



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



EFFECTO DE LA MATRIZ ORGÁNICA DE PICOROCO SOBRE LA
REPARACIÓN DE LA CONCHA DEL CARACOL DE TIERRA
HELIX ASPERSA

ALEJANDRA GALINDO AVILA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: JOSÉ LUIS ARIAS

SANTIAGO, CHILE
2013



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



EFECTO DE LA MATRIZ ORGÁNICA DE PICOROCO SOBRE LA
 REPARACIÓN DE LA CONCHA DEL CARACOL DE TIERRA
HELIX ASPERSA

ALEJANDRA GALINDO AVILA

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Ciencias
 Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JOSÉ LUIS ARIAS
PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS

SANTIAGO, CHILE
 2013

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores José Luis Arias y María Soledad Fernández, quienes me brindaron su ayuda en todo momento y fueron los gestores de este proyecto que hoy se concreta.

Y ante todo a mi familia, especialmente a mis padres, a los que dedico esta memoria por su incondicional apoyo y por enseñarme a caminar con fe para concretar mis sueños.

RESUMEN

La concha del caracol *Helix aspersa* ha sido estudiada como modelo biomineral por poseer una fase orgánica y una inorgánica. Se sabe que su producción es responsabilidad del manto. Mediante estudios histológicos, se vio que en su mayoría corresponde a un epitelio cilíndrico que disminuye su grosor hacia el centro y que en el borde posee tres pliegues y glándulas glomerulares. Estas peculiaridades podrían explicar que sólo el borde sea capaz de formar tanto la porción biomineral como el periostraco, en tanto el resto del manto no produce este último. En cuanto a la composición de la concha se sabe que la fase orgánica corresponde a proteínas, polisacáridos, proteoglicanos y lípidos y la inorgánica a cristales de aragonita. En la presente memoria se evaluó si el uso de un sustrato externo, matriz orgánica de picoroco, puede influenciar el polimorfo de CaCO_3 producido luego de la realización de una injuria y su posterior reparación. Se usaron tres grupos de caracoles, un control con la injuria expuesta al ambiente, un control cubierto con Parafilm® y un grupo experimental con sustrato. Se observó por microscopía SEM, espectroscopía RAMAN y FTIR que la fase inorgánica corresponde a aragonita. Si bien no se vio influencia, es necesario estudios en periodos más breves que pudiesen evidenciar lo contrario.

Palabras clave: *Biomíneral, manto, concha, aragonita*

ABSTRACT

The shell of the land snail, *Helix aspersa*, has been studied as a biomineral model, because it has an organic and inorganic portion. It is known that its production is responsibility of the mantle. By histological studies, we saw that it corresponds to a columnar epithelium that gets smaller to the center and has three folds and glomerular glands in the edge. These peculiarities may explain that only the edge is able to form the biomineral portion and the periostracum, while the rest of the mantle can't produce this last one. In terms of the composition, it is known that the organic phase corresponds to proteins, polysaccharides, proteoglycans and lipids and the inorganic is made by aragonite crystals. In these work, we evaluate if the use of an external substratum, organic matrix of picoroco could influence on the type of CaCO_3 polymorphous produced after making an injury and its fixing process. Three groups of snails were used, a control group with an exposed injury, a control group covered with Parafilm® and an experimental group with substratum. We saw under SEM microscopy, RAMAN and FTIR spectroscopy, the inorganic phase is aragonite. Although no influence was shown, it is necessary to perform experiment on shorter times, that could evidence something different.

Keywords: *Biomíneral, mantle, shell, aragonite*

Introducción

El proceso de biomineralización se define como los mecanismos por los cuales los organismos vivos forman minerales integrados a una fase orgánica (Lowenstam and Weiner, 1989). Este fenómeno se puede evidenciar en diversos modelos de la naturaleza como esqueletos, exoesqueletos, la cáscara del huevo y la concha de moluscos, como el caracol de tierra *Helix aspersa*, siendo este último el elegido para el presente estudio, dada su facilidad de obtención y mantención.

Para entender la biomineralización se han desarrollado estudios desde distintas perspectivas: composición, organización estructural, formación y reparación de la concha.

En cuanto a la composición se sabe que la fase orgánica corresponde a una mezcla de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, representando usualmente menos de un 5% del peso de la concha, y a pesar de ello ejerciendo un importante control del proceso de construcción de la concha, puesto que es la estructura orgánica tridimensional que precede la deposición mineral (Pavat *et al*, 2012). En tanto, la fase inorgánica es carbonato de calcio (CaCO_3) en forma de cristales de aragonita (Saleuddin, 1971).

Estudios recientes respecto de la estructura de la concha consideran la presencia de una primera capa proteica denominada

periostraco, bajo la cual existen 5 capas biominerales: una externa con cristales granulares elongados, 3 capas medias lamelar cruzadas y una interna como remanente de las anteriores, también denominada capa nacarada (Pavat *et al*, 2012).

La concha de *H. aspersa* cubre la porción visceral del cuerpo y crece en sentido dextrógiro por depósito de materiales orgánicos e inorgánicos por parte del epitelio subyacente, denominado manto. Se sabe de este proceso, que en los moluscos, es el epitelio del borde el único responsable de formar el periostraco, mientras que el resto del epitelio secreta la fase biomineral. Esto último ha sido corroborado por análisis de reparación de concha de caracoles *Otala lactea*, donde se describe que el proceso se inicia cuando el manto secreta una capa de matriz orgánica, y luego produce el depósito de pequeños cristales que coalescen para formar la capa calcificada, sin embargo, el periostraco que está presente durante el crecimiento normal de la concha, está ausente en la concha en reparación, esto último no sucedería cuando la injuria es realizada en el borde de la concha (Meenakshi *et al.*, 1974). Pese a conocerse este rol del epitelio, no se dispone de una descripción histológica que muestre las diferencias de las porciones que lo conforman, siendo este uno de los objetivos del presente estudio.

En relación a la concha reparada se ha visto que la fase cristalina correspondería principalmente a calcita (Saleuddin, 1971).

