



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS DEL
CEMENTO DE PICOROCO, *Austromegabalannus psittacus*
(MOLINA, 1782).

PAMELA CANNOBBIO CASTILLO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA

SANTIAGO, CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS DEL
CEMENTO DE PICOROCO, *Austromegabalanus psittacus*
(MOLINA, 1782).

PAMELA CANNOBBIO CASTILLO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA
PROFESOR CONSEJERO	: MA. SOLEDAD FERNANDEZ GARAY
PROFESOR CONSEJERO	: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA

SANTIAGO, CHILE

2012

MEMORIA DE TÍTULO

**“ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS DEL CEMENTO DE PICOROCO,
Austromegabalanus psittacus (MOLINA, 1782)”**

**“ESTIMATION OF THE PROTEIN COMPOSITION OF THE PICOROCO CEMENT,
Austromegabalanus psittacus (MOLINA, 1782)”**

Pamela Andrea Cannobbio Castillo *

* Departamento de Ciencias Biológicas Animales

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Proyecto FONDAP 11980002.

ABSTRACT

In the present work, the cement-producing cell in adult picorocos, *Austromegabalanus psittacus*, was characterized histologically and ultrastructurally. Light microscopy showed that cement-producing apparatus consists of unicellular glands, which are arranged in clusters between ovarian follicles, and several accessory canals. Transmission electron microscopy showed the ultrastructure of this apparatus, as well as made it clear that the secretion of cement is of the merocrine type. Furthermore, knowing that the cement is a proteinaceous material, the constituent proteins of picoroco cement polymerized into baseplate were analyzed in this work through Bradford method and polyacrylamide gel electrophoresis. However, due to its insoluble nature, it was necessary to solubilize the samples previously, being effective solubilization with 70% formic acid. It is suggested that observed bands in SDS-PAGE of 25 and 85 KDa correspond to proteins of *A. psittacus* cement, those of 10, 22 and 75 KDa, to fragments of them, those of 15, 40, 70 and 170 KDa, to proteins of shell and those of 14 and 27 KDa, to fragments of the latter.

Keywords: barnacle, picoroco, cement, histology, ultrastructure, protein composition.

RESUMEN

En la presente memoria de título se caracterizó histológica y ultraestructuralmente la célula productora de cemento en picorocos adultos, *Austromegabalanus psittacus*. La microscopía óptica mostró que el aparato de cemento está compuesto de glándulas unicelulares, organizadas en grupos entre los folículos ováricos, y varios canales accesorios. La microscopía electrónica de transmisión, además de mostrar la ultraestructura de este aparato, dejó en evidencia que la secreción de cemento es de tipo merocrina. Además, conociendo que el cemento es un material proteico, en esta memoria se analizaron las proteínas constituyentes del cemento de picoroco polimerizado en la placa basal a través de método de Bradford y electroforesis en geles de poliacrilamida. Sin embargo, debido a su naturaleza insoluble, fue necesario solubilizar las muestras previamente, siendo eficaz la solubilización con ácido fórmico 70%. Se plantea que las bandas observadas en los geles de SDS-PAGE de 25 y 85 KDa corresponden a proteínas del cemento de *A. psittacus*, las de 10, 22 y 75 KDa, a fragmentos de ellas, las de 15, 40, 70 y 170 KDa, a proteínas de la concha y las de 14 y 27 KDa, a fragmentos de estas últimas.

Palabras clave: cirripedio, picoroco, cemento, histología, ultraestructura, composición proteica.

1. INTRODUCCIÓN

Los crustáceos cirripedios y otros invertebrados marinos producen un pegamento muy resistente (denominado “cemento”) que les permite adherirse a una gran variedad de sustratos, incluso bajo el agua, por lo cual el estudio de su síntesis y composición podría ser útil para su aplicación en campos muy diversos, haciendo muy conveniente su imitación para elaborar adhesivos sintéticos.

Sin embargo, esta propiedad adhesiva también resulta indeseada cuando estos animales se adhieren y acumulan formando comunidades sobre estructuras marinas artificiales, como cascos de naves y tuberías que drenan hacia el mar, en un proceso denominado *fouling* o lastre, el cual tiene un fuerte impacto económico y ecológico.

Conociendo la estructura y, a partir de ésta, las funciones de cada componente del cemento, se puede aclarar cómo opera el mecanismo de adhesión de estos organismos, lo que permitiría diseñar polímeros adhesivos “bioinspirados” y, también, desarrollar estrategias para evitar, inhibir o corregir el *fouling*.

1.1 Características generales de *Austromegabalanus psittacus*

Austromegabalanus psittacus (*A. psittacus*) o picoroco es una especie de crustáceo cirripedo balanomorfo que habita en las costas de Chile, Argentina y sur de Perú. Es sésil, asentado sobre su base (carece de pedúnculo para fijarse al sustrato), de gran tamaño (hasta 20 cm de altura y 8,5 cm de diámetro basal) y filtrador.

El ciclo de vida del cirripedio incluye seis etapas de larva nauplius nadadoras, una etapa de larva cipris y la etapa adulta. El cipris explora el bentos con un adhesivo temporal, originado en glándulas en sus anténulas, dejando “huellas” de adhesivo en la superficie, y luego se fija con un adhesivo permanente, originado en glándulas del cuerpo. Una vez asentado, el cipris metamorfosea a adulto (2, 22, 32).

Los cirripedios son hermafroditas sésiles de apareamiento cruzado, siendo crucial su gregarismo para que ocurra la reproducción (2, 10). Para esto han desarrollado mecanismos que le permiten localizar congéneres en proceso de adhesión, como “*settlement-inducing protein complex*” (SIPC), una feromona de contacto de origen cuticular. Un SIPC aloespecífico es suficientemente similar para ser reconocido por un cipris aloespecífico y suficientemente distinto para facilitar la discriminación (10).

1.2 Adhesión en cirripedios

Cipris

Los cipris tienen un mecanismo de adhesión temporal rápidamente reversible para explorar las superficies (23) y un mecanismo de adhesión permanente al sustrato seleccionado único e irreversible, debido a la liberación de todas las reservas del adhesivo (29).

Para exploración y fijación a la superficie, el cipris posee dos anténulas muy especializadas, compuestas de cuatro segmentos. El tercer segmento termina con un disco de adhesión que facilita andar de forma bipedal; la superficie ventral del disco está cubierto de una cutícula, vellosidades cuticulares y poros de secreción del adhesivo, proveniente de glándulas hipodérmicas del segundo segmento. El cuarto segmento es especializado en la función sensorial, ya que son altamente discriminatorios durante la exploración y juzgan la idoneidad de una superficie basándose en criterios como textura, hidrodinámica local, química y color de superficie y presencia de congéneres (2).

Adultos

El aparato de cemento en cirripedios adultos está compuesto de glándulas unicelulares de origen epidérmico (originadas a partir de células del epitelio

escamoso de la pared de canales secundarios y principales) y una serie de canales accesorios (circular, radiales, principales, secundarios y colectores) de origen hipodérmico (originados por invaginación progresiva de células hipodérmicas de la pared del manto exterior después del asentamiento del cipris) que comunican a las glándulas con la zona de fijación (18).

Dado que las células de cemento son células epidérmicas modificadas, la secreción de cemento está ligada al ciclo de muda del picoroco, ocurriendo entre dos mudas consecutivas (25, 30, 32) y hacia la periferia, apareciendo el cemento solidificado o curado como anillos concéntricos discretos (25, 32).

Las células de cemento se encuentran en grupos (*B. tintinnabulum*, *B. eburneus* y *B. amphrite*) o rosetas (*B. nubilis*) entremezclados con los folículos ováricos dentro de la cámara del manto. En *B. balanoides* están dispersas individualmente entre el tejido conectivo cerca de la región basal (18).

La secreción de cemento difiere entre cirripedios con base membranosa y calcárea. En los de base membranosa (*Elminius modestus* y *B. balanoides*) es de tipo merocrina, donde el material secretorio pasa desde vacuolas en el citoplasma a canales intracelulares y luego a conductos extracelulares con

revestimiento de quitina. En los de base calcárea (*B. humeri*) las secreciones pasan directamente desde las células glandulares hacia el interior de células de conductos extracelulares. Los ápices de las células de los conductos, sin revestimiento de quitina, se rompen para formar el lumen del canal (28).

Se han caracterizado dos tipos de cemento en adultos (13). Al adherirse al sustrato el adulto produce un *cemento primario*, el que curado es rígido, mientras que al separarse o readherirse produce un *cemento secundario*, más flexible y que sirve más como "relleno" que adhesivo (2).

1.3 Propiedades del cemento

El adhesivo es un material proteico (más del 90% está compuesto de proteína), mientras que el resto se compone de carbohidratos (1%), lípidos (1%) y cenizas (4% y el 30% de las cenizas corresponde a calcio) (9, 32).

El cemento es capaz de unir dos materiales distintos: la base calcárea del animal y el sustrato de un material extraño, en base a un complejo multiproteico insoluble biosintetizado en un ambiente acuoso, capaz de fijarse bajo el agua en un evento molecular multifuncional (15, 27), conocido como adhesión "en húmedo". La adhesión "en seco" (interacción adhesiva entre dos sólidos) también funciona bajo el agua a

través de un íntimo contacto entre la vellosidad cuticular en la base del disco de adhesión del cipris con la superficie (23).

Los bioadhesivos marinos impiden la agregación al azar en la glándula, mantienen la solubilidad en el transporte al sitio de fijación, desplazan agua de la superficie y se condensan durante la interacción con el sustrato y posterior curado (28).

Las funciones del cemento pueden agruparse en: funciones de superficie, que incluyen el desplazamiento de la capa de agua unida al sustrato, difusión del cemento, acoplamiento a diversos materiales y limpieza del biofilm, y funciones de la mayor parte del cemento, que incluyen autoensamblaje, curado y protección de la degradación microbiana (16). Esta multifuncionalidad, junto con su naturaleza insoluble y compleja, ha impedido un análisis detallado de sus funciones, especialmente la evaluación directa del proceso adhesivo (27).

