



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE ALGUNOS
PROTEOGLICANOS DE LA CONCHA DE ABALÓN ROJO
Haliotis rufescens (Swainson, 1822)”

KARIN ANGÉLICA ARRIAGADA URBINA

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

PROFESOR GUÍA: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY

PROYECTO FONDAP 11980002

**SANTIAGO, CHILE
2007**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE ALGUNOS
PROTEOGLICANOS DE LA CONCHA DE ABALÓN ROJO
Haliotis rufescens (Swainson, 1822)”

KARIN ANGÉLICA ARRIAGADA URBINA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA
PROFESOR CONSEJERO: LAURA GRACIELA HUAQUÍN MORA

SANTIAGO, CHILE
2007

ÍNDICE

	Pág.
1. Índice	2
2. Resumen	3
3. Abstract	4
4. Introducción	5
5. Revisión Bibliográfica	7
Características Generales.....	7
Características de la Concha.....	9
6. Hipótesis	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
7. Material y Métodos	19
Grupo A: Muestras descalcificadas parcialmente para Microscopía	
Electrónica de Barrido (SEM).....	19
Grupo B: Muestras desproteinizadas parcialmente para SEM.....	19
Grupo C: Muestras descalcificadas completamente para Microscopía	
Electrónica de Transmisión (TEM).....	20
8. Resultados	22
Microscopía Electrónica de Barrido.....	22
Microscopía Electrónica de Transmisión.....	36
9. Discusión	45
10. Conclusiones	50
11. Bibliografía	51

RESUMEN

El estudio de las biocerámicas ha alcanzado grandes avances en los últimos años al lograr un mayor entendimiento de la formación de éstas, ya sean huesos, cáscara de huevo de aves, conchas de moluscos, urolitos o corales. Pero aún faltan muchos aspectos por comprender, como lo es la participación de las moléculas de la matriz orgánica, entre ellas los proteoglicanos, poco estudiados en cuanto a su ubicación y función en el proceso de biomineralización. Por esto se planteó como objetivo determinar su presencia y distribución en una biocerámica cuya matriz orgánica ha sido descrita en parte, la concha del abalón rojo (*Haliotis rufescens*), pero en la que los proteoglicanos no han sido descritos.

Para ello, en primer lugar se realizó un análisis estructural de la concha a través del uso de microscopía electrónica de barrido, y se utilizaron muestras descalcificadas parcialmente, las cuales aportaron un mayor entendimiento a la composición de los componentes orgánico e inorgánico de la porción aragonítica de la concha. Utilizando la misma técnica microscópica, se procedió a determinar la presencia de GAGs (glicosaminoglicanos) en la matriz orgánica por medio de inmunodetección; para lograrlo se obtuvieron cortes de concha desproteinizadas parcialmente, en las cuales se encontraron estos proteoglicanos y se describió una cierta distribución diferencial.

También se utilizó microscopía electrónica de transmisión como apoyo para describir la presencia y localización de los GAGs en la concha, para lo cual se realizaron cortes finos de muestras descalcificadas y a través del uso de la técnica de inmunoro se reveló la existencia de estos proteoglicanos y su ubicación en la matriz orgánica.

Queratán sulfato se presentó principalmente en la mesocapa y aragonita esferulítica, por lo que podría estar interviniendo en la nucleación de cristales de aragonita. Condroitín 4 sulfato, Condroitín 6 sulfato y Dermatán sulfato se ubicaron a nivel de las matrices de la aragonita en tabletas, determinando posiblemente la morfología de este tipo de aragonita, y Condroitín 4 sulfato también fue hallado en la matriz de la aragonita en bloques, por lo que puede estar influyendo la disposición de los cristales de aragonita en bloque en esta zona.

Estos resultados sugerirían que al existir una localización diferencial de los proteoglicanos a través de la porción aragonítica de la concha, existe una función específica para cada uno de ellos en el proceso de biomineralización.

ABSTRACT

In the last few years the study of biominerals has reached great advances succeeding in better understanding of their formation, like bones, eggshells of birds, seashells, kidney stones or corals. Nevertheless still many aspect of their formation are not well understand, for example the influence of the organic matrix molecules in its formation, between these molecules are the proteoglycans, not well studied in its localization and functions in the biomineralization process. For these reason the objective of this work was to determine the presence and distribution of some of these proteoglycans in the partly described organic matrix of the red abalone shell (*Haliotis rufescens*).

A structural analysis of partially decalcified shells by scanning electronic microscopy (SEM) was done to understand the relation of the organic – inorganic components of the aragonitic portion of the shell. Using the inmunodetection technique the presence of GAGs (glicosaminoglycans) on the organic matrix of partially deproteinized shells samples was determined.

Using inmunogold technique an transmission electronic microscopy (TEM) in decalcified section of shells the localization of GAGs in the organic matrix was determined.

Keratan sulphate appeared mainly in the mesolayer and spherulitic aragonite, suggesting its participation in aragonite crystal nucleation. Chondroitin 4 sulphate, Chondroitin 6 sulphate and Dermatan sulphate were located mainly in the organic matrix around aragonite tiles, possibly determining the morphology of this type of aragonite; Chondroitin 4 sulphate also was found in the matrix of the aragonite block-like matrix, probably influencing the blocks morphology of the aragonite crystals in this zone.

These results suggested that the differential localization of the proteoglycans in the aragonitic portion of the shell is due to a specific function for each one of them in the biomineralization process.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las biocerámicas, tales como hueso, dientes, espículas de erizo de mar, cáscara de huevo, conchas de moluscos y caparazón de crustáceos, ha inspirado a muchos científicos a desarrollar nuevos materiales sintéticos basados en estos diseños naturales. Tal disciplina constituye la Biomimética (Heuer *et al.*, 1992).

Esta disciplina por la cual se crean compuestos avanzados con nuevas propiedades, ha llevado a la aparición de modernos avances en el diseño de materiales inspirados en procesos biológicos (Arias y Fernández, 2003a).

Un gran número de estos materiales biológicos duros están constituidos por carbonato de calcio, molécula que forma parte de la fase inorgánica, presentando propiedades y características morfológicas únicas. Estas biocerámicas se originan a través de un proceso llamado Biomineralización, y están conformadas además por otras moléculas de tipo orgánico, las cuales regulan la formación del componente inorgánico. Estas macromoléculas han sido estudiadas en diferentes modelos de biomineralización tales como moluscos, crustáceos, equinodermos y huevos de ave, siendo caracterizadas en algunos de ellos, aunque el rol que juegan en este proceso aún es poco entendido. (Fernández *et al.*, 2002).