Dados los estudios tanto de la concha normal como en su estado reparativo, se hace necesario evaluar la potencialidad de ejercer influencia en el procedimiento de biomineralización. Esto se realizó mediante el uso de un sustrato externo, matriz orgánica de picoroco. Ya en 2002, Arias estimó el rol de la matriz orgánica del picoroco en la formación de la concha del mismo, específicamente por la presencia de proteoglicanos ricos en glicosaminoglicanos de queratán sulfato, dermatán sulfato y condrotín sulfato, los que modificarían la morfología de los cristales de CaCO_3 *in vitro* e *in vivo*. De allí que se postule que si la matriz orgánica de picoroco modula la cristalización de CaCO_3 en la concha de picoroco, también ejercerá un efecto modulador al ser utilizada como sustrato para la reparación de la concha de caracol *Helix aspersa*.

Materiales y Métodos

Caracoles *Helix aspersa*

Para la obtención de muestras se mantuvieron en cautiverio caracoles *H. aspersa*, en terrarios a temperatura ambiente y con humidificación constante para mantener un estándar cercano al 70%. Los individuos se alimentaron con hojas de lechuga y zanahoria y se suplementaron

con cáscara de huevo molida como aporte de calcio.

El sustrato

El sustrato externo que se utilizó corresponde a parte de la matriz orgánica de picoroco. Para la extracción de dicha fracción se sometió la concha de picoroco, previamente reducida a pequeños trozos, a descalcificación en ácido fórmico al 10% por 13 días. De ello resultó un sedimento orgánico insoluble y un sobrenadante. El sedimento se lavó sucesivamente con agua destilada y fue colocado en papel filtro para eliminar el exceso de agua. Finalmente se secó en estufa a 40°C obteniéndose la fracción insoluble como finas láminas que se usaron como sustrato (Arias, 2002). Para su uso, el sustrato fue hidratado con agua destilada y se usaron secciones de aproximadamente 6 mm².

Estudio del manto

Con el fin de caracterizar el manto del caracol *H. aspersa* como tejido productor de la concha se descalcificaron 2 individuos en solución Ana Morse durante 24 horas, para luego obtener un trozo de manto de aproximadamente 3 mm de ancho x 7 mm de largo y que incluyera parte del borde del manto (Figura 1).

Las muestras fueron observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) en microscopio modelo Tesla BS 343 A. Para ello se fijaron por 12 horas en una

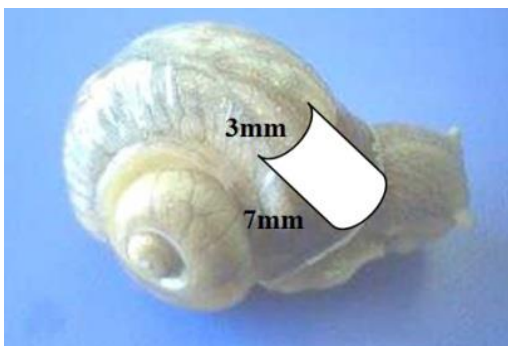


Figura 1. Dimensiones de la muestra de manto de *H. aspersa*

solución de glutaraldehído 3% en *buffer* cacodilato de sodio 100 mM, pH 7,4. Luego fueron lavadas con *buffer* cacodilato de sodio 100 mM, pH 7,4 y posteriormente deshidratadas en pasos sucesivos por acetona a concentraciones crecientes y sometidas a secado de punto crítico. Finalmente se sombrearon las muestras con oro y se montaron en soportes metálicos.

Además se analizaron las muestras por microscopía óptica. Para ello las muestras fueron fijadas en una solución de paraformaldehído 2% + glutaraldehído 0.2% en *buffer* fosfato 0.1 M, pH 7.4 y deshidratadas en etanol a concentraciones crecientes, y luego procesadas por métodos de rutina para la obtención de cortes histológicos que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y Alcian Blue pH 2,5 para determinar la presencia de proteoglicanos

Descripción del proceso reparativo

Con el fin de comparar el proceso reparativo normal y en presencia de sustrato, se

utilizaron 54 caracoles. A todos los individuos se les realizó un orificio de 5 mm de diámetro en la parte superior de la concha con una fresa odontológica de diamante y cuidando de no dañar el manto (Figura 2).

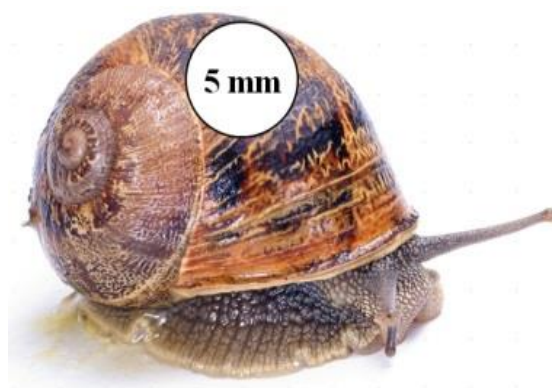


Figura 2. Esquema de la injuria en la concha de *H. aspersa*

Posteriormente a 18 de los caracoles se les introdujo un trozo de matriz orgánica de picoroco en el lugar de la injuria, considerando que tomara contacto con el manto y sellara el orificio desde adentro. Luego se puso, por fuera de la concha del caracol, un trozo de Parafilm® para aislar todo el proceso y evitar el ingreso de sustancias externas o la salida del sustrato, estos fueron los individuos experimentales. A otro grupo de 18 caracoles se les colocó un trozo de Parafilm® como capa protectora y aislante del exterior, estos fueron el grupo control 1. Finalmente al resto de los caracoles se les dejó sin ningún tipo de protección en el orificio realizado en la concha, siendo estos individuos el grupo control 2. (Figura 3).