Los cirripedios viven en sectores submareales e intermareales rocosos, por lo tanto, el curado del adhesivo es rápido, impidiendo el desprendimiento y la desecación del cipris asentado, permitiendo que metamorfosee antes que baje la marea. El proceso de curado del cemento permanente del cipris fue confirmado en un estudio *in situ* mediante Microscopía de Fuerza Atómica, en que

las fuerza de tracción, longitud de tramo molecular y frecuencia de eventos de tracción disminuyeron a través del tiempo por un menor número de cadenas libres en la superficie debido a un cambio conformacional de proteínas, sugiriendo que hay un cambio significativo en las propiedades del cemento en el tiempo (22).

Existen diferencias en la fuerza de adhesión, morfología y composición de la placa adhesiva biosintetizada por cirripedios que crecen sobre sustratos con diferentes características. Por ejemplo, aquéllos que crecen sobre polidimetilsiloxano (PDMS; superficie antiadherente) sintetizan una placa adhesiva elástica, deformable y gruesa, es decir, producen mayor cantidad de cemento secundario, en cambio, sobre polimetilmetacrilato (PMMA; superficie fácil para adherirse) sintetizan una placa dura y vidriosa que, además, incorpora calcio en forma de calcita, siendo insoluble en las mismas condiciones que solubilizan a la placa biosintetizada sobre PDMS (5).

Se ha sugerido que el proceso de incorporación de carbonato de calcio (CaCO_3) durante la formación de la placa adhesiva aumenta la rigidez del cemento, ya que aumenta la resistencia a la compresión, flexión y fuerzas de cizalla (5). La biomineralización del cemento solidificado ocurre por precipitación de

CaCO_3 a través de la reacción de iones de calcio con grupos aniónicos de la matriz orgánica, considerando cristales de apatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) como fuente de calcio. Por lo tanto, la placa basal es un material compuesto donde cristales de calcita están incrustados en una matriz orgánica (25).

Análisis de los cementos primario y secundario del *B. amphitrite* mostraron que consistieron de estructuras nanofibrilares constituidas por amiloides y proteínas globulares. Los biomateriales de amiloide presentan propiedades útiles como alta fuerza y resistencia a la degradación, pueden formarse a partir de muchas proteínas no relacionadas y, además, prevendrían la contaminación biológica (4).

Además, se ha sugerido que la polimerización del cemento es una forma especializada de cicatrización de heridas debido a que es bioquímicamente similar a la coagulación de la sangre, ya que involucra activación de enzimas proteolíticas y precursores estructurales, entrecruzamiento por transglutaminasa y ensamblaje de proteínas fibrosas, resultando en una malla insoluble de proteínas fibrosas entrelazadas, donde los péptidos generados por la proteasa funcionan como moléculas de señal, estimulando el asentamiento de cipris (9).

1.4 *Biofouling* o lastre

Biofouling se refiere a la acumulación no deseada de organismos en superficies artificiales inmersas en un ambiente acuático (2, 3, 12, 34).

Biofouling se divide en dos categorías: El *microfouling* o “limo” es la capa original, compuesto por cianobacterias, protozoos, hongos, diatomeas, esporas y microalgas; el *macrofouling* aparece después de 2 a 3 semanas y está compuesto por algas mayores e invertebrados de cuerpo blando como esponjas, tunicados y briozoos (*macrofouling suave*) e invertebrados calcificados como lapas, choros, cirripedios y poliquetos (*macrofouling duro*) (3, 8, 34).

El *biofouling* que ocurre en los cascos de las naves tiene consecuencias económicas y ecológicas negativas (12), ya que produce mayor resistencia de fricción, con la subsiguiente reducción de velocidad y mayor consumo de combustible (lo que se asocia a aumentos significativos en emisión de gases perjudiciales para el ambiente), menor maniobrabilidad, mayor corrosión de revestimientos y mayor frecuencia de diqueado (2, 23, 34, 35). El *biofouling* marino es uno de los principales contribuyentes a la introducción de especies invasivas en ecosistemas sensibles (35), siendo los cirripedios un componente importante por su cuerpo de gran tamaño, duro y calcáreo (3).

1.5 Estrategias *antifouling*

El método más eficaz de control del *biofouling* es la aplicación a las superficies de revestimientos *antifouling* (AFC) tóxicos. La mayoría contienen metales pesados como tributilestaño u óxido cúprico, los cuales se filtran a un ritmo constante y se acumulan en el ambiente, siendo perjudiciales en especies no objetivo (12).

Una estrategia *antifouling* más benigna con el ambiente es la interferencia con los mecanismos de asentamiento y fijación, mediante imitación de los procesos *antifouling* naturales (por ejemplo, para controlar el *fouling* en sus superficies, los organismos marinos secretan metabolitos secundarios) y modificación de las características del sustrato (34). Además, el cipris es de mayor interés para los estudios de estas estrategias, debido a que es el que explora y adhiere a las superficies (2, 22).

Inicialmente, el desarrollo de estrategias para controlar la colonización se centró en biocidas y superficies de bajo módulo perturbadoras del asentamiento de cipris; actualmente, se han desarrollado nuevas estrategias, como revestimientos liberadores del *fouling* (FRC) de baja energía superficial, inertes para el medio ambiente (2). Los FRC son funcionalmente diferentes a los AFC, ya que permiten el asentamiento, pero con una unión adhesiva débil entre organismos marinos y superficie, siendo

arrastrados con un flujo de agua suficiente, por depredación o su propio peso (5, 12). Los más utilizados en investigación son recubrimientos de politetrafluoretileno, hidrocarburos y silicona (PDMS) (12).

Al examinar el efecto de la temperatura sobre la adhesión de cirripedios a revestimientos liberadores del *fouling*, se determinó que el “estrés crítico de remoción” en animales criados a 15°C fue mayor que en animales criados a 25°C, lo que sugiere que en temperaturas oceanográficas frías puede ser más difícil eliminar los cirripedios que a temperaturas más cálidas. Esto fue atribuido a diferencias significativas en la expresión de proteínas adhesivas que afectan la tenacidad del cemento (12).

Se ha averiguado bastante acerca de la composición del cemento en muchas especies de cirripedios, pero no en el *A. psittacus*, de especial preocupación por su gran tamaño que, al acumularse, agravaría el impacto del *fouling*. Sin embargo, los estudios del cemento se han dificultado debido a la naturaleza insoluble del adhesivo y los diversos métodos desarrollados para solubilizarlo han mostrado resultados poco concluyentes.

A partir de esto, se planteó la hipótesis de que si se comparan las proteínas

extraídas de las bases con las proteínas de las paredes de las conchas de picoroco, *A. psittacus*, entonces se podrán estimar las proteínas constituyentes del cemento. El objetivo general de este estudio fue hacer una estimación preliminar de la composición de las proteínas constituyentes del cemento de picoroco, *A. psittacus*. Para esto, se plantearon como objetivos específicos: obtener células glandulares productoras de cemento de picoroco; caracterizar histológica y ultraestructuralmente las células glandulares productoras de cemento de picoroco; y, por otro lado, comparar la concentración total y los pesos moleculares de las proteínas constituyentes de bases y paredes de conchas de picoroco.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron especímenes vivos de picorocos adultos, *A. psittacus*, de 3 a 5 cm de diámetro basal, provenientes de supermercados, Mercado Central de Santiago y Terminal Pesquero Metropolitano, los cuales fueron procesados inmediatamente para llevar a cabo la caracterización histológica y ultraestructural de las células productoras de cemento y, luego, el análisis de las proteínas del cemento polimerizado.

2.1 Caracterización histológica y ultraestructural de células productoras de cemento

2.1.1 Toma de muestras de manto

Se seccionó cerca de la base de la concha del picoroco con una sierra, se removieron los fragmentos de material duro con pinzas y se disectaron muestras de manto de hasta 1 cm² con un bisturí y, utilizando una lupa estereoscópica binocular, se eliminaron restos de concha y otros tejidos, como fibras musculares.

2.1.2 Microscopía óptica

Las muestras fueron lavadas con agua destilada, fijadas en formalina 10% durante 48 horas, lavadas con agua corriente por 24 horas, deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. Con un micrótopo (Leitz) se realizaron cortes de 5 µm, los cuales fueron desparafinados en xilol, hidratados en alcoholes de graduación decreciente y teñidos con hematoxilina-eosina y azul de toluidina, luego deshidratados en alcoholes de graduación creciente y aclarados en xilol para seguir con el montaje definitivo. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio óptico (Nikon Eclipse E400).

2.1.3 Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron enjuagadas con buffer cacodilato sódico 0,2 M a pH 7,2 y fijadas inmediatamente en líquido de Karnovsky (paraformaldehído 2% y glutaraldehído 2,5% en buffer cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2) durante 2 horas. A partir de éstas sobre una placa de cera se disectaron muestras de 1 mm³ con una cuchilla, las cuales fueron fijadas en líquido de Karnovsky durante 24 horas, postfijadas en tetróxido de osmio 1% durante 2 horas, deshidratadas en acetonas de graduación creciente e incluidas en resina Epon. Con un ultramicrotomo (Porter Blum MT2-B) se hicieron cortes semifinos de 1 µm, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y observados por microscopía óptica para seleccionar las zonas de interés. Luego, se hicieron cortes finos de 70 nm, los cuales fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron observados con un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM-100) a un voltaje de 80 KV.

2.2 Evaluación de las proteínas del cemento polimerizado

2.2.1 Procesamiento de conchas de picoroco

Se seccionó cerca de la base de la concha de picoroco con una sierra, obteniéndose dos fracciones: base y pared, las cuales fueron lavadas minuciosamente, trituradas en un mortero, desmineralizadas en ácido fórmico 80%, dializadas contra agua desionizada, liofilizadas a -49°C y 0,040 mbar y homogeneizadas en un molino criogénico a -15°C durante 2 minutos.