La Biomineralización involucra la participación selectiva de elementos y moléculas obtenidas desde el ambiente y un estricto control biológico del proceso, produciéndose este fenómeno a través de un autoensamblaje, en forma organizada y jerárquica, fenómeno que ha generado gran interés entre los científicos de los materiales, siendo de gran importancia el efecto del componente orgánico en la formación de las cerámicas, lo que ha suscitado la necesidad de ser comprendido y caracterizado (Lin y Meyers, 2005).

Aunque ha habido un rápido progreso en la caracterización de la fase orgánica en los últimos años, no se ha puesto demasiado énfasis en el tema de la presencia y ubicación de un componente importante de ella, los proteoglicanos, que han sido encontrados tanto en cáscara de huevo de ave, como en conchas de algunos moluscos, concha de picoroco y en corales (Arias y Fernández, 2003b; Arias *et al.*, 2004).

Entre los componentes mayoritarios de la matriz orgánica de estas estructuras biológicas, se ha descrito en ciertos moluscos la presencia de una serie de moléculas

sulfatadas, carboxiladas y quitina, todas distribuidas de manera tal que ejercen un control organizado en el proceso de formación de la matriz inorgánica de la concha (Nudelman *et al.*, 2006). Las moléculas sulfatadas aquí mencionadas aparentemente podrían corresponder a los proteoglicanos, que ya han sido descritos en conchas de otras especies de moluscos y crustáceos, pero no aún en la concha del abalón, que se caracteriza por poseer su matriz orgánica e inorgánica muy bien estructuradas, por lo que resulta ser un excelente modelo para describir la localización y naturaleza de los proteoglicanos involucrados.

Es por esta razón que en esta memoria de título se buscó identificar y localizar los proteoglicanos presentes en la matriz orgánica de la concha del abalón rojo (*Haliotis rufescens*), proyecto que se encuentra enmarcado dentro de las actividades del programa de materiales biocerámicos del Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales (CIMAT) de la Universidad de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características Generales:

El abalón (*Haliotis spp.*) es un molusco perteneciente a la clase Gastropoda, la cual se caracteriza por especies que poseen un esqueleto o concha de una sola pieza, o que carecen de ella, como las babosas. Se ubica dentro del Orden Archaeogastropoda, en la Familia Halotidae y Género *Haliotis* (del latín *Haliotis*, que significa “oreja de mar”), nombre dado por la forma de la concha semejante a una oreja (Anderson, 2003).

Son gastrópodos marinos de importancia comercial, debido a la creciente demanda de su carne y concha para fines gastronómicos y de orfebrería, respectivamente (Olguín *et al.*, 2003). Entre los productos comercializados se encuentran los abalones vivos, congelados, carne fresca, enlatada, deshidratada, para cocktail, además las conchas ya mencionadas y las semillas destinadas a plantas de cultivo (Fallu, 1991). Se distribuyen en zonas rocosas e islas de las regiones templadas de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico (Olguín *et al.*, 2003), en donde viven adheridos a las rocas del fondo marino, desde la zona intermareal hasta profundidades de 50 metros, dependiendo de la especie (Fallu, 1991).

El abalón rojo (*Haliotis rufescens*) es una especie proveniente de Baja California, introducida a Chile en 1980, siendo cultivada en forma experimental. En la actualidad es comercializada en el país (Huaquín, 2002).

Este gastrópodo, al igual que las otras familias que conforman este grupo, es asimétrico, presenta una cubierta univalva, presenta una cabeza anterior bien desarrollada y un pie ventral que les da el medio de sujeción a las superficies rocosas, y que es la parte comestible del animal. La masa visceral, que se ubica dentro de la concha dorsal, está enrollada en espiral y es asimétrica, a diferencia de la cabeza y el pie ventral, que poseen simetría bilateral (Huaquín, 2002) (Figura 1 A).

No presenta opérculo. Generalmente exhibe un epipodium de color negro, que es la estructura que se proyecta desde el pie, y sirve como órgano sensitivo y sustentador de los tentáculos, ubicado en la base de la concha, sobresaliendo más allá de su margen inferior. Presenta una superficie lisa y escalopada a lo largo de la orilla. (Figura 1 B). Esta es la estructura más confiable utilizada para identificar las distintas especies de abalones (Price y Tom, 1997).

Los órganos internos pertenecientes a los sistemas digestivo, respiratorio, circulatorio y reproductor rodean al pie muscular. El tracto digestivo se ubica a la izquierda visto desde arriba, luego gira desde el ápice de la concha para llegar al ano por el lado izquierdo, bajo el último orificio de la concha y en una abertura del manto, el cual se encuentra en contacto con la cara interna de la concha y modula el crecimiento de ésta (Anderson, 2003).

Los abalones alcanzan la madurez sexual a un pequeño tamaño; presentan una alta fecundidad, que es cada vez mayor a medida que se incrementa su tamaño. Puede desovar de 10.000 a 1.000.000 de huevos por vez, dependiendo de su longitud, proceso que el abalón rojo realiza a lo largo de todo el año en ciertas regiones (Price y Tom, 1997). Tienen sexos separados, con fecundación externa, momento en el cual todos los especímenes hembras comienzan a desovar simultáneamente asegurando así una gran cantidad de huevos y espermatozoides localizados en una misma área, lo que aumenta la probabilidad de fecundación (Anderson, 2003).

Su ciclo de vida es altamente dependiente de las condiciones medioambientales, las cuales pueden provocar cambios en su comportamiento o condición. Esta influencia externa está dada principalmente por la temperatura, variaciones en la duración de los días/noches, o la presencia de un miembro de un sexo opuesto en áreas cercanas (Fallu, 1991). El ciclo se inicia con la fecundación de los huevos por los espermatozoides liberados en el agua, generando así huevos fertilizados, de los cuales emergen las larvas, llamadas véliger (Anderson, 2003), que se forman a través de una metamorfosis, son pequeñas y no presentan concha (Fallu, 1991). Se alimentan de plancton, a diferencia de los adultos que se transforman en herbívoros una vez formada la concha y después de haberse asentado y adherido a las piedras del fondo marino, en donde se alimentan de microalgas, prefiriendo las algas rojas (Price y Tom, 1997).

