
0	0	0	2,369	0	0,710	4,269
Cu	Zn	As	Se	Y	Mo	Cd
0,541	0,126	0,747	0	0,084	0,778	0,030
In	Sn	Sb	Ba	Au	Tl	Pb
0	0	0,434	4,039	0,011	0	0,063
Bi	Th	U				
0,007	0,924	0,016				

Tabla 11. Análisis ICP-Masas para una muestra de *L. gigas*.

3.4.4.-ANÁLISIS DE AZÚCARES

Para proceder al análisis de azúcares, la fracción soluble liofilizada fue analizada por espectrometría infrarroja (FTIR). Los resultados se muestran en la Figura 45.

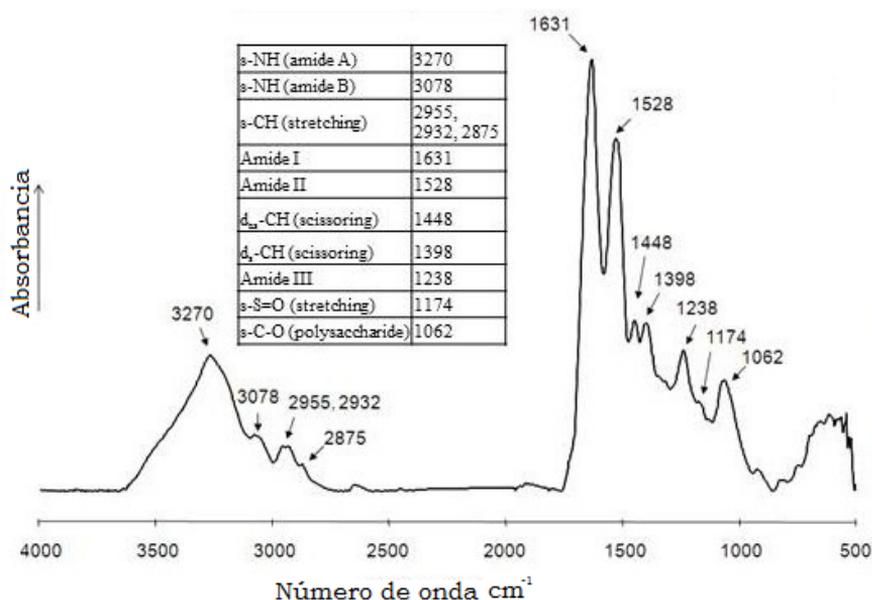


Fig. 45. Análisis de FTIR de los azúcares de la fracción soluble de la matriz orgánica de la concha de *L. gigas*, con interpretación de los picos.

El espectro obtenido mediante FTIR se caracteriza por la existencia de funciones amida (A, B, I, II, III) encontradas en la fracción proteica. El pico a 1062 cm^{-1} revela la presencia de una fracción polisacarídica (C/O), mientras un pequeño pico en 1174 cm^{-1} indica el estiramiento de un doble enlace S/O, que caracteriza los grupos sulfato. Esto sugiere que la fracción soluble contiene cantidades detectables de polisacáridos sulfatados.

La presencia de azúcares, es decir de proteínas glicosiladas en la fracción soluble se confirmó mediante la tinción de PAS de los componentes solubles, migrados en un mini gel (Fig. 46). Las dos bandas de la fracción 3P3 se tiñeron con PAS. Sólo la fracción 3P3 demostró estar glicosilada por este método.

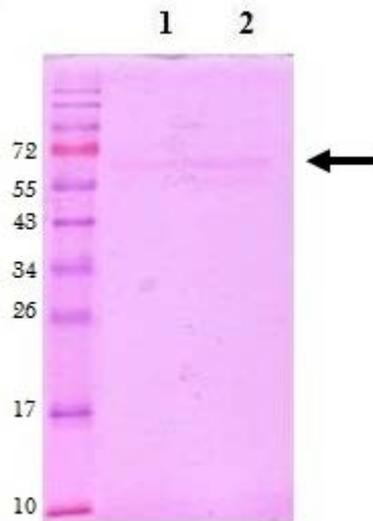


Fig. 46. Análisis de los azúcares de la fracción soluble. Tinción PAS. Columna 1, fracción soluble; columna 2, fracción insoluble (LS-AIM).

Con objeto de confirmar la glicosilación de esta fracción, la fracción soluble al completo fue deglicosilada enzimáticamente y analizada en un mini gel.

Se usaron para ello geles con dos porcentajes diferentes de acrilamida (al 8 y al 15%), y un control de fetuína, tanto sin tratar como deglicosilada. Los resultados se muestran en la Figura 47. Los carriles 2 y 5 corresponden a la fracción soluble sin tratar, y los carriles 3 y 6 a la fracción deglicosilada.

Puede concluirse que la deglicosilación de la fracción soluble de la matriz orgánica conduce a un ligero desplazamiento de las dos bandas que corresponden a 3P3, patente sólo en el gel de acrilamida al 8%. Estimamos que este movimiento representa una diferencia entre 3 y 4 kDa (Fig. 47, carriles 5 y 6).

Los resultados del estudio de la deglicosilación confirman los obtenidos con la tinción de PAS: la ausencia de glicosilación en 1P3 y 2P3, y la existencia de una leve glicosilación en 3P3, expresada por un ligero cambio en el peso molecular (3-4 kDa), visible solo en el gel de acrilamida al 8%.

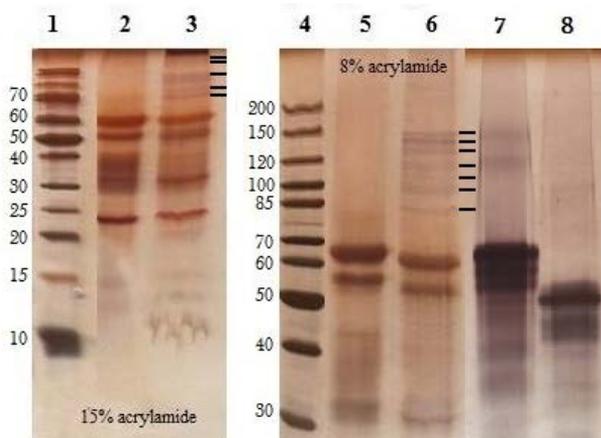


Fig. 47. Análisis de los azúcares de la fracción soluble de la matriz orgánica de *L. gigas*, tras su deglicosilación química. Gel de acrilamida al 15% (carriles 1 a 3), gel de acrilamida al 8% (carriles 4 a 6). Fracción soluble antes (carriles 2 y 5) y después (carriles 3 y 6) de la deglicosilación. Carriles 7 y 8, control positivo con fetuina sin deglicosilar (7) y deglicosilada (8). Las pequeñas bandas visibles en la parte superior del gel (indicadas mediante líneas al margen derecho de los carriles 3 y 6) corresponden al cóctel de enzimas y sus subunidades, utilizados en la deglicosilación de la fracción soluble.

La existencia de restos sacáridos en la fracción soluble fue abordada mediante el análisis del contenido en monosacáridos, después de efectuar una ligera hidrólisis en ácido trifluoroacético (TFA). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

	ng/ μ g	%
Fucosa	TR	
Ramnosa	0,24	0,8
Galactosamina	1,76	5,7
Arabinosa	0,36	1,2
Glucosamina	6,29	20,5
Galactosa	6,60	21,5
Glucosa	4,59	15,0
Manosa	9,91	32,3
Xylosa	0,93	3,0
Ac. Gal	ND	
Ac. Glu	ND	
Total	30,68	100,0

Tabla 12. Análisis de los azúcares de la fracción soluble de la matriz orgánica de *L. gigas*.

La cantidad total de aminoazúcares neutros y ácidos, es de alrededor de 31 μg por ml de fracción soluble (3,1 %), lo cual significa que esta fracción está solo débilmente glicosilada. El azúcar más abundante es la manosa, que representa cerca de un tercio de los monosacáridos totales, seguido por galactosa, glucosamina y glucosa. Una alta cantidad de manosa es poco usual en la matriz de la concha de los moluscos. Los restantes azúcares se encuentran en muy baja cantidad. Solo se evidencian trazas de fucosa, y no se encuentran ni ácido glucurónico ni galacturónico.

3.4.5.-CRISTALIZACIÓN IN VITRO

Los resultados obtenidos en las pruebas de cristalización *in vitro* se muestran en la Figura 48. El efecto de la adición de 1P3 muestra ser dosis-dependiente. Partiendo de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 48B1, B1*), a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 48B2, B2*), y a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 48B3, B3*), se detectan progresivamente más cristales de calcita con imperfecciones en las caras, algunos agregados policristalinos, y un incremento en la proporción de cristales de vaterita.

Al añadir la fracción soluble completa, los efectos se incrementaron igualmente con la cantidad añadida al medio; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (Fig. 48 1, C1*), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 48 C2, C2*) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 48 C3, C3*). Las imperfecciones en las caras de los cristales aumentan progresivamente, pero, a diferencia de lo observado con la adición de 1P3, casi no se observaron cristales de vaterita.

Las pruebas realizadas añadiendo 2P3 y 3P3 en las mismas condiciones experimentales ofrecieron los mismos resultados que los obtenidos con la fracción soluble total, por lo que se han omitido las imágenes.

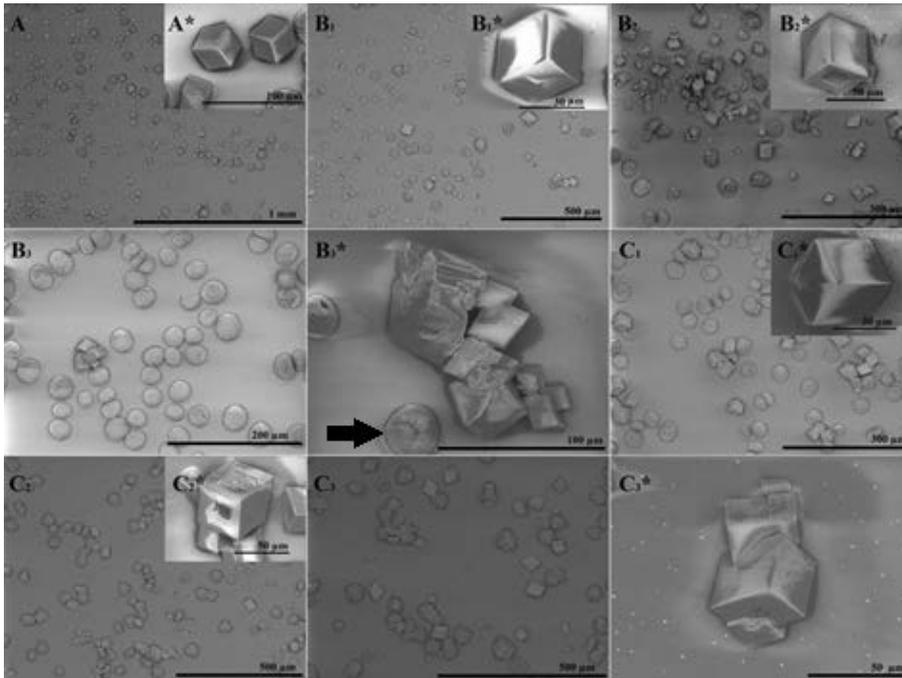


Fig. 48. Microscopía electrónica de barrido de cristales sintéticos de calcita crecidos in vitro. A. Control negativo: 10 nM CaCl₂. B₁-B₃. Adición de 1P3 a 1 μg/ml (B₁ y B₁*), a 5 μg/ml (B₂ y B₂*) y a 10 μg/ml (B₃ y B₃*). C₁-C₃. Adición de la fracción soluble a 1 μg/ml (C₁ y C₁*), 5 μg/ml (C₂ y C₂*) y 10 μg/ml (C₃ y C₃*). La flecha en B₃* señala un cristal de vaterita.

3.5.-Discusión

3.5.- DISCUSIÓN

3.5.1.- LAMELAR CRUZADA DE *LOBATUS GIGAS*

Nuestro estudio ultraestructural, nos ha permitido poner de relieve algunas características inesperadas, y ahondar en el estudio de la matriz orgánica asociada a la microestructura lamelar cruzada. En concreto, hemos caracterizado bioquímicamente la matriz de la estructura lamelar cruzada de la concha de *Lobatus gigas*.

Como ya hemos indicado la construcción de la concha de los moluscos es el resultado de un proceso de mineralización *controlado biológicamente*, en contraste con lo que acontece en otros organismos que llevan a cabo una mineralización biológicamente inducida. Este proceso en los moluscos se encuentra *regulado y dirigido por una matriz orgánica extracelular*.

Nos hemos centrado en caracterizar esta matriz orgánica en *L. gigas*. Este tipo de estudios en moluscos se realiza con una descalcificación ácida previa de la concha, que conduce a la obtención de dos fracciones; soluble e insoluble. La fracción insoluble se conoce desde hace más de siglo y medio, y fue descrita por primera vez en 1855 por Frémy [62], quién la llamó conchiolina, describiéndola como un residuo de materia orgánica de aspecto brillante, insoluble en agua, alcohol y éter, que es resistente a la acción de disolventes ácidos. La fracción soluble, sin embargo, no fue evidenciada hasta los años setenta, en los que, casi simultáneamente, Meenakshi en 1971 [63] y Crenshaw en 1972 [64] descubrieron la presencia de matriz orgánica disuelta en el EDTA que habían usado para disolver la concha.

Hoy disponemos de información acumulada en lo que respecta a las proteínas de la matriz orgánica de algunas especies nacaradas. Sabemos, por ejemplo, que existen proteínas con la capacidad de modificar la formación de cristales de CaCO_3 , así como también pueden inhibir su precipitación [65]. No obstante, la microestructura lamelar cruzada, pese a su importancia taxonómica, ecológica y evolutiva, apenas se ha comenzado a estudiar.

“...Sin embargo, nuestro conocimiento acerca de las proteínas de concha está casi completamente restringido a las capas nacaradas, y en menor medida a los prismas de calcita. Prácticamente no sabemos nada acerca de la prismática compleja, la lamelar cruzada, la lamelar cruzada compleja, la foliada, ni las estructuras homogéneas” Marin & Luquet (2004) [65].

Como ocurre con otras matrices orgánicas, la de *Lobatus gigas* puede ser fraccionada en dos partes, por sus componentes solubles e insolubles. Las fracciones soluble e insoluble representan una parte minúscula de la concha: 0,0074% (soluble) y 0,042% (insoluble) del peso seco del total de la estructura. Estos valores son particularmente bajos, ya que suponen sólo 1/25 de la cantidad de matriz orgánica que podemos encontrar en el nácar de *Pinctada* [66] y 1/80 de la de *Nautilus* [67].

Curiosamente, acorde con nuestros resultados la proporción entre la matriz soluble e insoluble es inferior a 6, algo que no es coincidente con datos previos [68] donde se afirmaba que casi toda la matriz orgánica de *Lobatus gigas* era soluble. Esta discrepancia puede estar relacionada con el método utilizado en la extracción de la matriz, ya que aquel trabajo previo estaba basado en datos obtenidos mediante extractos de EDTA, mientras que nosotros hemos utilizado ácido acético.

En el gel, la fracción soluble y la insoluble están parcialmente representadas por unas pocas bandas concretas de proteína dispersas en el material. Es importante señalar que tanto la fracción soluble como la insoluble muestran patrones muy similares, caracterizados por la presencia de un número limitado de bandas, tal y como puede apreciarse en las Figuras 19, 20 y 21, donde se muestran los densitogramas de ambas fracciones y sus masas moleculares relativas, deducidas éstas a partir de las proteínas marcadoras. Esto puede llevar a pensar, en un principio, que están compuestas por las mismas o similares proteínas. Los pesos moleculares se mueven entre 83,64 y 6,86 kDa, con 10 picos, en la fracción soluble y entre 104,36 y 15,02, con 12 picos, en la insoluble. En ambas son predominantes los pesos próximos a 24 y 32 kDa, y dos algo inferiores a 70 kDa.

Las cuatro bandas principales de la fracción soluble son también patentes en la insoluble, pero tres de ellas (las inferiores a 70 kDa y la inferior a 24 kDa) tienden a teñirse de forma negativa con plata, mientras que la de 24 kDa se tiñe fuertemente con azul Coomassie. Son también visibles otras bandas entre los 25 y 60 kDa, así como inferiores a 25 kDa (Fig. 19).

La capacidad para ligar calcio se puede evidenciar gracias a la tinción “Stainsall” (Fig. 22). Constatamos que las bandas de 24 y 32 kDa dieron resultado negativo (ausencia de tinción) en la fracción soluble, mientras que las dos bandas superiores se tiñeron en color púrpura. En la fracción insoluble, sólo las dos bandas superiores (inferiores a 70kDa) se tiñeron de púrpura oscuro, lo cual sugiere que estas dos fracciones proteicas tienen capacidad de unirse al calcio. Aunque en ninguna de las pruebas realizadas se encontró el azul metacromático característico con el que se tiñen las proteínas capaces de unirse fuertemente al calcio. Estos datos son interesantes para estudios posteriores, pues esta coloración azul oscura intermedia, entre la tinción roja de las proteínas que no se ligan al calcio, y el azul fuerte de las que sí lo hacen, se ha observado repetidas veces en los extractos de conchas.

Cuando empleamos la tinción Alcian Blue, específica para oligosacáridos ácidos, sólo se evidenció una banda muy tenue en ambas fracciones, de unos 23 kDa (Fig. 23).

El análisis de los resultados obtenidos en lo relativo a proteínas totales en ambas fracciones nos llevó a centrarnos en la fracción soluble. Tratamos por ello de purificar las proteínas mayoritarias para continuar con su estudio, y la obtención de anticuerpos frente a ellas para su empleo en la inmunolocalización. En la Figura 24 (electroforesis preparativa) se muestra una de las proteínas elegidas, 1P3, con un peso molecular aproximado de unos 24 kDa. En la Figura 25 se muestra la proteína 2P3, de unos 45 kDa, y en la Figura 26, la 3P3 de unos 80 kDa. En la Figura 27 se muestran las purificaciones de las tres proteínas.

El estudio de la fracción soluble mediante electroforesis bidimensional (2D), con tinción posterior tanto con plata como con azul Coomassie (Fig. 28), demostró que la fracción soluble es moderadamente ácida. La mayor parte de las bandas están

localizadas en la región ácida del gel, con pHs comprendidos entre 4,5 y 6,5; hay dos bandas difusas a un pH inferior a 4 y tres más en la región básica del gel correspondiente a un pI superior a 10. Resulta extraño que la fracción 1P3 quede muy bien marcada en el gel 1D, pero no sea detectable en el 2D. Por el contrario, una fracción de bajo peso molecular, que apenas se tiñe con plata en el gel 1D, da aquí una serie de puntos alineados. Esto sugiere la existencia de diferentes patrones de modificaciones postraduccionales, como son las fosforilaciones o la glicosilación. La fracción 2P3 aparece aquí más compleja, y se caracteriza por una alta concentración de puntos yuxtapuestos en valores altos de punto isoeléctrico. Existe además un alineamiento de puntos en niveles muy básicos de pI. La fracción 3P3 solo ofrece áreas borrosas sin puntos reconocibles. Weiner [68] encontró una fracción (fracción II) enriquecida en residuos de aspartato (Asp + Asn = 29,4%), algo que sugería que era extremadamente ácida. Nosotros hemos encontrado dos puntos ligeramente difusos correspondientes a dichas fracciones ácidas (Fig. 28). Pero estos son solo componentes menores de la fracción soluble total.

Tras las pruebas con ELISA y Western-Blot, los anticuerpos policlonales obtenidos a partir de la inmunización con 3P3 fueron usados para inmunolocalizar componentes en la concha. Las reacciones detectadas con microscopía electrónica de barrido demostraron ser excesivas al comparar con los sueros no inmunes (pre-sueros) (Figs. 38-42). Decidimos por ello valorar el ensalzador de plata con otros modelos de moluscos. Escogimos para ello al gasterópodo *Conus figulinus* y al bivalvo *Acanthocardia tuberculata*. Se siguió para ello el mismo protocolo, exceptuando los anticuerpos unidos a las partículas de oro. Tal y como se aprecia en las Figuras 40 y 41, no se encontraron restos del ensalzador de plata ni en *C. figulinus* ni en *A. tuberculata*. La respuesta inespecífica sólo era patente en las muestras de *L. gigas* (Fig. 42) y en otra concha, la del cercanamente emparentado *C. decorus* (Fig. 43).

Estos resultados nos llevaron a eliminar el ensalzador de plata, y, al mismo tiempo a iniciar el estudio de los metales pesados presentes en la concha de *L. gigas*, que pudieran ser responsables de la inespecificidad de la reacción. Existen, y algunos de ellos en concentraciones notables, tal y como se demostró por ICP masas (Tabla 11). Trataremos de ello más adelante.

Una vez superados los problemas debidos al uso del ensalzador de plata, se logró un buen marcaje a lo largo de toda la superficie de la concha con el anticuerpo anti-3P3. Los antígenos 3P3 aparecen repartidos por la superficie de las lamelas de tercer orden, pero sin alineaciones o patrones reconocibles (Fig. 44). Se estimó la existencia de más de una docena de partículas de oro por cada $25 \mu\text{m}^2$. Las señales obtenidas con 1P3 y 2P3 fueron extremadamente débiles.

La presencia de precipitados de plata en ausencia de anticuerpos específicos en el suero preinmune e incluso en ausencia de suero, nos llevó a pensar que la precipitación de plata pudiera deberse a una reacción inespecífica frente a la presencia de metales pesados en la estructura de la concha del molusco. La compañía que fabrica el ensalzador de plata utilizado, British Biocell, nos confirmó su inespecificidad frente a otros elementos.

Parecía claro para nosotros que al menos ese ejemplar de *Strombus gigas* era un firme candidato a poseer metales pesados en su concha. Debido a lo sorprendente de la intensa reacción del ensalzador de plata en *Strombus gigas*, y a la ausencia de antecedentes bibliográficos, tratamos de encontrar sin éxito otro ejemplar para repetir el proceso. Recurrimos por ello a otra especie disponible de la misma familia: *Strombus decorus* (*Conomurex decorus*) que dio también una reacción positiva para el ensalzador de plata.

Realizamos tras ello un test ICP-Masas para comprobar la presencia de metales pesados en la concha, tal y como se muestra en la Tabla 11. La sustitución de átomos de carbono por metales pesados en el aragonito de las conchas de moluscos está documentada, y ha llegado incluso a usarse como método para la detoxificación de ríos contaminados con metales [69]. De estos resultados parece deducirse que, al menos, estos dos estrómbidos, (*L. gigas* y *C. decorus*) tienen una enorme facilidad para captar metales pesados del medio, lo que pudiera ser una característica fisiológica del grupo.

En cuanto al análisis de azúcares, la matriz orgánica de *Lobatus gigas*, comparada con la de otras especies, está solo

débilmente glicosilada, representando los azúcares solo un 3% de su fracción soluble (31 µg/ml de fracción soluble). Ello sugiere una débil glicosilación de sus proteínas. El análisis por FTIR reveló una fracción polisacáridica (Fig. 45), así como la existencia de polisacáridos sulfatados. La tinción de PAS de las bandas correspondientes a la fracción 3P3 confirmó la existencia de azúcares (Fig. 46). No se detectaron azúcares, sin embargo, en 1P3 y 2P3, que parecen ser, por ello, proteínas no glicosiladas. Así, de las tres bandas proteicas principales, solo 3P3 presenta un bajo nivel de monosacáridos, que representan entre un 4 y 5% de su peso molecular (Fig. 47). De forma similar, la matriz del patelógasterópodo *Lottia gigantea* muestra también una banda proteica altamente glicosilada, que migra por encima de los 70 kDa [66].

El contenido en monosacáridos se evidenció tras hidrólisis con trifluoroacético (Tabla 12). El más abundante es la manosa (32,3%), seguida por galactosa (21,5%) y glucosamina (20,5%). A pesar de que se han identificado azúcares con manosa en diferentes matrices orgánicas [67, 70], es muy poco común encontrar una proporción tan alta de este monosacárido en la fracción soluble. Compere [71] observó que la cutícula mineralizada del cangrejo verde europeo (*Carcinus maenas*) contiene glicoproteínas que poseen glicanos N-glicosilados ricos en manosa. Aunque la glucosamina representa cerca del 20% del total de monosacáridos de la fracción soluble, es poco probable que este residuo esté indicando la presencia de quitina. Dadas las características de la quitina, de encontrarla, lo esperable sería hacerlo en la fracción insoluble de la matriz orgánica. Puesto que hemos trabajado principalmente con la fracción soluble, nuestro análisis no cierra la puerta a la existencia de quitina en la lamelar cruzada de gasterópodos.