- Tratamiento de extracción de proteínas

Se prepararon una solución *stock* de bromuro de cianógeno (CNBr) con 500 mg de CNBr y 10 mL de ácido fórmico 70% según lo descrito por Naldrett y Kaplan (20) y una solución *stock* 10 mL de ácido fórmico 70%.

En tubos Eppendorf (1500 μL), bajo campana, en oscuridad y a temperatura ambiente a las muestras desmineralizadas de base y pared se hicieron tratamientos con las soluciones *stock* de CNBr y con ácido fórmico 70% a distintos tiempos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos con bromuro de cianógeno y con ácido fórmico 70% en muestras de base y pared de concha de picoroco desmineralizadas previamente con ácido fórmico 80%.

Muestra	2 mg de base desmineralizada	2 mg de pared desmineralizada
Tpo. \ Tto.	5 mg de CNBr en 100 μL de ácido fórmico 70%	
1 hora	BtCNBr1h	PtCNBr1h
2 horas	BtCNBr2h	PtCNBr2h
4 horas	BtCNBr4h	PtCNBr4h
8 horas	BtCNBr8h	PtCNBr8h
16 horas	BtCNBr16h	PtCNBr16h
24 horas	BtCNBr24h	PtCNBr24h
Tpo. \ Tto.	100 μL de ácido fórmico 70%	
1 hora	BtAF1h	PtAF1h
4 horas	BtAF4h	PtAF4h
8 horas	BtAF8h	PtAF8h
16 horas	BtAF16h	PtAF16h
24 horas	BtAF24h	PtAF24h

(BtCNBr = Base tratada con CNBr, PtCNBr = Pared tratada con CNBr, BtAF = Base tratada con ácido fórmico y PtAF = Pared tratada con ácido fórmico)

Luego de 1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas de tratamiento, se agregaron 1000 μL de TRIS 0,5 M pH 6,8 y se centrifugó (13000 rpm por 5' a 4°C) para extraer la fracción soluble de las muestras, a la cual se ajustó el pH, agregando TRIS 0,5 M pH 6,8 y NaOH 1N, y se concentró en unidades para filtración con centrífuga Amicon Ultra-4 de Millipore (en varias series de 4500 rpm por 10') hasta un volumen final de 500 μL .

2.2.2 Caracterización de proteínas de las muestras

- Medición de la concentración total de proteínas a través del método de Bradford (7)

Se cuantificó cada muestra por triplicado en tubos Eppendorf (500 μ L), mezclando 10 μ L de muestra tratada y 500 μ L de reactivo de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce) y leyendo en un espectrofotómetro (Biochrom WPA Biowave DNA Life Science Spectrophotometer) a 595 nm. Se utilizó una curva estándar de concentración de albúmina sérica bovina de 0 a 750 μ g/mL, para determinar concentraciones de proteína dentro de dicho rango.

- Caracterización parcial de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

Para estimar el peso molecular (PM) de las posibles proteínas presentes o sus fragmentos, en una cámara electroforética (Bio-Rad) se corrieron geles de SDS-PAGE al 15 y 22% a un voltaje constante de 170 V durante 2 horas aproximadamente y luego fueron teñidos con nitrato de plata con la técnica descrita por Blum *et al.* en 1987 (6).

Los geles fueron cargados con muestras de base y pared tratadas con CNBr en ácido fórmico 70% (BtCNBr y PtCNBr, respectivamente) y tratadas sólo en ácido fórmico 70% (BtAF y PtAF, respectivamente) a distintos tiempos (1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas), las cuales se hirvieron a 100°C por 5' con un buffer de carga 5X con ditioneitol (DTT) en la razón 4:1 (muestra:buffer). Además, se cargaron dos marcadores de PM de amplio rango de tamaños (New England BioLabs, P7702 de 6,5 a 212 Da y P7708 de 7 a 175 Da).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización histológica de las células productoras de cemento

A la microscopía óptica de manto de picoroco se distinguen tres tipos principales de células: células glandulares productoras de cemento, células ováricas formando folículos ováricos y tejido conectivo rodeando a ambos tipos celulares (fig. 1a).

Célula glandular productora de cemento

Las células productoras de cemento se observan basófilas al ser teñidas con las técnicas de hematoxilina-eosina y azul de toluidina, lo cual indica una producción activa de proteínas. Éstas se ubicaron en grupos irregulares, entremezclados con los folículos ováricos. Cada grupo está compuesto de 5 a 15 células en distintas etapas de desarrollo, en un rango de diámetro celular de aprox. 20 a 120 μm (fig. 1a).

Las células de cemento inmaduras (de 20 a 50 μm) son redondas u ovals (fig. 1b). Su citoplasma es denso y homogéneo; sus núcleos son redondos, regulares, centralmente situados, con zonas de cromatina laxa y condensada, con 3 a 5 nucléolos. Las células de cemento maduras (de 50 a 120 μm) muestran núcleos grandes, de contorno irregular y pleomórficos, ricos en cromatina laxa, con 7 a 11 nucléolos de distinto tamaño distribuidos irregularmente a través del nucleoplasma (fig. 1d).

El citoplasma de las células glandulares es granuloso y de distribución homogénea. Además, presenta pequeñas vacuolas hacia la periferia de la célula, muy cerca de la membrana plasmática, que aumentan en tamaño y cantidad a medida que la célula de cemento va madurando (fig. 1d, 1f).

En células de hasta 50 μm el núcleo es redondeado y su diámetro corresponde al 50% del diámetro celular (fig. 1b), mientras que en células más grandes, el núcleo es bastante irregular, constituyendo desde el 50 al 80% del diámetro de la célula (fig. 1d). Los núcleos presentan varios nucléolos en su interior, los cuales aumentan en número y tamaño a través de un alza en la producción de proteínas a medida que la célula va madurando.

Mientras que las células glandulares secretan cemento, se observan más pálidas y menos regulares en su forma, es decir, la célula va perdiendo la afinidad al colorante y su forma globosa.

Sistema de conductos

La secreción pasa desde vacuolas a través de la membrana de la célula glandular hacia el lumen de conductos colectores (2 a 4 μm de diámetro), desde donde pasa a conductos secundarios (5 a 7 μm), luego, a conductos primarios (9 a 11 μm) y, finalmente, a conductos circulares (fig. 1c, 1e, 1f).

Los canales secundarios están compuestos de células epiteliales planas, con núcleos alargados, con zonas de cromatina laxa y condensada, mientras que las células epiteliales de los canales principales tienden a ser más grandes, de núcleo redondo (fig. 1e, 1f).

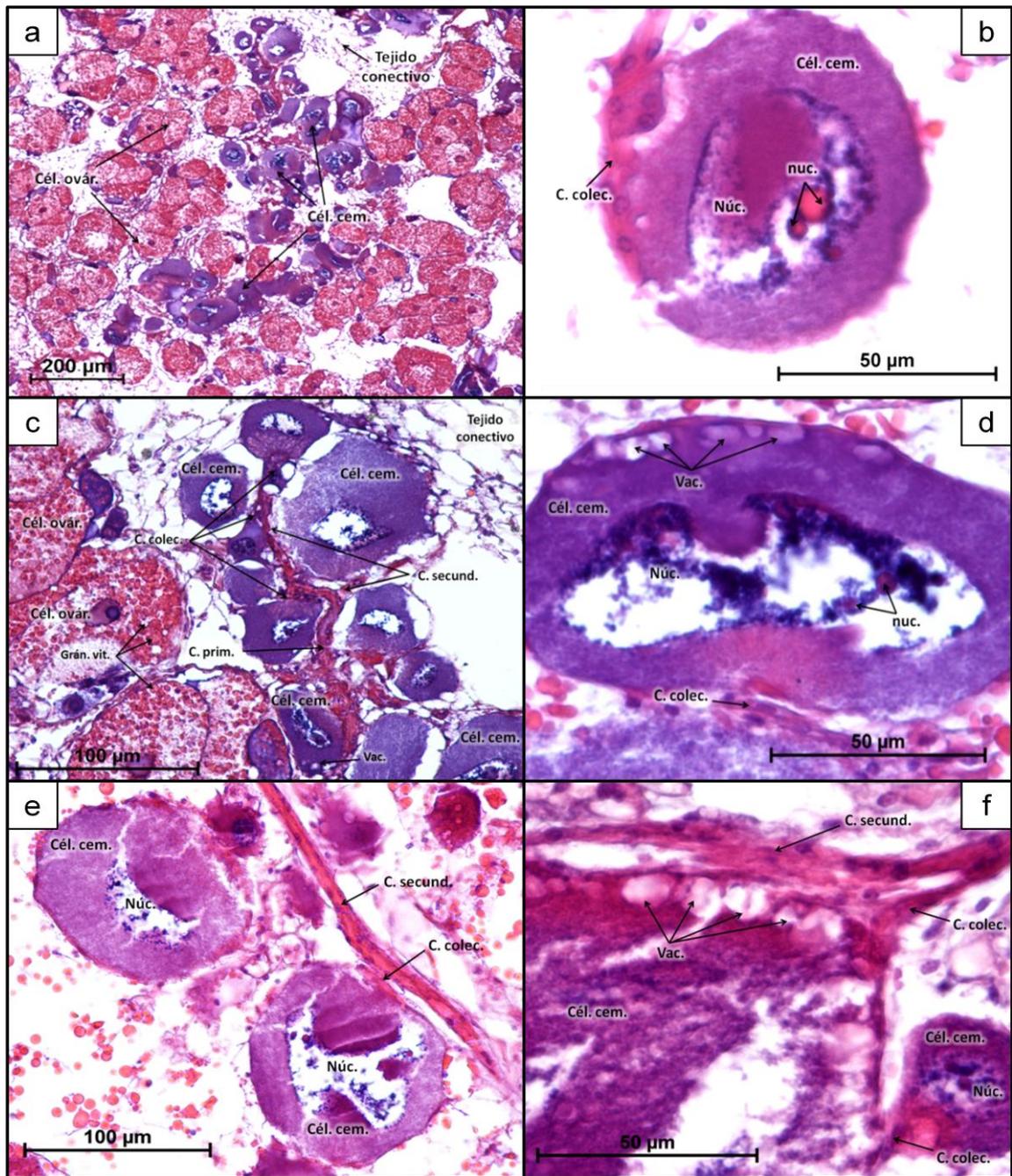


Figura 1. Corte histológico de manto de *A. psittacus*. Se observa un grupo de células de cemento (Cél. cem.) en estrecha relación con células ováricas (Cél. ovar.) que conforman folículos (a); célula de cemento inmadura con núcleo (Núc.) regular y central con pocos nucléolos (nuc.) que vierte su secreción en un conducto colector (C. colec.) (b); células de cemento que secretan a un conducto colector, que confluyen en conductos secundarios (C. secund.) y éstos en un conducto primario (C. prim.), y células ováricas llenas de gránulos de vitelo (Grán. vit.) en su citoplasma (c); célula de cemento madura con núcleo irregular con varios nucléolos y vacuolas (Vac.) hacia la periferia que vierte su secreción a un conducto colector (d); células de cemento con su núcleo que vierten su secreción en un conducto colector, que desemboca en un conducto secundario (e); célula de cemento con vacuolas hacia la periferia del citoplasma que secretan hacia un conducto colector que desemboca en un conducto secundario (f). Tinción hematoxilina-eosina. Magnificación 10X (a), 40X (c, e) y 100X (b, d, f).