Características de la concha:

La concha del abalón rojo (*Haliotis rufescens*) es el medio de protección de este molusco, y está unido a ella fuertemente a través de un músculo central.

Vista desde arriba es de forma ovalada, su superficie es de color rojo ladrillo y el borde anterior es usualmente rojo (Price y Tom, 1997). Presenta un eje antero-posterior largo, con una espiral que culmina en el ápex, ubicado hacia posterior y a la derecha. Presenta una fila de orificios en el lado izquierdo de la concha, cercano al margen anterior, los cuales tienen funciones respiratorias y de eliminación de desperdicios (Fallu, 1991), siendo en esta especie de tres a cuatro poros respiratorios, cuyos bordes sobresalen de la superficie de la concha. El interior presenta un nácar iridiscente, blancoplateado a verrojo, razón por la cual la concha es apetecida para la elaboración de joyas. En cuanto a su tamaño, se describe una longitud máxima de 31 cm, aunque generalmente se encuentra entre los 18 y los 23 cm (Price y Tom, 1997) (Figura 2 A y B).

El crecimiento de la concha del abalón rojo comienza a finales del estadio larval (Anderson, 2003), y ocurre a través de la adición de material desde la parte anterior derecha, en espiral, de manera que la concha va rotando a medida que el cuerpo crece (Fallu, 1991). Este proceso es dependiente del manto, el cual está unido a la superficie interna de la concha y posee un epitelio que secreta sustancias que permiten el crecimiento de la concha, ya sea sumando capas hacia el exterior, aumentando así el diámetro, o agregando capas hacia el interior, aumentando el espesor de ésta. Así se van formando anillos concéntricos hacia los bordes de la concha, los cuales varían en sus características según las condiciones ambientales. Además, el abalón es capaz de reparar la concha en caso de daño no muy severo y que no comprometa el tejido de este molusco. Pero si ésta es removida por completo, el abalón no es capaz de crear una nueva (Anderson, 2003).

La concha del abalón (*Haliotis rufescens*) está formada por un 95% de CaCO_3 y 5% de matriz orgánica. Estos elementos se disponen en forma ordenada dado el control activo de las células epiteliales del manto y la influencia externa del ambiente. El epitelio del manto está en contacto con el espacio extrapalial, al cual se liberan las sustancias encargadas del crecimiento de la concha; le sigue una capa de aragonita en crecimiento, que origina a la región aragonítica propiamente tal (nácar), y externamente una capa de calcita prismática y el periostraco, que es una cubierta proteica (Lin y Meyers, 2005) (Figura 3).



Figura 1: A) Abalón rojo (*Haliotis rufescens*) en su ambiente natural (Fuente: Haaker *et al.*, 1986). B) Abalón rojo exhibiendo su epipodium negro (e) (Fuente: Bauder, 2005).

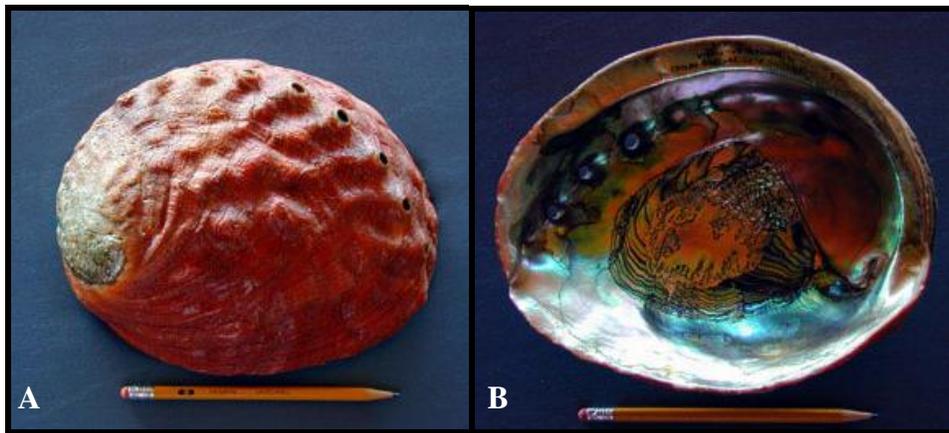


Figura 2: A) Superficie externa de una concha de abalón rojo. B) Superficie interna de una concha de abalón rojo (Fuente: Anderson, 2003).

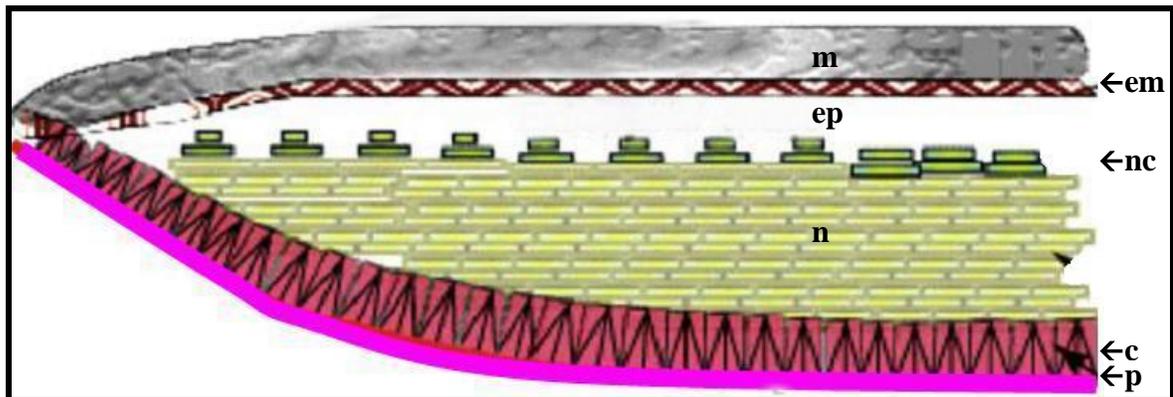


Figura 3: Esquema de un corte sagital de concha de abalón rojo; m: manto; em: epitelio del manto; ep: espacio extrapalial; nc: capa de aragonita (nácar) en crecimiento; n: capa de nácar; c: capa de calcita; p: periostraco. (Fuente: Lin y Meyers, 2005).