En los experimentos de cristalización *in vitro* se ha tratado de valorar el efecto de la adición de la fracción soluble a diferentes concentraciones, así como de la proteína 1P3 sobre la formación de cristales de calcita. Se ha constatado que la fracción soluble interacciona con los cristales del carbonato cálcico, pero esta interacción es moderada cuando se compara con la detectada en otras matrices [72]. Es interesante observar como la 1P3 aislada interacciona con la precipitación del carbonato cálcico, pero lo hace de forma diferente a la fracción soluble empleada globalmente,

mientras que la adición de 2P3 y 3P3 tuvo el mismo efecto que la adición de la fracción soluble total. La diferente acción de la 1P3 aislada conduce a deducir que los efectos de la fracción soluble sobre la cristalización son debidos a la acción sinérgica de sus diferentes componentes.

Además de los argumentos derivados de la paleontología, debemos tener en cuenta el “molecular toolbox”, los componentes bioquímicos necesarios para desarrollar una microestructura y una concha. Asomarnos por la ventana de la bioquímica puede traer muchas sorpresas.

Recientemente, utilizando proteómica de alto rendimiento en la matriz de la lamelar cruzada de *Lottia*, se ha observado algo completamente contraintuitivo, pues la bioquímica de su concha tiene más en común con la de *Pinctada* (bivalvo con capa externa prismática calcítica y capa interna nacarada) que con *Haliotis*, gasterópodo (capa externa calcítica prismática o aragonítica fibrosa, según la especie, e interna nacarada) con el que está mucho más cercanamente emparentado [66].

También se ha observado que los “molecular toolbox” encontrados en distintas capas de la misma concha (por ejemplo, una capa nacarada y otra prismática) son absolutamente diferentes [73]. El “molecular toolbox” está aún plagado de incógnitas que le restan validez taxonómica, al tiempo que promete aportar mucha información acerca del origen de las distintas microestructuras. Por estos motivos, podemos esperar que la exploración proteómica de la concha de *Lobatus gigas* sea un camino plagado de sorpresas.

Newton era circunspecto con sus descubrimientos y ferozmente competitivo con sus colegas científicos. No le costó nada esperar una década o dos antes de publicar la ley del cuadrado inverso que había descubierto. Pero al igual que Kepler y Tolomeo, se exaltaba ante la grandiosidad y la complicación de la Naturaleza, y al mismo tiempo se mostraba de una modestia encantadora. Poco antes de morir escribió: “No sé qué opina el mundo de mí; pero yo me siento como un niño que juega en la orilla del mar, y se divierte descubriendo de vez en cuando un guijarro más liso o una concha más bella de lo corriente, mientras el gran océano de la verdad se extiende ante mí, todo él por descubrir.”

Carl Sagan. Cosmos 1980. Capítulo 3. La armonía de los mundos.

4- NÁCAR

4.- NÁCAR

4.1.- ANTECEDENTES NÁCAR

*Oh mother of pearl
submarine lover
in a shrinking world
oh lonely dreamer
your choker provokes
a picture cameo
oh mother of pearl
soso semi-precious
in your detached world
oh mother of pearl
I wouldn't trade you
for another girl*

Roxy Music (1973)

Isaac Newton, es sin duda una de las mayores figuras que hayan existido jamás en el ámbito científico. Carl Sagan en su obra “Cosmos” cita a Newton quien se describe a sí mismo con la retrospectiva de una persona que ya ha vivido una larga y provechosa vida. Despojado de todo adorno superfluo, de toda condecoración social, como si se tratara de un niño, queda solo lo más básico, aquello que es propio de cualquier ser humano. Para representar tal nimiedad se refiere a la observación de las pequeñas conchas de los moluscos, frente a la grandeza del mar. Es una visión metafórica muy acertada, no sólo por simbolizar la realidad de la ciencia, esos pequeños pasos discretos en un recorrido inabarcable, sino porque curiosamente elige las conchas de los moluscos como ejemplo de aquello que nos atrae por su naturaleza. Y es que los moluscos nos han acompañado en lo que podría ser buena parte de nuestra historia como especie. Es por ello que quizás no debería sorprendernos su presencia en la historia y en las mitologías que ha sobrevivido hasta la actualidad.

El primer uso decorativo de conchas se remonta a hace unos 100.000 años en el norte de África, donde se han descubierto conchas del género *Nassarius* perforadas con evidentes fines ornamentales [74]. Pero ésta no es una exclusiva de nuestra especie; un descubrimiento en la Cueva de los Aviones [75], en Cartagena,

supuso un vuelco en la balanza a favor de los neandertales, pues aún son muchos los que defendían que estos eran incapaces de pensamiento simbólico. Allí se encontró una gran diversidad de conchas de moluscos (que incluían géneros como *Pecten*, *Acanthocardia* y *Glycymeris*) con restos de pigmentos, denotando que habían sido coloreadas. Estas conchas tienen una antigüedad cifrada en unos 50.000 años, 10.000 años anteriores a la llegada de nuestra especie a la zona. Pero el hallazgo más antiguo también es el más reciente, se trata de una concha de bivalvo del género *Pseudodon* con marcas en zigzag dibujadas por un *Homo erectus*, que data de aproximadamente unos 500.000 años [76].

El uso de conchas de moluscos como herramienta tampoco se restringe a los homínidos. En Shark Bay (Australia) se reúnen una serie de condiciones particulares que permiten el estudio de los delfines (*Tursiops truncatus*) como en ningún otro lugar del mundo. Se ha observado la transmisión cultural de herramientas en estos delfines. Primero se descubrió que estos cetáceos habían aprendido a usar esponjas marinas para excavar el fondo, evitando con ello dañarse el rostrum con rocas o con fragmentos de concha enterrados [77]. Pero recientemente se ha descubierto que también utilizan conchas de moluscos, concretamente enormes ejemplares del género *Turbinella*, para atrapar peces. El método continúa siendo un misterio, pero se les ha visto sacando estas caracolas a la superficie para drenarlas, y así extraer a un pez (*Lethrinus* sp) de su interior.

En lo que respecta a nuestra cultura, la ornamentación con conchas de moluscos ha estado mayoritariamente ligada al nácar. En el hinduismo las conchas de los moluscos también tienen un papel mágico. El primer hijo de Shiva, Ganesha (el dios con cabeza de elefante), siempre porta una concha (shankha) en uno de sus cuatro brazos. El dios azteca Quetzalcoatl era representado con una concha cortada en su pecho (ehēcācozcatl), simbolizando su papel como dios del viento, también se creía que era capaz de crear vida gracias al uso de una concha. Otro dios azteca, Tlaloc, el dios de la lluvia, suele encontrarse representado emergiendo del interior de una concha. De hecho, éste es un lugar común en las mitologías a lo largo del mundo. Los haida, indígenas de Canadá, cuentan como los primeros hombres llegaron al mundo en una enorme concha de

bivalvo que varó en la playa Rose Spit, en Graham Island, en el archipiélago pacífico Haida Gwaii.



Fig. 49. “Raven and the First Men” (The Story of Creation) por Lionel Samuels, artista haida.

“Un cuervo, el animal más poderoso en los mitos haida, se encontraba vagando por la playa, cuando escuchó un ruido en el interior de una almeja. Cuando se acercó, descubrió que estaba lleno de diminutas criaturas, asustadas por el cuervo y por el enorme mundo exterior. El cuervo con la lengua, que le había metido y sacado de tantos problemas, halagó y engatusó a las pequeñas criaturas a salir y a jugar en su maravilloso y resplandeciente nuevo mundo”

Traducción no literal de un texto de Bill Reid, artista haida.

Entre los cristianos, una valva cóncava de *Pecten* representa el bautismo, así como el peregrinaje de Santiago.

Afrodita (y después Venus, su versión romana reciclada), formada por la espuma marina, vino al mundo sobre una concha supuestamente nacarada (Botticelli, en su famoso cuadro de 1484, la representó sobre una concha no nacarada, un *Pecten*), y de la alegría que le supuso nacer lloró perlas que se repartieron por el mar. Las perlas, aunque pueden formarse a partir de otras microestructuras, es sólo en conchas nacaradas donde poseen la combinación de características (brillo, durabilidad, etc) que las han hecho tan codiciadas.

Curiosamente, para los persas las perlas también tenían su origen en lágrimas endurecidas, mientras que en algunas antiguas leyendas arábigas, las perlas son gotas endurecidas de la Luna, algo similar a lo que creían los hindúes, que atribuían su origen a las gotas de rocío que quedaban atrapadas en el interior de los moluscos. Para los musulmanes las perlas simbolizan la perfección absoluta, y forman parte de los regalos que se encuentran en el paraíso (Yanna), algo que representa muy bien la fascinación que los seres humanos han sentido siempre por el nácar y su particular belleza.

La belleza del nácar radica (parcialmente) en su iridiscencia. El brillo y el color que han hecho famosa a esta estructura se deben a los llamados “colores estructurales”. Es el mismo efecto que la selección natural ha favorecido en muchas especies de mariposa (como el famoso género *Morpho*) y, por supuesto, el que dota a los pavos reales de esos colores tan magníficos y que tantos quebraderos de cabeza han dado a los biólogos evolutivos. Las colas de pavo real no poseen más que un solo pigmento oscuro (melanina) para dar lugar a infinidad de tonos brillantes de verde, azul y marrón. De igual modo, las conchas nacaradas no requieren de ningún pigmento para brillar en tonos azulados. Describiendo por primera vez la coloración estructural, en su obra *Micrographia* (1665), Robert Hooke [78] se refería a este efecto como “colores fantásticos”:

“Como el nácar, no solo refleja un pequeño rayo de luz, sino que lo tiñe de la forma más curiosa: en función de las distintas posiciones, con respecto a la luz, reflejan un color, y después otro, de la forma más vívida. Ahora, que estos colores son solo fantásticos, esto es, tal y como surgen de las refracciones de la luz, encuentro por esto que el agua que moja estas partes coloreadas destruye sus colores, lo cual parece proceder de la alteración de la reflexión y la refracción”

Robert Hooke. *Micrographia* (1665) [78]

En el nácar el efecto radica en la disposición de los hexágonos de aragonito, así como en su pequeño tamaño (su espesor se encuentra dentro de la longitud de onda del espectro de luz visible). Al incidir la luz sobre la estructura, parte es reflejada inmediatamente en la superficie, mientras otra fracción atravesará la estructura de forma parcial (las primeras placas de aragonito)

para también ser reflejada, pero en este caso, fuera de fase. De esta forma, en función de nuestra posición respecto a la estructura, veremos la luz actuar como ondas que interfieren entre sí de forma positiva o negativa, aumentando o reduciendo la intensidad del reflejo. La misma interferencia entre ondas provoca que, desde ciertos ángulos, se seleccionen longitudes de onda propias de distintos colores. El resultado es ese característico efecto de cambio de color con la posición del observador respecto a la estructura iridiscente.

Es interesante el hecho de que en algunos organismos estas estructuras han sido seleccionadas a través de los años por medio de la selección natural, con resultados muy similares al del nácar. “En los moluscos la iridiscencia es un subproducto evolutivo de una estructura seleccionada por otras características, una pechina (o enjuta) de San Marcos” (Gould, 1979)[79].

De todos modos, el éxito cultural de las conchas nacaradas, no solo es debido a la iridiscencia, o a la belleza de las proporciones que presentan algunas de ellas. Son sus peculiares propiedades físicas las que les han proporcionado su éxito evolutivo, así como también parte del éxito cultural.

El nácar es un biocompuesto propio de la capa interna de la concha de algunos moluscos (aunque existe una estructura calcítica similar en briozoos y braquiópodos inarticulados: el semi-nácar) [80], siendo la capa externa generalmente de una microestructura diferente. Es iridiscente, fuerte, duro y resistente, además de ser de una gran importancia ecológica y cultural. Está presente en moluscos bivalvos, gasterópodos, cefalópodos y monoplacóforos, aunque es principalmente en bivalvos y gasterópodos (concretamente en *Haliotis*) donde más se han centrado los estudios.

La estructura nacarada presenta notables diferencias en los distintos grupos en los que se encuentra. Mientras que en gasterópodos encontramos pilas de tabletas de CaCO_3 formando columnas, en bivalvos encontramos las tabletas formando escalones o terrazas, dando lugar a formas aparentemente caprichosas como espirales y laberintos. En bivalvos, los ejes cristalográficos a , b y c están co-orientados, con el eje c perpendicular a la superficie del nácar, y el b paralelo a la dirección local de crecimiento del margen

de la concha. En gasterópodos, las plaquitas están co-orientadas con el eje *c* siguiendo el crecimiento de las columnas, pero tanto *a* como *b* no están ordenados.

Los cefalópodos actuales que poseen nácar se reducen a *Nautilus*, y curiosamente presentan un nácar que parece la combinación de las torres y tabletas encontradas en gasterópodos y bivalvos [81], concretamente con torres en los bordes y terrazas en la zona interior de la concha.

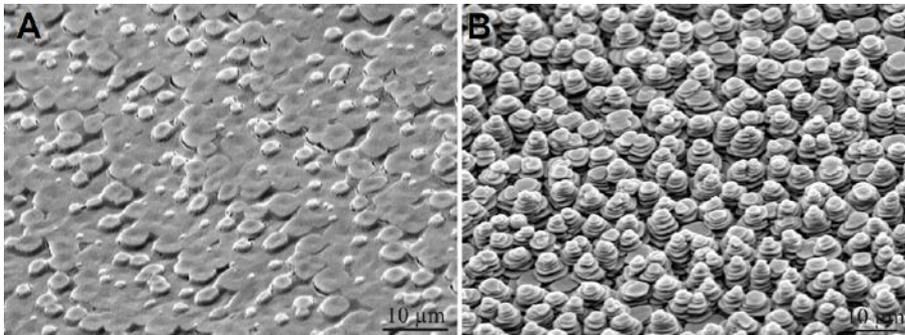


Fig. 50 Nácar comparado de bivalvo y gasterópodo. A. Vista oblicua del nácar en forma de terrazas del bivalvo *P. margaritifera*. B. Vista oblicua del nácar en torres del gasterópodo *Perotrochus caledonicus*. (Modificado de Checa 2009) [13]

Al analizar las plaquitas en detalle, descubrimos que cada una de ellas es un compuesto de mineral aragonítico junto con membranas orgánicas. La superficie interior y superior de cada tableta está limitada por un aglomerado orgánico que, como ahora sabemos, está compuesto por quitina y proteínas.

Esta materia orgánica juega un papel clave en la disposición final del carbonato cálcico. La formación de puentes minerales [82], la orientación de los cristales de aragonito [34, 83], o la mismísima estructura de las plaquitas del nácar [84], están directamente relacionadas con la fracción orgánica. Debemos pensar en el nácar como un sistema en el que materia orgánica y aragonito actúan en conjunto, entremezclados. Es un sistema de tal complejidad que para conocer sus entresijos, debemos “atacar” desde distintas perspectivas.

Al igual que ocurre en la neurofisiología, son las pequeñas alteraciones las que permiten conocer el funcionamiento del

sistema. La observación y el análisis del nácar completo no aportan información suficiente. Es el caso de las estructuras de disolución observadas en las plaquitas de nácar [84-90], en las que atacando exclusivamente la fracción orgánica, o bien la inorgánica, se pueden extraer valiosas informaciones concernientes a la interrelación existente entre ambas fracciones. Se usa para ello tratamiento con proteasas, diferentes protocolos químicos y tratamiento simple con lejía a diferentes concentraciones. El uso de estas técnicas de tratamiento previo de las muestras nos ha servido para poner en evidencia algunas de estas relaciones.

La característica más notoria del nácar quizás sea su extraordinaria resistencia, gracias en gran parte a su fracción orgánica y a los biopolímeros elásticos que la componen, entre ellos la quitina, un polisacárido compuesto por unidades de N-glucosamina. La quitina parece jugar un papel fundamental, tanto en las propiedades de las conchas nacaradas, como en la formación de las mismas.

El límite entre tabletas lo ocupa la llamada membrana interlamelar, una membrana de naturaleza orgánica, donde se encuentran la mayor parte de las proteínas y las fibras de quitina. Sabemos que juega un papel muy importante tanto en la formación del nácar como en sus propiedades finales. La membrana interlamelar de gasterópodos y bivalvos también presenta diferencias, pues en gasterópodos se encuentran poros en gran cantidad, mientras que estos no se aprecian en bivalvos.

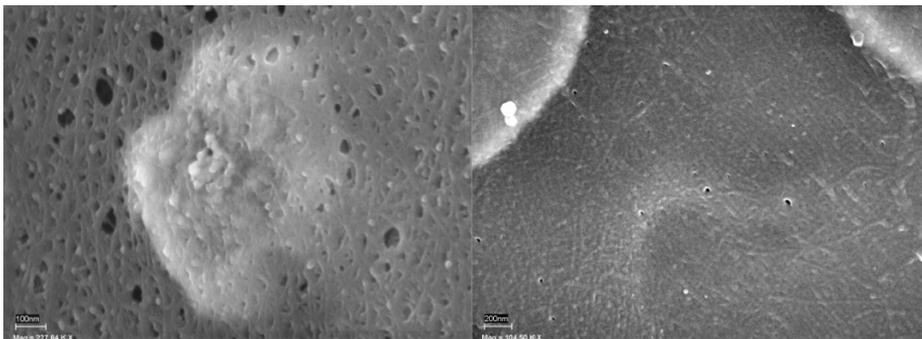


Fig. 51. Microscopía SEM. Membrana interlamelar de *Gibbula pennanti* (gasterópodo), izquierda, y de *Anodonta cygnea* (bivalvo), derecha.

Si el éxito evolutivo del nácar es debido a su asombrosa resistencia a la fractura (como ya se ha comentado, la concha de *Haliotis* es unas 3000 veces más resistente a la fractura que un solo cristal de mineral puro), esta resistencia, a su vez, se debe a la gran cantidad de materia orgánica que contiene. Entre la materia orgánica juega un papel fundamental la quitina.

2.3.2.1.- QUITINA

Quitina deriva del francés “chitine”, que a su vez proviene del término griego “χιτών” (chitón) que significa “tapar”. Era también el nombre de una prenda de vestir que hemos visto en innumerables ilustraciones o películas, y que todos tenemos asociada a la antigua Grecia. Probablemente la frase popular “¡chitón en boca!”, utilizada cuando se quiere hacer callar a alguien, tiene su origen en tapar la boca. Hoy el término quitón (o Chiton) es usado principalmente para referirnos al género mejor conocido de la Clase Polyplacophora, aunque popularmente el término se ha extendido a todo el grupo.

La quitina (un polisacárido rico en nitrógeno, N-acetil-D-glucosamina) es uno de los materiales orgánicos más resistentes que existen. El pico de los calamares, las espinas de las diatomeas, y las alas de los insectos son buenos ejemplos de ello. Fue descubierta en 1811 por el químico francés Henri Braconnot, quien, después de atacar con álcalis a algunos hongos, descubrió una fracción resistente a la que llamó “fingine” [91]. Fue en 1823 cuando Auguste Odier encontró el mismo material en el exoesqueleto de insectos y lo llamó “chitine” [92], haciendo referencia a su función de cubierta. Es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, solo por detrás de la celulosa, debiendo su éxito evolutivo a su enorme resistencia. Ésta deriva de su estructura molecular (sea en sus formas alfa, beta o gamma), y de su capacidad para combinarse con proteínas y con otros compuestos formando así materiales híbridos. La combinación de las quitina-sintasas y las quitinasas permite generalmente que los organismos puedan reconstruir constantemente sus estructuras, aunque esto es algo que no es posible en la concha de los moluscos. La versatilidad de las quitinas en sus distintos papeles, con resultados excepcionales, nos da una pista del porqué de su presencia en tantos organismos desde la explosión del Cámbrico.

La encontramos así en una gran diversidad de organismos. Por supuesto en artrópodos y moluscos, pero también muchos protistas utilizan quitina, entre ellos muchas especies de amebas (todas las parásitas de animales), también los hidrozooos, los anélidos, e incluso se encuentra presente en diatomeas y oomicetos. Curiosamente, tanto los cordados como las plantas superiores no sintetizan quitina, pero sí que lo hacen muchos de sus parásitos, quizás es por ello que tanto en seres humanos como en plantas superiores se ha encontrado la enzima quitinasa.

La biosíntesis de la quitina se da en tres pasos. Inicialmente se forma el polímero gracias a la acción de la enzima catalítica en el citoplasma. La molécula de azúcar adopta la forma de un hexágono irregular, en cuyos extremos encontramos el átomo de carbono que podemos llamar número 1, con función reductora (aldehído), y otro que correspondería al átomo número 4, con función no reductora (alcohol). Al unirse dos moléculas de N-acetil glucosamina se da una unión glicosídica entre los átomos 1 y 4. En toda cadena formada por moléculas de N-acetil glucosamina quedan entonces dos extremos, uno con función reductora y otro con no reductora.

Después se da la translocación del polímero y su paso al espacio extracelular. Por último se completa el proceso con el ensamblado espontáneo de los polímeros formando microfibrillas cristalinas. Posteriormente, las microfibrillas se combinan con azúcares, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos, resultando con ello un material con características muy peculiares.

La diferencia existente entre los tres polimorfos cristalinos alfa, beta y gamma, radica en la forma en la que se ordenan las cadenas formadas por N-acetil glucosamina. La forma alfa, que encontramos en los artrópodos (por tanto la más abundante), posee las cadenas ordenadas de forma antiparalela, como la molécula de ADN. Cada cadena está orientada en un sentido opuesto a la anterior. La forma beta, común entre los moluscos, se forma por cadenas paralelas entre sí al igual que la celulosa. La forma gamma, que encontramos en hongos superiores, presenta una alternancia en la ordenación de las cadenas: por cada dos paralelas encontramos estadísticamente una antiparalela.

Aunque son muchas las incógnitas que aún quedan respecto a la formación de los distintos tipos de quitina, sí podemos ver como las tres formas poseen cualidades significativamente diferentes. En su forma alfa, la quitina es mucho más rígida que en sus otras dos versiones, que son capaces de hidratarse.

Y es que, pese a la admiración que los seres humanos hemos sentido por la belleza de las conchas de los moluscos, lo cierto es que sabemos muy poco acerca de la forma en la que éstas se desarrollan. En lo que respecta al nácar la quitina podría jugar un papel absolutamente esencial.

La formación de las conchas de los moluscos es un proceso particularmente interesante y lleno de incógnitas. A primera vista, lo más destacable es el hecho de que la concha se forma en un espacio acelular, el espacio extrapaleal. El organismo genera una estructura asombrosamente compleja en una interacción “a distancia” de sus células secretoras.

Desde mediados del siglo pasado el estudio de la biomineralización de los moluscos (y en especial del nácar), no ha parado de evolucionar. El motor de este cambio constante quizás haya sido el desarrollo de la tecnología, y con ella de las técnicas asociadas al estudio de las microestructuras. Inicialmente, la microscopía electrónica de barrido (SEM) era la única herramienta a disposición. Después, con la llegada de nuevas técnicas (TEM, cryo-TEM, AFM, etc.), se fue conociendo cada vez más y mejor la ultraestructura de las conchas de los moluscos, y los modelos de su formación se fueron sucediendo, especialmente los del nácar.

Uno de los primeros modelos de formación del nácar fue el basado en compartimentos (“compartment model”) de Bevelander y Nakahara (1969) [93]. Se basaba en la idea de que las membranas interlamelares e intertabulares dejaban huecos, que después serían ocupados por las plaquitas de nácar de forma independiente, algo que hoy sabemos que no es correcto. En los años 80, Weiner y sus colaboradores [94] trataron de integrar el conocimiento de la época en un modelo más acertado. A diferencia del anterior, en éste se tuvo en cuenta el papel de los componentes orgánicos, y sus posibles interacciones con el carbonato cálcico. Se creía que existía una capa formada por quitina encerrada en el centro de la

membrana orgánica, y rodeada a ambos lados por dos capas de fibroína, y de proteínas ricas en ácido aspártico. Este complejo serviría como base para la nucleación de cristales de aragonito, en un proceso de heteroepitaxia. El desarrollo de los cristales se limitaría por la acción de macromoléculas capaces de inhibir su crecimiento.