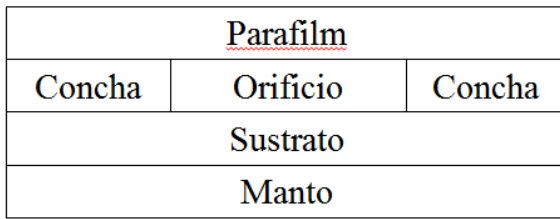


Figura 3. Esquema de la distribución de materiales en la fase experimental

A las 24 horas se tomaron 27 individuos, 9 controles con Parafilm®, 9 controles sin Parafilm® y 9 experimentales, se sacrificaron por medio de una sobredosis de anestesia inhalatoria con isoflurano y se extrajo el trozo de concha reparado con un borde de concha normal de aproximadamente 0,5 cm. Dichas muestras se evaluaron por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS), para verificar la composición elemental de la porción reparada; por SEM, que permitió evaluar la morfología y distribución de la porción cristalina en la concha reparada del caracol, por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía Raman (RAMAN), para la caracterización de los polimorfos que se inducen por efecto del sustrato matriz orgánica de picoroco en la concha reparada de caracol de tierra. Se consideraron 3 individuos del grupo control 1, 3 individuos del grupo control 2 y 3 individuos experimentales para cada caso. Para las muestras evaluadas con SEM, se realizó el mismo procedimiento descrito en la preparación de las muestras de tejido del

Tabla 1. Esquema de la toma de muestras

Individuos muestreados	24 horas	48 horas
Control 1 (Cubierto con parafilm)	3 SEM 3 FTIR- EDS 3 RAMAN-EDS	3 SEM 3 FTIR-EDS 3 RAMAN-EDS
Control 2 (Sin sustrato- sin parafilm)	3 SEM 3 FTIR-EDS 3 RAMAN-EDS	3 SEM 3 FTIR- EDS 3 RAMAN-EDS
Experimental (Con sustrato)	3 SEM 3 FTIR-EDS 3 RAMAN-EDS	3 SEM 3 FTIR- EDS 3 RAMAN-EDS

manto. Las muestras analizadas con FTIR y RAMAN se mantuvieron al vacío para evitar su humidificación. A las 48 horas se realizó el mismo procedimiento, considerando 27 individuos (9 controles con Parafilm®, 9 controles sin Parafilm® y 9 experimentales) en cada caso (Tabla 1).

Resultados

Estudio del manto

Los resultados obtenidos por Microscopía óptica, permitieron la recreación de un esquema general del manto. Éste consta de una primera porción denominada borde del manto que toma contacto con la apertura de la concha, una zona de transición que da origen al manto anterior, seguido del manto medio y posterior (Figura 4).

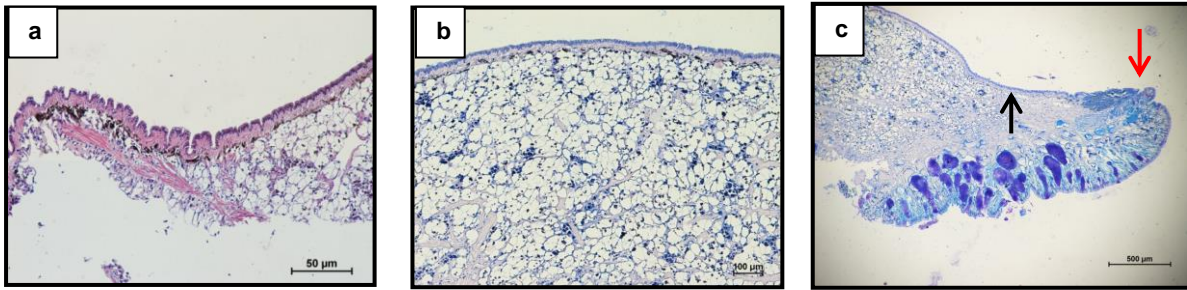


Figura 4. Esquema del manto de *H. aspersa*. (a) Manto posterior (b) Manto medio (c) Flecha negra indica manto anterior, flecha roja indica borde del manto

La descripción de todas estas porciones obtenida por microscopía óptica y SEM arrojó resultados concordantes.

a) Borde del manto: Se compone de tres pliegues, uno externo, uno medio y uno interno. Esta zona se encarga de la formación de la nueva concha y toma contacto constante con la apertura de la misma. Se pudo demostrar la presencia de fibras musculares que se asocian a la movilidad de esta zona. Con respecto al pliegue externo, se puede ver que en su interior posee un aspecto similar al músculo estriado. Su porción interna está revestida por epitelio cilíndrico alto con células de núcleo basal de aproximadamente 30 µm de altura. El pliegue medio, mantiene el tipo de epitelio, pero se pueden apreciar invaginaciones y la presencia de conductos excretores de glándulas glomerular tubulares, que tiñen positivo con alcian blue, asociado a su contenido de proteoglicanos. En

el borde de este pliegue las células son más pequeñas. Finalmente, el pliegue interno conserva el epitelio cilíndrico, pero en el borde las células poseen microvellosidades en su ápice. En la zona baja de este pliegue, las células son más altas (35 µm) y se pueden ver grandes glándulas de baba, positivas a la tinción con alcian blue (Figura 5)

b) Manto anterior: Se caracteriza por tener epitelio cilíndrico simple y células con núcleos basales (30 µm), además de la presencia de vesículas pigmentadas. Presenta gran cantidad de tejido conectivo bajo el epitelio (Figura 6).

c) Manto medio: Muestra el mismo tipo de epitelio, que va disminuyendo en altura a medida que se acerca al manto posterior, además, se ven pliegues en el epitelio y se siguen observando vesículas pigmentadas. Se mantiene la presencia de tejido conectivo (Figura 7).