De esta manera, existe una organización de los componentes orgánicos y mineral de manera tal que se genera una concha con características físicas difíciles de igualar sintéticamente. Incluso existen estudios relacionados con la dureza de la concha del abalón rojo que indican que la resistencia a la fractura del nácar (aragonita más matriz orgánica) es cercana a 3×10^3 veces mayor que la alcanzada por la aragonita pura, lo que demuestra la gran influencia de la matriz orgánica en el conjunto biomineral (Zaremba *et al.*, 1996). El componente inorgánico o mineral, en la concha del abalón, está constituido por dos morfologías de carbonato de calcio: aragonita, ubicada en la porción interna, y calcita en la porción externa (Heuer *et al.*, 1992). El orden de los componentes antes mencionados es el siguiente: la primera estructura en generarse es el periostraco; a continuación, calcita de morfología prismática, sobre una lámina proteica, en las etapas iniciales de biomineralización (Morse *et al.*, 1993). El depósito de calcita es seguido por una transición abrupta a cristales de aragonita, en la cual se describe un material granular precedido por disrupciones horizontales en la estructura de la calcita, tanto como similitudes estructurales en la superficie de ésta con la aragonita adyacente (Zaremba *et al.*, 1996).

La porción aragonítica, que se desarrolla posterior a la calcítica, está formada por tres capas o morfologías de aragonita distintas que siguen un orden establecido dado por el crecimiento de la concha. Existen regiones de aragonita, de aproximadamente 300 μm , que se encuentran separadas por mesocapas o bandas de crecimiento, de 20 μm de grosor, constituidas por matriz orgánica, las cuales indican cambios ambientales que influenciaron el crecimiento de la concha (Lin y Meyers, 2005). La primera capa de aragonita en aparecer posterior a una mesocapa es la capa esferulítica, que es irregular y formada por cristales alargados distribuidos radialmente, es la transición hacia la aragonita en tabletas, y se manifiesta en forma irregular dado por el crecimiento intercalado de estos cristales dentro de la zona de aragonita en tabletas (Su *et al.*, 2002). La capa de aragonita en tabletas está formada por tabletas pseudo-hexagonales rodeadas de matriz orgánica en forma de un delgado cemento viscoelástico que separa tabletas adyacentes, ya sea sobre y bajo cada tableta, matriz que recibe el nombre de matriz interlaminar o también nanocapa, y aquella matriz ubicada en las caras laterales de cada tableta, llamada matriz intertabular. Estas tabletas se encuentran alineadas perfectamente a través de un eje perpendicular (*eje c*), y miden 10 μm de longitud y 0,5 μm de espesor aproximadamente (Lin *et al.*, 2006).

Posterior a esta capa continúa la capa de aragonita en bloques, que da fin a una región aragonítica, dando paso al nacimiento de una nueva mesocapa (Lin y Meyers, 2005). Esta transición de aragonita en tabletas a la forma en bloques es abrupta, semejante a la observada en la zona de cambio de calcita a aragonita (Su *et al.*, 2002).

En general se considera que una banda de crecimiento, también llamada heterocapa, está formada por una mesocapa orgánica y por una microestructura inorgánica en bloques por un lado y esferulítica por el otro, bastante semejantes a la calcita, razón por la cual era llamada heterocapa orgánica/calcítica verde (Zaremba *et al.*, 1996), aunque posteriormente se confirmó a través de difracción de rayos X que en realidad estas microestructuras correspondían a aragonita en bloques y esferulítica, separadas por una intercapa orgánica de color verde (Su *et al.*, 2002).

La matriz orgánica es la encargada del desarrollo y modulación del componente mineral de la concha de abalón, y está compuesta por glicoproteínas hidrofílicas (muchas de ellas ricas en ácido aspártico), proteínas “seda” relativamente hidrofóbicas (ricas en glicina y alanina) (Addadi *et al.*, 2006) y el polisacárido β -quitina (Weiss *et al.*, 2002; Lin y Meyers, 2005). Cada lámina de materia orgánica que rodea a las tabletas por sus caras horizontales, es decir, la matriz interlaminar, está formada por una zona central compuesta por β -quitina, y rodeada por arriba y por abajo por proteínas (Blank *et al.*, 2003). La formación de la calcita y aragonita está acompañada por la síntesis de proteínas polianiónicas específicas, sugiriendo que interacciones entre estas proteínas y los iones inorgánicos durante la nucleación de los cristales permite al organismo inducir estos cambios de fase, controlando el crecimiento y el depósito de minerales que corresponda (Belcher *et al.*, 1996).

Entre los componentes ácido-solubles presentes están en mayor cantidad las proteínas ricas en ácido aspártico, el cual forma parte de una unidad de aragonita, al atraer una molécula de CaCO_3 , por lo que es un importante componente de los sitios de nucleación desde los cuales se inicia la cristalización y la consecuente formación de las tabletas de aragonita (Lin y Meyers, 2005). Ya se han identificado, a través de electroforesis, tres proteínas en la porción aragonítica, y que existen por lo menos seis proteínas solubles en la porción calcítica de la concha de abalón rojo (*H. rufescens*). Estudios realizados con el uso de microscopio de fuerza atómica (AFM) revelan que al

hacer interactuar estas proteínas con una superficie de calcita en crecimiento, y al observar ésta con el AFM se observa que ellas inducen una rugosidad y redondeo de los bordes en la superficie en forma desuniforme, lo cual indica la existencia de diferentes interacciones entre distintos tipos de proteínas y la calcita. Aún no se tiene totalmente clara la función específica de cada una de ellas y si unas presentan mayor importancia que otras (Walters *et al.*, 1997).