3.2 Caracterización ultraestructural de las células productoras de cemento

Con TEM de manto de picoroco se distinguen cinco tipos principales de células: células glandulares productoras de cemento, células epiteliales de conductos colectores, fibras musculares, células ováricas y tejido conectivo rodeándolas.

La estructura típica de las células ováricas y musculares facilita su diferenciación de las células productoras de cemento que se encuentran en estrecha relación con ambos tipos celulares. Las células ováricas se caracterizan por la presencia de gránulos de vitelo en su citoplasma (fig. 2a), los cuales se observan como estructuras esféricas de 900 nm de diámetro muy electrondensas, mientras que la estructura fibrilar de la célula muscular la hace inconfundible (fig. 2c).

Célula glandular de cemento

En una misma zona se observan células glandulares en distintas etapas de desarrollo y maduración. Las células inmaduras son redondas con citoplasma homogéneo, sus núcleos son redondos, regulares, con zonas de heterocromatina y eucromatina, con 3 a 5 nucléolos. Las células maduras no pudieron observarse completamente debido a los grandes

aumentos que utiliza TEM, pero se apreciaron sus núcleos grandes, de contorno irregular, ricos en cromatina laxa o eucromatina, con varios nucléolos de distinto tamaño (de 300 a 900 nm), indicando una síntesis activa de proteínas.

Las células de cemento no son polarizadas y su tamaño varía desde 14 μm de diámetro (hasta 120 μm de acuerdo a las técnicas de microscopía óptica).

La célula madura en su citoplasma contiene de moderada a alta cantidad de retículo endoplásmico rugoso (RER), ya sea en estado natural o formando acúmulos (1 a 2 μm de diámetro), mitocondrias (3 μm de longitud y 1,5 μm de ancho) y aparato de Golgi (6 cisternas paralelas de 2 μm de longitud y 800 nm de ancho) con vacuolas finales de 1 μm de diámetro, indicando una producción activa de proteínas. (fig. 2b, 2d).

Estas vacuolas de secreción están llenas de un material moderadamente denso y difuso (fig. 2b, 2e) y se presentan agregadas (1–3 μm diámetro) o fusionadas (> 5 μm), aumentando de tamaño hacia la periferia, pudiendo llegar a ocupar una vacuola casi la totalidad del citoplasma.

Además, se observan interdigitaciones de la membrana plasmática entre dos células de cemento contiguas (1 μm de longitud y 200 nm de ancho), pero no queda clara su función (fig. 2f).

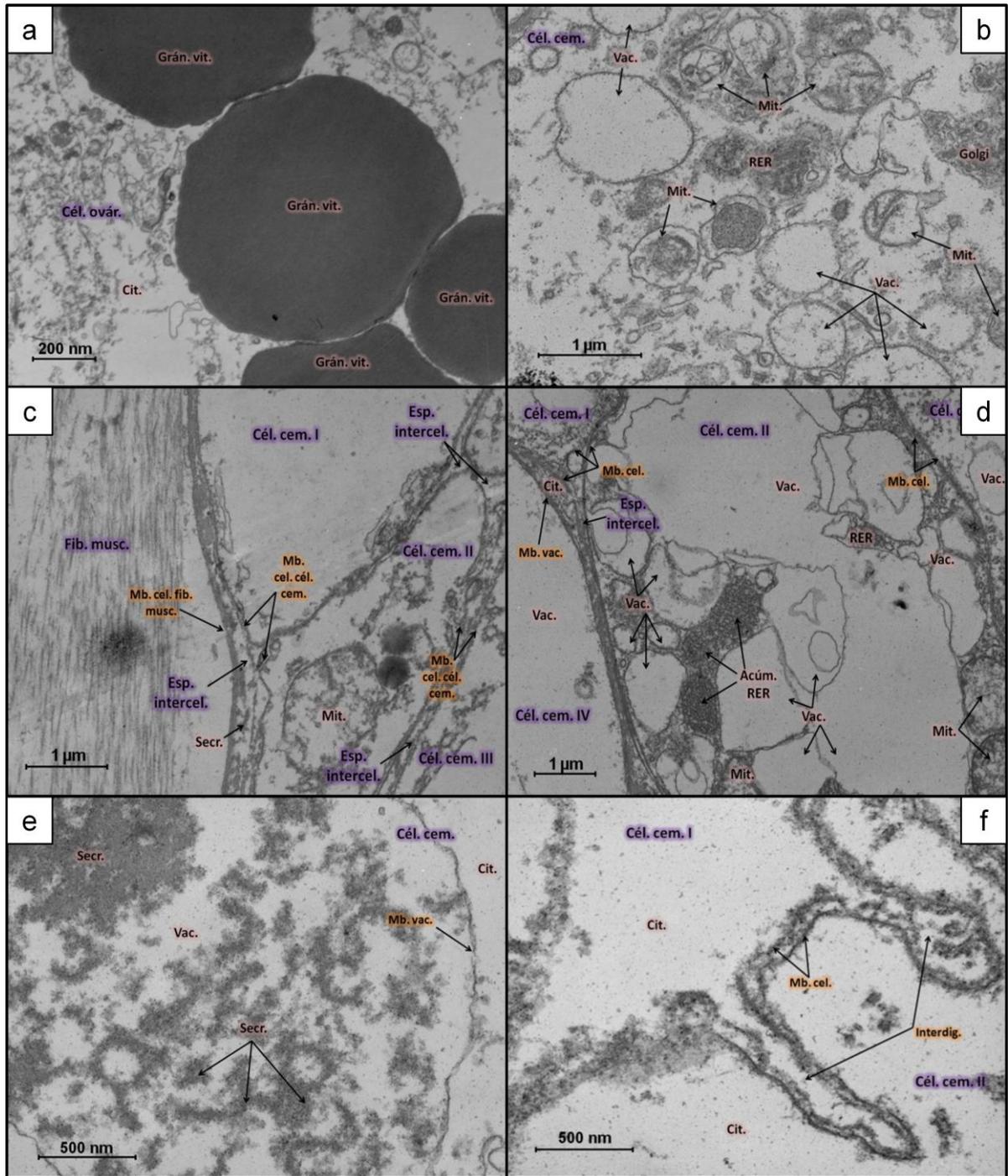


Figura 2. Corte fino de manto de *A. psittacus*. Se observan parte de una célula ovárica (Cél. ovár.) conteniendo gránulos de vitelo (Grán. vit.) en su citoplasma (Cit.) (a); en una célula de cemento (Cél. cem.) se observan mitocondrias (Mit.), retículo endoplasmático rugoso (RER), aparato de Golgi (Golgi) y vacuolas (Vac.) (b); células de cemento en estrecha relación con una fibra muscular (Fib. musc.), notándose sus membranas celulares (Mb. cel.) y los espacios intercelulares (Esp. intercel.) entre las células (c); diversos organelos en una célula de cemento, destacándose los acúmulos de retículo endoplasmático rugoso (Acúm. RER) y una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma (d); en el citoplasma de una célula de cemento una vacuola llena de secreción (Secr.) (e); dos células de cemento unidas a través de interdigitaciones (Interdig.) de sus membranas celulares (f). Tinción acetato de uranilo y citrato de plomo. Magnificación 7.900X (a, d), 11.500X (c), 13.500X (b), 28.500X (e, f).

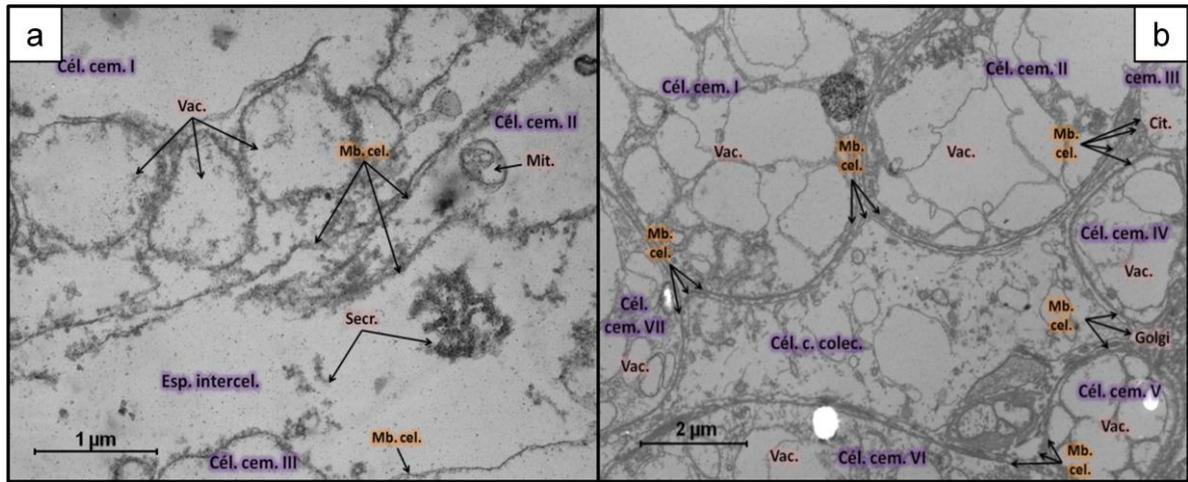


Figura 3. Corte fino de manto de *A. psittacus*. Se observan vacuolas (Vac.) en tres células de cemento (Cél. cem.) que vierten su secreción (Secr.) al espacio intercelular (Esp. intercel.) delimitado por sus membranas celulares (Mb. cel.), además, una mitocondria (Mit.) (c); siete células de cemento alrededor de una célula del conducto colector (Cél. c. colec.) (d). Tinción acetato de uranilo y citrato de plomo. Magnificación 5.800X (b), 15.500X (a).