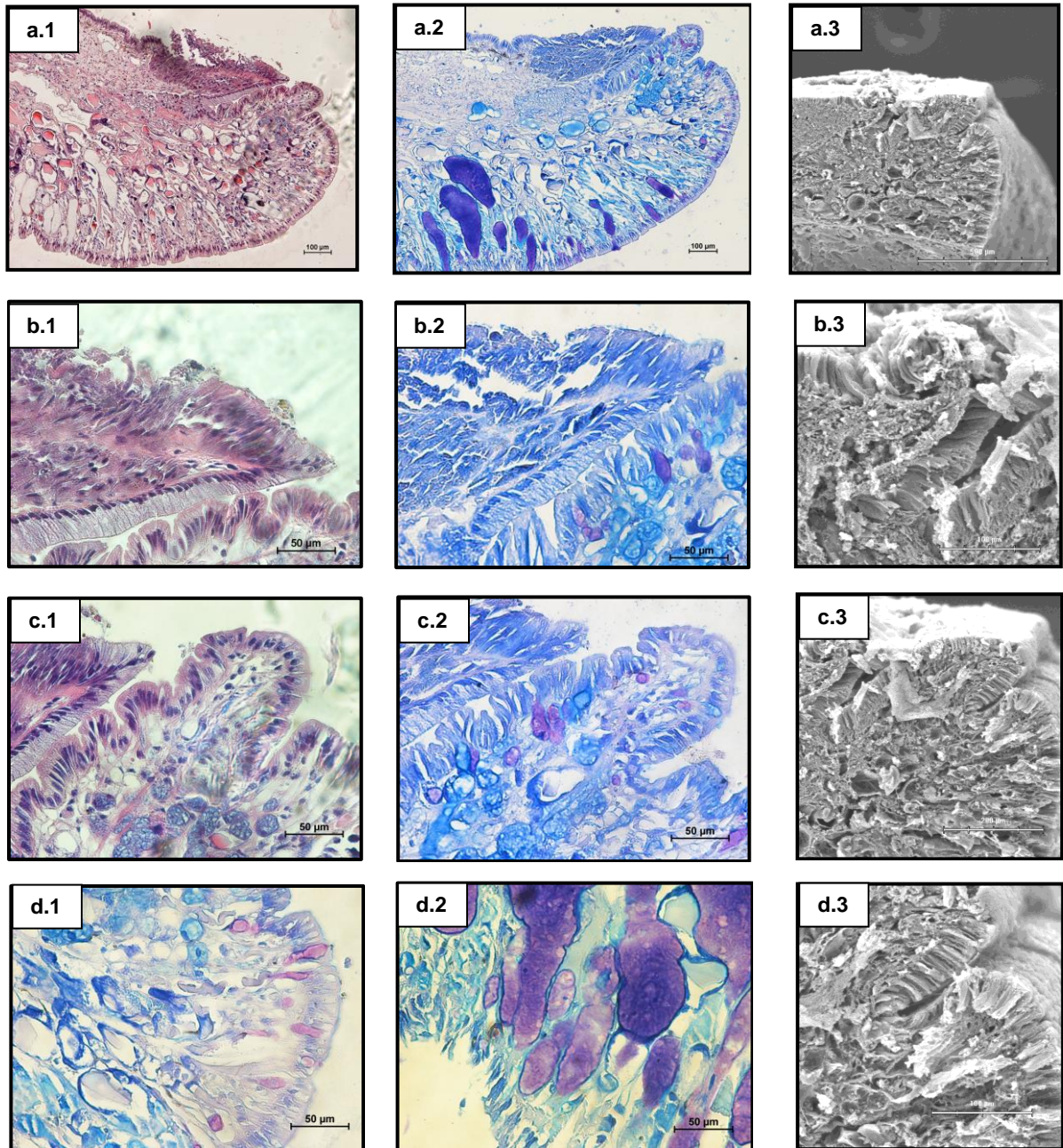


Figura. 5: Microscopía óptica y SEM del Borde del manto: (a.1) MO del borde del manto, tinción Hematoxilina-Eosina(HE) (a.2) MO del borde del manto, tinción Alcian blue (AB) (a.3) SEM del borde del manto (b.1) MO del pliegue externo, tinción HE (b.2) MO del pliegue externo, tinción AB (b.3) SEM del pliegue externo (c.1) MO del pliegue medio, tinción HE (c.2) MO del pliegue medio, tinción AB (c.3) SEM del pliegue medio (d.1) MO del pliegue interno, tinción AB (d.2) MO zona interna del pliegue interno, tinción AB (d.3) SEM del pliegue interno

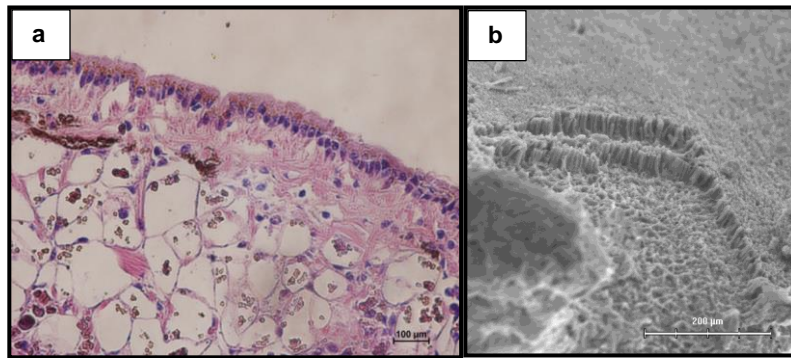


Figura 6 Manto anterior (a) MO del manto anterior, tinción HE (b) SEM manto anterior

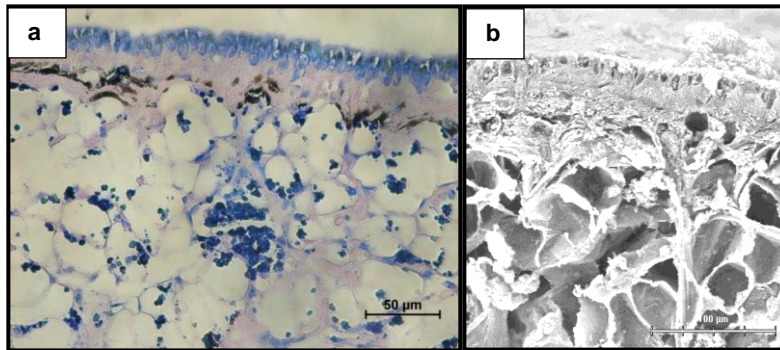


Figura 7 Manto medio (a) MO manto medio, tinción AB (b) SEM manto medio

- d) Manto posterior: La última porción del manto, es la de menor espesor, y está constituido por un epitelio cúbico (15 μm). Bajo este epitelio también se evidencia una menor cantidad de tejido conectivo y la presencia de bandas de tejido muscular liso, que contribuye al movimiento del manto (Figura 8).

Caracterización del proceso reparativo

a) SEM

En los controles sin Parafilm® se observó que a las 24 horas había espículas de aspecto similar a la aragonita en la zona de reparación y a las 48 horas la misma zona se veía cubierta, por una sustancia que correspondería a matriz orgánica, constituida principalmente por β quitina.