Este modelo se mantuvo con relativo éxito hasta el redescubrimiento de agujeros en la membrana interlamelar por Schäffer [82] en 1997, aunque ya habían sido documentados en 1969 por Mutvei [95]. Esto parecía indicar que las plaquitas de nácar continuaban su crecimiento atravesando la membrana, a través de lo que se llamaron “puentes minerales” (“mineral bridges”).

Levi-Kalisman et al. [83] se valieron de la criomicroscopía electrónica de transmisión (cryo-TEM) sobre muestras de un bivalvo para construir un nuevo modelo. La quitina jugaría en éste un papel fundamental, encontrándose altamente ordenada en el interior de las membranas interlamelares, y determinando la orientación de los cristales. Los minerales crecerían en un gel formado por proteínas ácidas (fibroínas) altamente insolubles. El modelo de membrana interlamelar presentado por Levi-Kalisman et al. es el más aceptado actualmente. Pero este modelo se construyó sobre el estudio de conchas desmineralizadas, de donde se obtuvo un “pellet”, algo que implica la pérdida de la organización original que las fibras de quitina pudieran tener.

Cartwright y Checa [34] propusieron un modelo más acorde con la desorientación de fibras que se puede observar en conchas no desmineralizadas. En este modelo las fibras de quitina se organizan como un cristal líquido en fase colestérica. La estructura de un cristal colestérico se caracteriza idealmente por una estructura ordenada en capas, donde cada una de las capas posee fibras perfectamente ordenadas en un plano, pero cada una de ellas está sensiblemente rotada (hasta 90°) respecto a la anterior. Con esta ligera rotación de las fibras por capas, a lo largo de una cierta distancia (en altura) se alcanza una rotación considerable, hasta que se vuelve a conseguir la orientación original. Cada una de estas capas se corresponde con las membranas interlamelares y sus fibras de quitina. Este proceso, unido a los pequeños defectos acumulados

del cristal líquido (pequeñas dislocaciones), acaba dando lugar a la compleja estructura espiralada del nácar.

Cartwright y Checa propusieron que en el nácar este cristal líquido en fase colestérica no es perfecto; las fibras de quitina se encuentran separadas en capas, pero están desordenadas dentro de cada capa. El entramado de fibras de quitina, que en condiciones ideales acabaría ordenado como un cristal líquido en fase colestérica, se ve bloqueado por la presencia de las proteínas antes de alcanzar el equilibrio. Proteínas y quitina forman la membrana interlamelar completa. Después de la cobertura de las fibras de quitina por las proteínas, comienzan a crecer los cristales de carbonato cálcico entre los espacios interlamelares. En este proceso se separan las distintas membranas interlamelares a las distancias usuales de entre 0,3 y 0,5 μm .

El nácar de las perlas fue considerado antaño como un líquido endurecido, lágrimas de Afrodita, gotas de luna caídas al mar, o de rocío endurecidas en el interior de los moluscos. El hecho de que hoy sea considerado el resultado de un cristal líquido, debería ser motivo suficiente como para arrancar una sonrisa al lector.

Cartwright y Checa basaron su trabajo en observaciones de microscopía, sin proporcionar evidencias bioquímicas de la naturaleza de las supuestas fibras de quitina, ni de las proteínas que las cubren. Ese es el fin del presente trabajo.

2.3.2.1.2.- PTERIA HIRUNDO, alas de golondrina

La familia *Pteriidae* (Gray, 1847) es probablemente la que presenta mayor interés económico entre los moluscos, considerando su gran potencial para la producción de perlas y nácar. Los miembros de la familia *Pteriidae* se distribuyen de forma natural principalmente a lo largo de los trópicos. Normalmente, las especies de moluscos elegidas para cultivo son nativas de los sitios elegidos para la actividad. Quizás es por ello que *Pteria hirundo* tenga tanto éxito como molusco de cultivo, ya que se puede encontrar en casi cualquier costa atlántica, desde el frío Mar del Norte hasta las playas tropicales del sur de Brasil, incluyendo tanto el Mediterráneo como el Caribe.

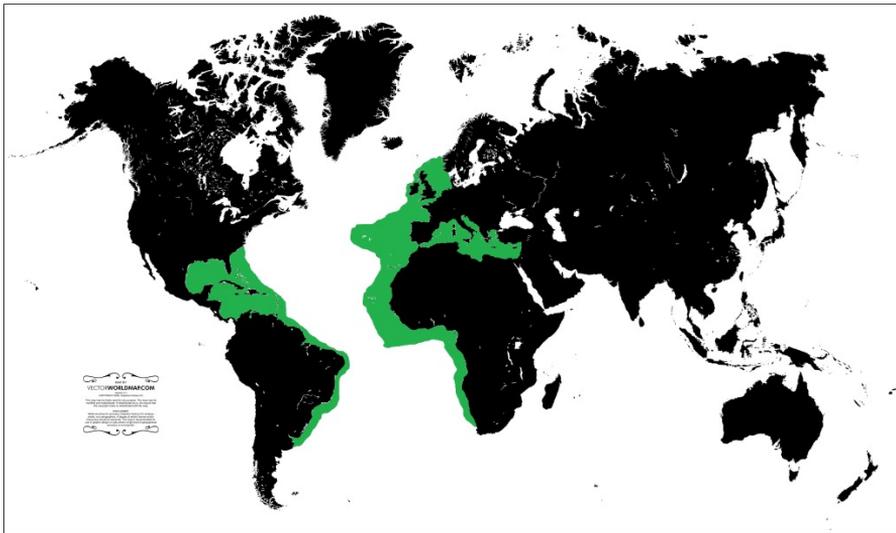


Fig. 52. Distribución de *Pteria hirundo*.

Su aspecto es muy característico. Con un tamaño normalmente comprendido entre los 60 y 70 mm, rara vez superando los 100 mm. La superficie externa es lisa con escamas irregulares y un periostraco delgado. El color de la concha varía de rojo a marrón claro. La línea de la articulación termina en dos proyecciones que le valen tanto su nombre científico (*Pteria* del griego “πτερο, ptero”, ala, *hirundo*, del latín, golondrina), como aquél por el que se conoce popularmente, “ostra de alas” (*wingshell*) o pajarita. La valva izquierda es más convexa que la derecha. En cuanto a la superficie interior es nacarada, y presenta un amplio margen flexible formado por microestructura prismática. Los bordes suelen ser muy delgados y flexibles; en condiciones de sequedad la flexibilidad de la capa prismática desaparece y se vuelve quebradiza.

La llamativa estructura de los miembros de la familia *Pteria* es resultado de las adaptaciones evolutivas propias de su particular forma de vida. La forma de su concha “alada” les confiere una hidrodinámica que permite soportar mejor las corrientes, así como una mejor fijación (mediante el biso) a las gorgonias con las que mantienen una relación casi simbiótica [96]. Los especímenes provenientes de cultivo suelen presentar unas “alas” mucho menos desarrolladas debido a la fricción entre individuos.

4.2.-Objetivos

4.2.- OBJETIVOS

De considerarse un mero componente más del nácar, las evidencias han convertido a las fibras de quitina en un constituyente básico para su crecimiento y desarrollo como un cristal líquido. Es necesario identificar las fibras observadas como constituidas por quitina, para poder avanzar en el desarrollo de un modelo que represente tanto la estructura del nácar como su crecimiento. En este sentido nuestra atención se ha dirigido a:

- 1- Identificación y marcaje de fibras de quitina en el nácar no desmineralizado.
- 2- Desarrollo de un modelo que represente la distribución y naturaleza de dichas fibras.

Dados los resultados obtenidos tras los tratamientos con quitinasa, añadimos un objetivo más.

- 3- Desarrollo de un modelo que explique la formación de patrones repetidos, como las vermiculizaciones o los relojes de arena en el nácar [85].

4.3.-Materiales y Métodos

4.3.1.-MUESTRAS BIOLÓGICAS

1. *Pteria hirundo*

Clase: *Bivalvia*
Subclase: *Pteriomorpha*
Orden: *Pterioida*
Superfamilia: *Pterioidea*
Familia: *Pteriidae*
Género: *Pteria*
Especie: *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758)



Lugar de origen: España (Málaga)
Fecha de recolección: 2013.

2. *Haliotis rufescens*

Clase: *Gastropoda*
Subclase: *Vetigastropoda*
Superfamilia: *Haliotoidea*
Familia: *Haliotidae*
Género: *Haliotis*
Especie: *Haliotis rufescens* (Linnaeus, 1758)



3. *Neotrigonia bednalli*

Clase: *Gastropoda*
Subclase: *Paleoheterodonta*
Orden: *Trigonioida*
Superfamilia: *Trigonioidea*
Familia: *Trigoniidae*
Género: *Neotrigonia*
Especie: *Neotrigonia bednalli* (Verco, 1907)



Lugar de origen: Australia

4. *Pinna nobilis*

Clase: *Bivalvia*

Subclase: *Pteriomorpha*

Orden: *Pterioida*

Superfamilia: *Pinnoidea*

Familia: *Pinnidae*

Género: *Pinna*

Especie: *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758)

Lugar de origen: España (Almería)



4.3.3.- ESTUDIOS EN EL NÁCAR

4.3.3.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

Los ejemplares de *Pteria hirundo*, recolectados directamente de la costa de Málaga (España), fueron introducidos inmediatamente en alcohol (90%), y almacenados en un frigorífico a 4°C.

Los ejemplares utilizados de *Haliotis rufescens*, *Pinna nobilis* y *Neotrigonia bednalli* fueron seleccionados de la colección de investigación del Grupo RNM 190, almacenados en el Área de Paleontología de la UGR.

4.3.3.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se sacaron los ejemplares de *Pteria hirundo* del alcohol, utilizando unas pinzas para abrir las valvas, con cuidado de no dañar la concha. Con ayuda de pinzas y cuchilla se extrajo el cuerpo del animal, y se retiró con cuidado cualquier fragmento que pudiera quedar del mismo adherido a la concha. Ambas valvas se lavaron

con agua abundante y agitación, al objeto de eliminar restos de alcohol.

Para las muestras destinadas a inmunogold superficial se cortaron fragmentos (de 1x1 cm), con ayuda de un martillo y una cuchilla, de aquellas zonas de la concha compuestas por nácar, y que no habían estado en contacto directo con el manto.

El polvo de concha para inmunogold se obtuvo raspando la superficie de la concha con una cuchilla, hasta obtener la cantidad suficiente de polvo fino.

Las muestras de *Haliotis* destinadas a microscopía confocal se cortaron con una sierra circular de corte en frío. Las secciones cortadas se dividieron después en sub-fragmentos de 2x2 cm, mediante un disco de corte Multi-Dremel. Cada una de ellas se fijó previamente a un portaobjetos y se pulió usando carborundo (silicon carbide, SiC) junto con agua. Se redujo el tamaño del grano del carborundo de 80 a 320, de forma secuencial hasta que las muestras quedaron sin imperfecciones ni arañazos visibles. Se pulieron hasta alcanzar los 80-100 μm de grosor. Dada la naturaleza de la microscopía confocal, la muestra pulida no solo debe quedar libre de imperfecciones sino que también debe ser muy fina.

4.3.3.3.- TRATAMIENTO Y OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras de *Haliotis*, adheridas al portaobjetos y pulidas, fueron tratadas con proteinasa K (0,02 g/ml), e incubadas con WGA (Wheat Germ Agglutinin) unida a Isotiocianato de fluoresceína (FITC), en oscuridad y humedad constante durante 30 min.

El isotiocianato de fluoresceína es un derivado de la fluoresceína usado en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo la citometría de flujo. Como la mayor parte de los fluorocromos, es susceptible al efecto de fotoblanqueo, por lo que no solo el tratamiento debe hacerse en oscuridad, sino que las muestras

preparadas deben ser observadas inmediatamente mediante microscopía.

Las muestras control fueron tratadas con quitinasa (1 mg/ml) en solución citrato (0,5M, pH 5,5), durante 2 h y a 50°C.

La observación en microscopía láser confocal (CLSM) se realizó en un Microscopio Invertido Leica DMI6000. Dada la sensibilidad de las muestras a la acción del láser, y el tiempo limitado por el fotoblanqueo, se probaron distintos medios de montaje, dando los mejores resultados el glicerol al 70% en PBS.

El isotiocianato de fluoresceína se excita con luz azul de 492 nm, y su emisión máxima tiene un pico de unos 518 nm del espectro electromagnético.

4.3.3.4.- IMMUNOGOLD

En los distintos tipos de immunogold realizados el modelo de estudio fue *Pteria hirundo*.

4.3.3.4.1.- IMMUNOGOLD PARA QUITINA

Cada una de las muestras fue tratada ligeramente con proteinasa K (0,01 g/ml), durante 2h en un horno a 55°C (para liberar ligeramente las fibras de quitina de las proteínas que las recubren). Se lavaron 5 veces, durante 5 min cada vez, en agua destilada, y de igual modo en PBS. Las muestras control para la quitinasa fueron tratadas con 1 mg/ml durante 2 h y a 50°C. Tras ello se lavan en abundante PBS, para ser bloqueadas después durante 13 min con gelatina filtrada (para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos). Para eliminar la gelatina utilizamos PBS-OVA.

Posteriormente, las muestras fueron expuestas a la WGA durante 16 h a 4°C, o durante 2 h a 30°C. Tras ello se lavaron con PBS 5 veces, 5 min cada vez. Posteriormente fueron incubadas con un anticuerpo específico para la lectina (Anti-WGA, Sigma), diluido 1/20, durante 1 a 3 h y a 30°C. Se eliminaron los restos del

anticuerpo anti-lectina con 5 lavados de 5 min en PBS-OVA. Las muestras fueron finalmente incubadas con proteína A unida a oro coloidal (partículas de 20 nm de diámetro), y durante 3 h y a 30°C. Por último se lavaron con PBS y agua, 5 veces y 5 min cada vez. Se secaron tras ello en una estufa a 35°C.

Se podrían haber usado anticuerpos desarrollados específicamente para la quitina, pero no fue posible por encontrarse actualmente descatalogados en todas las casas comerciales consultadas. La proteína-A es muy usada en bioquímica por su alta afinidad por las inmunoglobulinas. La unión específica a la región Fc de los anticuerpos por parte de la proteína-A, permite unir el oro coloidal sin afectar a la función de los anticuerpos. Se usaron partículas de oro de 20 nm, por ser el grosor que teóricamente podrían tener las fibras de quitina mostradas por Levi-Kalisman et al. [83]. Dichas partículas de oro debían ser fácilmente reconocibles en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución, sin necesidad de ensalzadores que incrementasen el tamaño de las partículas

Se utilizaron distintas muestras como control:

- Control con quitinasa: Cuya finalidad es comprobar la naturaleza quitinosa de las fibras, pues en este caso las fibras que normalmente se observan en la membrana interlamelar, o las partículas de oro coloidal, desaparecerían.
- Control sin proteinasa K: Para probar la necesidad de un ataque a las proteínas para exponer las fibras de quitina a la acción de las lectinas.
- Control sin anticuerpo anti-lectina: Al carecer de anticuerpo anti-lectina la existencia de partículas de oro coloidal significaría la existencia de uniones inespecíficas a la estructura.
- Control sin proteinasa K ni anticuerpo: Para valorar uniones inespecíficas a la proteína.

4.3.3.4.2.- IMMUNOGOLD PARA QUITINA SOBRE POLVO

El polvo fue repartido en varios tubos, y tratado igual que las muestras fracturadas, con la excepción de que en este caso las muestras tenían que ser centrifugadas para ser depositadas en el fondo del tubo. Se utilizaron tubos de micro-centrífuga Eppendorf de 1,5 ml y pulsos de 10 s en la microcentrífuga, acelerando hasta 14.000 rpm.

4.3.3.4.3.- DOBLE IMMUNOGOLD

En el doble inmunogold se combinan dos técnicas de inmunolocalización, con la intención de marcar y diferenciar las fibras compuestas por quitina de aquellas otras compuestas por proteína. Las muestras fracturadas de *Pteria hirundo* fueron primero sometidas al tratamiento ya descrito para marcar las fibras de quitina.

Posteriormente, se procedió con el segundo inmunomarcaje sobre las mismas muestras, esta vez para marcar proteínas en la membrana interlamelar de *Pteria hirundo*. Para ello se utilizó un pool de anticuerpos cedidos por el Dr. Frederic Marin (CNRS, Dijon, France) compuesto por cuatro anticuerpos policlonales generalistas, obtenidos usando distintos bivalvos como se detalla seguidamente.

- k5087: Anticuerpo obtenido frente a la matriz orgánica soluble al ácido acético (ASM, acetic acid-soluble matrix) de *Pinctada margaritifera*.
- K5089: Anticuerpo obtenido frente a la ASM de *Pinna nobilis*,
- k5090: Obtenido frente a la ASM de *Pinna nobilis*.
- K4952: Obtenido igual que los anteriores, pero con respecto al bivalvo *Bathymodiolus*.

Las muestras se incubaron en este pool en una proporción 1/20 a 4°C, y durante toda la noche. Tras ello se lavaron con PBS cinco veces (5 min cada vez), para ser incubadas después durante 2 h a 37°C, con un anticuerpo anti-conejo unido a partículas de oro

coloidal de 10 nm de diámetro. Finalmente las muestras fueron lavadas con PBS y agua, secadas en estufa y metalizadas para su posterior observación en SEM.

4.3.3.5.- OBSERVACIÓN EN SEM

Una vez secas, las muestras fueron colocadas sobre una fina capa de carbono y metalizadas. La observación se realizó en un SEM de emisión de campo (Field Emission SEM, FESEM Zeiss Auriga Cross-Beam Station), ubicado en el Centro de Instrumentación Científica (CIC), de la Universidad de Granada, mediante observación tanto en modo In-Lens, como mediante electrones retrodispersados (ESB, Energy selective Backscattered).

Las condiciones utilizadas en la microscopía electrónica resultaron ser claves en la observación correcta de las fibras de tipo 2. Alterando el kilovoltaje del microscopio electrónico de barrido se puede “jugar” con la transparencia de la capa de proteína. De este modo, las mejores condiciones de observación de las fibras se obtuvieron a 3 kV. Con un kilovoltaje menor los electrones del haz aportan una imagen exclusivamente superficial pero con menor resolución, mientras que con un valor mayor se consigue un excesivo efecto de transparencia.

4.4.-Resultados

4.4.- RESULTADOS

4.4.1.- INMUNOLocalIZACIÓN DE LA QUITINA

Los estudios de localización de la quitina se realizaron mediante el marcaje con lectinas unidas a isotiocianato de fluoresceína, usando inmunofluorescencia directa y lectinas marcadas con oro en inmunogold.

4.4.1.1.-MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

Los estudios de localización llevados a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia directa bajo microscopía láser confocal, pusieron de manifiesto la presencia de quitina en las conchas pulidas.

Las Figuras 53 y 55 muestran secciones pulidas de las conchas de *Haliotis rufescens* y *Neotrigonia bednalli*, tratadas con lectina WGA unida a isotiocianato de fluoresceína (FITc), observadas en microscopía confocal bajo luz de entre 320 y 492 nm de longitud de onda.

La reacción observada es muy clara; hay una fuerte fluorescencia en el contacto entre placas de nácar, zona que ocupan las llamadas membranas intertabulares, que rodean a las placas de nácar. No se apreció, sin embargo, fluorescencia alguna en las muestras procesadas de igual forma pero tratadas previamente con quitinasa (Fig. 54).

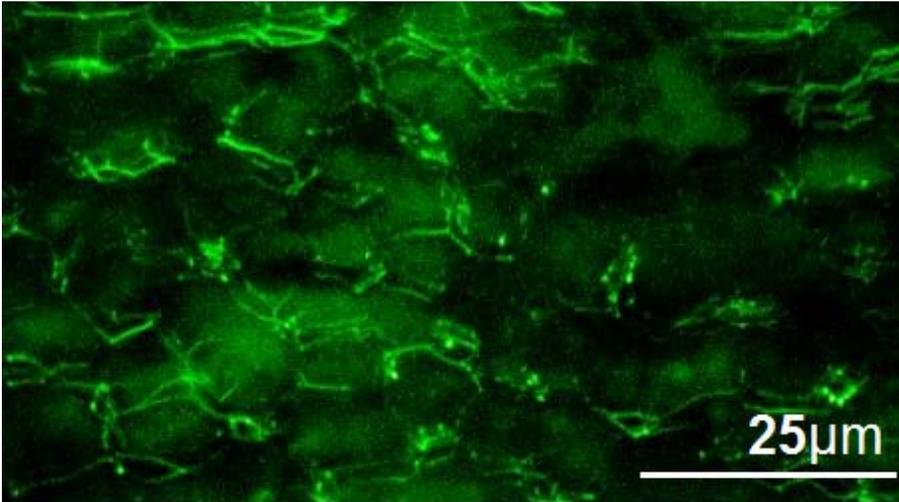


Fig. 53.- Microscopía confocal de la superficie pulida de la concha de Haliotis sp. Pieza experimental, tratada con lectinas (WGA) unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

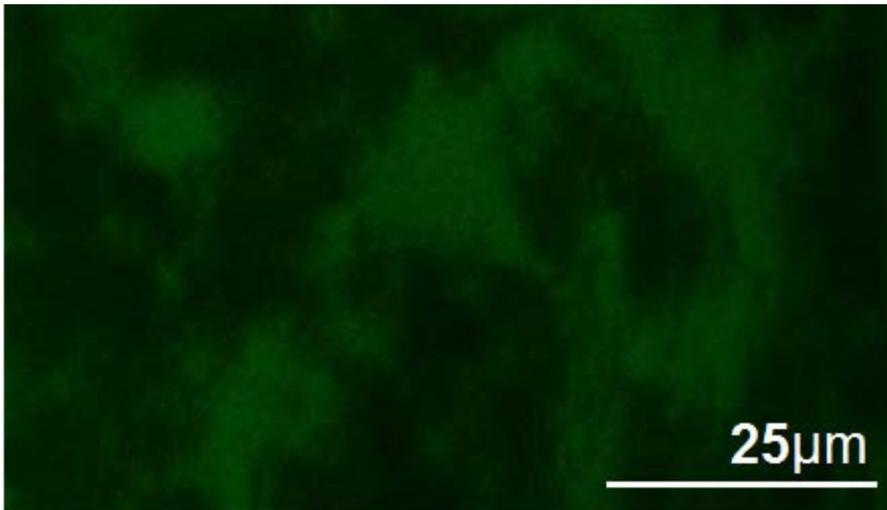


Fig. 54. Microscopía confocal de la superficie pulida de la concha de Haliotis rufescens. Pieza tratada con quitinasa y lectina (WGA) unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

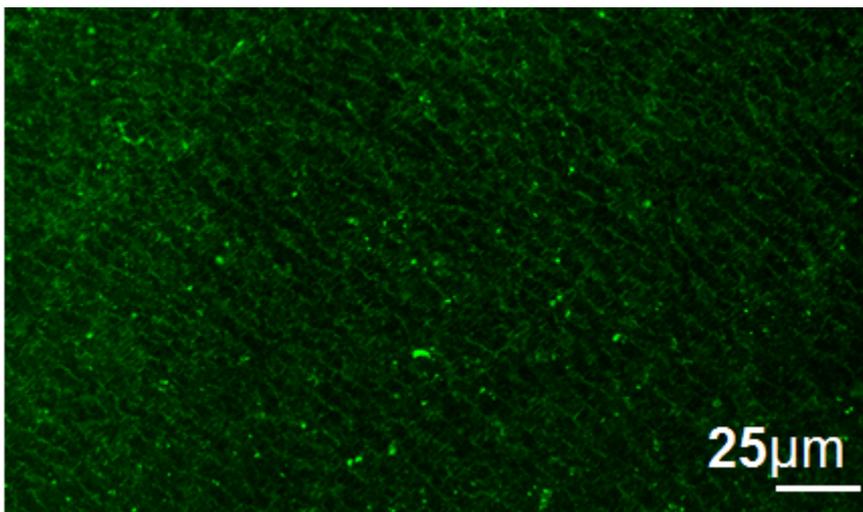


Fig. 55. Microscopía confocal de la superficie pulida de la concha de *Neotrigonia bednalli*. Pieza experimental, tratada con lectinas (WGA) unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

4.4.1.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las muestras de *Pteria hirundo* muestran los patrones espirales y laberínticos típicos de los frentes del crecimiento del nácar de bivalvos.