Se sabe que las proteínas solubles de la concha pueden controlar la morfología del cristal, pero se ha sospechado que el cambio de calcita a aragonita puede requerir el depósito de una nueva capa proteica de nucleación, lo cual ya se ha descartado mediante estudios con microscopía electrónica de barrido, observando la zona de transición; en estudios *in vitro* sobre cristalización de carbonato de calcio en presencia de proteínas solubles polianiónicas extraídas de concha de abalón (Belcher *et al.*, 1996), y en estudios de microscopía de fuerza atómica (Thompson *et al.*, 2000), los cuales avalan la influencia de estas proteínas solubles solas, sin la necesidad del depósito de una lámina proteica que inicie la nucleación de la aragonita post fase de calcita (Belcher *et al.*, 1996). El AFM ha sido de gran utilidad para este fin, ya que aunque ya se había empleado con anterioridad para revelar cambios morfológicos en la calcita (Walters *et al.*, 1997), no fue sino hasta un tiempo después que se afirmó que estos cambios inducidos por proteínas solubles de la concha corresponden a la creación de cristales de aragonita, explicando en gran parte la participación de estas proteínas en la transición calcita-aragonita (Thompson *et al.*, 2000). Algunos autores creen que esta abrupta transición puede ser debida a la influencia de un inhibidor del crecimiento de calcita y/o de un acelerador del crecimiento de la aragonita (Zaremba *et al.*, 1996), lo cual es una posibilidad cierta, ya que recientemente fue encontrada la proteína Perlwapin en el nácar, la cual actúa como inhibidor del crecimiento de cristales de carbonato de calcio *in vitro* (Treccani *et al.*, 2006), por lo que este mecanismo no puede ser descartado aún.

En la actualidad, se tiene conocimiento de varias proteínas que provocan el crecimiento de cristales de carbonato de calcio, pero no si actúan directamente en la fase de cambio de calcita a aragonita, aunque sí existen algunos atisbos de que esto pueda ser posible, ya que en ciertos casos se ha visto cambio en la morfología del cristal. Se ha descrito la presencia de Lustrin A en la matriz proteica del nácar de la concha y perla del

abalón rojo (*Haliotis rufescens*); se le ha adjudicado un carácter multifuncional, por su estructura molecular multidominio, y es así como se cree que pueda tener un rol estructural dentro de la matriz insoluble del nácar, interactuar con proteínas polianiónicas, proteger los componentes proteicos de la degradación, y conferirle resistencia elástica a la concha (Shen *et al.*, 1997). La Lustrin A presenta dos dominios bien caracterizados, RKS Y y D4, siendo el segundo el que posee efecto sobre el crecimiento de cristales de carbonato de calcio, a diferencia del primero, que carece de esta propiedad (Wustman *et al.*, 2003). Otras proteínas han sido identificadas, entre ellas una pequeña familia de proteínas ácidas llamadas N16 o Pearlin, las cuales inducen la formación de tabletas de aragonita *in vitro* de forma similar al nácar (Samata *et al.*, 1999; Miyashita *et al.*, 2000). Dentro de este grupo se encuentran N66 y N14 (Kono *et al.*, 2000). La proteína Mucoperlin descrita por Marin *et al.* (2000) tiene carácter de mucina. En el abalón labio verde (*Haliotis laevis*) fueron encontradas dos proteínas hidrosolubles no-acídicas, Perlucin (Mann *et al.*, 2000) y Perlustrin. La primera ha demostrado inducir nucleación en un medio saturado de carbonato de calcio (Weiss *et al.*, 2000), mientras que Perlustrin es un homólogo del dominio presente en proteínas ligadoras de factor de crecimiento mamario insulina-like (Weiss *et al.*, 2001). Perlwapin es otra proteína descrita en el nácar de *H. laevis*, la cual es capaz inhibir el crecimiento de los cristales en soluciones saturadas de carbonato de calcio, por lo que podría participar en la inhibición del crecimiento del nácar en condiciones naturales (Treccani *et al.*, 2006).

En el nácar además se han encontrado estructuras que están implicadas en el crecimiento de la aragonita en tabletas. Mediante estudios realizados con AFM, microscopio electrónico de transmisión (TEM) y microscopio de barrido de conductancia iónica (SICM) se ha revelado que este crecimiento ocurre por medio de “puentes minerales”, los cuales van uniendo las tabletas al ir éstas desarrollándose unas sobre otras, rodeadas de matriz orgánica, formando las características “pilas de moneda” que se observa en la superficie de crecimiento de la aragonita (Schäffer *et al.*, 1997), teoría que refuta la antigua hipótesis de un crecimiento heteroepitaxial de las tabletas en la cual estos puentes están ausentes (Morse *et al.*, 1993). Es más, en estudios posteriores, por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), se afirma la existencia de estos puentes (Su *et al.*, 2002). En otro biomineral, como es la perla de ostra, se ha encontrado estos puentes

minerales, pero a un nivel nanoscópico, observándose a su vez nanocristales integrando una tableta de aragonita, es decir, estos puentes minerales se encuentran conectando a estos nanocristales a una escala menor y en forma similar a lo que sucede entre tabletas adyacentes a una escala mayor. Es por esto que se habla de que existe una arquitectura jerárquica en la estructura de estos biominerales, en la cual existen tres niveles o escalones: el primero estaría formado por el nácar de aragonita a una escala macroscópica, el segundo constituido por una tableta o unidad a escala submicrométrica, y un tercer nivel formado por los nanocristales a una escala nanoscópica, entre los cuales también existe una matriz orgánica, que es llamada matriz intracristalina, al estar ubicada dentro de una tableta de aragonita. En el caso de la concha de abalón esto no ha sido bien estudiado, pero es de esperar que también posea una organización similar, tal como ocurre con otros biominerales entre los que se cuentan el coral, esqueleto de equinodermo, foraminífera y cáscara de huevo (Imai y Oaki, 2007).

Analizando una tableta de aragonita en particular, se ha encontrado una distribución específica de los componentes orgánicos que la rodean, en conchas de otros moluscos tales como el cefalópodo *Nautilus pompilius* y el bivalvo *Atrina rigida*. En este caso se reveló la ubicación de los carboxilatos y sulfatos de las proteínas y polisacáridos en la superficie de matriz interlaminar descalcificada, vale decir, de la matriz orgánica que separa a una tableta ubicada sobre otra. Se observaron cuatro diferentes zonas, en el centro se encontraron dos zonas, la primera más central compuesta por carboxilatos, y la segunda rodeando a la primera, compuesta por sulfatos. La tercera, constituida por proteínas formadoras de aragonita, entre la zona central de nucleación y la matriz intertabular, y finalmente la cuarta, correspondiente con la matriz intertabular, formada por carboxilatos y sulfatos. Esta conformación sugiere diferentes estados en la formación del cristal desde el sitio de nucleación hasta la matriz intertabular, dado por interacciones diferenciales de cada una de las partes influenciando el crecimiento y la morfología del cristal de diferentes maneras (Nudelman *et al.*, 2006).