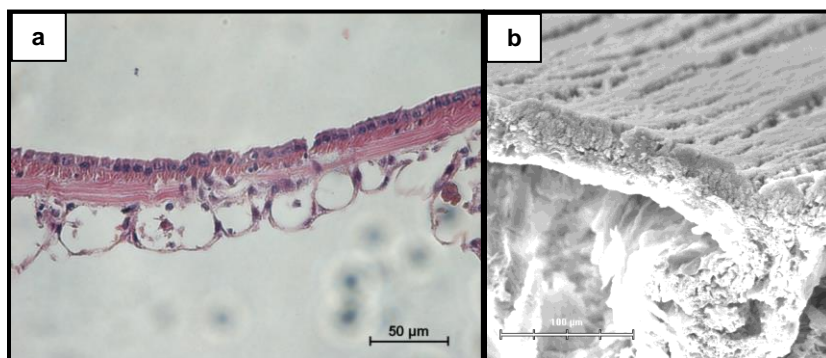


Figura 8 Manto posterior (a) MO manto posterior, tinción HE (b) SEM manto posterior

Los controles con Parafilm®, muestran a las 24 horas tanto en la zona normal, como en la zona de reparación la presencia de cristales en forma de tabletas de CaCO_3 , lo que deja entrever, que el manto actúa como un todo, cubriendo al menos la zona cercana a la lesión con el mismo material.

Llama la atención que directamente sobre el Parafilm®, existió un depósito cristalino de aspecto romboédrico, similar a calcita. A las 48 horas al igual que en lo que sucede sin la presencia de Parafilm® existe una cubierta de matriz orgánica bajo la cual se puede apreciar el material antes depositado.

El análisis del sustrato mostró una red de fibras que corresponde a la matriz orgánica de picoroco.

Las muestras experimentales, mostraron a las 24 horas la presencia de espículas de aragonita sobre una cubierta, que al no ser similar a la imagen del sustrato solo, hace pensar que el epitelio secreta su propia matriz orgánica. Algunas de las espículas evidencian crecimiento o coalescencia, lo

que daría lugar a las tabletas que se pueden ver a las 48 horas. Estas tabletas cristalinas se pueden ver a los 2 días puesto que la cubierta de matriz orgánica ya secretada ha sido fracturada (Figura 9)

b) EDS

En segundo lugar se realizó EDS con énfasis en la corroboración de la presencia de calcio.

Para la concha normal se pudo constatar la presencia de calcio, lo que se relaciona a su condición biomineral.

En cuanto a la matriz orgánica de picoroco, como era de esperar, no se encontró calcio, pues fue descalcificada en ácido fórmico, previo a su uso como sustrato.

Los tres modelos estudiados mostraron el esperado pico de calcio asociado a la formación de cristales, esto además se correlaciona con las imágenes SEM de los lugares donde se aplicó el EDS (Figura 10)

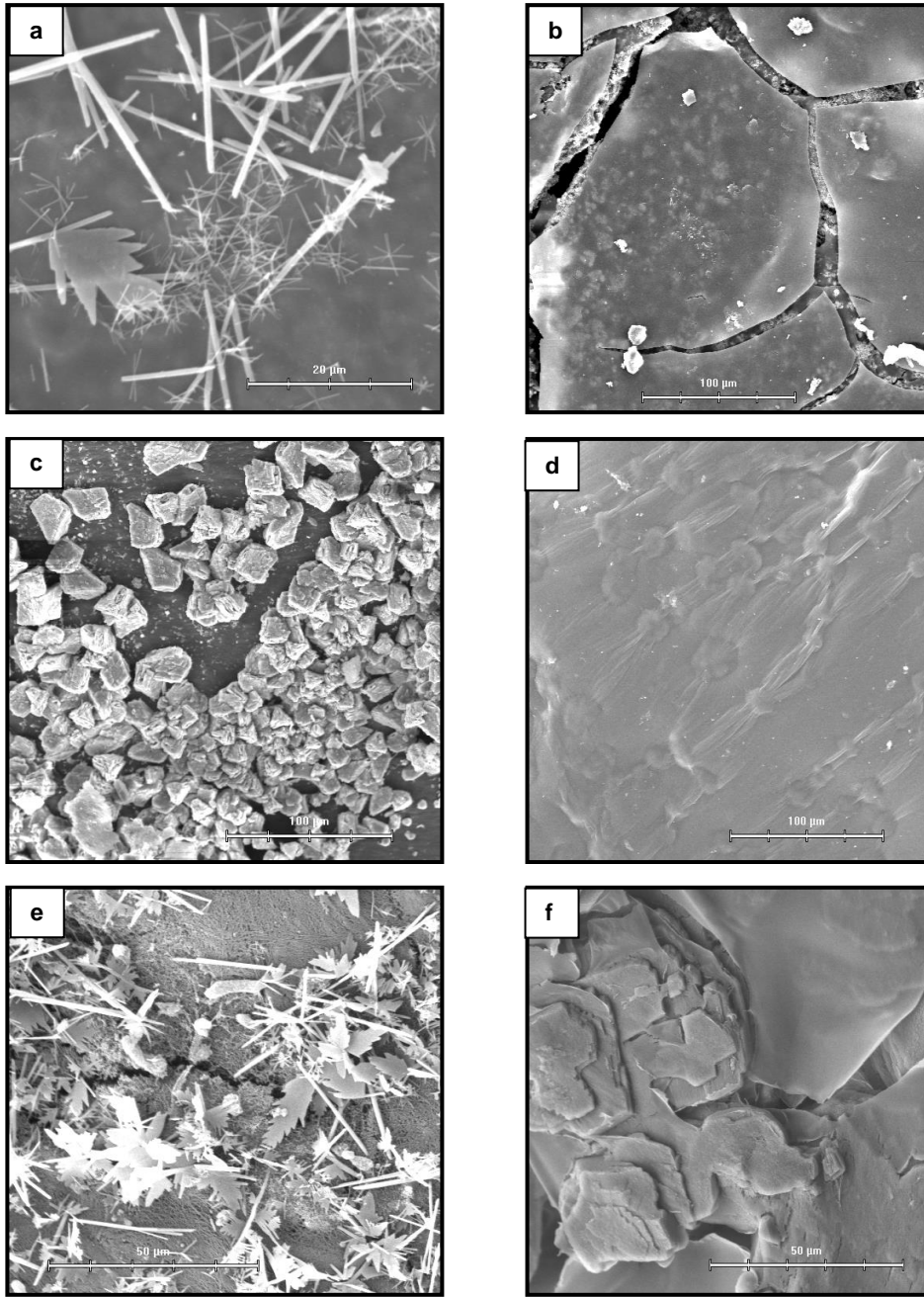


Figura 9. SEM de zona reparada (a) Control sin parafilm 24 horas (b) Control sin parafilm 48 horas (c) Control con parafilm 24 horas (d) Control con parafilm 48 horas (e) Experimental 24 horas (f) Experimental 48 horas