Las lamelas de plaquitas de nácar se encuentran cubiertas por finas membranas interlamelares de naturaleza orgánica. En ocasiones unen las placas inmaduras, pero también pueden aparecer deshilachadas en los bordes de las placas; este último efecto se incrementa por la acción deshidratadora del alcohol utilizado en la conservación de las muestras.

A lo largo del proceso de experimentación se hicieron pruebas con concentraciones variables de proteinasa K, con el fin de alcanzar la concentración ideal en la observación de los dos tipos de fibras descritos. Una vez alcanzada una concentración correcta se continuó manipulando la concentración de proteinasa K para observar la respuesta de la estructura, así como del marcaje (Figs. 56-58).

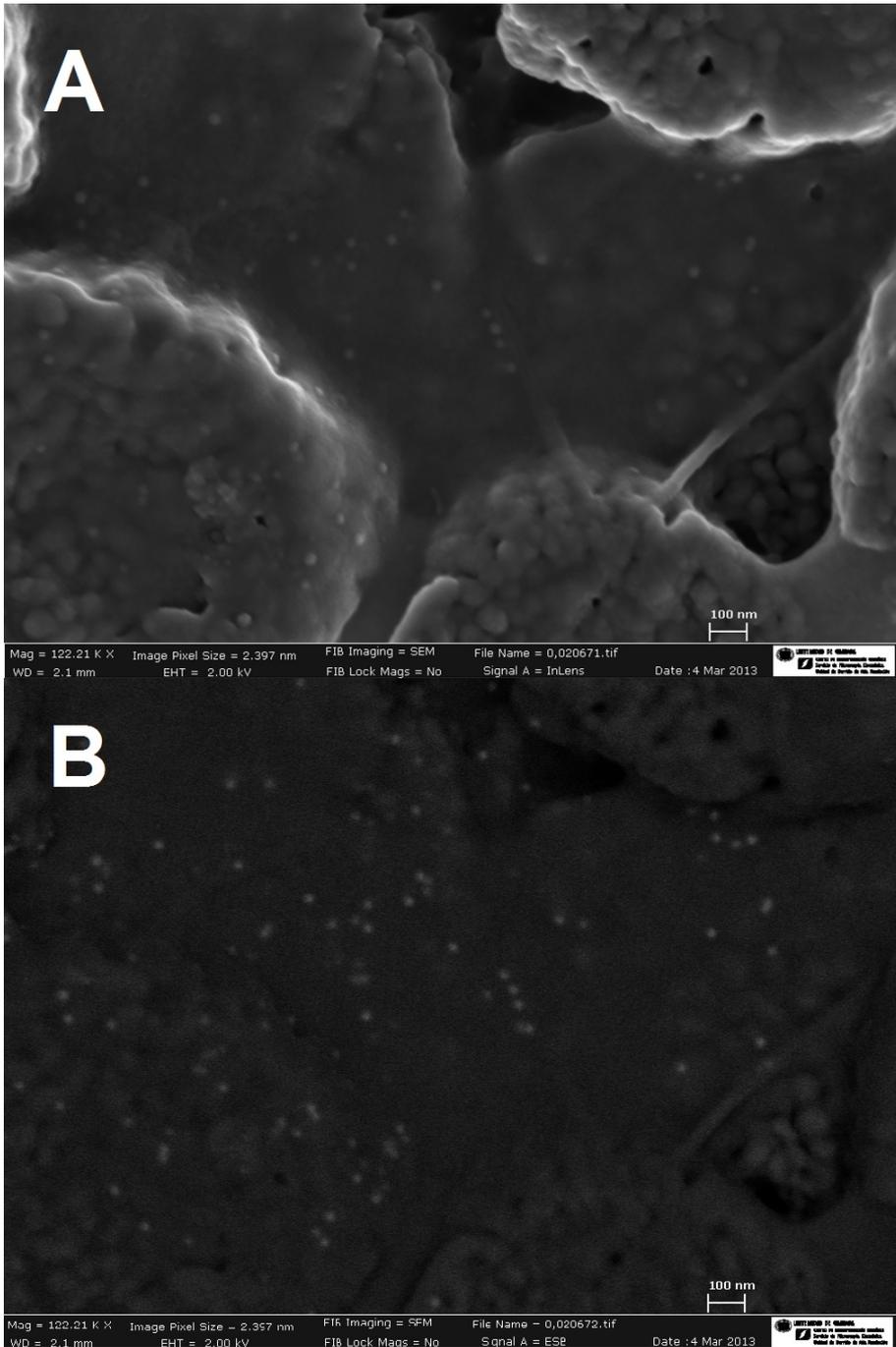


Fig. 56. P. hirundo. Marcaje obtenido con 0,02 g/ml de proteinasa K. Oro coloidal de 20 nm. A. In Lens; B. BSE.

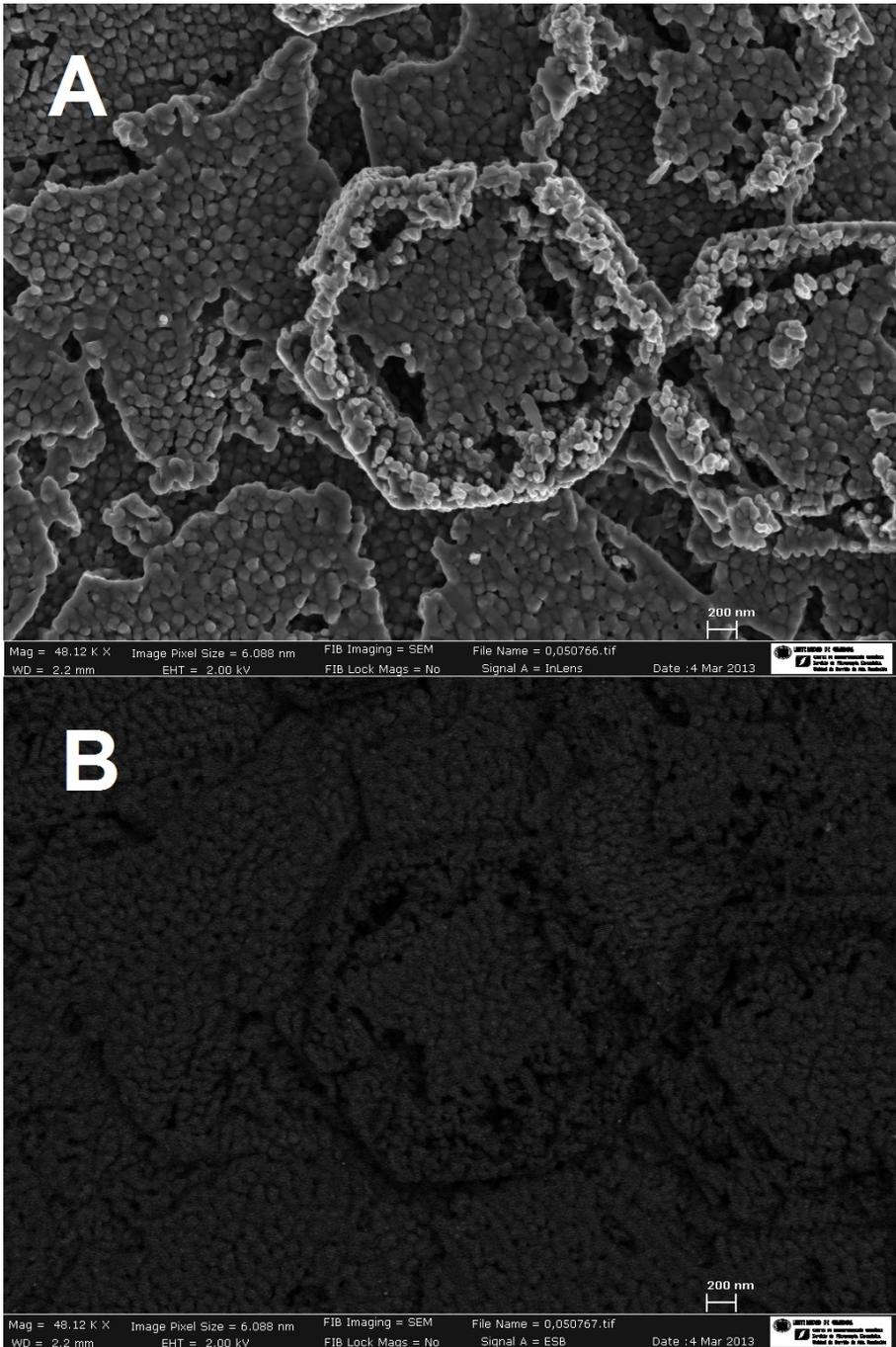


Fig. 57. *P. hirundo*. SEM. Marcaje obtenido con 0,05 g/ml de proteinasa K. Oro coloidal de 20 nm. A. In Lens; B. BSE.

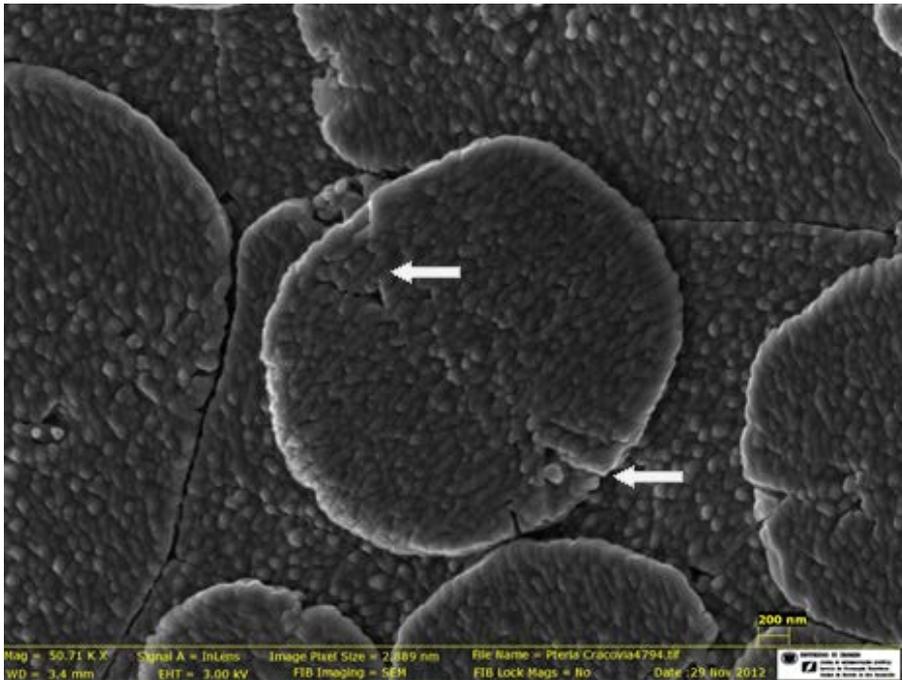


Fig. 58. P. hirundo. SEM. 0,2 g/ml de proteinasa K. Oro coloidal de 20 nm. La concentración de proteinasa K empleada origina el desarrollo de patrones de “reloj de arena” en las plaquitas de nácar.

Haciendo uso de la concentración apropiada de proteinasa K hemos constatado la existencia de dos tipos de fibras:

Fibras de tipo 1.- Grandes y de aspecto elástico, se encuentran formando un entramado que es continuación de la membrana interlamelar. Son más anchas en los extremos (allí donde conectan con otras fibras) que en la región central, donde tienen una anchura media de unos 100 nm. La deshidratación de las muestras incrementa la aparición de este tipo de fibras. Es común encontrarlas en los extremos de la membrana interlamelar, allí donde ésta puede haber quedado dañada (probablemente por retracción de las fibras). Cuando la membrana se encuentra reposando sobre la superficie de una plaquita de nácar es poco probable encontrar fibras de tipo 1. En cambio son muy comunes en aquellas zonas en las que la membrana se ha adherido a la superficie de la lamela inferior, o se extiende entre placas inmaduras (Figs. 59-62).

Fibras de tipo 2.- Más delgadas y más uniformes en grosor (entre 5 y 15 nm). Normalmente son rectas, aunque algunas aparecen curvadas suavemente. Lo más común es encontrarlas embebidas dentro de la membrana (Figs. 69-72). Poseen en común su aspecto rígido y son de un grosor constante, aunque existe una cierta variabilidad en grosor entre fibras diferentes

Ocasionalmente se encuentran fibras de tipo 1 que pierden grosor en uno de sus extremos, y una fibra de tipo 2 emergiendo de su interior (Fig. 61). Las fibras de tipo 2 son también observadas emergiendo de las plaquitas de nácar (Fig. 62), así como en las pequeñas partículas de concha obtenidas mediante el raspado, donde a veces aparecen empaquetadas en grupos de dos o tres fibras (Fig. 74-75).

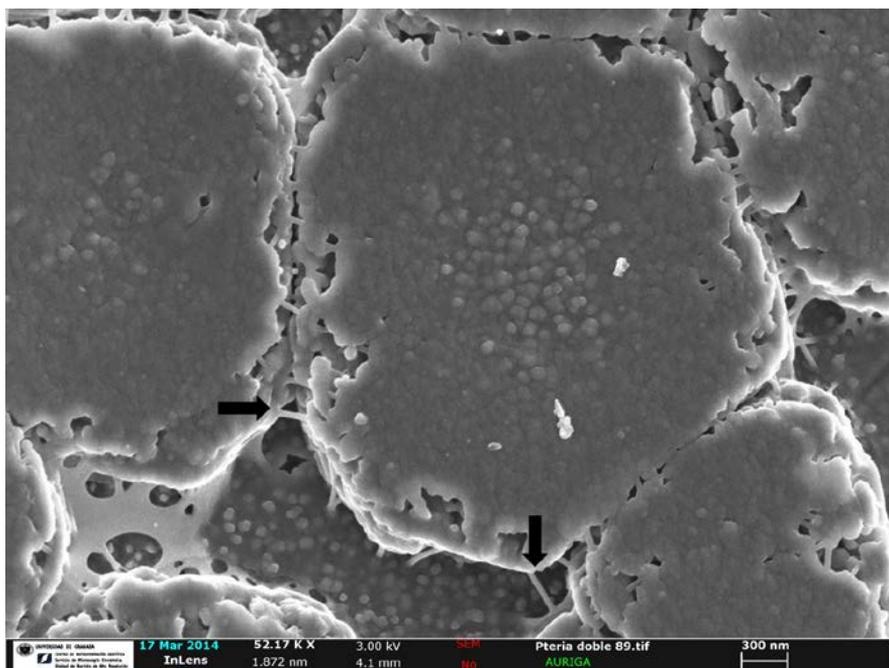


Fig. 59. Plaquetas de nácar de *P. hirundo*, membrana interlamelar y fibras de tipo 1.

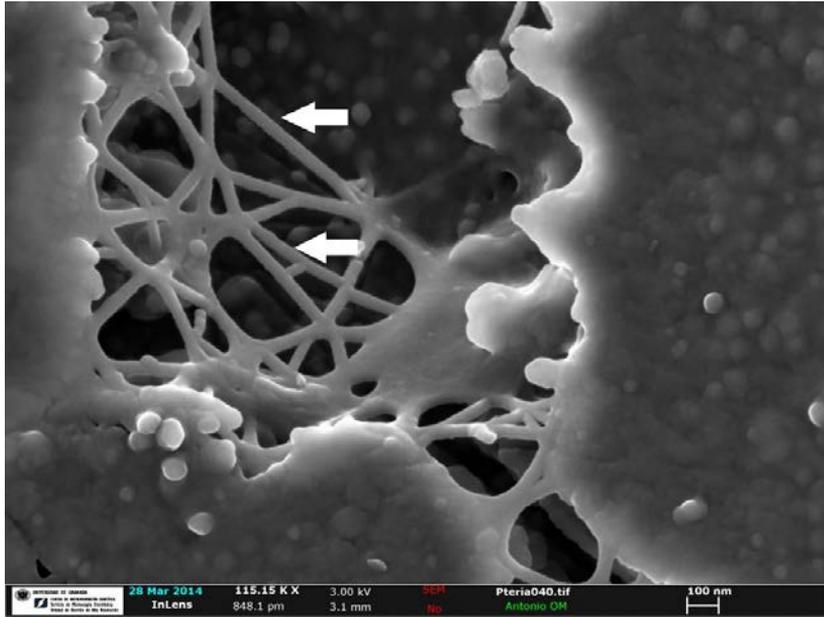


Fig. 60. *P. hirundo*. Membrana interlamelar entre plaquitas de nácar inmaduras, con abundantes fibras de tipo 1 visibles (flechas).

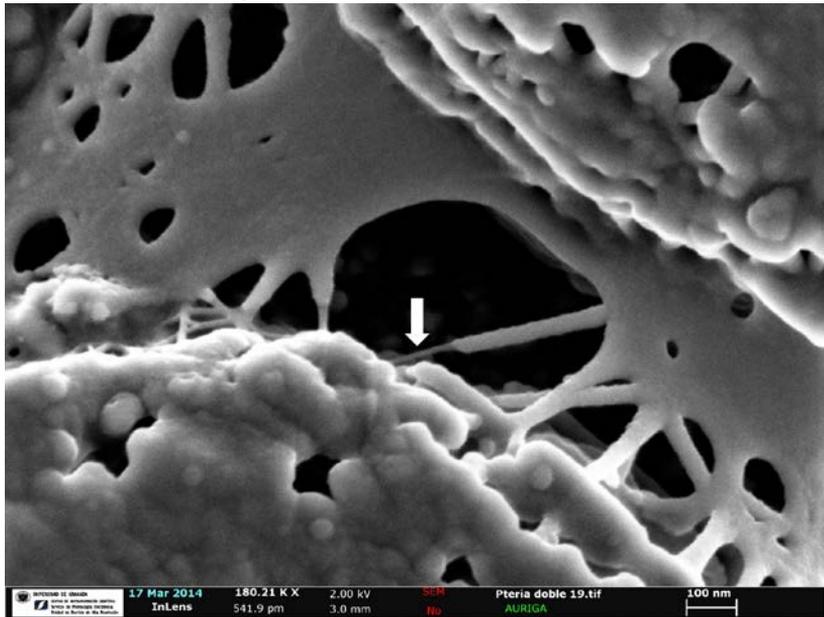


Fig. 61. *P. hirundo*. Membrana interlamelar entre plaquitas, mostrando fibras de tipo 1. En el centro de la imagen se observa cómo una fibra de tipo 1 pierde grosor hasta quedar en una fibra de tipo 2 (flecha), que muestra un contraste diferente.

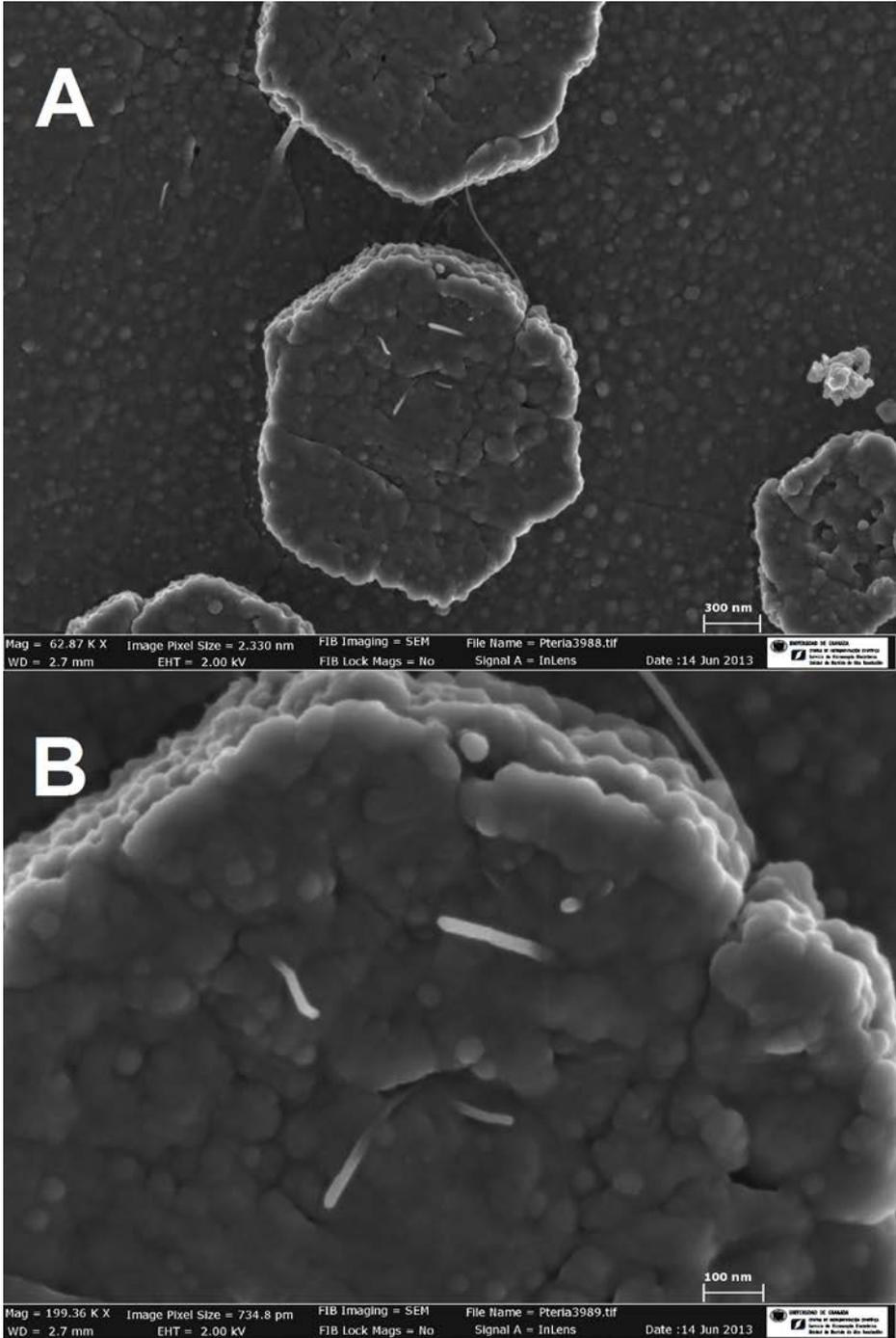


Fig. 62. *P. hirundo*. A Detalle. B Fibras de tipo 2 emergiendo del interior de una plaquita de nácar.

4.4.1.2.1.- IMMUNOGOLD

Mediante técnicas de inmunolocalización con oro coloidal, y observación en SEM, se puso de manifiesto la naturaleza de las fibras observadas.

A.-Control con quitinasa

En las muestras tratadas con quitinasa las plaquitas de nácar aparecen ligeramente dañadas y completamente desorganizadas, como si, literalmente, hubiesen perdido su fijación (Fig. 63). La corrosión observada se interpreta como debida parcialmente a la solución citrato utilizada (pH 5,5), pero el efecto de la quitinasa es evidente en la desorganización. La quitinasa es asimismo responsable de la ausencia de partículas de oro de 20 nm.

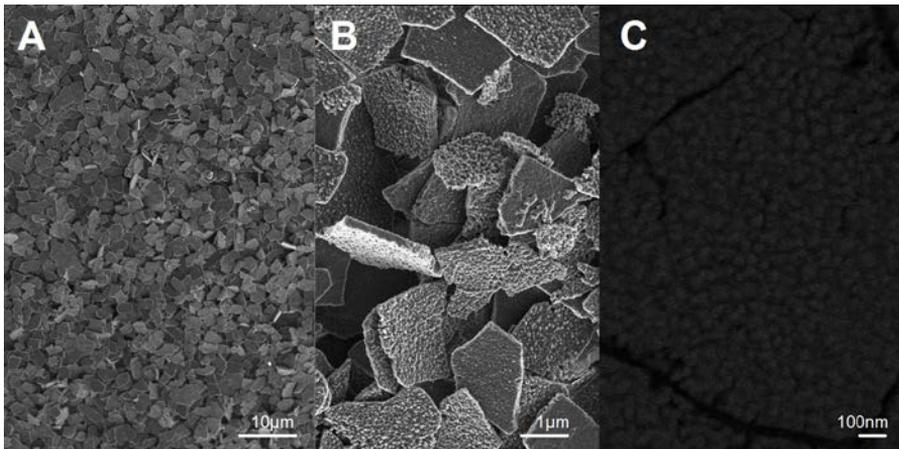


Fig. 63. P. hirundo. Control 1. Piezas control tratadas con quitinasa. La quitinasa se añade al tratamiento normal de una muestra experimental. La desorganización obtenida es muy evidente. A y B. Fotografías SEM en modo In-Lens con distinto aumento. Se aprecia una gran desorganización así como corrosión en las plaquitas. C. Detalle (modo ESB) para poner de manifiesto la ausencia de partículas de oro.