Otros estudios además le atribuyen importancia en el crecimiento de cristales de aragonita a la matriz insoluble del nácar de la concha del abalón labio verde (*Haliotis laevigata*), la cual está compuesta por β -quitina (Weiss *et al.*, 2002), proteínas “seda” y proteínas ricas en aspartato (Nudelman *et al.*, 2006). A través de SEM y Difracción de

rayos X (XRD) se obtuvo claras evidencias de que la matriz insoluble del nácar induce el crecimiento de cristales de aragonita, ejerciendo enorme influencia en el crecimiento, morfología y en el tipo de polimorfo de carbonato de calcio (Heinemann *et al.*, 2006).

Algunos de los resultados expuestos hasta el momento se han obtenido por medio de la experimentación con perlas de abalón rojo, las cuales resultan ser bastante similares y análogas a la concha de abalón (Zaremba *et al.*, 1996). Para este efecto, las perlas se producen insertando un sustrato abiótico dentro de la concha de un abalón vivo, entre el manto y el borde en crecimiento de la concha por su cara interna, de manera tal de reproducir artificialmente lo que ocurre normalmente en la naturaleza. De esta forma, el organismo responde a este material extraño con el depósito de calcita en primera instancia, posteriormente matriz orgánica de color verde, que genera a continuación aragonita esferulítica y en seguida aragonita en tabletas o nácar. Es notoria la similitud entre la estructura de la perla con la de las bandas de crecimiento de la concha, sólo que en la concha el primer componente en aparecer es aragonita en bloques, y en la perla es calcita, aunque coincidentemente durante algún tiempo se pensó que las bandas de crecimiento de la concha presentaban calcita en bloques, pero posteriormente se afirmó que era aragonita en bloques (Su *et al.*, 2002).

Además de poseer proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, es posible que la concha del abalón contenga un tipo particular de moléculas orgánicas, los proteoglicanos, que han sido poco estudiados en los moluscos, aunque sí se sabe que están presentes en la matriz orgánica de la concha del picoroco (*Austrorhynchus psittacus*) según Fernández *et al.* (2002), en las formaciones calcáreas de algunos corales, en gastrolitos y en estructuras óseas. También es posible que tengan funciones importantes en el proceso de mineralización. Los proteoglicanos son macromoléculas formadas por una proteína central o core proteico, a lo largo del cual se asocian, por su extremo terminal, numerosas moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). Las moléculas sulfatadas que poseen tendrían una gran participación en el proceso de formación de los cristales de carbonato de calcio en la concha del abalón (Arias *et al.*, 2004), fenómeno que estaría explicado por el carácter polianiónico que presentan los GAGs y su elevada densidad de carga negativa, por lo que presenta una alta afinidad a cationes, lo que explicaría su posible participación en la atracción de iones Ca y así en el proceso de mineralización. Existe la gran posibilidad de

que los GAGs sean hallados en la concha del abalón, ya que se han encontrado sulfatos en la matriz orgánica de la concha de otros moluscos (Nudelman *et al.*, 2006). Es por esta razón que nos hemos propuesto en la presente memoria de título identificar y localizar proteoglicanos en la matriz orgánica de la concha del abalón rojo, y así evaluar y caracterizar su posible participación en la formación de esta biocerámica.

HIPÓTESIS

Si en la concha de abalón rojo se presentan proteoglicanos, como ocurre en otras biocerámicas, y éstos tienen alguna influencia en la determinación cristalográfica y estructural de la fase mineral, entonces se debería encontrar una distribución diferencial de diversos proteoglicanos en las distintas estructuras de la concha.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de algunos proteoglicanos en concha de abalón rojo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la localización de algunos proteoglicanos en la matriz orgánica de la concha de abalón rojo.
2. Reconocer la ubicación de algunos proteoglicanos en relación al componente inorgánico en concha de abalón rojo.
3. Analizar la relación estructural entre matriz orgánica e inorgánica en concha de abalón rojo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para estudiar la concha del abalón se utilizó un ejemplar adulto de abalón rojo (*Haliotis rufescens*), a partir de cuya concha se obtuvieron varios trozos de aproximadamente 1 cm por 1 cm que se dividieron en tres grupos: A, B y C.

Grupo A: Muestras descalcificadas parcialmente para Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Muestras de 2 mm de grosor aproximadamente fueron fijadas en Carnoy durante 48 horas, luego lavadas en etanol absoluto 3 veces por 5 minutos. Después se impregnaron en Lowicryl puro realizando 3 cambios. El primero y el segundo a intervalos de 48 horas de impregnación a 4°C, y el tercero después de 7 días a la misma temperatura. Luego se incluyeron en Lowicryl y se dejó polimerizar la resina con luz UV a temperatura ambiente durante 24 horas dentro de tubos Eppendorf. Los bloques obtenidos fueron sacados de los tubos, emparejados con una herramienta rotatoria o taladro y colocados en moldes para tacos de parafina. Estos moldes se rellenaron con acrílico dental transparente de autocurado (Acrílico de Polimerización Transparente Marche®) en estado acuoso, dejando endurecer los bloques durante 5 minutos. Una vez endurecidas las muestras se cortaron en láminas de 1 mm., con cuchilla de diamante en cortadora ISOMET®, a 300 rpm.

Algunas muestras fueron descalcificadas parcialmente en ácido ortofosfórico al 37%, durante diferentes tiempos (6, 30 y 60 minutos). Luego fueron lavadas en agua destilada y secadas. Una vez ubicadas en un soporte metálico, todas las muestras se cubrieron con oro para evaluar estructura por SEM.

Grupo B: Muestras desproteinizadas parcialmente para SEM.

Muestras de 2 mm de grosor aproximadamente fueron fijadas en Carnoy, impregnadas en Lowicryl puro e incluidas en acrílico dental transparente de autocurado siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras del Grupo A. Una vez endurecidas las muestras se cortaron en láminas de 1 mm, con cuchilla de diamante en cortadora ISOMET®, a 300 rpm.

Posteriormente se realizó una desproteinización incompleta con hipoclorito de sodio 10%. Algunas muestras estuvieron sumergidas durante 24 hrs, otras por 48 hrs. A partir de ellas se obtuvieron fragmentos de la porción aragonítica, las que fueron cortadas

transversalmente, para observar una de sus superficies, con o sin mesocapa, y sus bordes fracturados, en los que se buscaron tabletas apiladas.