Sistema de conductos

Los conductos colectores están formados por células epiteliales planas (10 μm de longitud y 5 μm de ancho), polarizadas, con núcleos alargados (5 μm de longitud y 3 μm de ancho), zonas de heterocromatina y eucromatina, 2 a 3 nucléolos (1 μm de diámetro), una cantidad moderada de RER, mitocondrias (500 nm de longitud) y vacuolas (< 1 μm de diámetro) (fig. 4).

Aparentemente, el material secretorio contenido en vacuolas citoplasmáticas en la célula glandular, es exocitado al espacio extracelular (o intercelular), luego es endocitado a través de la membrana basal de la célula epitelial del conducto colector en nuevas vacuolas citoplasmáticas y, finalmente, es exocitado al lumen del conducto a través de la membrana apical de la célula (fig. 3a, 3b, 4).

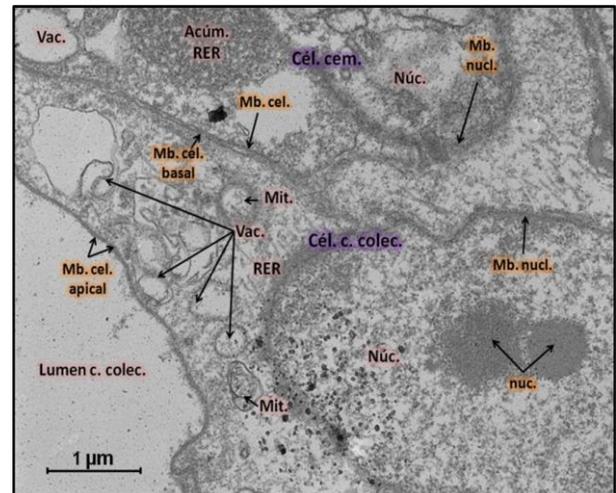


Figura 4. Corte fino de manto de *A. psittacus*. Se observa una célula de cemento (Cél. cem.) en estrecha relación con una célula del conducto colector (Cél. c. colec.). También se muestran: la membrana celular de la célula de cemento (Mb. cel.), membrana celular de célula del conducto colector basal (Mb. cel. basal) y apical (Mb. cel. apical), núcleos de ambos tipos celulares (Núc.) con su membrana nuclear (Mb. nucl.) y nucléolos (nuc.), retículo endoplasmático rugoso (RER) y acúmulos de retículo endoplasmático rugoso (Acúm. RER), mitocondrias (Mit.) y vacuolas (Vac.) que se dirigen al lumen de conducto colector (Lumen c. colec.). Tinción acetato de uranilo y citrato de plomo. Magnificación 10.500X.

3.3 Evaluación de las proteínas del cemento polimerizado

3.3.1 Medición de concentración de proteína total por método de Bradford

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las mediciones de concentración total de proteínas por método de Bradford en muestras de base y pared tratadas con las soluciones *stock* de CNBr y ácido fórmico 70%.

Tabla 2. Concentración total de proteína ($\mu\text{g/mL}$) en muestras de base y pared de concha de picoroco tratadas con CNBr y con ácido fórmico según tiempo de tratamiento.

Tratamiento	1 h	4 h	8 h	16 h	24 h
BtCNBr	262	889	65	83	154
PtCNBr	319	30	27	105	439
BtAF	92	93	131	130	358
PtAF	11	68	405	114	55

Se observa que los valores de concentración total de proteína, pese a no presentar una tendencia clara según los distintos tiempos de tratamiento, en su mayoría resultaron adecuados para realizar geles de SDS-PAGE.

3.3.2 Caracterización parcial de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

En las figuras 5, 6 y 7 se observan los resultados de la migración electroforética en geles de SDS-PAGE de las muestras de base y pared tratadas con CNBr y ácido fórmico 70% a distintos tiempos.

En la figura 5 se puede apreciar que entre los geles 1 y 2 se observan bandas más resueltas en el gel con mayor concentración de acrilamida (22% versus 15%). Además, entre los geles 2 y 3 se observan bandas más definidas en el gel con menor tiempo de tratamiento con CNBr (2 hrs versus 24 hrs).

En la figura 6 se observa que en el gel 4 al aumentar el tiempo de tratamiento con CNBr de las muestras de base, las bandas de mayor PM aparecen más débiles y las de menor PM, más nítidas. En cambio, en el gel 5 al aumentar el tiempo de tratamiento con CNBr de las muestras de pared, las bandas desaparecen.

En la figura 7 se puede notar que el tratamiento con ácido fórmico 70% de las muestras de base y pared fue más suave comparada con el tratamiento con CNBr, ya que aparecen bandas de alto PM más nítidas y bandas de bajo PM ligeramente más débiles. Sin embargo, al aumentar el tiempo de tratamiento con ácido fórmico las bandas de mayor PM aparecen más débiles y las de menor PM, más nítidas.

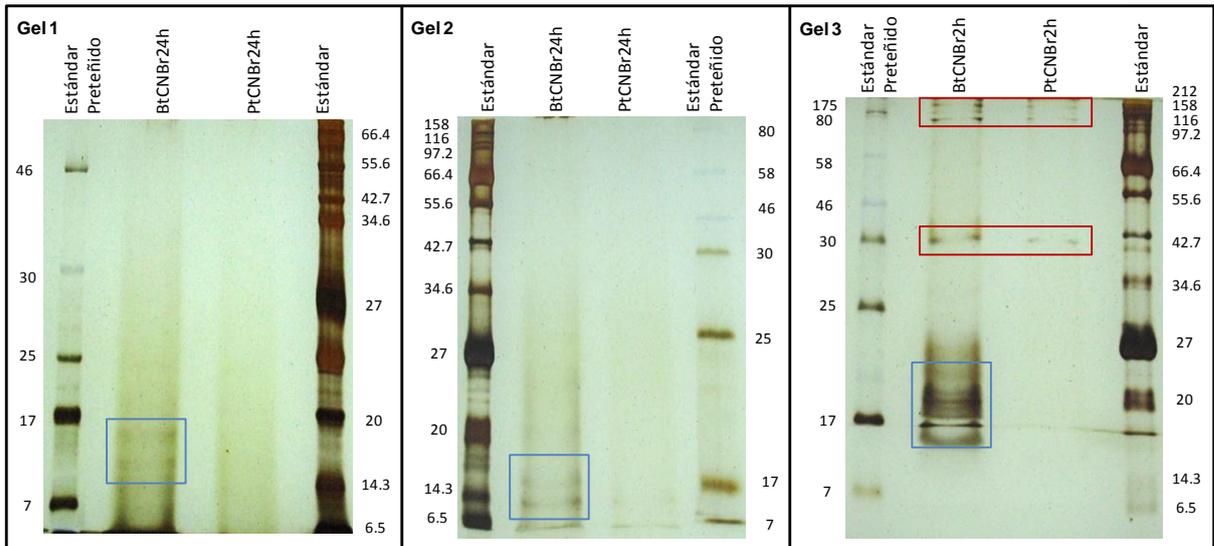


Figura 5. Gel 1 (SDS-PAGE al 15% de muestras de base y pared tratadas con CNBr durante 24 hrs.), gel 2 (SDS-PAGE al 22% de muestras de base y pared tratadas con CNBr durante 24 hrs.) y gel 3 (SDS-PAGE al 22% de muestras de base y pared tratadas con CNBr durante 2 hrs.). Nota: Los recuadros de colores serán explicados en la discusión.

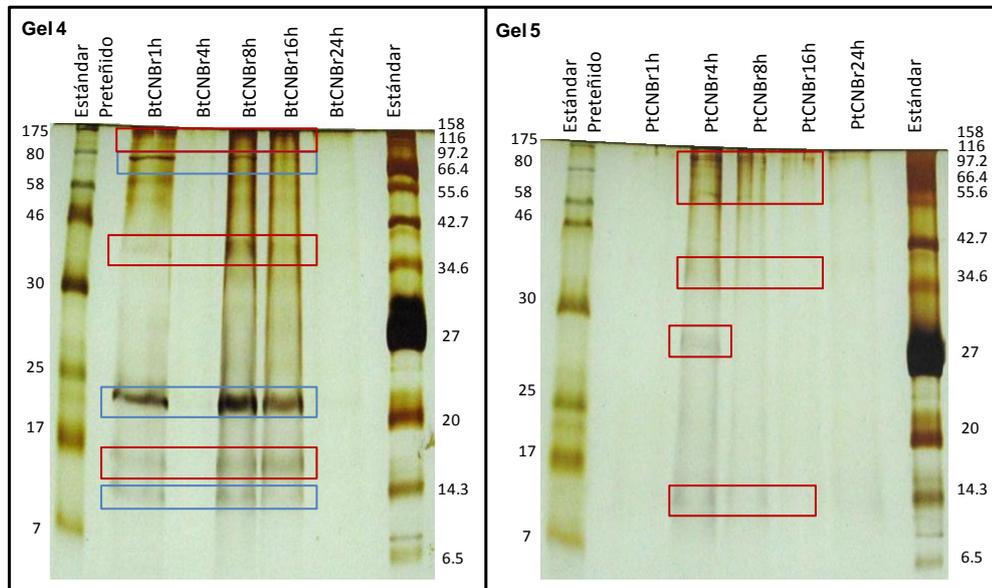


Figura 6. Gel 4 (SDS-PAGE al 22% de muestras de base tratadas con CNBr durante 1, 4, 8, 16 y 24 hrs.) y gel 5 (SDS-PAGE al 22% de muestras de pared tratadas con CNBr durante 1, 4, 8, 16 y 24 hrs.). Nota: Los recuadros de colores serán explicados en la discusión.