2.-Controles sin anti-lectina

Las muestras no tratadas con anticuerpos anti-lectina no mostraron uniones inespecíficas para ninguno de los dos controles en los que fueron utilizadas: Fig. 64 sin anticuerpo (para evaluar posibles uniones inespecíficas a la estructura), y Fig. 65 sin anticuerpo anti-lectina y sin proteinasa K (para evaluar posibles uniones inespecíficas a la proteína).

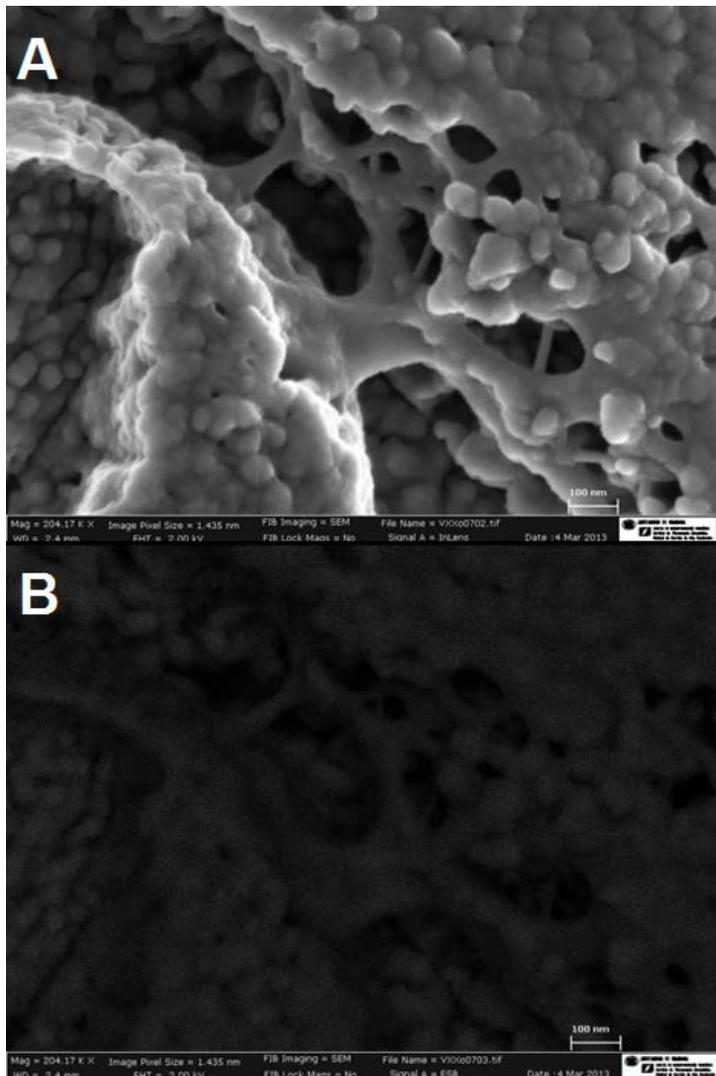


Fig. 64. *P. hirundo*. Control 2a) sin anti-lectina. A. In Lens, B. ESB.

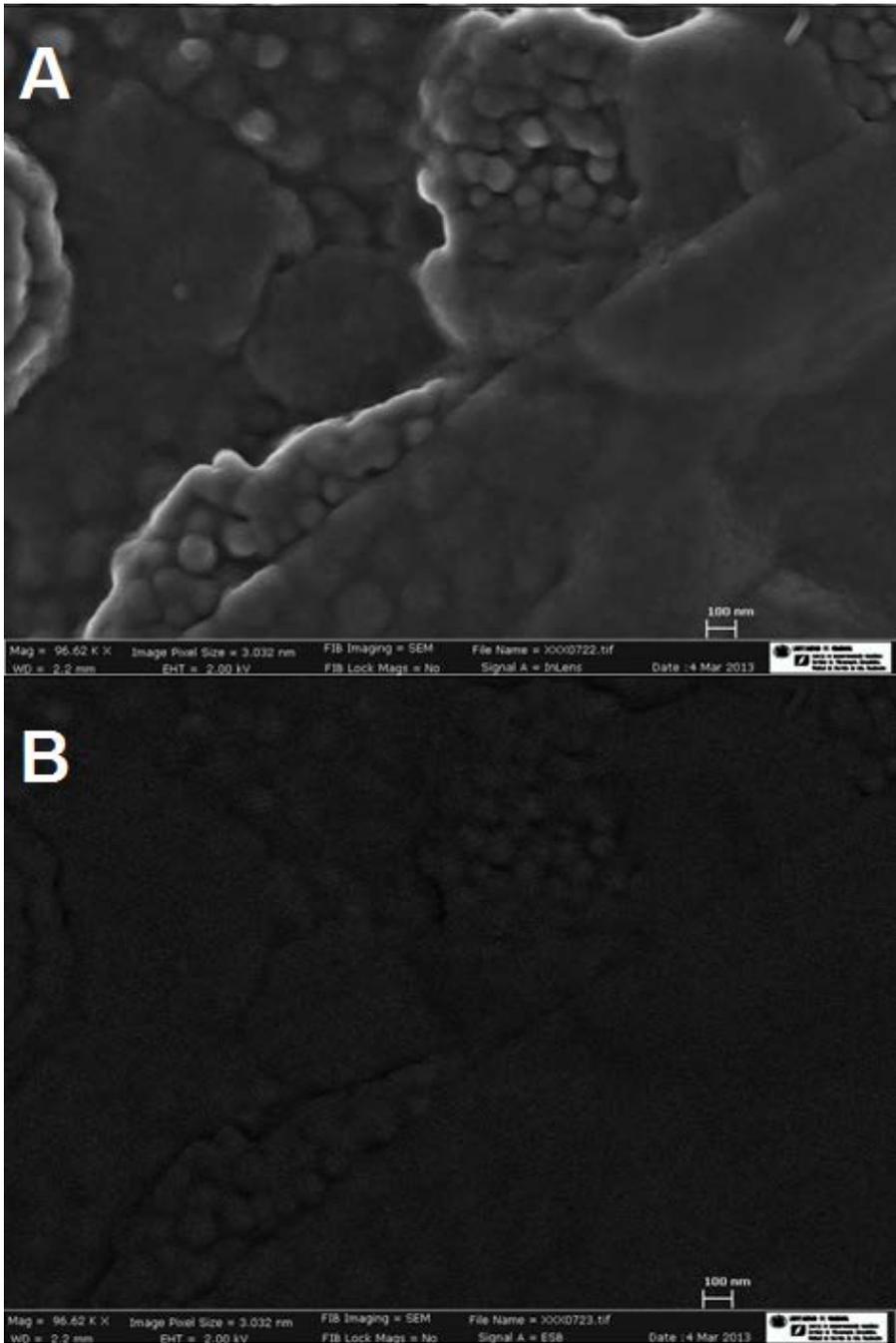


Fig. 65. *P. hirundo*. Control 2b) sin anti-lectina y sin proteinasa K. A. In Lens, B. ESB.

3.- Control sin proteinasa K

Los controles sin proteinasa K no mostraban marcaje para quitina (Fig. 66), lo cual sugiere que una eliminación ligera de la proteína que cubre las fibras de quitina (fibras de tipo 2) es necesaria para exponerlas a la unión de las lectinas.

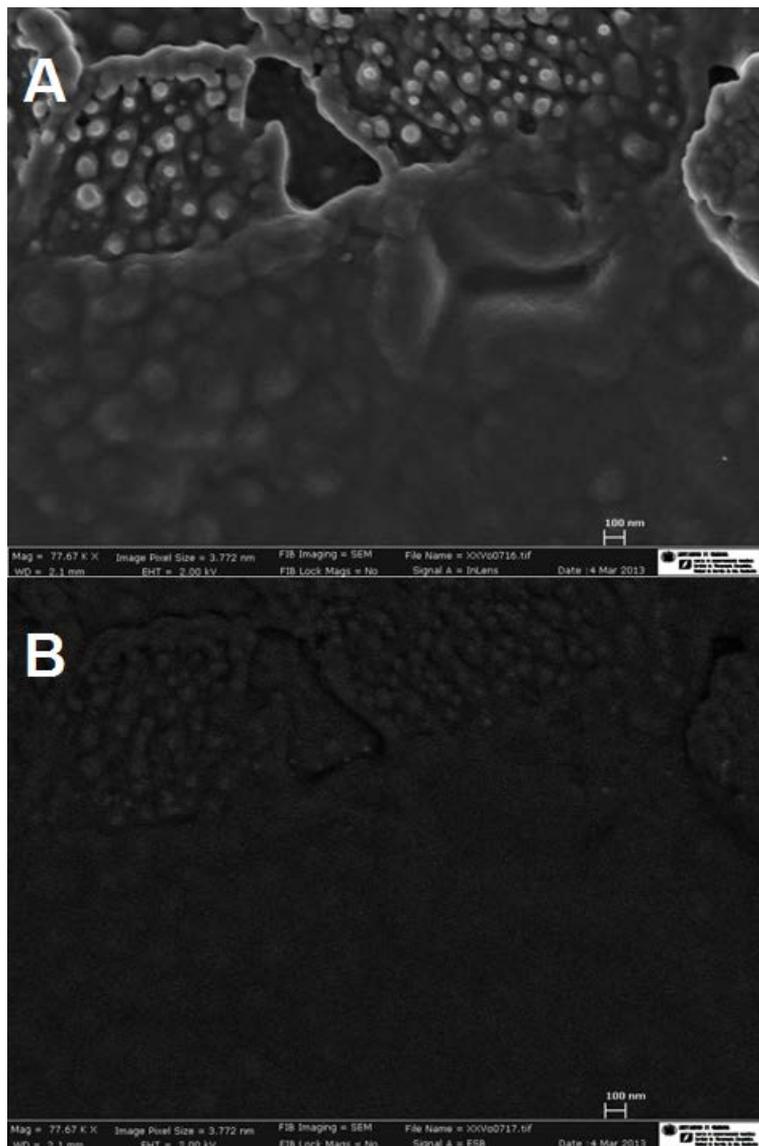


Fig. 66. *P. hirundo*. Control 3. Sin proteinasa K, A. InLens, B. ESB.

4.-Marcaje simple

Se utilizó oro coloidal de 20 nm para el marcaje de quitina. Las partículas de oro aparecen cubriendo la membrana orgánica, en ocasiones con un patrón de hilera (Fig. 67).

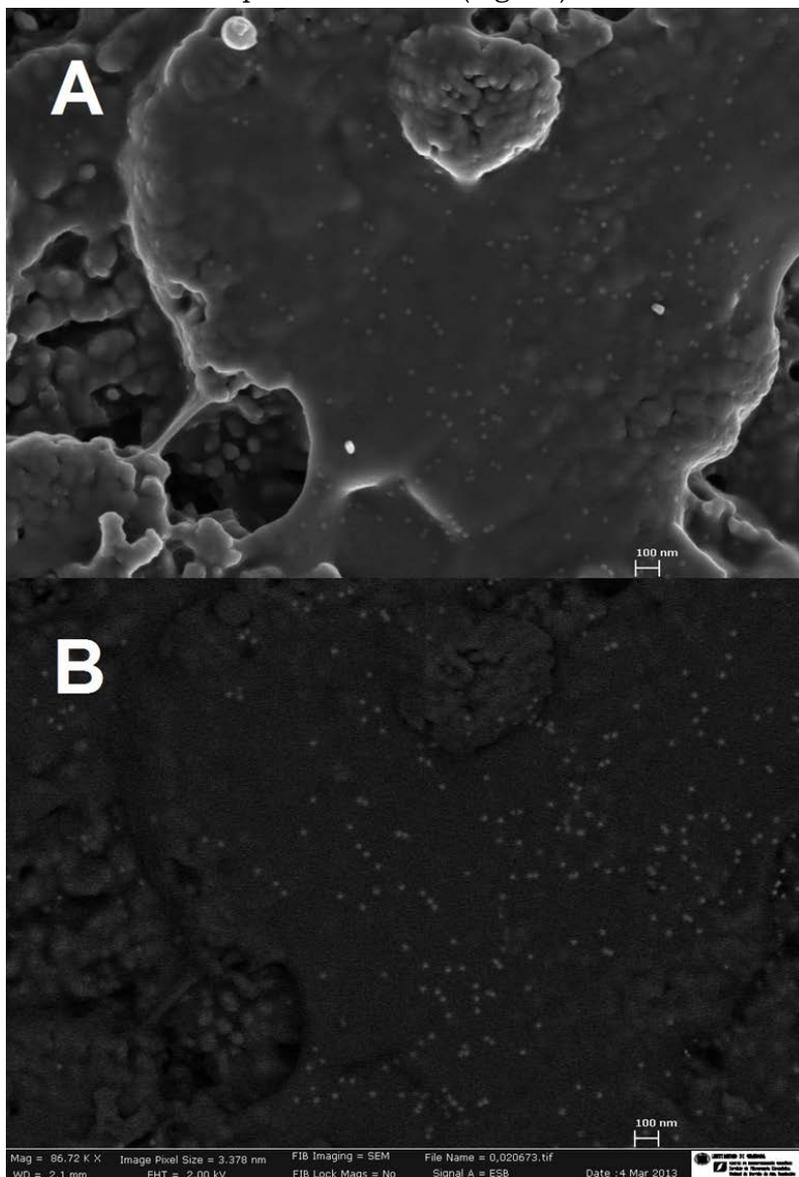


Fig. 67. *P. hirundo*. Marcaje simple. A. In Lens. B. ESB, donde se aprecia el marcaje con oro coloidal de 20 nm.

6.-Doble inmunogold.

Con el doble marcaje, las membranas interlamelares aparecen cubiertas de las pequeñas partículas de oro (10 nm) usadas para marcar proteínas (Fig. 68). Esto también ocurre tanto con la superficie de las plaquitas de nácar que se encuentran cubiertas por la membrana, como con las porciones de la membrana que conectan las plaquitas (fibras de tipo 1).

Las fibras de tipo 2 que se encuentran embebidas dentro de la membrana aparecen marcadas con partículas de oro de 20 nm, que marcan quitina (Figs. 69-71). Donde mejor se aprecia este marcaje es en aquellas zonas en las que la membrana interlamelar se extiende libre entre plaquitas de nácar, que es donde las fibras de tipo 2 son más evidentes.

En muchos casos queda patente cómo las partículas de oro de 20 nm se encuentran alineadas exactamente a lo largo de las fibras de tipo 2 (Figs. 69-71). Estas fibras marcadas pueden también verse sobre las plaquitas, pero las irregularidades de los gránulos de la superficie de la plaquita subyacente dificultan su reconocimiento.

Las intersecciones de las fibras de tipo 1 aparecen frecuentemente marcadas para quitina (con partículas de oro de 20 nm). Esto, junto con la existencia de fibras de tipo 2 emergiendo de las de tipo 1 (Fig. 61), indica que, como en el resto de la membrana interlamelar, las fibras proteicas (denominadas de tipo 1) pueden contener en su interior fibras de quitina (denominadas de tipo 2).

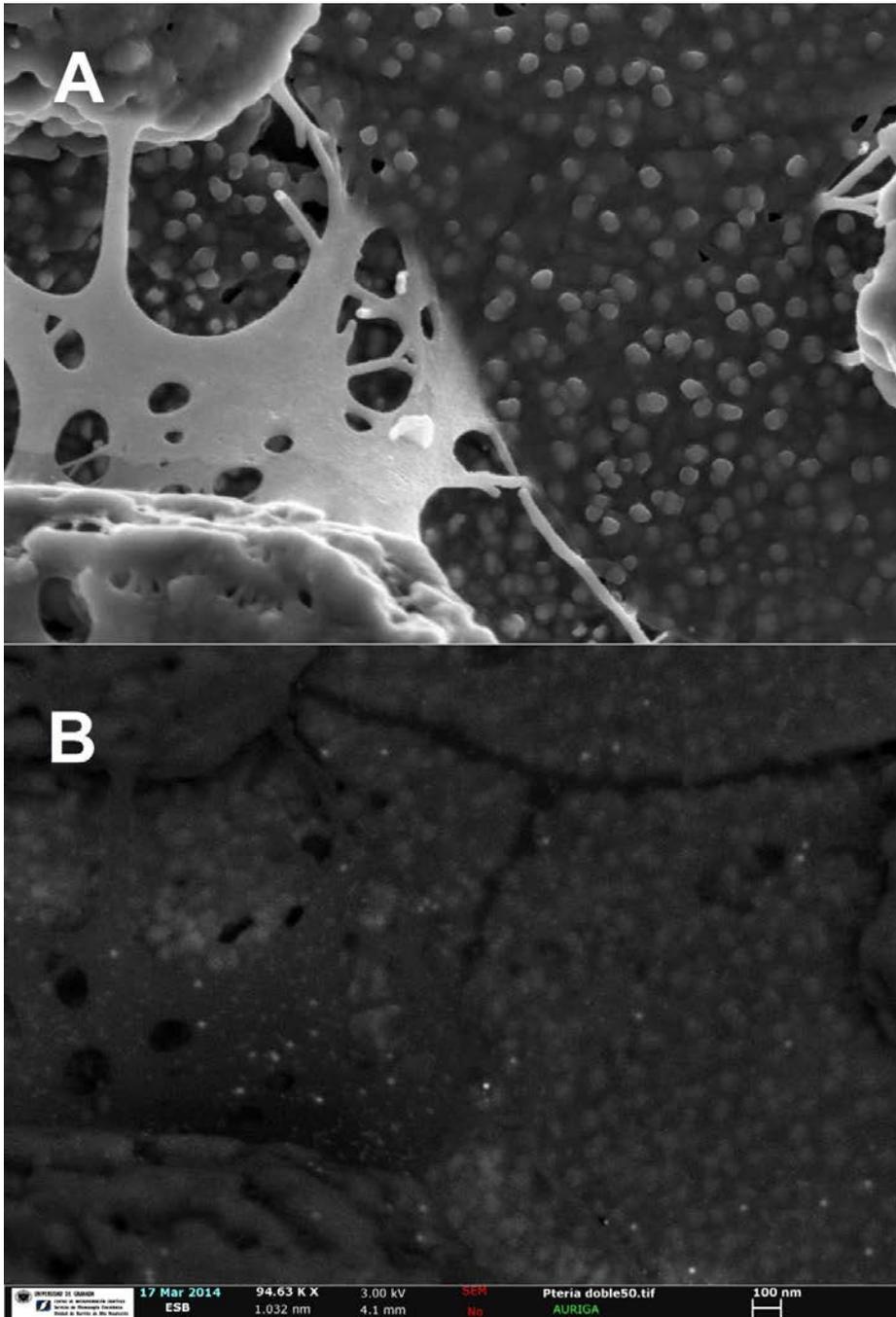


Fig. 68. *P. hirundo*. Doble Immunogold. A y B. Extensión de la membrana interlamelar mostrando abundante marcaje para proteínas (partículas de oro de 10 nm), así como cierto marcaje para quitina (partículas de oro de 20 nm). A. In Lens. B. EBS.

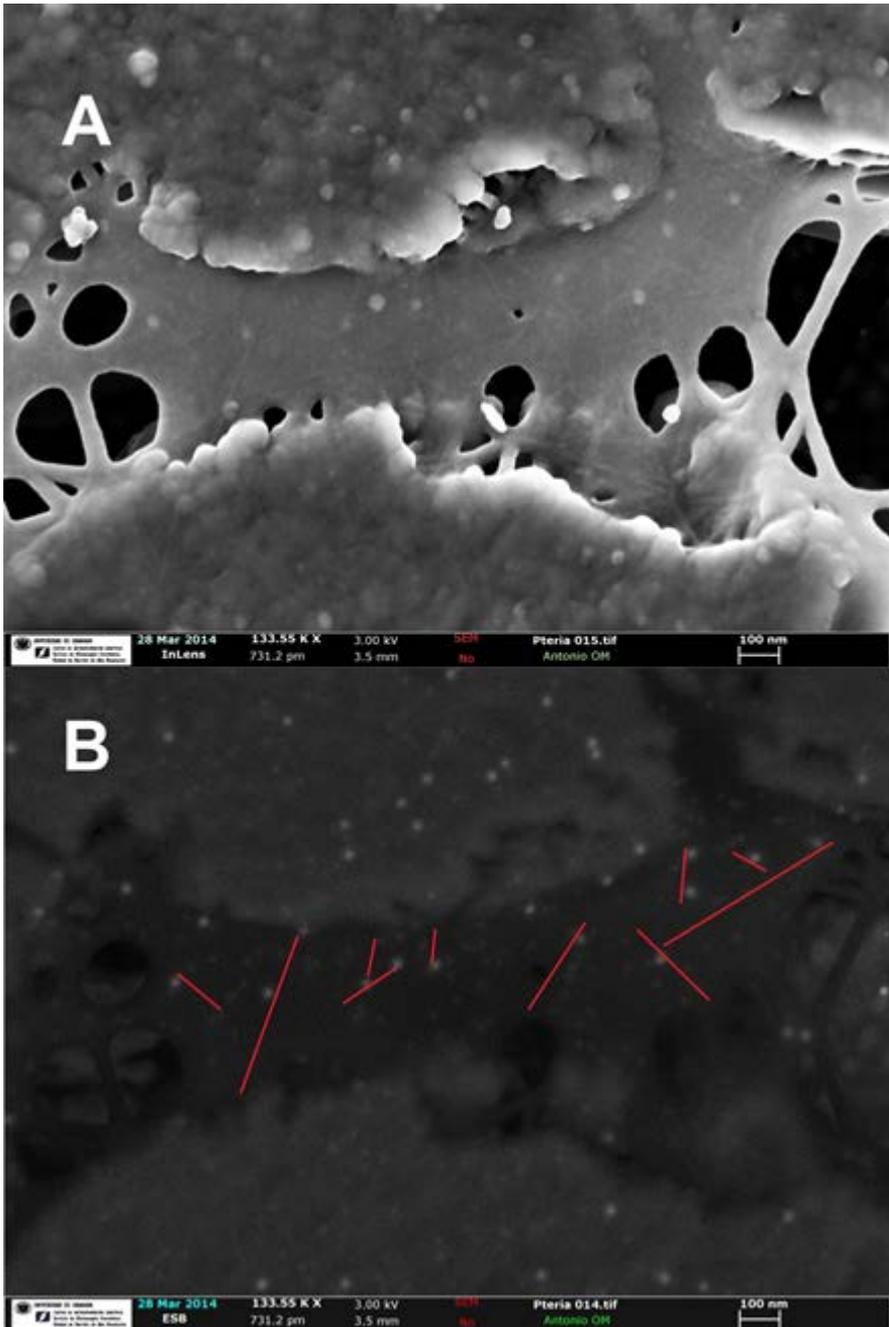


Fig. 69. *P. hirundo*. Doble inmunogold. A. In Lens. B. ESB, en que se marcan con líneas rojas las fibras de tipo 2 observadas en A.