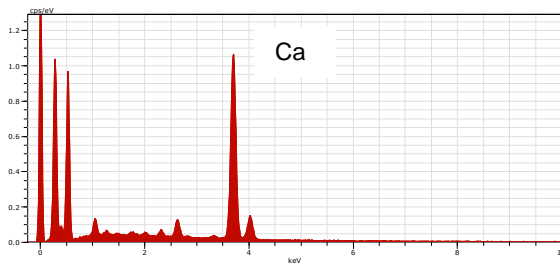
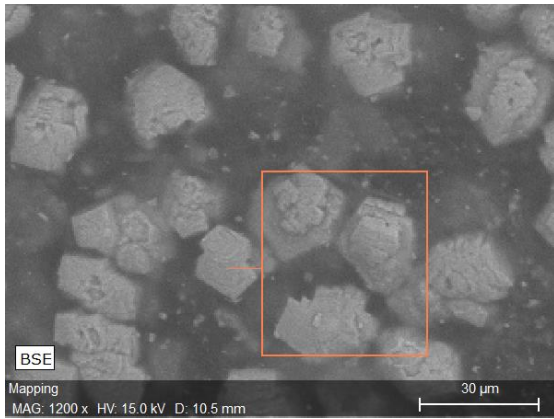


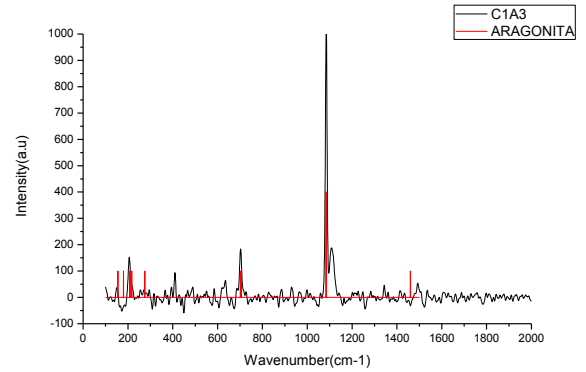
Figura 10 EDS zona reparada con presencia de cristales. Pico corresponde a la presencia de calcio

c) RAMAN

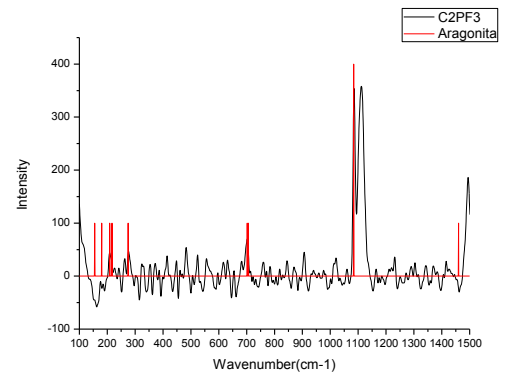
Se compararon los espectros obtenidos a partir de las muestras con patrones referenciales obtenidos de la literatura, a partir de los que se graficaron los picos más representativos de los polimorfos de CaCO_3 , aragonita y calcita.

Todas las muestras tuvieron una similitud evidente con ambos parámetros, dada su alta semejanza. Se tomó en cuenta como diferenciales los múltiples picos a longitud de onda menor que existen en el parámetro de aragonita, además de una mayor equivalencia con el pico más alto, cercano a longitudes de onda de 1085 cm^{-1} .

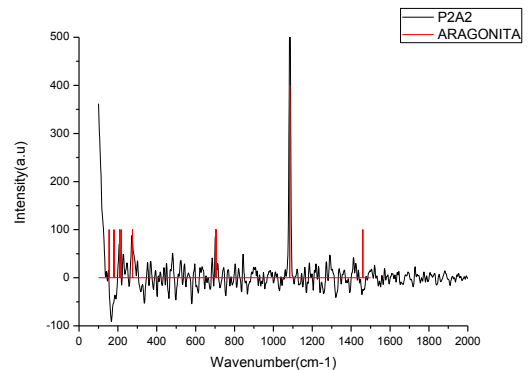
Considerando lo anterior, en todas las muestras, tanto a las 24 como 48 horas, hubo mayor similitud con el espectro de aragonita (Figura 11).



(a)



(b)



(c)

Figura 11. RAMAN de la zona reparada (a) Control sin parafilm a las 24 horas (b) Control con parafilm a las 48 horas (c) Experimental a las 48 horas

d) FTIR

Al igual que con los parámetros RAMAN, para FTIR se usaron patrones obtenidos de referencias bibliográficas y se graficaron los picos más característicos de cada polimorfo (calcita y aragonita) para compararlos con los espectros obtenidos en base a las muestras. Se consideró como principal diferencia, que el espectro de aragonita, presenta dos picos a longitud de onda cercano a 700 cm^{-1} .

Además se compararon los resultados con un parámetro de β quitina obtenido de la literatura. Esto, considerando que las muestras corresponden a un biomineral y por lo tanto poseen una porción orgánica.

Para todas las muestras se vio una mayor concordancia con el espectro de aragonita en ambos tiempos de medición. También exhibieron semejanza con algunos de los picos de β quitina (Figura 12).