A continuación las muestras fueron sometidas a inmunodetección, realizando el procedimiento de forma semejante a lo descrito por Robinson *et al.* (1998). Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: 5D4 (anti-queratán sulfato), 2B6 (anti-dermatán sulfato y anti-condroitín 4 sulfato) y 3B3 (anti-condroitín 6 sulfato). Los cortes a los cuales se les aplicaron los anticuerpos 2B6 y 3B3 fueron previamente tratados con enzima condroitinasa ABC para que 2B6 reconociera la presencia de Dermatán sulfato y Condroitín 4 sulfato (2B6 (ABC)), y 3B3 la presencia de Condroitín 6 sulfato (3B3 (ABC)). Otros fueron tratados con la enzima condroitinasa ACII para que 2B6 reconociera exclusivamente la presencia de Condroitín 4 sulfato (2B6 (ACII)). El segundo anticuerpo fue IgG de cabra anti-ratón unido a esferas de poliestireno de 1 μm de diámetro (PolySciences UK Ltd), incubado durante 1 hora y en una concentración de 1:100 o 1:200. Luego las muestras se cubrieron con oro para ser observadas por SEM. Los controles fueron tratados sólo con el segundo anticuerpo.

Como resultado se obtuvo muestras con escasa matriz orgánica, sobre la cual los anticuerpos pudieron reaccionar, fenómeno que pudo ser observado al encontrarse esferas unidas específicamente a materia orgánica adyacente a las tabletas y en la mesocapa, confirmando así la presencia de los proteoglicanos que hemos estado buscando.

Grupo C: Muestras descalcificadas completamente para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Muestras de 1 a 1,5 mm de espesor se fijaron en 2% Paraformaldehído más 0.2% Glutaraldehído en tampón fosfato 200 mM pH 7,4 durante 48 horas aproximadamente. Posteriormente se procedió a la descalcificación con una solución de fijador más ácido fórmico en partes iguales, usando el ácido fórmico al 5% y al 10% dependiendo del grado de descalcificación deseado, durante 72 horas. Luego fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona e incluidas en resina epóxica Poly Bed (PolySciences, Inc. Warrington, P.A.). Así preparadas las muestras se obtuvieron cortes finos con un ultra micrótomo Porter Blum MT2-B.

A continuación, los cortes se ubicaron en grillas y fueron preparados para la técnica de inmunoro. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los mismos del Grupo B. El

segundo anticuerpo para todos los casos fue IgG de cabra anti-ratón conjugado con esferas de oro de 10 nm de diámetro (Fernández *et al.*, 2001). Los controles sólo fueron tratados con el segundo anticuerpo. La observación se efectuó con microscopio electrónico de transmisión Zeiss-109.

En resumen, mediante el análisis de los cortes al microscopio, se pudo evidenciar la presencia de las moléculas sometidas a estudio, los proteoglicanos, su ubicación respectiva en la matriz orgánica de la concha de este molusco, su relación con la matriz orgánica e inorgánica, y la estructura general de la concha.

RESULTADOS

Microscopía Electrónica de Barrido

Los Grupos A y B fueron analizados a través de microscopía electrónica de barrido.

El Grupo A está formado por muestras de concha de aproximadamente 2 mm de grosor que fueron descalcificados parcialmente, siendo tratada su superficie de corte transversal, como se puede ver en la Figura 4, correspondiente a la porción aragonítica descalcificada. Éstas fueron analizadas estructuralmente. En ellas se observa claramente la constitución de la concha del abalón rojo. En muestras descalcificadas con ácido ortofosfórico 37% por 6 minutos, se observa en la porción aragonítica unas bandas claras paralelas entre sí, correspondientes a las mesocapas orgánicas, que sobresalen levemente de la superficie. Estas bandas son interrupciones de una estructura más oscura, las regiones de aragonita, de aproximadamente 300 μm , las cuales están formadas por estrías que revelan la dirección de las tabletas de aragonita y su conformación en capas (Figura 5).

A un tiempo mayor de descalcificación, de 60 minutos, se ven ambas caras opuestas de cada mesocapa con mayor claridad, las cuales coinciden con el tipo de aragonita adyacente a ellas. En uno de los lados, la superficie es prácticamente lisa, en cuyo caso la aragonita en contacto con esa cara es la aragonita en bloques; todas las caras lisas miran hacia el exterior de la concha. En contraste, la cara opuesta es rugosa, coincidiendo con la aragonita esferulítica colindante a ella; todas las caras rugosas, por lo tanto, miran hacia el interior de la concha. El grosor de cada mesocapa es cercano a los 20 μm (Figura 6).

A un mayor aumento se aprecia con detalle la superficie de cada una de las caras de la mesocapa. La cara lisa presenta cierto grado de rugosidad dado que está en contacto con la aragonita en bloques, revelando un relieve coincidente con la matriz orgánica que rodearía a sus bloques. En cambio, la cara rugosa presenta mayor rugosidad, mostrando una superficie concordante con los esferulitos adyacentes a la mesocapa (Figura 7 A y B).

La porción de calcita, ubicada a continuación y más externamente de la de aragonita, aparece en forma abrupta, como se ve en la Figura 8. Posterior a la porción de calcita, y en la parte más externa de la concha, está el periostraco, de menor espesor que las porciones de aragonita y calcita, y que macroscópicamente es de color rojo. La transición calcita – periostraco es menos abrupta y más irregular (Figura 9 A y B).

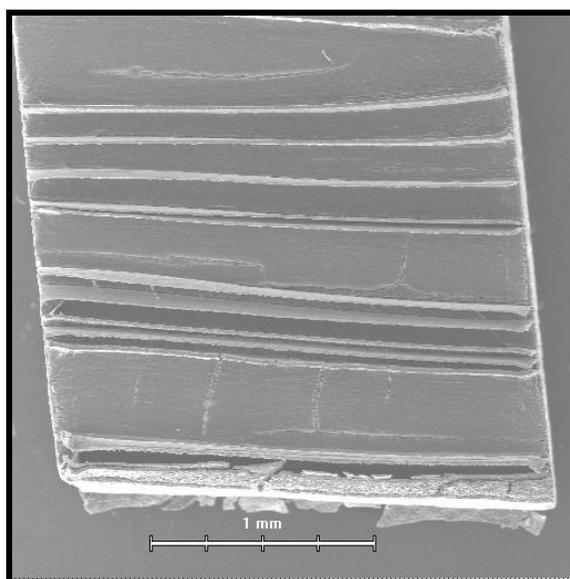


Figura 4: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de trozo de concha de abalón rojo de 2 mm de grosor, descalcificado durante 60 minutos con ácido ortofosfórico 37% en su superficie de corte, en el cual se puede ver la porción de aragonita ubicada en la porción interna de la concha, 67X.