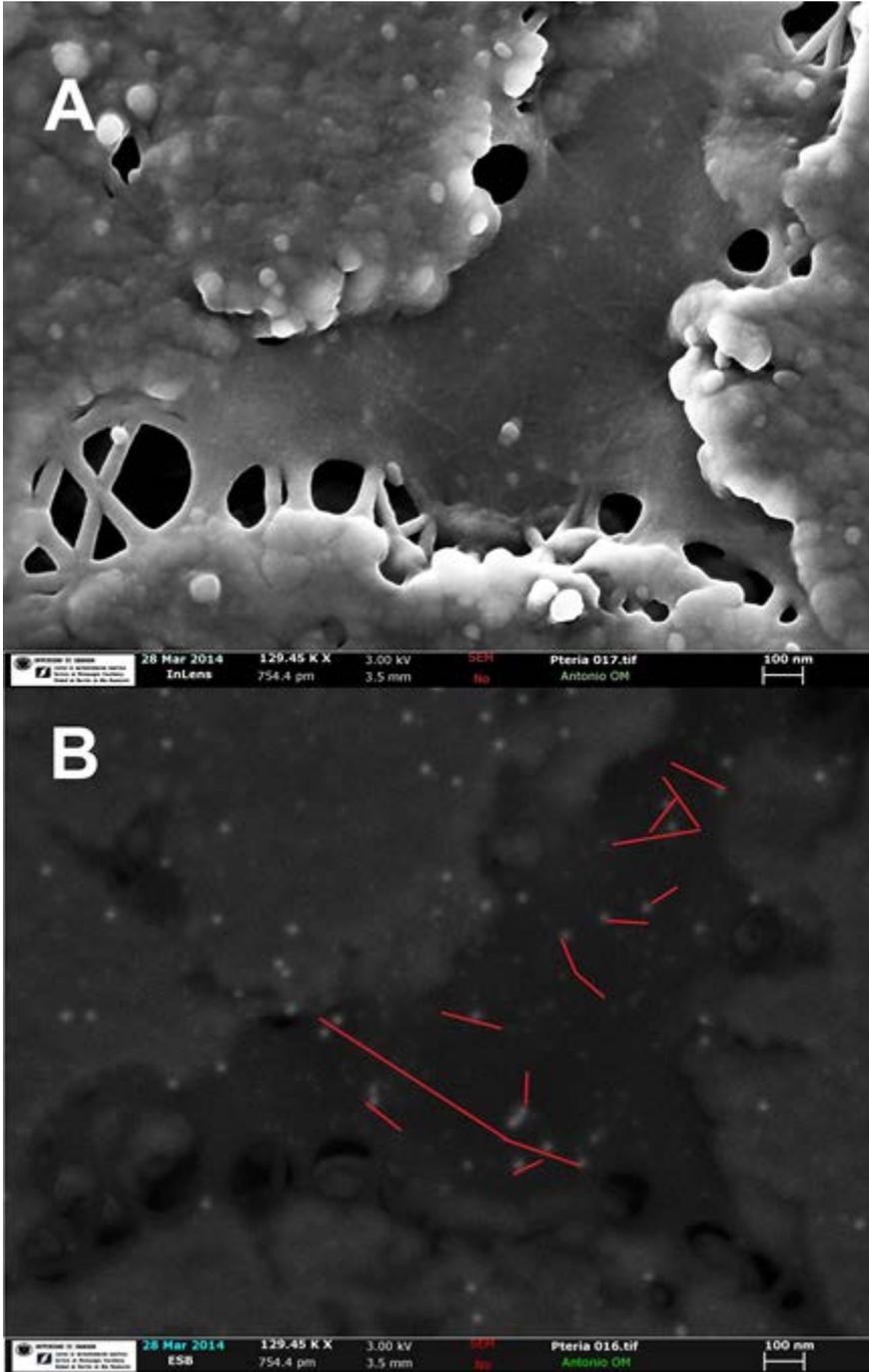


Fig. 70. *P. hirundo*. Doble inmunogold. A. In Lens. B. ESB, en que se marcan con líneas rojas las fibras de tipo 2 observadas en A.

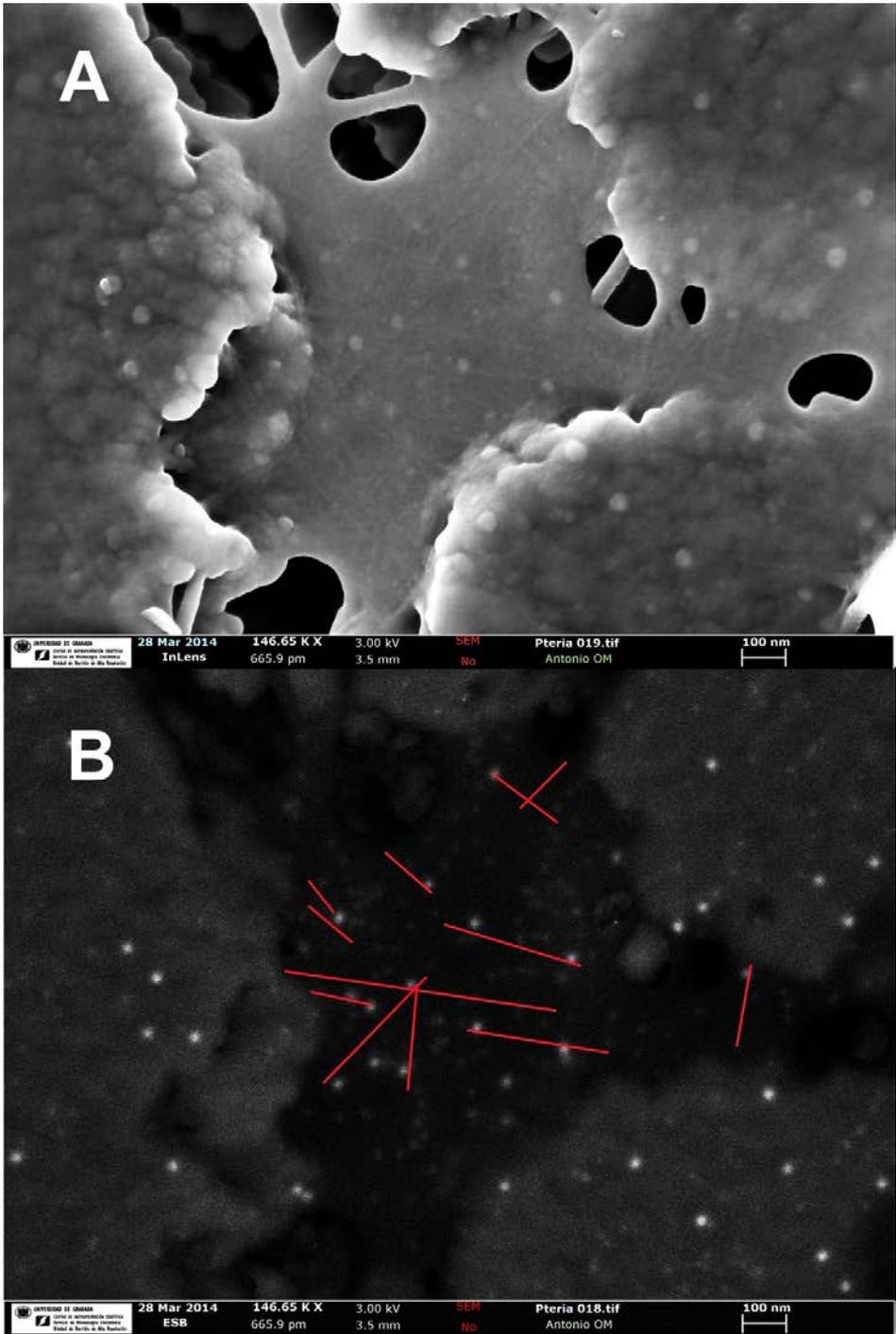


Fig. 71. *P. hirundo*. Doble inmunogold. A. In Lens. B. ESB, en que se marcan con líneas rojas las fibras de tipo 2 observadas en A.

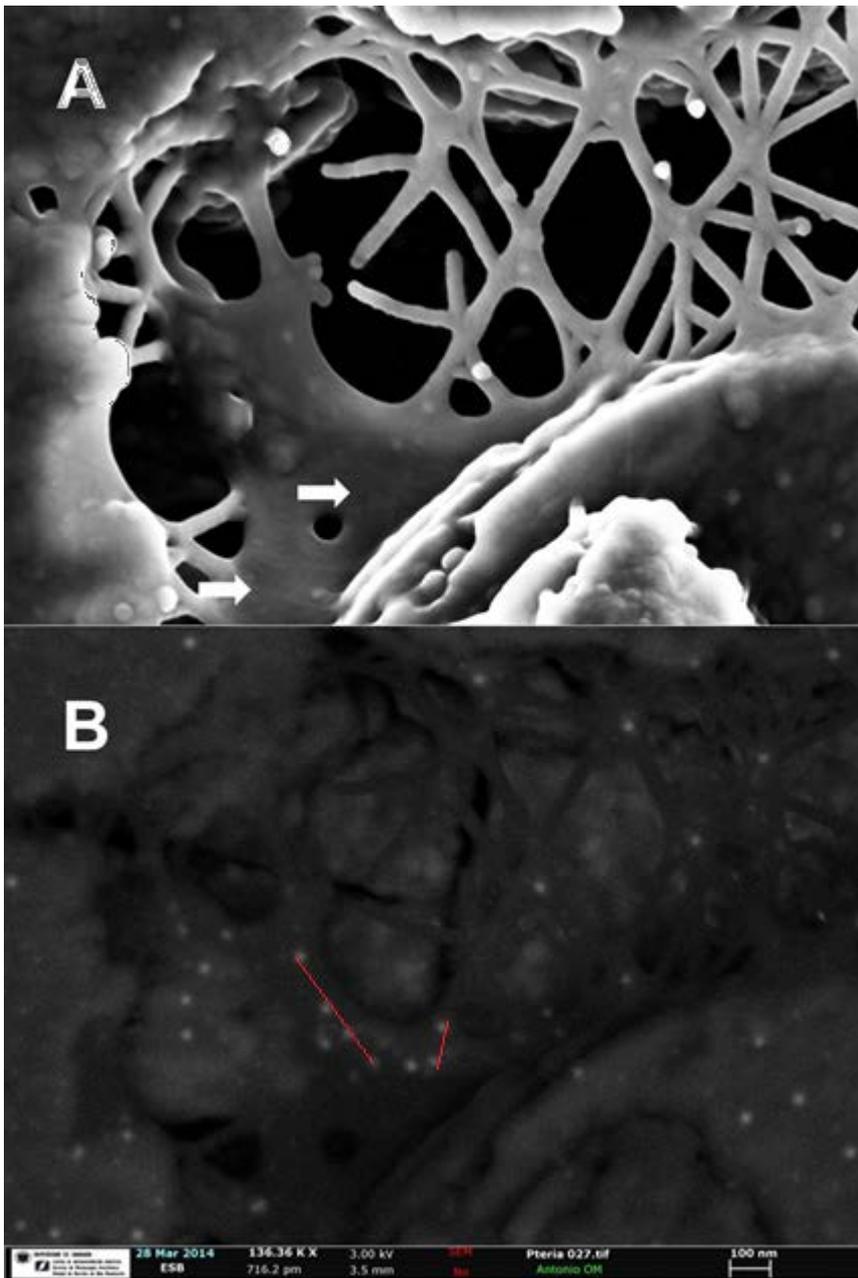


Fig. 72. *P. hirundo*. Doble immunogold. A. In Lens. B. ESB. Puntos de intersección en los cruces de fibras de tipo 1 marcados con partículas de oro de 20 nm. Se observan débilmente algunas fibras de tipo 2 en la membrana de la zona inferior izquierda de A (flechas), así como partículas de oro de 20 nm alineadas a lo largo de algunas de estas fibras (rojo). A. In Lens. B. ESB.

Las pruebas experimentales con partículas de concha, se llevaron a cabo con la intención de exponer y marcar las fibras intracristalinas de tipo 2 observadas mediante SEM (Fig. 73). Sin embargo, ha sido imposible marcarlas usando nuestro método, probablemente debido a que solo aparecen en relativamente pocos de los pequeños fragmentos.

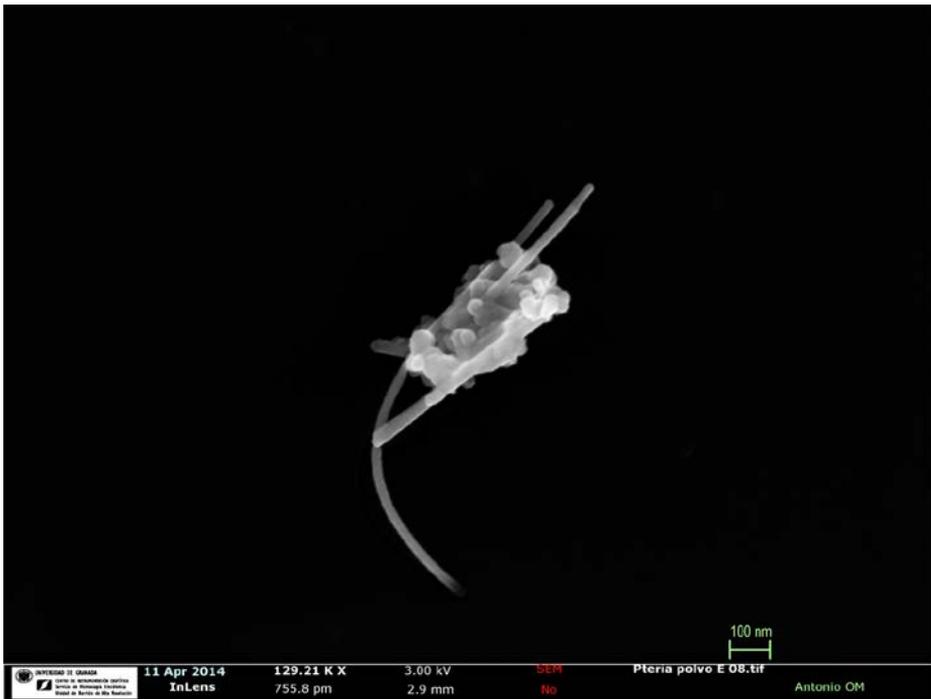


Fig. 73. P. hirundo. Fibras de tipo 2 en un pequeño fragmento de nácar obtenido por raspado.

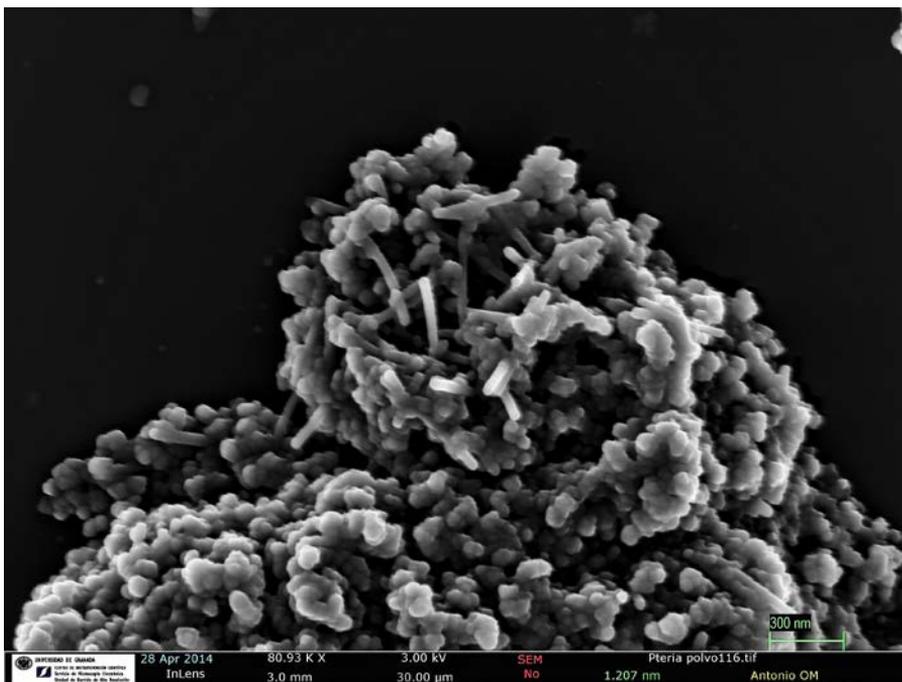


Fig. 74. *P. hirundo*. Fibras de tipo 2 emergiendo de un fragmento de nácar obtenido por raspado.

4.4.1.2.2.- ESTRUCTURAS DE DISOLUCIÓN

Las muestras de *P. hirundo* tratadas con altas concentraciones de proteinasa K mostraron alineaciones vermiformes, similares a las encontradas por Mutvei [55-58] y Mutvei y Dunca [89, 90]. Estos patrones vermiformes recorren toda la superficie de las tabletas, y son paralelos entre sí.

Las alineaciones pueden aparecer fusionadas o divididas, dando un aspecto de continuidad serpenteante (al fusionarse alineaciones paralelas de distintos niveles), su grosor varía entre los 40 y los 120 nm. En Checa et al. [84] se las denominó por ello vermiculaciones (*vermiculations*) (Fig. 75).

Algunas de las muestras no tratadas con proteinasa, y solo ligeramente atacadas con lejía, tienen la superficie de las plaquitas cubierta con nanopartículas globulares alineadas (entre 20 y 120 nm de diámetro) a lo largo del diámetro total de la tableta. Estos alineamientos muestran exactamente el mismo patrón de

irregularidades y tamaños que las vermiculaciones observadas en las muestras tratadas. En algunos casos, los nanogránulos encontrados en la superficie de las tabletas habían crecido aislados, y mostraban unos contornos claramente pseudo-hexagonales, pudiendo ser por ello calificados como nanocristales [84] (Fig. 77). Estos “nano-pseudo-hexágonos” pueden ser más grandes que los nanogránulos (hasta 200 nm), y a veces divergir en 60° o 120°, algo que sugiere una naturaleza de nano-maclas policíclicas.

Las muestras de *Pinna nobilis* y *Pteria hirundo* tratadas con proteinasa K mostraban un patrón típico en reloj de arena en bajo relieve. Las tabletas de *P. nobilis* tienen una inusual forma rectangular [84, 85] (Fig. 76). En *P. hirundo* estas áreas aparecen alineadas con el eje corto de las tabletas, con formas triangulares incipientes. En *P. nobilis*, cuando dos tabletas en la misma orientación se encuentran y se intersectan, la unión resultante es invariablemente paralela a los lados de los triángulos (planos 110). Esto se interpreta debido a que las relaciones laterales de las plaquitas rectangulares de esta especie muestran la relación a/b de la celdilla unidad del aragonito; $4.959/7.968=0.622$ [55].

En *P. hirundo* se encuentra un relieve vermiculado, con la elongación general orientada de forma perpendicular al eje en el que se unen los dos triángulos (Fig. 75).

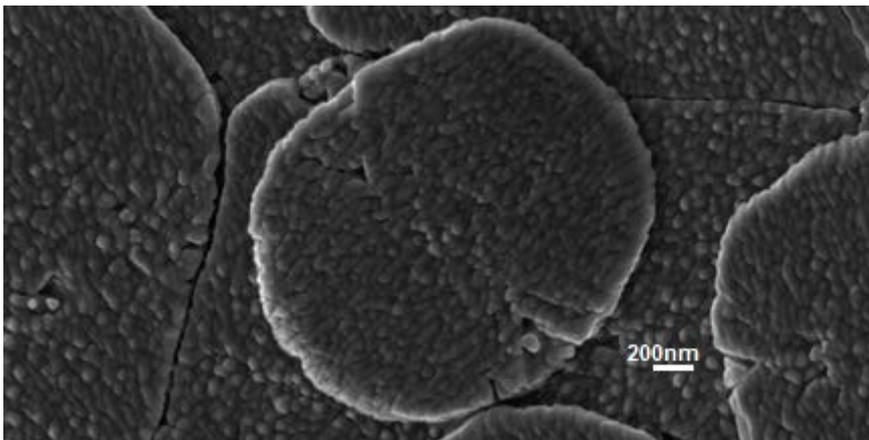


Fig. 75. *P. hirundo* tratada con proteinasa (0,2 g/ml., 1h). Con vermiculaciones muy evidentes, así como muescas triangulares en los bordes perpendiculares a la dirección de crecimiento de las vermiculaciones.

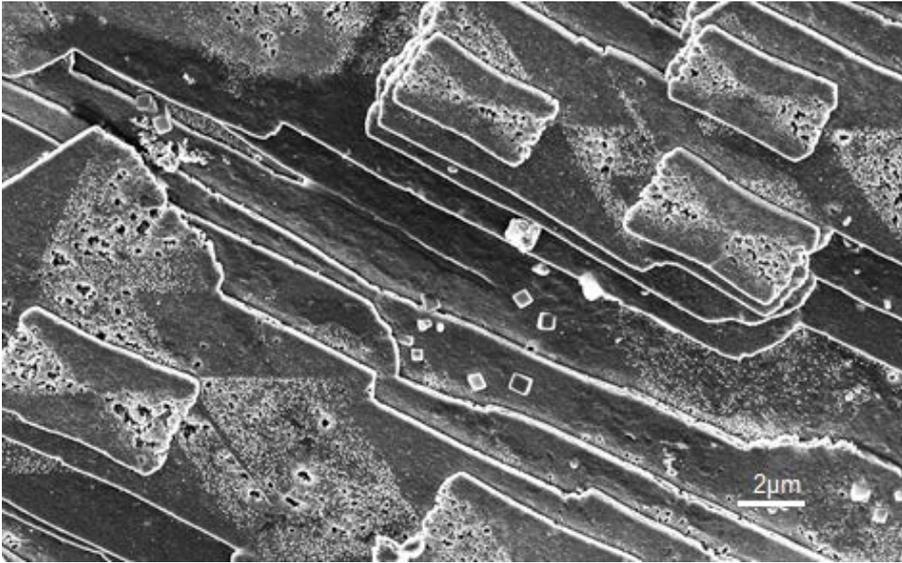


Fig. 76. Tabletas rectangulares de P. nobilis, tratadas con proteinasa (0,2 g/ml., 1 h). Patrones de reloj de arena formados tras el tratamiento.

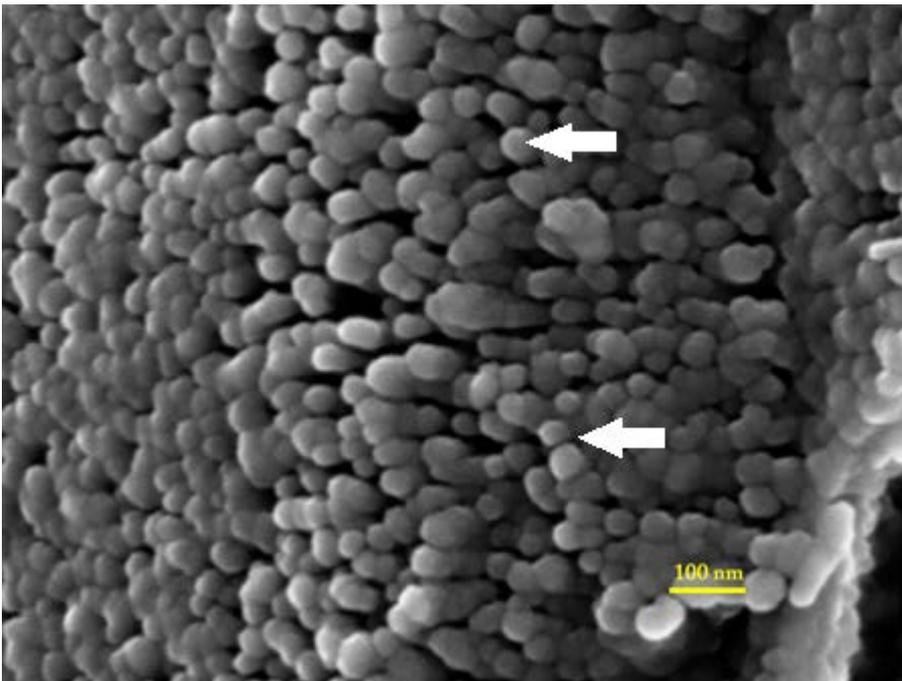


Fig. 77. Tableta de P. nobilis, tratada con proteinasa (0,2 g/ml., 1 h). Gránulos con aspecto cristalino (flechas).

4.5.-Discusión

4.5.- DISCUSIÓN

4.5.1- DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE QUITINA EN NÁCAR

Se abordó por distintos procedimientos la puesta en evidencia de fibras de quitina en conchas nacaradas, usando para ello muestras de *Pteria hirundo*, *Neotrignonia bednalli* y *Haliotis rufescens*.