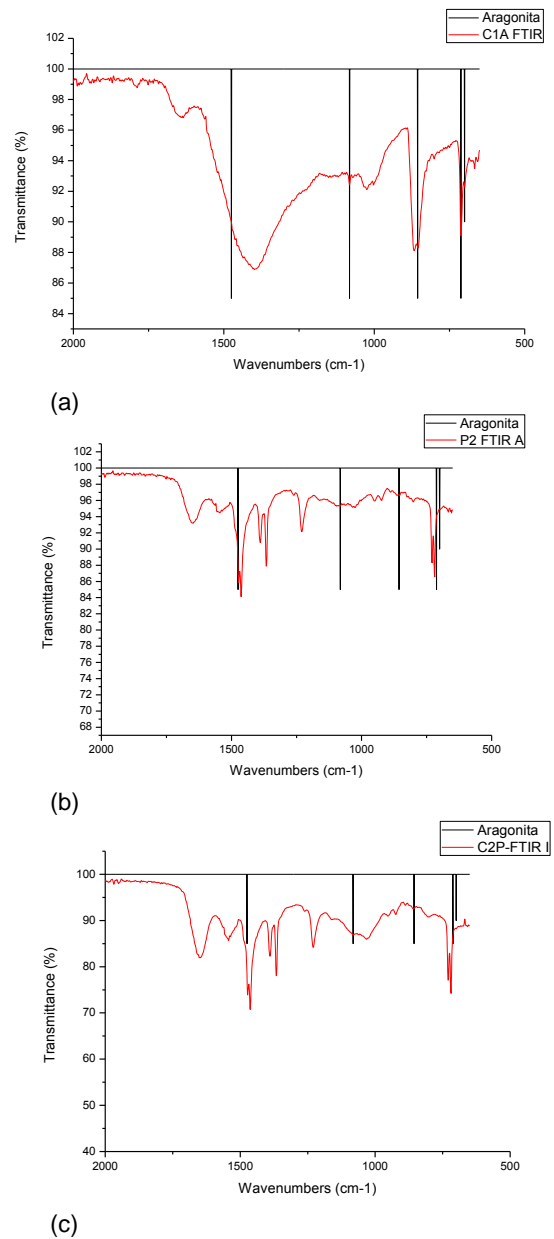


Figura 12. FTIR zona reparada (a) Control sin parafilm a las 24 horas (b) Control con parafilm a las 48 horas (c) Experimental a las 48 horas

Discusión

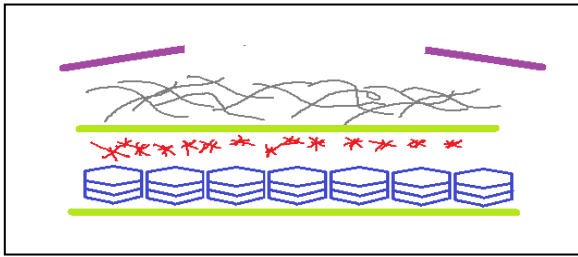
Estudio del manto

La información proporcionada por los estudios del manto, tanto por microscopía óptica, como por SEM coinciden con lo expuesto por Durning (1957), en cuanto al tipo de epitelio predominante en la mayor parte del manto, además de la existencia de microvellosidades.

En cuanto a la presencia de vesículas bajo el epitelio del manto medio y posterior, existen algunos estudios previos que mencionan algo similar, sugiriendo que se trata de vesículas de calcio, lo que podría comprobarse mediante un nuevo estudio histológico que incluyera tinción Von Kossa (Durning, 1957). Kohn *et al* (1979) mencionaron la existencia de células subyacentes al manto con capacidad secretora de calcio, lo que podría tener relación con las vesículas descritas en el presente estudio. Otros autores mencionan la presencia de gránulos pigmentados en el epitelio del manto del caracol *Helix pomatia* y se asociarían al proceso de crecimiento y reparación de la concha. Estos gránulos estarían compuestos de lípidos, proteínas y glicosaminoglicanos (Abolins-Krogis, 1973).

Caracterización del proceso reparativo

Los resultados observados por microscopía SEM, mostraron que cuando no existe un sustrato, el manto secreta una capa de matriz orgánica sobre la cual deposita los cristales de aragonita, con aspecto de espículas a las 24 horas. Éstos coalescen formando tabletas que son cubiertas con una nueva capa de matriz orgánica a las 48 horas. Este tipo de crecimiento tabular, también fue descrito en los estudios de Kapur y Gupta (1970), quienes vieron la coalescencia de cristales y la superposición de capas de estas tabletas. También se ha visto que los moluscos bivalvos depositan matriz orgánica interlaminar, dando un cierto patrón de secreción a intervalos, similar a lo observado aquí (Watabe, 1965 citado por Saleuddin, 1970). Lo mismo sucede con la presencia del sustrato experimental, matriz orgánica de picoroco, donde no se vio una influencia directa en el tipo de polimorfo depositado en la zona reparada. El caracol realiza el mismo proceso que cuando no existe un sustrato, secretando su propia matriz orgánica y sobre ella se produce la nucleación de cristales de CaCO_3 en su forma de aragonita. Se estima que éste proceso se repite hasta alcanzar un grosor similar al de la concha normal (Figura 13).



Concha
Matriz orgánica de picoroco
Matriz orgánica
Espículas de aragonita
Agrupaciones de tabletas cristaloides
Matriz orgánica

Figura 13. Esquema de depósito biomineral en presencia del sustrato experimental matriz orgánica de picoroco.

Ante la presencia de Parafilm® se pudo observar, a diferencia de las demás muestras, la nucleación directa de cristales romboédricos similares a calcita sobre este sustrato inerte. Cabe destacar que esto se observó sólo en una fracción de la muestra a las 24 horas, donde no había una capa de material orgánico y cristales de aragonita sobre él. Posteriormente, el manto reacciona de la misma manera que en los demás casos, es decir, secretando una cubierta orgánica sobre la cual se depositan cristales de aspecto semejante a la aragonita al igual que en los demás casos.

La ausencia de periostraco en los tres ejemplos de reparación observados a diferencia de la concha normal concuerda con los análisis de Meenakshi *et al* (1974), en *Otala láctea*, aquellos de Andrews (1934)

en *Pleurodonte rostrata* y los de Meenakshi *et al* (1975) en *Pomacea paludosa*, cuando la lesión se realiza alejada del borde.