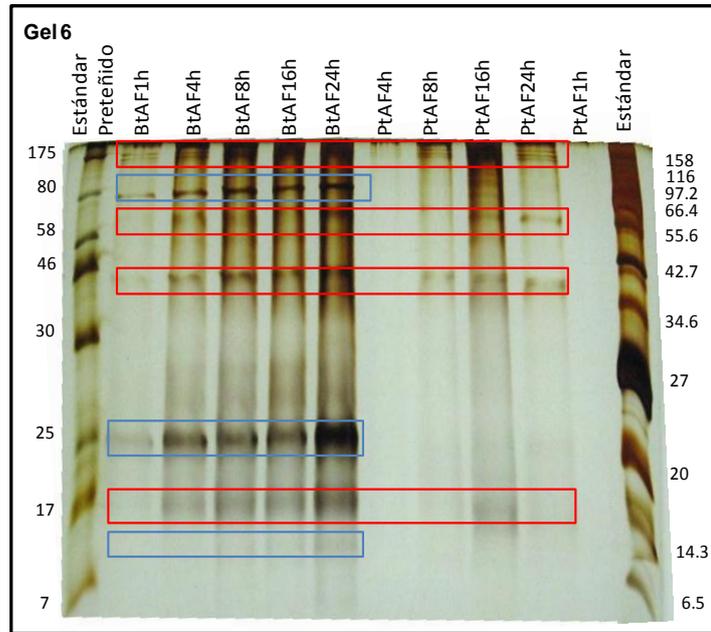


Figura 7. Gel 6 (SDS-PAGE al 22% de muestras de base y pared tratadas con ácido fórmico 70% durante 1, 4, 8, 16 y 24 hrs.). Nota: Los recuadros de colores serán explicados en la discusión.

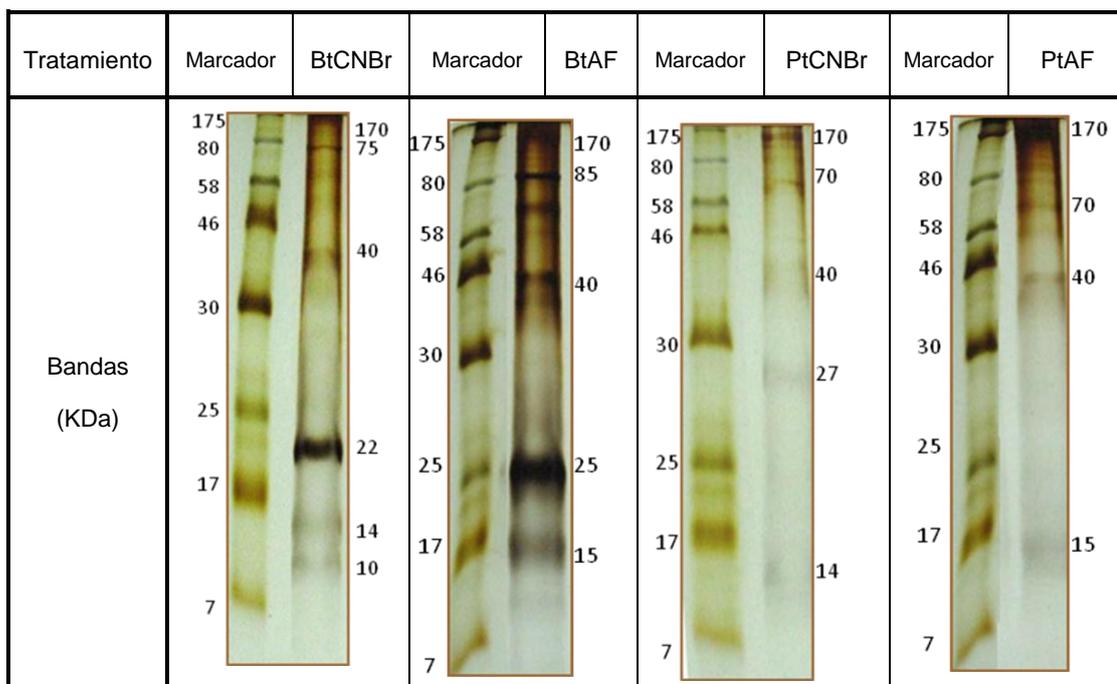
Se ordenaron las proteínas y/o fragmentos de proteínas por peso molecular en las muestras de base y las muestras de pared de concha de picoroco

tratadas con la solución *stock* de CNBr y con ácido fórmico 70% a distintos tiempos de tratamiento (Tabla 3) e independiente de los tiempos de tratamiento (Tabla 4).

Tabla 3. Proteínas y/o fragmentos de proteínas ordenados por peso molecular en muestras de base y pared de concha de picoroco tratadas con CNBr y con ácido fórmico durante 1, 4, 8, 16 y 24 horas.

Tratamiento	BtCNBr1h	BtCNBr8h	BtCNBr16h	BtAF1h	BtAF4h	BtAF8h	BtAF16h	BtAF24h	PtCNBr4h	PtCNBr8h	PtCNBr16h	PtCNBr24h	PtAF8h	PtAF16h	PtAF24h
Bandas (KDa)	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170
				85	85	85	85	85							
	75	75	75						70	70	70	70	70	70	70
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
				25	25	25	25	25	27						
	22	22	22												
			15	15	15	15	15						15	15	15
14	14	14							14	14	14	14			
10	10	10													

Tabla 4. Proteínas y/o fragmentos de proteínas ordenados por peso molecular en muestras de base y pared de concha de picoroco tratadas con CNBr y con ácido fórmico comparadas con un marcador de PM preteñido.



4. DISCUSIÓN

Las técnicas utilizadas en la caracterización de las células glandulares fueron complementarias y aportaron información muy valiosa. La microscopía óptica fue útil para entender la organización de todo el tejido, en particular, cómo se relacionan las células de cemento entre sí y con el resto de las células del manto. En cambio, TEM aportó mucho más en relación a la síntesis y la secreción del cemento.

Con la microscopía óptica se observó que, al igual que en las especies de cirripedios adultos descritos por Lacombe en 1970 (18), el aparato de cemento en

picorocos está compuesto de glándulas unicelulares y de conductos accesorios (fig. 1), por lo tanto, tendrían un origen epidérmico e hipodérmico, respectivamente. Además, como en *B. tintinnabulum*, *B. eburneus* y *B. amphrite*, en *A. psittacus* las células de cemento se organizaron de forma agrupada en el manto (fig. 1a, 1c).

Con TEM se observó que la secreción de cemento en picoroco es de tipo merocrina (fig. 3a, 3b, 4), pero a diferencia de lo descrito en *E. modestus* y *B. balanoides* por Walker en 1970 (28) las vacuolas de secreción pasan desde las células de cemento a conductos extracelulares sin revestimiento de quitina, lo cual fue confirmado al microscopio de

fluorescencia (Nikon Eclipse E400). Además, *A. psittacus* posee una base calcárea, por lo cual se difiere con el modo de secreción según el tipo de base del cirripedio definido en ese estudio.

Además, se notó que fibras musculares en el manto se encuentran en estrecha relación con las células de cemento (fig. 2c), sugiriendo que su contracción ayuda en la secreción de cemento desde la célula glandular hacia el lumen del conducto colector y en su transporte a través de los conductos accesorios, similar a lo que Walley en 1969 (33) propuso para la secreción de cemento permanente del cipris luego del asentamiento.

Por otra parte, se intentó estimar la composición de proteínas del cemento por medio del análisis de proteínas en la secreción producida por células de cemento cultivadas *in vitro*, lo cual no ha sido probado, y por medio del análisis de proteínas en cemento fresco de picorocos cultivados en un acuario, similar a otros estudios (Barlow *et al.* (2010), Berglin y Gatenholm (2003), Dickinson *et al.* (2009), Johnston (2010), Kamino y Maruyama (1996), Kamino *et al.* (2000), Kamino (2001), Naldrett y Kaplan (1997), Urushida *et al.* (2007)). Sin embargo, no fue posible obtener la muestra inicial adecuada, ya que no pudieron seleccionarse células de cemento para ser cultivadas y no se pudo

extraer cemento fresco por contaminación de la muestra al fracturarse la concha de picoroco. Finalmente, se analizaron las proteínas presentes en cemento polimerizado en la placa basal, por tanto, insoluble.

En estudios anteriores se solubilizó el cemento fresco de cirripedios mediante condiciones denaturantes reductoras y no reductoras. Naldrett (1993) y Naldrett y Kaplan (1997) y Dickinson (2009) utilizaron un buffer de carga reductor para la electroforesis con 2-mercaptoetanol (2-ME) y Kamino *et al.* (1996), Kamino *et al.* (2000) y Berglin y Gatenholm (2003) otro con DTT y guanidina hidrocioruro. Naldrett y Kaplan (1997) incubaron cemento a 40°C por 24 horas bajo condiciones no reductoras. Además, Kamino *et al.* (1996) y Naldrett y Kaplan (1997) utilizaron CNBr para fraccionar las proteínas del cemento.