A lo largo de la investigación, dada la utilización de una perspectiva tanto estructural como bioquímica, el estudio ha requerido la adaptación de algunas técnicas. Las técnicas bioquímicas suelen requerir la alteración estructural de la muestra, y está claro también que un análisis estructural puede dañar los componentes orgánicos en alguno de sus pasos (fijación, altas temperaturas, pH, etc). Es por ello que, en la discusión de los resultados obtenidos, se tratarán las modificaciones realizadas en los procedimientos que hemos seguido, pues la puesta a punto de una metodología adecuada es básica para conseguir datos que puedan ser reproducibles.

El diseño experimental comenzó con la observación en microscopía confocal de muestras tratadas con lectina de germen de trigo (WGA), ligada a isotiocianato de fluoresceína para detectar fluorescencia en caso positivo, tal y como se muestra en la Figura 53 para el caso de *Haliotis rufescens*. No se evidenció fluorescencia cuando la muestra había sido previamente tratada con quitinasa (Fig. 54). Las otras dos especies, *Pteria hirundo* y *Neotrignonia bednalli*, ofrecieron los mismos resultados. Ello demuestra la presencia de quitina en las membranas intertabulares, tanto en bivalvos como en gasterópodos, como ya había sido puesto en evidencia por Bezares [97]. Pese a los buenos y evidentes resultados obtenidos en esta parte, las limitaciones de resolución propias de esta técnica nos impidieron alcanzar el objetivo de visualizar las fibras de quitina descritas por Levi Kalisman [83] y otros [34, 97]. Sus pequeños tamaños, de tan solo unas decenas de nanómetros, requieren el uso de microscopía electrónica de alta resolución.

En la publicación de Levi-Kalisman et al., se estableció el modelo vigente de distribución de quitina en las membranas interlamelares. Este estudio se llevó a cabo sobre conchas

desmineralizadas, de forma que su disposición original se perdía durante el proceso. Dado que nuestro interés radicaba en la observación e identificación de las fibras en su orientación original, en condiciones lo más cercanas posible a las naturales, se decidió que la experimentación y la posterior observación debían realizarse directamente sobre membranas interlamelares de conchas sin desmineralizar.

Es por ello que se estudió en detalle la microestructura nacarada en SEM, focalizándonos en la detección de fibras situadas entre las placas de nácar que pudieran ser de quitina.

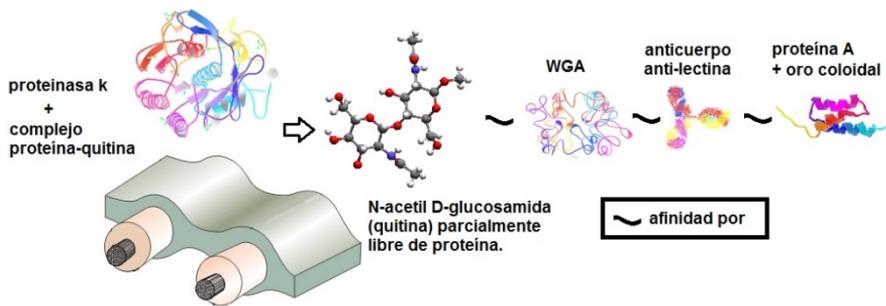


Fig. 78. Secuencia seguida en el marcateo mediante Immunogold para las muestras experimentales.

Numerosas y detalladas observaciones usando immunogold para quitina (Fig. 78) y para proteínas, nos confirmaron la existencia de dos tipos de fibras diferentes en ubicación, tamaño y morfología, a las que se denominó como fibras tipo 1 y tipo 2.

Las fibras tipo 1 se localizan formando un entramado que es la continuación de la membrana interlamelar en los espacios entre plaquitas en crecimiento (Figs. 59-61). Es llamativo el hallazgo de fibras de tipo 1 de las que aparentemente emergen fibras de tipo 2 (Fig. 61).

El tamaño y apariencia de las fibras de tipo 2 son ligeramente diferentes a las descritas por Levi-Kalishman et al. (siendo mucho más estrechas y largas las aquí encontradas), pero la mayor diferencia se apreció en su organización. En lugar de encontrarlas coorientadas y empaquetadas, se detectan completamente desorientadas en la membrana interlamelar (Figs.

69-71). También pueden hallarse incluidas en los propios cristales (Figs. 62, 73, 74). La mejor visualización de las fibras de tipo 2 se ha logrado en aquellas zonas de la membrana interlamelar que se encuentran entre plaquitas de nácar, es decir, aquellas zonas de la membrana que no están descansando sobre la superficie del aragonito (Fig. 69-71). La superficie de las plaquitas de nácar, muy irregular y granulada, impide que las fibras de la membrana suprayacente se puedan ver con claridad (lo que sólo ocurre ocasionalmente, Fig. 72A), algo que no evitó sin embargo su marcaje.

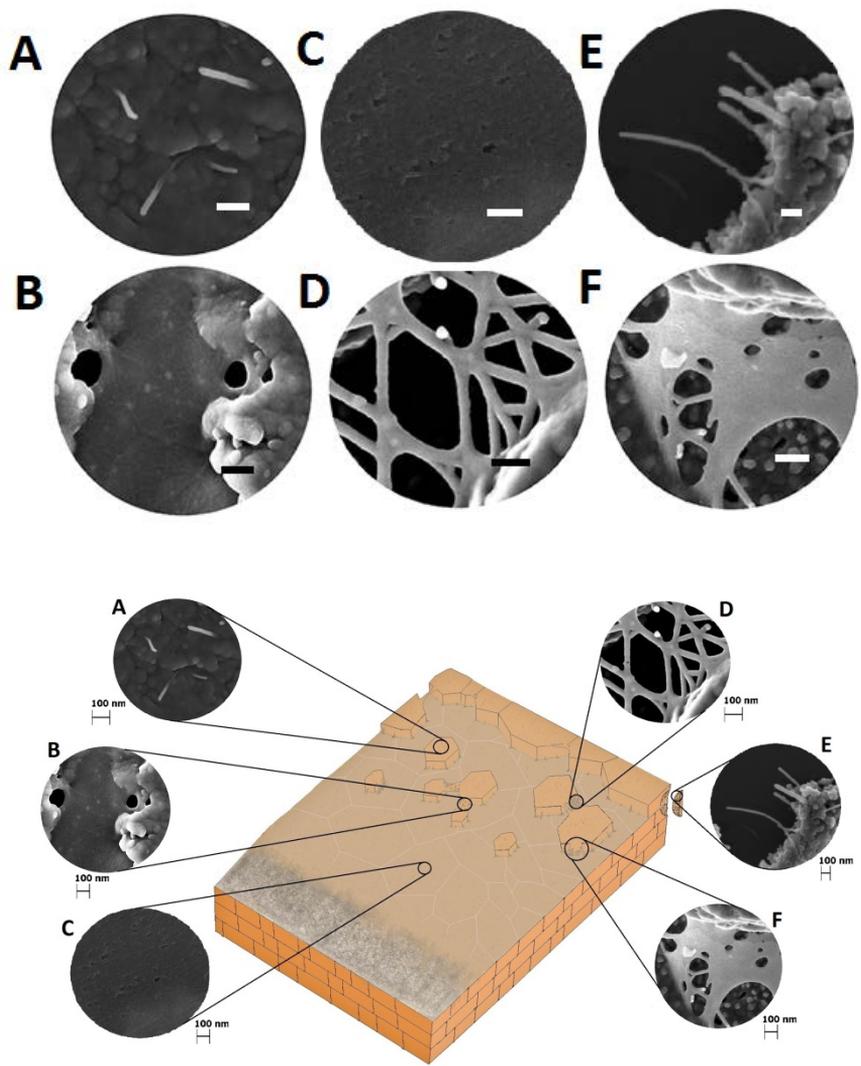


Fig. 79. Esquema que representa el aspecto del nácar deshidratado de Pteria hirundo. Muestra la membrana interlamelar superior descansando sobre la superficie del nácar, tal y como se observa en SEM. Los detalles resaltados son; A. Fibras de tipo 2 atravesando las placas de nácar. B. Membrana interlamelar entre placas con fibras de tipo 2 visibles. C. Membrana interlamelar inalterada. D. Fibras de tipo 1 entre placas. E. Fibras de tipo 2 en un fragmento obtenido mediante raspado. F. Zona en que la membrana interlamelar se deshace en fibras de tipo 1.

La detección por inmunogold se realizó con tres tipos de controles:(1) con quitinasa, (2) sin anti-lectina y (3) sin proteinasa K.

La desorganización apreciada en las muestras tratadas con quitinasa (Fig. 63) se interpretó como debida a la acción deletérea conjunta de la quitinasa y de la solución de citrato usada, cuya acidez (pH 5,5) pudo haber dañado también al nácar, corroyendo la superficie de las plaquitas.

En las muestras sin anticuerpo anti-lectina no se observó marcaje, lo que demuestra la inexistencia de uniones inespecíficas, tanto si se elimina el tratamiento con anticuerpo (Fig. 64), como si se elimina asimismo el tratamiento con proteinasa K (Fig. 65).

Tras ello llevamos a cabo el inmunogold en ausencia de tratamiento con proteinasa K, dejando por ello inalteradas las proteínas presentes en la muestra (Fig. 66). En estas condiciones experimentales no detectamos marcas de quitina, lo cual mantiene la hipótesis de que las fibras tipo 2 están rodeadas por proteínas. Por lo tanto, es preciso el tratamiento con la proteinasa para exponer las fibras tipo 2 a la unión de las lectinas.

Los anticuerpos utilizados se habían desarrollado frente a proteínas de la matriz orgánica soluble (al ácido acético) de otras especies de moluscos, como son *Pinctada margaritifera* y *Pinna nobilis*, pero era bien conocida la gran reactividad cruzada que muestran con *Pteria hirundo*. El marcaje de proteínas usado destaca tanto la superficie de la membrana interlamelar como las fibras de tipo 1. Las fibras de tipo 1 son sin duda un artefacto formado a partir del deshilachado de la membrana interlamelar.

Nuestro trabajo demuestra más allá de toda duda que la quitina (β -quitina según Weiner y Traub [94]) es un componente esencial de las membranas interlamelares. Sin embargo, los intentos de eliminar completamente las proteínas con el fin de mostrar el aspecto de la quitina han sido vanos. Esto parece deberse al hecho de que ambos componentes forman complejos quitina-proteína [98], para los que existen algunos modelos en artrópodos [99]. La estimación del porcentaje de quitina comparado con la fracción orgánica total varía mucho de unos trabajos a otros, pero siempre

presenta valores inferiores al 7% [97, 100, 101]. Es interesante el hecho de que los valores más bajos (publicados por Goffinet y Jeuniaux en 1979 [100]) son para dos especies de *Pinctada* (*P. margaritifera*, 0,17%; *P. galtsoffi*, 0,19%), que es un género de la familia Pteriidae, a la cual pertenece la especie aquí utilizada para el marcaje, *Pteria hirundo*.

Teniendo en cuenta estos datos, es evidente que el entramado que otros autores han adjudicado a las fibras de quitina de la membrana interlamelar tanto en bivalvos [97] como en *Haliotis* [102] tras tratamiento con proteinasa, debía contener todavía altas concentraciones de proteínas. En base a ello, las conclusiones acerca del alto grado de alineamiento de las fibras de quitina en membranas interlamelares tratadas con proteasa [103], deberían tomarse con precaución. Estos resultados nos llevan a cuestionar que el entramado residual refleje la distribución real de la quitina.

Por otro lado, las imágenes de fibras similares obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) de Schäffer [82] y Bezares [97], con diámetros de 5-10 nm, encajan mejor con lo que se espera de la quitina, basándonos en las fibras de tipo 2 que hemos observado. La escasa cantidad de quitina medida en la matriz [100] explica por qué nuestros tratamientos prolongados con proteinasa eliminaban completamente las membranas interlamelares, así como por qué al tratar con quitinasa nos encontramos con una fuerte desorganización del nácar (Fig. 63). Algo que no queda tan claro es por qué en los bivalvos estudiados por Nudelman [104] solo el tratamiento con quitinasa conducía a la eliminación total de las membranas interlamelares.

En resumen, las membranas interlamelares del nácar consisten en fibras muy finas de β -quitina (nuestras fibras de tipo 2) cubiertas por proteínas (fibras de tipo 1), mediante unión covalente y formando complejos. De acuerdo con el aspecto de las membranas sin tratar, esta matriz debe de estar incluida en una matriz proteica adicional (Fig. 80).

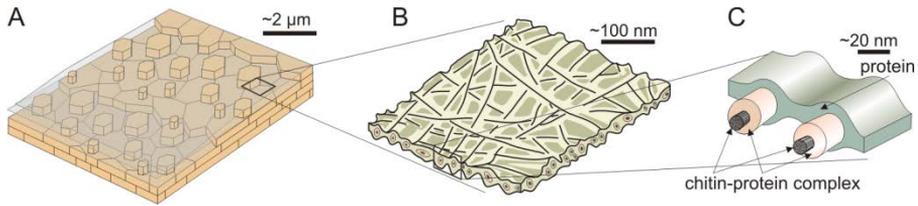


Fig. 80. Esquema de la ultraestructura de las membranas interlamelares del nácar. A. Estructura general del nácar de bivalvos. Las plaquitas se ordenan en terrazas y la membrana interlamelar se extiende por encima de la última lámina formada, más allá del frente de crecimiento de la propia lámina. B. Estructura general de una membrana interlamelar. Tiene aspecto fibroso, con fibras largas aparentemente desorientadas que se extienden por el interior de la membrana. C. Detalle de la ultraestructura de la membrana interlamelar. Se compone de fibras proteicas que rodean a un núcleo de quitina, formando un complejo quitina-proteína. La red está embebida en una matriz proteica adicional.

Aún queda mucho por desvelar acerca de la ultraestructura de las membranas interlamelares, como los diámetros, longitudes y anchuras exactas, o las relaciones (distribución, alineamientos, y entrelazamientos) entre las fibras. El modelo más ampliamente aceptado para la estructura de las membranas interlamelares del nácar es el ya mencionado de Levi-Kalisman et al. [83], quienes proponen que las fibras de quitina están densamente distribuidas, y altamente ordenadas dentro de las membranas interlamelares. Nuestra nueva evidencia en *Pteria hirundo*, así como evidencias previas en otros grupos (principalmente en bivalvos y gasterópodos), parecen demostrar sin embargo que las fibras de quitina están fuertemente desorganizadas en el plano de la membrana. De acuerdo con ello, el modelo de Levi-Kaslیمان et al. [83] debe ser reconsiderado.

Cartwright y Checa [34] tuvieron en consideración esta desorganización de las fibras, cuando propusieron la formación de las membranas interlamelares por medio de un cristal líquido. En su modelo se sugiere que la membrana interlamelar tiene su origen en un entramado de fibras de quitina. De la interacción entre dichas fibras, emerge un comportamiento propio de la fase colestérica de un cristal líquido. Probablemente esta interacción se dé entre fibras formadas por el complejo quitina-proteína, antes de ser cubierto por el resto de proteínas de la membrana interlamelar. Los elementos constituyentes de un cristal líquido en fase colestérica se ordenan

por capas, estando las fibras de cada una de las capas giradas respecto a la anterior. Esto resulta en un patrón espiral con un eje perpendicular al plano de las membranas. En el caso del nácar, Cartwright y Checa [34] compararon la ordenación con la de un “logjam” (Fig. 81), la situación que se da en un río que arrastra los troncos de los árboles talados cuando se produce un atasco. Los troncos, arrastrados por la corriente, interaccionan entre ellos, chocando unos con otros, hasta alcanzar un punto de equilibrio donde quedan encajados entre sí sin más posibilidad de movimiento. Ello es debido a que las fibras del complejo quitina-proteína no llegan a alcanzar una ordenación de fase colestérica, ya que previamente el proceso quedaría bloqueado por la maduración de la membrana interlamelar debido a la agregación de proteína.



Fig. 81 “Logjam” en Dalles del río St. Croix en el Interstate Park de Minnesota-Wisconsin (EEUU). Fotografía de 1886.

De este modo la membrana interlamelar incompleta estaría compuesta tan sólo por un conjunto de fibras, formadas por el complejo quitina-proteínas, que interaccionan entre sí. Poco a poco, al ir madurando, una fracción proteica extra comenzaría a rellenar los espacios entre las fibras y a cubrirlas, hasta paralizar por completo el proceso de organización de la fase colestérica.

Según mostraron Nakahara [93] y Cartwright & Checa [34] las membranas interlamelares recién formadas (supuestamente compuestas sólo por el complejo quitina-proteínas) se encuentran separadas por unos escasos 90 nm. A medida que las membranas se alejan del frente de crecimiento, es decir, con la maduración de la membrana, la situación cambia. Las fuerzas que actúan en el complejo quitina-proteína, y las proteínas que lo cubren, provocan una separación paulatina de las membranas, hasta un espaciado habitual de entre 300 y 500 nm, debido a repulsión electrostática [34]. Los cristalitas de nácar continúan luego creciendo dentro del espacio entre las membranas interlamelares, a través de grandes poros en las membranas (puentes minerales). Si durante el proceso inicial, alguna de las fibras no se une a la membrana inferior o superior, y queda libre en el espacio entre dos membranas interlamelares, será absorbida por las plaquitas de nácar durante su crecimiento, o quedará incluida en las membranas intertabulares. De esta forma se explica la observación de fibras de quitina intracristalinas mediante SEM, así como gran parte de la tinción observada en los experimentos con microscopía confocal.

4.5.2.- ESTRUCTURAS DE DISOLUCIÓN

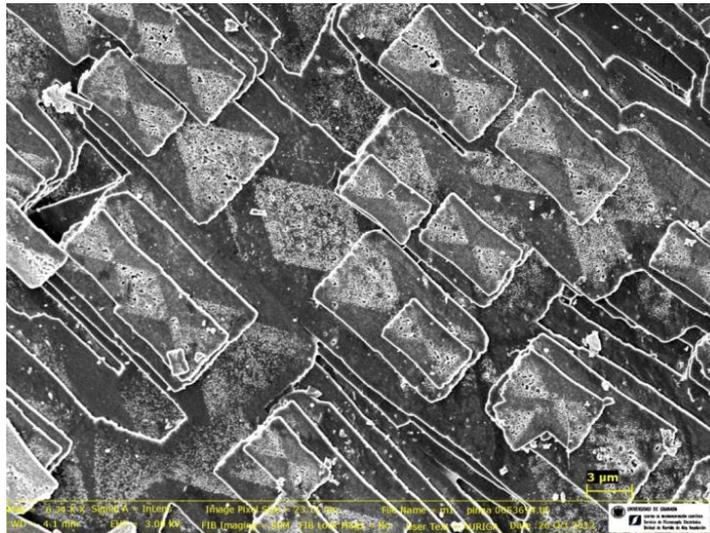


Fig. 82. Patrón de “reloj de arena” en *Pinna nobilis*. (Tratamiento con 0,2 g/ml. de proteinasa K).

Se ha constatado que las tabletas de nácar tienen una subestructura de aspecto granular. Los gránulos son de tamaños variables, oscilando entre los 20 y los 120 nm. Se ha podido apreciar un aspecto globular, aunque en algunos casos los gránulos tienden también a mostrar márgenes cristalinos pseudo hexagonales (Fig. 77). Otros investigadores [89, 105] han descrito nanocristales de aspecto similar, así como también han podido observarse en nácar maduro mediante TEM [106], lo cual excluye la posibilidad de que sean artefactos debidos a la preparación.

En Checa et al., 2013 [84] se muestra, mediante EBSD, que las vermiculaciones observadas en las muestras tratadas con lejía se orientan en paralelo al eje a cristalográfico del aragonito. Dadas las coincidencias en tamaño, morfología y orientación cristalográfica, es evidente que las vermiculaciones observadas en las muestras tratadas ligeramente con lejía son las mismas que las observadas en muestras muy tratadas con lejía, o tratadas con proteínasa K. En base a lo observado y al análisis cristalográfico expuesto en Checa et al., 2013 [84], proponemos que las plaquitas de nácar consisten en una amalgama de vermiculaciones (gránulos de carbonato cálcico, fusionados y alineados paralelamente con el eje a cristalográfico de la tableta), formadas por las particulares condiciones del crecimiento del cristal en presencia de materia orgánica.

Cuando los gránulos crecen aislados en la superficie de la tableta tienden a desarrollar formas cristalinas. Progresan rodeados por el material proteico que cubre la membrana interlamelar por ambos lados. Estos son los llamados “hillocks” (montículos) observados en la superficie de las tabletas del nácar [106]. Se corresponden con la capa granular gruesa indicada por Mutvei y Dunca [89, 90]. Las vermiculaciones están rodeadas y separadas entre sí por finísimas películas orgánicas.

En la estructura del aragonito existen cadenas de enlaces muy fuertes a lo largo del eje a cristalográfico, donde la distancia entre los átomos de Ca y los grupos CO_3 es la más corta. Las moléculas orgánicas quedan expulsadas y pueden ser fácilmente incorporadas hacia otras direcciones cristalográficas, donde tanto las distancias del CaCO_3 son mayores (eje b), o los grupos CO_3 se

encuentran unidos mediante las débiles fuerzas de Van der Waals (eje *c*) [107].

Según los modelos actuales, los biocristales se forman a partir de un precursor del carbonato cálcico amorfo, mediante nucleación secundaria [108-111]. En moluscos la evidencia más convincente fue presentada por Baronnet [112]. Baronnet mostró cómo un córtex de carbonato cálcico amorfo (de entre 40 y 60 nm) tapiza la superficie de crecimiento de los prismas calcíticos de *P. margaritifera*. En consonancia con las observaciones de Nudelman [113] y las de Baronnet [112], podemos considerar los gránulos que forman las vermiculaciones como unidades de cristalización. Curiosamente esta es una hipótesis similar a la del modelo de Weiner y Addadi [109] para la cristalización de las espículas del erizo de mar. Durante el crecimiento, las conexiones entre gránulos en la dirección del eje *a* no van a interrumpirse por la presencia de moléculas orgánicas, pues éstas no pueden introducirse fácilmente en la estructura mineral en esta dirección. Las moléculas orgánicas serían absorbidas principalmente en los límites entre gránulos pertenecientes a vermiculaciones adyacentes.

Los triángulos aparecidos en *P. nobilis* corresponden al avance de las caras (010) durante el crecimiento del cristal de nácar. La explicación aportada en Checa et al. [84] es similar a la requerida para las vermiculaciones; una absorción preferencial de moléculas orgánicas a lo largo del eje de crecimiento (010) de estas plaquitas, debido a una diferencia en la distancia de las uniones atómicas entre el eje *a* y el *b*. La materia orgánica queda expulsada preferentemente a aquellas zonas donde la distancia de las uniones atómicas es mayor. El hecho de que no se hayan detectado vermiculaciones en *P. nobilis*, ni en la zona central de las tabletas de *P. hirundo*, quizás pueda deberse a la falta del componente proteico normalmente absorbible.

Con este trabajo se demuestra que la dinámica de crecimiento de las tabletas del nácar es mucho más compleja de lo previamente supuesto. Es un resultado de la interacción de dos niveles diferentes pero mutuamente relacionados, las tabletas y los nanogránulos que las componen.

Pese a las abundantes contribuciones que se están haciendo por diferentes grupos, el estudio en profundidad del nácar continúa planteando muchas cuestiones por resolver. Éste puede ser un buen momento para recordar las palabras del estadístico George E. P. Box en 1986: “Remember that all models are wrong; the practical question is how wrong do they have to be to not be useful” [114].

5-Conclusiones

5.- CONCLUSIONES

5.1.- LAMELAR CRUZADA.

5.1.1- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA LAMELAR CRUZADA DE *L. GIGAS*

-La proporción entre la matriz soluble y la insoluble de *L. gigas* es inferior a 6, muy diferente de la previamente descrita por otros autores.

-La fracciones soluble e insoluble presentan un patrón proteico similar de cuatro bandas bien diferenciadas. Dos bandas inferiores a 70 kDa (3P3), una de 32 kDa (2P3) y otra de 24 kDa (1P3).

-Las bandas inferiores a 70 kDa (3P3) de la fracción insoluble parecen tener actividad ligadora de calcio, pero continúan existiendo incógnitas sobre ello.