En cuanto a los estudios por espectroscopía RAMAN y FTIR, es importante considerar que los parámetros de comparación no fueron obtenidos en el laboratorio bajo las mismas condiciones que se analizaron las muestras, que por lo demás correspondían a biominerales, es decir, con una porción orgánica, a diferencia de los espectros obtenidos de la literatura que eran minerales puros. Todo lo anterior significó la consideración de posibles desviaciones de los resultados respecto de los parámetros de control.

Otro punto interesante, es la notoria similitud de los espectros de las muestras con ambos parámetros, lo que puede asociarse a una mezcla de polimorfos, con preponderancia de uno de ellos, que se va acentuando en el tiempo, lo que tendría sentido según los estudios de Saleuddin y Wilbur (1969) que mostraban que en la concha reparada coexistían aragonita, calcita y vaterita en menor proporción. Según este estudio entre las 1-3 horas de reparación se encuentran cristales de calcita. Mientras que otro estudio evidenció que conchas reparadas a los 8-10 días tienen una apariencia similar a la capa nacarada de la concha normal, pero con los tres polimorfos antes mencionados, predominando la calcita, además había

matriz orgánica rodeándolos (Saleuddin, 1971). Observaciones en el caracol de agua dulce, *P. paludosa* mostraron también una mezcla de cristales de aragonita y calcita en los primeros días de reparación de concha, sin embargo a medida que pasaba el tiempo aumentaba la proporción de aragonita, llegando a ser altamente predominante a los 30 días (Meenakshi *et al*, 1975).

Es preciso establecer distintos tiempos de observación para poder entender estas diferencias, siendo especialmente interesante las primeras horas y las más avanzadas.

Saleuddin y Chan (1969) propusieron variar la temperatura en el proceso de reparación, dando a conocer que a temperaturas altas de 25-35°C predomina el depósito calcítico, mientras que a temperaturas cercanas a los 15°C la mayor cantidad de cristales era de aragonita. El hecho de que la temperatura en estos experimentos fuese variable pero cercana a los 20°C, no permite establecer una notoria evidencia para la influencia de este factor sobre un mayor depósito de aragonita. En futuros estudios se hace necesario establecer una temperatura

constante, para evitar una posible influencia.

Otro parámetro de comparación utilizado fue el espectro FTIR de β quitina, encontrando una alta similitud con los picos más característicos, esto también fue reportado por De Paula y Silveira (2009), tanto para algunos gastrópodos como moluscos bivalvos. Por lo tanto, es posible aseverar que la matriz orgánica tendría una proporción de dicho material en su composición.

En conclusión, el presente estudio, mostró que el uso del sustrato matriz orgánica de picoroco no ejerció influencia sobre el tipo de polimorfo secretado en el proceso reparativo de la concha del caracol *H. aspersa*. Además, hay que mencionar que es necesaria la realización de experimentos con menores tiempos de observación, para evaluar la posibilidad de variaciones del tipo de polimorfo secretado. Se sugiere el uso de otras técnicas para su determinación, además del uso de otros sustratos que pudiesen efectivamente ejercer alguna influencia en el patrón de secreción, ya sea el tipo de polimorfo de CaCO_3 o la velocidad de reparación.

Bibliografía

- ANDREWS, E.** 1934. Shell repair by the snail *Pleurodonte rostrata* Pfr. Biol Bull 67(2): 294-299
- ABOLINS-KROGIS, A.** 1973. Fluorescence and histochemical studies of the calcification-initiating lipofuscin type pigment granules in the shell-repair membrane of the snail, *Helix pomatia*. Z.Zellforsch. (142): 205-221
- ARIAS, I.** 2002. Influencia de distintas macromoléculas presentes en matrices de biocerámicas naturales, sobre la cristalización de carbonato de calcio *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 40p
- DE PAULA, S.; SILVEIRA, M.** 2009. Studies on molluscan shells: Contributions from microscopic and analytical methods. Micron (40): 669–690
- DURNING, C.** 1957. Repair of a defect in the shell of the snail *Helix aspersa*. J. Bone Joint Surg. Am. 39 A(2)
- KAPUR, S.; GUPTA, S.** 1970. The role of amoebocytes in the regeneration of shell in the land pulmonate, *Euplecta indica* (pfeiffer). Biol. Bull. (139): 502-509
- KOHN, A.; MYERS, E.; MEENAKSHI, V.** 1979. Interior remodeling of the shell by a gastropod mollusk. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (7): 3406-3410
- LOWENSTAM, H.; WEINER, S.** 1989. On biomineralization. Oxford University Press, New York
- MEENAKSHI, V.; DONNAY, G.; BLACKWELDER, P.; WILBUR, K.** 1974. The influence of substrata on calcification patterns in molluscan shell. Calc. Tiss. Res. (15): 31-44
- MEENAKSHI, V.; BLACKWELDER, P.; HARE, P.; WILBUR, K.; WATABE, N.** 1975. Studies on shell regeneration. Matrix and mineral composition of the normal and regenerated shell of *Pomacea paludosa*. Comp. Biochem. Physiol., A: Comp. Physiol. 50(2): 347–351
- PAVAT, C.; ZANELLA-CLÉON, I.; BECCHI, M.; MEDAKOVIC, D.; LUQUET, G.; GUICHARD, N.; ALCARAZ, G.; DOMMERGUES, J.; SERPENTINI, A.; LEBEL, J.; MARIN, F.** 2012. The shell matrix of the pulmonate land snail *Helix aspersa maxima*. Comp. Biochem. Physiol. Part B (161): 303–314

- SALEUDDIN, A.** 1971. Fine structure of normal and regenerated shell of *Helix*. *Can. J. Zool.* (49):37-41
- SALEUDDIN, A.; CHAN, W.** 1969. Shell regeneration in *Helix*: shell matrix composition and crystal formation. *Can. J. Zool.* (47): 1107-1111
- SALEUDDIN, A.; WILBUR, K.** 1969. Shell regeneration in *Helix pomatia*. *Can. J. Zool.* (47): 51-53.
- WATABE, N.** 1965. Studies on shell formation. XI. Crystal matrix relationships in the inner layer of mollusk shells. *J. Ultrastruc. Res.* (12): 351-370