En esta memoria, para solubilizar el cemento polimerizado, se probó con CNBr en ácido fórmico 70% y sólo con ácido fórmico 70% como lo describieron Naldrett y Kaplan en 1997 (20), siendo sometidas todas las muestras a condiciones denaturantes reductoras mediante el tratamiento con ácido fórmico y, luego, el uso de un buffer de carga con DTT y temperatura elevada. También se probó un buffer de carga con 2-ME, pero al mezclarlo con las muestras, precipitaron.

Cabe señalar que el ácido fórmico es un buen solvente y denaturante de proteínas, mientras que CNBr en medio ácido escinde selectivamente el enlace al lado carboxi-C-terminal de los residuos metionil y, debido a que metionina es uno de los aminoácidos menos abundantes, la escisión en ese residuo tiende a generar un número relativamente pequeño de péptidos de gran tamaño, hasta 10 – 20 KDa (26). Por lo tanto, dependiendo de la composición de Met de la proteína, será el tamaño de los fragmentos producidos.

Por ejemplo, la composición de Met determinada mediante análisis de aminoácidos en una proteína de cemento de *M. rosa* de 100 KDa (Mr_{cp}-100k) fue de 1,11% (14), en el cemento de *B. eburneus*, de 1,07% (20) y en la concha de *Ibla cumingi*, de 5,2% (19). Según esto, CNBr fragmenta las proteínas de la concha en péptidos más pequeños que los producidos a partir de las proteínas cemento, los cuales, probablemente, se pierden a través del gel.

Por lo tanto, CNBr no es un buen método para solubilizar proteínas, ya que las fracciona, apareciendo artefactos en los geles que corresponden a fragmentos de proteínas, no proteínas propiamente tales; no así el ácido fórmico, el cual desnaturaliza las proteínas.

Para medir la concentración total de proteínas en las muestras tratadas con CNBr y ácido fórmico se utilizó el método de Bradford (7), el cual implica el uso del colorante azul de Coomassie, que en solución ácida reacciona con aminoácidos básicos y aromáticos, resultando en un cambio de absorbancia de 470 nm a 595 nm (1, 17). El colorante se une más fácilmente a residuos arginil y lisil. Esta especificidad puede llevar a variación en la respuesta a distintas proteínas (1 17).

Por ejemplo, mediante un análisis de aminoácidos en Mr_{cp}-100k se determinó la composición de arginina en 5,61% y de lisina en 3,64% (14); en el cemento de *B. eburneus*, en 7,5% y 5,27% (20); en el cemento solidificado de *B. glandula* y *B. nubilus*, en 2,16% y 3,27% (21) y en la concha de *B. glandula* y *B. nubilus*, en 2,08% y 2,04% (21), respectivamente. Según esto, pudo sobrestimarse la concentración total de proteína en las muestras de base de picoroco que, independiente del tratamiento, fue mayor que en las muestras de pared.

Además, algunos productos químicos alteran la absorbancia, por lo cual los estándares se pueden preparar en el buffer de la muestra y el buffer se utiliza como blanco (1, 17). Debido a que no se ha señalado un máximo de concentración de CNBr y NaOH que interfiera con el método

de Bradford (24), sería conveniente incluir estos reactivos para evitar errores en la medición de la concentración total de proteínas de las muestras.

En la Tabla 2 se notó que existe gran variación en los valores de concentración total de proteína entre muestras, tipo y tiempo de tratamiento. BtCNBr varió de 65,2 a 889 $\mu\text{g/mL}$; BtAF, de 91,5 a 358 $\mu\text{g/mL}$; PtCNBr, de 26,8 a 439 $\mu\text{g/mL}$; y PtAF, de 10,6 a 405 $\mu\text{g/mL}$. Esto pudo estar dado por una composición aminoacídica (Arg, Lys) variable entre proteínas, una deficiente homogeneización de las muestras y la presencia de productos químicos que alteran la absorbancia.

Al analizar los resultados de la migración electroforética en geles de SDS-PAGE de muestras de base y pared tratadas a distintos tiempos, se inferió que el tiempo de tratamiento es determinante en la aparición de bandas. Por un lado, a mayor tiempo de tratamiento con CNBr se produce mayor fragmentación de proteínas, lo que queda en evidencia en los geles 4 y 5 (fig. 6), en que al aumentar el tiempo de tratamiento en las muestras de base, las bandas de mayor PM aparecen más débiles y las de menor PM, más nítidas, sugiriendo que las bandas de bajo PM son fracciones de las de alto PM; mientras que al aumentar el tiempo de tratamiento en las muestras de pared, las

bandas desaparecen, sugiriendo que los fragmentos peptídicos más pequeños se pierden a través del gel. Por otro lado, a mayor tiempo de tratamiento con ácido fórmico se produce mayor solubilización de las proteínas, lo que puede apreciarse en el gel 6 (fig. 7), en que al aumentar el tiempo de tratamiento, las bandas de mayor PM aparecen más débiles y las de menor PM, más nítidas, siendo más evidente en las muestras de base.

En la Tabla 3 se ordenaron las bandas resultantes de los geles de SDS-PAGE, señalando que en cada tratamiento (BtCNBr, BtAF, PtCNBr y PtAF) y a distinto tiempo (1, 4, 8, 16 y 24 hrs.) se observaron bandas del mismo PM. Sin embargo, en los geles de las figuras 6 y 7 se apreció que estas bandas tienen distinta intensidad y nitidez, sugiriendo que existe denaturación y/o fragmentación de proteínas. Esto explica que la banda de 27 KDa que apareció en PtCNBr4h no se observó a más tiempo ni en otro tratamiento, la cual, probablemente, se fragmentó en péptidos de menor PM al aumentar el tiempo de tratamiento.

La elección del gel depende del tamaño de la proteína en estudio y si las proteínas cubren un amplio rango de valores de PM es más apropiado el uso de un gel de gradiente (31). Un amplio rango del gradiente (4–20%) es una buena elección

para separar proteínas en una mezcla compleja que contiene polipéptidos de un amplio rango de PM (24). En esta memoria, los geles de poliacrilamida se prepararon al 22% porque se asumió que CNBr fragmentaría las proteínas en pequeños péptidos (de hasta 20 KDa de acuerdo a lo descrito por Smith (2002) (26), los cuales migrarían adecuadamente a través de los geles.

Sin embargo, los cristales de CNBr de color (amarillo o naranja) muestran signos de degradación y al ser utilizados pueden ocurrir reacciones secundarias o disminuir el rendimiento de escisión (26) y el reactivo que fue utilizado era de color amarillo y, además, en los geles aparecieron bandas mayores a 20 KDa, sugiriendo que por degradación del reactivo pudo disminuir el rendimiento de fragmentación.

Para visualizar las proteínas de los geles de SDS-PAGE se utilizó la tinción de plata, ya que tiene un umbral de detección de 0,05 ng de proteína, siendo más sensible que el método que utiliza azul de Coomassie para cantidades de proteínas superior a 10 ng por banda (24). Sin embargo, los geles con un alto porcentaje de acrilamida pueden requerir un período más largo de fijación para la visualización de bandas (1, 11). En este estudio se prepararon geles de SDS-PAGE al 22% y se fijaron por el mínimo de

tiempo descrito por Blum en 1987 (6), lo cual pudo haber impedido la aparición de bandas más nítidas e intensas

Lo esperable es que a mayor concentración de proteína medida por método de Bradford aparezcan bandas más intensas y nítidas en el gel de SDS-PAGE, como ocurrió en BtCNBr1h y BtAF24h, y por el contrario, a menor concentración de proteína aparezcan bandas más débiles, como en PtCNBr4h, BtAF1h y PtAF16h-24h, o no aparezcan bandas, como en BtCNBr24h, PtCNBr8h-16h y PtAF1h-4h. Sin embargo, habiendo una concentración de proteínas adecuada (5 a 10 µg de proteína por carril), en PtAF8h aparecieron bandas débiles y en BtCNBr4h y PtCNBr1h-24h no aparecieron bandas, y habiendo una concentración de proteínas insuficiente (< 5 µg de proteína por carril), en BtCNBr8h-16h y BtAF4h-8h-16 aparecieron bandas nítidas. Esto podría estar explicado por una composición aminoacídica (Met, Arg, Lys) variable entre proteínas; una homogeneización deficiente de las muestras; la presencia de productos químicos que alteran la absorbancia; una deficiente solubilización de las proteínas; y la excesiva concentración de acrilamida en los geles de SDS-PAGE.

En la Tabla 4 se resumieron las bandas resultantes de los geles de SDS-PAGE

por tratamiento (BtCNBr, BtAF, PtCNBr y PtAF), pudiéndose apreciar que en las muestras de base tratadas con CNBr resultaron una banda de 22 KDa y otras de 10 y 75 KDa, las cuales probablemente son fragmentos de las bandas de 25 y 85 KDa, respectivamente, de las muestras de base tratadas sólo con ácido fórmico. Por otro lado, en todas las muestras resultaron bandas de 40 y 170 KDa; en las muestras de pared, una de 70 KDa; y en las muestras tratadas con ácido fórmico, una de 15 KDa. Además, en las muestras tratadas con CNBr resultó una banda de 14 KDa y en las muestras de pared tratadas con CNBr, una de 27 KDa, las cuales probablemente son fragmentos de una de las bandas de 40, 70 ó 170 KDa.

Se espera que las bandas presentes sólo en las muestras de base (10, 22, 25, 75 y 85 KDa) corresponden a proteínas del cemento de picoroco y sus fragmentos (en las figuras de los geles está señalado con un recuadro de color azul), mientras que las bandas que se observan tanto en las muestras de base como de pared (14, 15, 40 y 170 KDa) y sólo en las de pared (27 y 70 KDa) corresponden a proteínas de la concha y sus fragmentos (color rojo).

De acuerdo a esto, se planteó que las bandas de 25 y 85 KDa corresponden a proteínas constituyentes del cemento de *A. psittacus* y las de 10, 22 y 75 KDa, a

fragmentos de ellas, mientras que las bandas de 15, 40, 70 y 170 KDa corresponden a proteínas constituyentes de la concha y las de 14 y 27 KDa, a fragmentos de ellas.