-Como era esperable, la fracción soluble es moderadamente ácida. La mayor parte de sus proteínas tienen pHs comprendidos entre 4,5 y 6,5.

-El ensalzador de plata usado en immunogold puede servir como un método rápido para detección de metales pesados en conchas de moluscos, como ha quedado comprobado con *L. gigas* y *C. decorus*.

-Los antígenos 3P3 se encuentran repartidos por la superficie de las lamelas sin un orden aparente o patrón reconocible.

-La matriz de *L. gigas* está débilmente glicosilada, solo un 3% de la fracción soluble son azúcares. 1P3 y 2P3 parecen ser proteínas no glicosiladas.

-La proporción de manosa (32,3%) es inusualmente alta en la matriz orgánica de *L. gigas*.

-Existe una interacción moderada de la fracción soluble sobre la cristalización *in vitro*. Los efectos de la fracción soluble parecen ser debidos a la acción sinérgica de sus componentes.

5.2.- NÁCAR

5.2.1.- DETERMINACIÓN DE QUITINA EN LAS MEMBRANAS INTERLAMELARES

-Se ha constatado la existencia de dos tipos de fibras diferentes en ubicación, tamaño y morfología, a las que se denominó como fibras tipo 1 y tipo 2.

-Las fibras tipo 1, de naturaleza proteica, se localizan formando un entramado como continuación de la membrana interlamelar.

-Las fibras de tipo 2, de naturaleza quitinosa, se encuentran desorientadas en la membrana interlamelar e incluidas en los cristales de aragonito. Se han observado emergiendo de fibras de tipo 1.

-Las fibras de tipo 2 son diferentes a las descritas por Levi-Kalisman et al., ligeramente diferentes en cuanto a estructura, y muy diferentes en cuanto a organización.

-La quitina es un componente esencial de las membranas interlamelares en forma de complejos proteína-quitina.

-Las conclusiones de trabajos anteriores de otros autores indicando que las fibras de quitina se disponen en forma ordenada deberían tomarse con precaución.

-La interacción entre las fibras de quitina descrita por Cartwright y Checa [33] probablemente tenga lugar entre fibras del complejo proteína-quitina.

5.2.2.- ESTRUCTURAS DE DISOLUCIÓN EN NÁCAR

-Tras el tratamiento con proteasa se evidencia una subestructura de aspecto granular en las tabletas del nácar.

-Los gránulos que crecen aislados tienden a desarrollar formas cristalinas pudiendo tratarse de unidades de cristalización.

-La estructura granular da lugar a vermiculaciones en *P. hirundo* y a grandes estructuras triangulares en *P. nobilis* (patrones en reloj de arena).

-Tanto las vermiculaciones como los triángulos se deben a una absorción diferencial de materia orgánica a lo largo de distintas direcciones cristalográficas en el aragonito.

6.- CONCLUSIONS

6.1.- CROSSED LAMELLAR.

6.1.1- BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CROSSED LAMELLAR OF *L. GIGAS*

-Ratio of soluble and insoluble matrix of *L. gigas* is below 6, very different from that previously described by other authors.

-Soluble and insoluble protein fractions show a similar pattern of four distinct bands. Two below 70 kDa (3P3), a 32 kDa (2P3) and a 24 kDa (1P3) bands.

-The bands below 70 kDa (3P3) of the insoluble fraction seem to have calcium-binding activity, but still there remain uncertainties about it.

-As expected, the soluble fraction is moderately acidic. Most of their proteins have pHs between 4.5 and 6.5.

-The silver enhancer used for immunogold can be used as a quick method for detection of heavy metals in mollusk shells, as has been proven with *L. gigas* and *C. decorus*.

-The 3P3 antigens are distributed over the surface of the lamellae without apparent order or recognizable pattern.

-The matrix of *L. gigas* is weakly glycosylated, only 3% of the soluble fraction are sugars. 1P3 and 2P3 look to be non glycosylated proteins.

-Proportion of mannose (32.3%) is unusually high in the organic matrix of *L. gigas*.

-There is a moderate interaction of the soluble fraction over the in vitro crystallization. The effects of the soluble fraction appear to be due to the synergistic action of its components.

6.2.- NACRE

6.2.1.- CHITIN DETERMINATION IN INTERLAMELLAR MEMBRANES

-Has been confirmed the existence of two different fibers in location, size and morphology, which was named as type 1 and type 2 fibers.

-Type 1, proteinaceous fibers, located forming a framework in continuation of the interlamellar membrane.

-Fibers of type 2, of chitinous nature, are disoriented in the interlamellar membrane and included aragonite crystals. These fibers were observed emerging from type 1 fibers.

-Fibers of type 2 are different from those described by Levi-Kalisman et al., slightly different in structure, and also very different in its organization.

-Chitin is an essential component of the interlamellar membranes in form of a protein-chitin complex.

-Conclusions of previous works by other authors indicate that chitin fibers are arranged in an orderly manner should be taken with caution.

-The Interaction between chitin fibers described by Cartwright and Checa [33] probably occurs between fibers of chitin-protein complex.

6.2.2.- DISSOLUTION PATTERNS IN NACRE

-After treatment with protease, a granular aspect substructure is evident in nacre tablets.

-Granules that grown isolated, tend to develop crystalline forms, these could be units of crystallization..

-The granular structure results in vermiculations in *P. hirundo* and large triangular structures in *P. nobilis* (hourglass patterns).

-Vermiculations and the triangular structures are due to differential absorption of organic material to along different crystallographic directions in the aragonite.

6.-Bibliografía

6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Knoll, A.H., *Biom mineralization and Evolutionary History*. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2003. **54**(1): p. 329-356.
2. Bengtson, S. and S. Morris, *Early Radiation of Biom mineralizing Phyla*, in *Origin and Early Evolution of the Metazoa*, J. Lipps and P. Signor, Editors. 1992, Springer US. p. 447-481.
3. Raup, D.M. and J.J. Sepkoski, *Mass Extinctions in the Marine Fossil Record*. Science, 1982. **215**(4539): p. 1501-1503.
4. Lecointre, G., H.L. Guyader, and D. Visset, *Classification phylogénétique du vivant*. 2001: Belin. ISBN-2-7011-2137-X
5. Marin, F.d.r., et al., *Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution, Current Topics in Developmental Biology*. 2008, Academic Press. p. 209-276.
6. Shimamoto, M. and D. Tōhoku, *Shell Microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and Its Phylogenetic Implications*. 1986: *The Science Reports of the Tohoku University. Second series, Geology 56 (1), 1-A40 p.2-15*
7. Currey, J.D. and J.D. Taylor, *The mechanical behaviour of some molluscan hard tissues*. Journal of Zoology, 1974. **173**(3): p. 395-406.
8. Ballarini, R. and A.H. Heuer, *Secrets in the shell - The body armor of the queen conch is much tougher than comparable synthetic materials. What secrets does it hold?* American Scientist, 2007. **95**(5): p. 422-429.
9. Osuna-Mascaro, A., Cruz-Bustos, Benhamada, S., et al., *The shell organic matrix of the crossed lamellar queen conch shell (Strombus gigas)*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2014. **168**: p. 76-85.

10. Palmer, A.R., *Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification- Evidence from marine gastropods*. Marine Biology, 1983. **75**(2-3): p. 287-292.
11. Robert, C. and H. Chamley, *Paleoenvironmental significance of clay mineral associations at the Cretaceous-Tertiary passage*. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology, 1990. **79**(3-4): p. 205-219.
12. Latiolais, J.M., Taylor, M. S., Roy, K., Hellberg, M. E., *A molecular phylogenetic analysis of strombid gastropod morphological diversity*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006. **41**(2): p. 436-444.
13. Checa, A.G., J.H. Cartwright, and M.-G. Willinger, *The key role of the surface membrane in why gastropod nacre grows in towers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(1): p. 38-43.
14. Furuhashi, T., et al., *Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2009. **154**(3): p. 351-71.
15. Rosswog, S., C. Freiburghaus, and F.K. Thielemann, *Nucleosynthesis calculations for the ejecta of neutron star coalescences*. Nuclear Physics A, 2001. **688**(1-2): p. 344-348.
16. Conway Morris, S. *Darwin's dilemma: the realities of the Cambrian 'explosion'*. Philosophical Transactions B DOI: [10.1098/rstb.2006.1846](https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1846)
17. Vinther, J., *The origins of molluscs*. Palaeontology, 2015. **58**(1): p. 19-34.
18. Thomas, R.D.K., R.M. Shearman, and G.W. Stewart, *Evolutionary Exploitation of Design Options by the First Animals with Hard Skeletons*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1239-1242.
19. Haldane, J.B.S., *The Causes of Evolution*. 1990: Princeton University Press.

20. Henry, J.Q., A. Okusu, and M.Q. Martindale, *The cell lineage of the polyplacophoran, Chaetopleura apiculata: variation in the spiralian program and implications for molluscan evolution*. *Developmental Biology*, 2004. **272**(1): p. 145-160.
21. Bottjer, D.J. and J.G. Carter, *Functional and phylogenetic significance of projecting periostracal structures in the Bivalvia (Mollusca)*. *Journal of Paleontology*, 1980. **54**(1): p. 200-216.
22. Harper, E.M., *The molluscan periostracum: an important constraint in bivalve evolution*. *Palaeontology*, 1991. **40**(1): p. 71-97.
23. Boggild, O.B., *The shell structure of the Mollusks*. Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Natruvidenskabelig og Matematisk, Afdeling, Ser.9, 1930. **2**: p. 231-326.
24. Taylor, J.D. and M. Layman, *The mechanical properties of bivalve mollusca shell structures*. *Palaeontology*, 1972. **15**(1): p. 73-87.
25. Currey, J.D., *Mechanical Properties of Mother of Pearl in Tension*. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 1977. p. 443-463.
26. Jackson, A.P., J.F.V. Vincent, and R.M. Turner, *The Mechanical Design of Nacre*. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 234, 1988. P. 415-440.
27. Dauphin, Y., Denis, A., Guzman, N. & Ortlieb, L., *The paradoxal crossed lamellar layer of mollusc shells*. *ALR*, 2003. **16**: p. 95-103.
28. Rodriguez-Navarro, A.B., et al., *Crystallographic relationships in the crossed lamellar microstructure of the shell of the gastropod Conus marmoreus*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(2): p. 830-835.
29. Kiel, S. and J. FrýDa, *Nacre in Late Cretaceous Sensuitrochus ferreri-Implications for the taxonomic affinities of the Cirridae (Gastropoda)*. *Journal of Paleontology*, 2004. **78**(4): p. 795-797.

30. Hedegaard, C., D.R. Lindberg, and K. Bandel, *Shell microstructure of a Triassic patellogastropod limpet*. *Lethaia*, 1997. **30**(4): p. 331-335.
31. Carter, J.G., *Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends*. Vol. 2. 1990: Amer Geophysical Union. J. G. Carter edit. DOI:10.1029/SC005
32. Ponder, W.F. and D.R. Lindberg, *Gastropod phylogeny - challenges for the 90s*. Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. Oxford University Press, USA. 1996. p. 135-154.
33. Ponder, W.F. and D.R. Lindberg, *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. 2008: University of California Press. ISBN 97805 20250925
34. Cartwright, J.H.E. and A.G. Checa, *The dynamics of nacre self-assembly*. *Journal of The Royal Society Interface*, 2007. **4**(14): p. 491-504.
35. Palmer, A.R., *Calcification in marine mollusk-How costly is it*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. **89**(4): p. 1379-1382.
36. Taylor, J.D., *The structural evolution of the bivalve shell*. *Palaeontology*, 1973. **16**(3): p. 519-534.
37. Su, X.-W., D.-M. Zhang, and A.H. Heuer, *Tissue Regeneration in the Shell of the Giant Queen Conch, Strombus gigas*. *Chemistry of Materials*, 2004. **16**(4): p. 581-593.
38. Nakahara, H., An electron microscope study of the growing surface of nacre in two gastropod species, *Turbo cornutus* and *Tegula pfeifferi*. *Venus (Jap. J. Malac.)* 1979. **38**: p. 205-211.
39. Landau, B.M.K., Gus C Herbert, Gregory S, *A large new species of Lobatus (Gastropoda : Strombidae) from the Neogene of the Dominican Republic, with notes on the genus*. *Veliger*, 2008. **50**(1): p. 31-38.
40. Simone, L.R.L., *Comparative morphological study of representatives of the three families of Stromboidea and*

- the Xenophoroidea (Mollusca, Caenogastropoda), with an assessment of their phylogeny.* Arquivos de Zoologia S. Paulo. 2005. **37**(2): p. 141-267.
41. Linné, C.v. and L. Salvius, *Caroli Linnaei...Systema naturae per regna tria naturae :secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* Vol. v.1. 1758, Holmiae :: Impensis Direct. Laurentii Salvii.
 42. Parker, G.H., *The leaping of the stromb (Strombus gigas Linn.).* Journal of Experimental Zoology, 1922. **36**(2): p. 204-209.
 43. Mccarthy, K., *Queen conch (Strombus gigas) standardized catch rates from the Puerto Rico and US Virgin Island commercial fisheries,* 2007, SEDAR 14-AW-06. Sustainable Fisheries Division Contribution.
 44. Wyckoff, M., D. Rodbard, and A. Chrambach, *Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems: Properties of the stack, valid measurement, and optimized procedure.* Analytical biochemistry, 1977. **78**(2): p. 459-482.
 45. Andrews, A.T., *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications.* 1982: Clarendon Press Oxford. DOI 10.1002/food.19820260907
 46. Gordon, A.H., *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.* North holland Pub. Co. 1975.
 47. Dunbar, B.S. and B. Dunbar, *Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques.* 1988: Springer. U.S.
 48. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
 49. Kerenyi, L. and F. Gallyas, *A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic,*

- immuno-electrophoretic and immunodiffusion preparations*. Clinica Chimica Acta, 1972. **38**(2): p. 465-467.
50. Wall, R.S. and T.J. Gyi, *Alcian blue staining of proteoglycans in polyacrylamide gels using the "critical electrolyte concentration" approach*. Analytical biochemistry, 1988. **175**(1): p. 298-299.
 51. Campbell, K., D. MacLennan, and A. Jorgensen, *Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all"*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(18): p. 11267-11273.
 52. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. Journal of biological chemistry, 1975. **250**(10): p. 4007-4021.
 53. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues*. Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-243.
 54. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(5): p. 850-858.
 55. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets-procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
 56. Hoffman, A.S. and R.C. Nowinski, *Polymerizable compounds and methods for preparing synthetic polymers that integrally contain polypeptides*, 1985, Google Patents.
 57. Symington, J., *Electrophoretic transfer of proteins from two-dimensional gels to sheets and their detection*. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Academic Press, Inc., New York, 1984: p. 127-168.

58. Sutton, R., C. Wrigley, and B. Baldo, *Detection of IgE-and IgG-binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels*. Journal of immunological methods, 1982. **52**(2): p. 183-194.
59. Towbin, H., et al., *Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography*. Journal of immunological methods, 1984. **72**(2): p. 471-479.
60. Timmons, T.M. and B.S. Dunbar, *[51] Protein blotting and immunodetection*. Methods in enzymology, 1990. **182**: p. 679-688.
61. Albeck, S., et al., *Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(25): p. 11691-11697.
62. Fremy, E., *Recherches sur la composition des eufs dans la série des animaux*. 1855: Mallet-Bachelier.
63. Meenakshi, V., P. Hare, and K.M. Wilbur, *Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1971. **40**(4): p. 1037-1043.
64. Crenshaw, M.A., *The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid*. Biological Bulletin, 1972: 143 p. 506-512.
65. Marin, F. and G. Luquet, *Molluscan shell proteins*. Comptes Rendus Palevol, 2004. **3**(6): p. 469-492.
66. Marie, B., et al., *The shell-forming proteome of Lottia gigantea reveals both deep conservations and lineage-specific novelties*. FEBS J, 2013. **280**(1): p. 214-32.
67. Marie, B., et al., *Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod Nautilus macromphalus*. Chembiochem, 2009. **10**(9): p. 1495-506.
68. Weiner, S., *Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusk*

- shells*. *Calcified tissue international*, 1979. **29**(1): p. 163-167.
69. Köhler, S.J., et al., *Removal of cadmium from wastewaters by aragonite shells and the influence of other divalent cations*. *Environmental science & technology*, 2007. **41**(1): p. 112-118.
 70. Fernández, M.S., et al., *Proteoglycan occurrence in gastrolith of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Malacostraca: Decapoda)*. *Journal of Crustacean Biology*, 2012. **32**(5): p. 802-815.
 71. Compere, P., M.F. Jaspard-Versali, and G. Goffinet, *Glycoproteins from the cuticle of the Atlantic shore crab *Carcinus maenas*: I. Electrophoresis and western-blot analysis by use of lectins*. *Biological Bulletin*, 2002. **202**(1): p. 61-73.
 72. Marin, F., et al., *Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis**. *J Biol Chem*, 2005. **280**(40): p. 33895-908.
 73. Marie, B., et al., *Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(51): p. 20986-91.
 74. Vanhaeren, M., et al., *Middle Paleolithic Shell Beads in Israel and Algeria*. *Science*, 2006. **312**(5781): p. 1785-1788.
 75. Zilhão, J., et al., *Symbolic use of marine shells and mineral pigments by Iberian Neandertals*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(3): p. 1023-1028.
 76. Joordens, J.C.A., et al., *Homo erectus at Trinil on Java used shells for tool production and engraving*. *Nature*, 2014. advance online publication.
 77. Allen, S.J., L. Bejder, and M. Krützen, *Why do Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) carry conch shells*

- (*Turbinella* sp.) in Shark Bay, Western Australia? Marine Mammal Science, 2011. **27**(2): p. 449-454.
78. Hooke, R., *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries Thereupon*. 1665: Dover Publications. Gutenberg.org.
 79. Gould, S.J. and R.C. Lewontin, *The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme*. Vol. 205. 1979. 581-598. faculty.washington.edu.
 80. Weedon, M.J.T., P D, *Calcitic Nacreous Ultrastructures in Bryozoans: Implications for Comparative Biomineralization of Lophophorates and Molluscs*. Biol Bull, 1995. **188**: p. 281-292.
 81. Mitchell, P., et al., *Notes on the microstructure of the Nautilus shell. Discussion*. Scanning microscopy, 1995. **9**(1): p. 215-230.
 82. Schäffer, T.E., et al., *Does Abalone Nacre Form by Heteroepitaxial Nucleation or by Growth through Mineral Bridges?* Chemistry of Materials, 1997. **9**(8): p. 1731-1740.
 83. Levi-Kalisman, Y., et al., *Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM*. Journal of Structural Biology, 2001. **135**(1): p. 8-17.
 84. Checa, A.G., et al., *Crystallographic control on the substructure of nacre tablets*. Journal of Structural Biology, 2013. **183**(3): p. 368-376.
 85. Mutvei, H., *The nacreous layer in Mytilus, Nucula, and Unio (Bivalvia). Crystalline composition and nucleation of nacreous tablets*. Calcif Tissue Res, 1977. **24**(1): p. 11-8.
 86. Mutvei, H., *The nacreous layer in molluscan shells. The mechanisms of biomineralization in animals and plants*. Tokai University Press, Tokyo, 1980: p. 49-56.

87. Mutvei, H., *Ultrastructural characteristics of the nacre in some gastropods*. Zool. Scr., 1978. **7**: p. 287-298.
88. Mutvei, H., *On the internal structures of the nacreous tablets in molluscan shells*. SEM, 1979. **2**: p. 457-462.
89. Mutvei, H. and E. Dunca, *Crystalline structure, orientation and nucleation of the nacreous tablets in the cephalopod Nautilus*. Paläontologische Zeitschrift, 2010. **84**(4): p. 457-465.
90. Mutvei, H. and E. Dunca, *Structural relationship between interlamellar organic sheets and nacreous tablets in gastropods and the cephalopod Nautilus*. Paläontologische Zeitschrift, 2008. **82**(1): p. 85-94.
91. Braconnot, H., *Recherches analytique sur la nature des champignons*. Ann. Chim, 1811. **79**: p. 265-304.
92. Odier, A., *Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes*. 1823.
93. Bevelander, G.B. and H. Nakahara, *An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs*. Calc. Tiss. Res., 1969. **3**: p. 84-92.
94. Weiner, S. and W. Traub, *X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells*. FEBS Letters, 1980. **111**(2): p. 311-316.
95. Mutvei, H., *On the micro- and ultrastructure of the conchiolin in the nacreous layer of some recent and fossil molluscs*. Stockholm Contr. Geol., 1969. **20**: p. 1-17.
96. Morton, B., *The biology and functional morphology of Pteria breviaalata (Bivalvia: Pterioidea), epizoic on gorgonians in Hong Kong*. Journal of Zoology, 1995. **236**(2): p. 223-241.
97. Bezares, J., R.J. Asaro, and M. Hawley, *Macromolecular structure of the organic framework of nacre in Haliotis rufescens: implications for growth and mechanical behavior*. J Struct Biol, 2008. **163**(1): p. 61-75.

98. Hackman, R., *Studies on Chitin IV. The Occurrence of Complexes in Which Chitin and Protein are Covalently Linked*. Australian Journal of Biological Sciences, 1960. **13**(4): p. 568-577.
99. Blackwell, J. and M.A. Weih, *Structure of chitin-protein complexes: Ovipositor of the ichneumon fly Megarhyssa*. Journal of Molecular Biology, 1980. **137**(1): p. 49-60.
100. Goffinet, G. and C. Jeuniaux, *Distribution and quantitative importance of chitin in mollusca shells*. Cahiers De Biologie Marine, 1979. **20**(3): p. 341-349.
101. Zentz, F., et al., *Characterization and quantification of chitosan extracted from nacre of the abalone Haliotis tuberculata and the oyster Pinctada maxima*. Mar Biotechnol (NY), 2001. **3**(1): p. 36-44.
102. Bezares, J., et al., *Macromolecular structure and viscoelastic response of the organic framework of nacre in Haliotis rufescens: A perspective and overview*. Theoretical and Applied Mechanics, 2011. **78**(2): p. 75-106.
103. Bezares, J., Asaro .R. J., and Lubarda .V. A., *Core structure of aligned chitin fibers within the interlamellar framework extracted from Haliotis rufescens nacre. Part I: Implications for growth and mechanical response*. Theoretical and Applied Mechanics, 2012. **39**(4): p. 343-363.
104. Nudelman, F., et al., *Forming nacreous layer of the shells of the bivalves Atrina rigida and Pinctada margaritifera: an environmental- and cryo-scanning electron microscopy study*. J Struct Biol, 2008. **162**(2): p. 290-300.
105. Metzler, R.A., et al., *Polarization-dependent imaging contrast in abalone shells*. Physical Review B, 2008. **77**(6): p. 064110.
106. Checa, A.G., J.H.E. Cartwright, and M.-G. Willinger, *Mineral bridges in nacre*. Journal of Structural Biology, 2011. **176**(3): p. 330-339.

107. Nelyubina, Y.V. and K.A. Lyssenko, *From "Loose" to "Dense" Crystalline Phases of Calcium Carbonate through "Repulsive" Interactions: An Experimental Charge-Density Study*. *Chemistry-A European Journal*, 2012. **18**(40): p. 12633-12636.
108. Politi, Y., et al., *Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(45): p. 17362-17366.
109. Weiner, S. and L. Addadi, *Crystallization pathways in biomineralization*. *Annual Review of Materials Research*, 2011. **41**: p. 21-40.
110. Gong, Y.U., et al., *Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(16): p. 6088-6093.
111. Cartwright, J.H., et al., *Calcium carbonate polymorphism and its role in biomineralization: how many amorphous calcium carbonates are there?* *Angewandte Chemie International Edition*, 2012. **51**(48): p. 11960-11970.
112. Baronnet, A., et al., *Crystallization of biogenic Ca-carbonate within organo-mineral micro-domains. Structure of the calcite prisms of the Pelecypod *Pinctada margaritifera* (Mollusca) at the submicron to nanometre ranges*. *Mineralogical Magazine*, 2008. **72**(2): p. 617-626.
113. Nudelman, F., et al., *Spiers Memorial Lecture Lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida**. *Faraday discussions*, 2007. **136**: p. 9-25.
114. Box, G.E.P. and N.R. Draper, *Empirical model-building and response surface*. 1986: John Wiley & Sons, Inc. 669.