Estos pesos moleculares de proteínas o de fragmentos de proteínas difieren de lo señalado anteriormente. Por ejemplo, Naldrett y Kaplan (20) encontraron que las proteínas de cemento de *B. crenatus* tienen PM de 3 a 40-50 KDa y las de *B. eburneus* tienen PM de 7, 22, 36, 52 y 58 KDa; Kamino *et al.* (14), Kamino (15, 16) y Urushida *et al.* (27) encontraron que las proteínas de cemento de *M. rosa* tienen PM de 20, 52, 68 y 100 KDa. Estas diferencias podrían deberse principalmente a la especie estudiada, la pureza de la muestra, la naturaleza del cemento y el método de utilizado para su solubilización.

5. CONCLUSIONES

En esta memoria de título se llevó a cabo la caracterización histológica y ultraestructural del aparato de cemento de picorocos adultos, *A. psittacus*. Este aparato está compuesto de glándulas unicelulares, organizadas en grupos entre los folículos ováricos y comunicadas a la zona de fijación por medio de una serie de canales

accesorios. La célula glandular se caracterizó, incluso a distintas etapas de su desarrollo, por una producción activa de proteínas de cemento, las cuales son contenidas y secretadas en vacuolas citoplasmáticas.

Además, se hizo una estimación preliminar de las proteínas constituyentes del cemento de picorocos, *A. psittacus*, comparando las proteínas solubilizadas de la base con las proteínas solubilizadas de las paredes de la concha, siendo más eficaz para este propósito el tratamiento con ácido fórmico 70%, en comparación al tratamiento con CNBr en ácido fórmico 70%, que no solubiliza, sino que fragmenta las proteínas.

Se estimó que las proteínas de cemento de *A. psittacus* tienen PM de 25 y 85 KDa y fragmentos de 10, 22 y 75 KDa, mientras que las proteínas de la concha de *A. psittacus* tienen PM de 15, 40, 70 y 170 KDa y fragmentos de 14 y 27 KDa.

Por lo tanto, hay proteínas y/o fragmentos de proteínas comunes a la concha y proteínas y/o fragmentos de proteínas propios de la base que son consistentes con la naturaleza del cemento de *A. psittacus*.

6. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Fondo de Financiamiento de Centros de Excelencia en Investigación (FONDAP n° 11980002). Se agradece a Miguel Sepúlveda por la preparación de los cortes histológicos, a la Dra. Nancy Olea por la preparación de los cortes finos, al Dr. Walter Sierralta por facilitar el microscopio electrónico de transmisión del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) y las microfotografías que fueron tomadas, a Cynthia Ortiz, Evelyn Albornoz y Sonia Vidal por su ayuda constante en la ejecución de los distintos protocolos, y a la Dra. María Soledad Fernández y al Dr. José Luis Arias por sus innumerables consejos, gran apoyo e inagotable paciencia para la realización de la presente memoria de título.

REFERENCIAS

1. **AHMED, H. 2005.** Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization. Boca Ratón, Florida. Editorial CRC Press. pp. 35 – 132.
2. **ALDRED, N.; CLARE, A. 2008.** Review, The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings. *Biofouling*. 24 (5): 351 – 363.
3. **ANDERSON, C.; CALLOW, M.; MILNE, A. 2003.** The development of foul-release coatings for seagoing vessels. *J. Mar. Des. Op.*, B. 4: 11 – 23.

4. **BARLOW, D.; DICKINSON, G.; ORIHUELA, B.; KULP, J.; RITTSCHOF, D.; WAHL, K. 2010.** Characterization of the adhesive plaque of the barnacle *Balanus amphitrite*: amyloid-like nanofibrils are a major component. *Langmuir*. 26 (9): 6549 – 6556.
5. **BERGLIN, M.; GATENHOLM, P. 2003.** The barnacle adhesive plaque: morphological and chemical differences as a response to substrate properties. *Colloids Surf., B*. 28: 107 – 117.
6. **BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8: 93 – 99.
7. **BRADFORD, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 – 254.
8. **CALLOW, M. E.; CALLOW, J. A. 2002.** Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist*. 49 (1): 1 – 5.
9. **DICKINSON, G. H.; VEGA, I. E.; WAHL, K. J.; ORIHUELA, B.; BEYLEY, V.; RODRIGUEZ, E. N.; EVERETT, R. K.; BONAVENTURA, J.; RITTSCHOF, D. 2009.** Barnacle cement: a polymerization model based on evolutionary concepts *J. Exp. Biol.* 212: 3499 – 3510.
10. **DREANNO, C.; KIRBY, R.; CLARE, A. 2007.** Involvement of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 351: 276 – 282.
11. **DUNN, M. J. 2002.** Detection of proteins in polyacrylamide gels by silver staining. En: Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook*. Segunda edición. Totowa, New Jersey. Editorial Humana Press. pp. 265 – 271.
12. **JOHNSTON, L. A. 2010.** Thesis. Temperature affects adhesion of the acorn barnacle, *Balanus amphitrite*. San Luis Obispo. California State University. Faculty of California Polytechnic State University.
13. **KAMINO, K.; ODO, S.; MARUYAMA, T. 1996.** Cement proteins of the acorn barnacle, *Megabalanus rosa*. *Biol. Bull.* 190: 403 – 409.
14. **KAMINO, K.; INOUE, K.; MARUYAMA, T.; TAKAMATSU, N.; HARAYAMA, S.; SHIZURI, Y. 2000.** Barnacle Cement Proteins: Importance of disulfide bonds in their insolubility. *J. Biol. Chem.* 275 (35): 27360 – 27365.
15. **KAMINO, K. 2001.** Novel barnacle underwater adhesive protein is a charged amino acid-rich protein constituted by a Cys-rich repetitive sequence. *Biochem. J.* 356: 503 – 507.
16. **KAMINO, K. 2008.** Review, Underwater Adhesive of Marine Organisms as the Vital Link Between Biological Science and Material Science. *Mar. Biotechnol.* 10: 111 – 121.
17. **KRUGER, N. J. 2002.** The Bradford method for protein quantitation. En: Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook*. Segunda edición. Totowa, New Jersey. Editorial Humana Press. pp. 15 – 21.
18. **LACOMBE, D. 1970.** A comparative study of the cement glands in some balanid barnacles (Cirripedia, Balanidae). *Biol. Bull.* 139: 164 – 179.
19. **LOWENSTAM, H. A.; WEINER, S. 1992.** Phosphatic shell plate of the barnacle *Ibla* (Cirripedia): A bone-like structure. *PNAS*. 89: 10573 – 10577.
20. **NALDRETT, M. J.; KAPLAN, D. L. 1997.** Characterization of barnacle (*Balanus eburneus* and *B. crenatus*) adhesive proteins. *Marine Biology*. 127: 629 – 635.
21. **OTNESS, J. S.; MEDCALF D. G. 1972.** Chemical and physical characterization of barnacle cement. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 43: 443 – 449.
22. **PHANG, I. Y.; ALDRED, N.; CLARE, A.; CALLOW, J.; VANCISO, G. J. 2006.** An in situ study of the nanomechanical properties of barnacle (*Balanus amphitrite*) cyprid cement using atomic force microscopy (AFM). *Biofouling*. 22 (4): 245 – 250.
23. **PHANG, I. Y.; ALDRED, N.; CLARE, A.; CALLOW, J.; VANCISO, G. J. 2007.** Towards a nanomechanical basis for temporary adhesion in barnacle cyprids (*Semibalanus balanoides*). *J. R. Soc. Interface*. 5: 397 – 401.
24. **ROSENBERG, I. M. 2005.** Protein Analysis and Purification – Benchtop Techniques. Segunda edición. Boston, Massachusetts. Editorial Springer. p. 63 – 152.
25. **SANGEETHA, R.; KUMAR, R.; VENKATESAN, R.; DOBLE, M.; VEDAPRAKASH, L.; KRUPARATNAM; LAKSHMI, K.; DINESHRAM. 2010.** Understanding the structure of the adhesive plaque of *Amphibalanus reticulatus*. *Mater. Sci. Eng., C*. 30: 112 – 119.
26. **SMITH, B. J. 2002.** Chemical cleavage of proteins at methionyl-X peptide bonds. En: Walker, J. M. *The Protein Protocols Handbook*. Segunda edición. Totowa, New Jersey. Editorial Humana Press. pp. 485-491.
27. **URUSHIDA, Y.; NAKANO, M.; MATSUDA, S.; INOUE, N.; KANAI, S.; KITAMURA, N.; NISHINO, T.; KAMINO, K. 2007.** Identification and functional characterization of a novel barnacle cement protein. *FEBS Journal*. 274: 4336 – 4346.

28. **WALKER, G. 1970.** The histology, histochemistry and ultrastructure of the cement apparatus of three adult sessile barnacles, *Elminius modestus*, *Balanus balanoides* and *Balanus hameri*. *Marine Biology*. 7: 239 – 248.
29. **WALKER, G. 1971.** A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides*. *Marine Biology*. 9: 205 – 212.
30. **WALKER, G. 1999.** Cirripedia. En: Harrison, F. W.; Humes, A. G. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. 9: Crustacea. New York, Chichester. Editorial Wiley-Liss. pp. 249 – 311.
31. **WALKER, J. M. 2002.** *The Protein Protocols Handbook*. Segunda edición. Totowa, New Jersey. Editorial Humana Press. pp. 61 – 67.
32. **WIEGEMANN, M. 2005.** Review. Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): Mechanisms and technical applications. *Aquat. Sci.* 67: 166 – 176.
33. **WALLEY, L. J. 1969.** Studies on the larval structure and metamorphosis of *Balanus balanoides* (L.). *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* 256: 237 – 280.
34. **YEBRA, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. 2004.** Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* 50: 75 – 104.
35. **YEBRA, D. M.; CATALÀ, P. 2011.** Redefining antifouling coating technology - Part 1. *Mater. Performance.* 50 (4): 42 – 46.