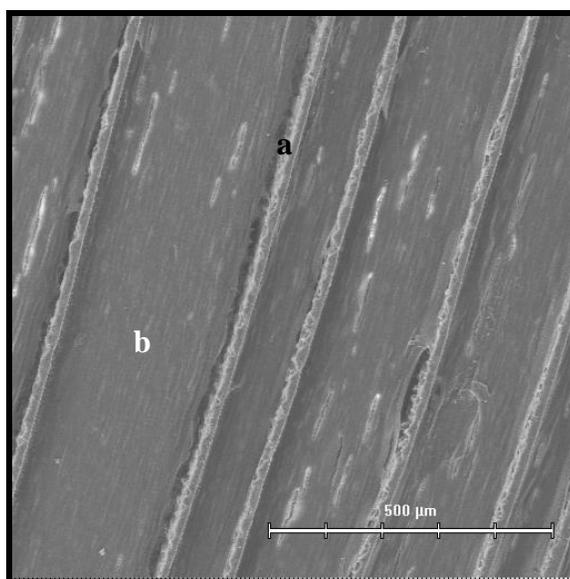


Figura 5: SEM de corte vertical de trozo de concha de abalón rojo descalcificado superficialmente con ácido ortofosfórico 37% durante 6 minutos, en el cual se observa la porción de aragonita formada por bandas claras paralelas entre sí y que sobresalen levemente de la superficie correspondiente a las mesocapas orgánicas (a), y separadas por aproximadamente 300 μm. Entre ellas existe una estructura más oscura marcada con líneas paralelas correspondiente a las tabletas de aragonita (b), 170X.

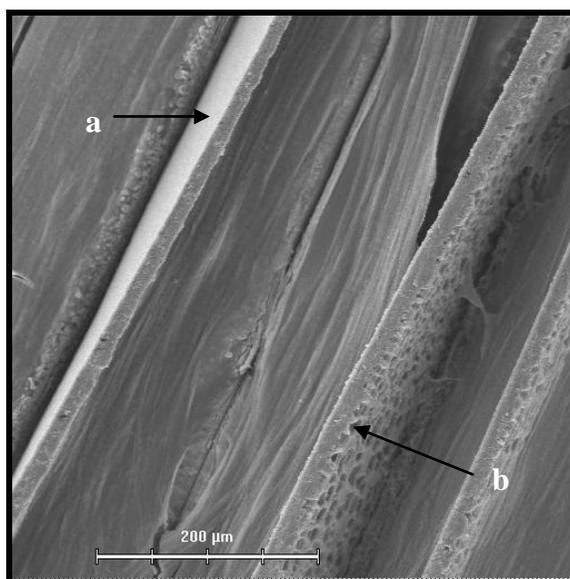


Figura 6: SEM de trozo de concha de abalón rojo descalcificado parcialmente con ácido ortofosfórico 37% por 30 minutos, en cuya porción de aragonita se encuentran unas bandas claras sobresalientes correspondientes a las mesocapas, cada una de las cuales poseen una cara lisa (a) y una rugosa (b). El interior de la concha está hacia la esquina inferior derecha de la imagen, 330X.

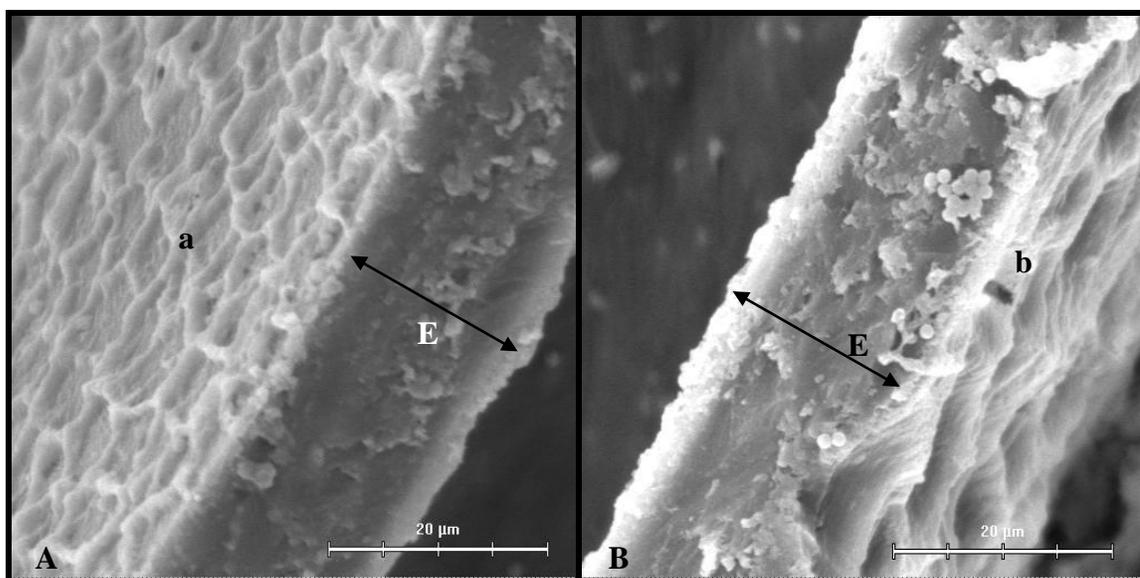


Figura 7: A) SEM de trozo de concha de abalón rojo descalcificado parcialmente con ácido ortofosfórico 37% por 60 minutos donde es posible evidenciar un espesor de 20 µm (E) de una mesocapa, junto con su cara lisa (a), la que presenta cierto grado de rugosidad, 3.300X. B) SEM de trozo de concha de abalón rojo descalcificado parcialmente con ácido ortofosfórico 37% por 60 minutos donde es posible evidenciar un espesor de 20 µm (E) de una mesocapa, junto con su cara rugosa (b), que muestra grandes concavidades, 3.300X.

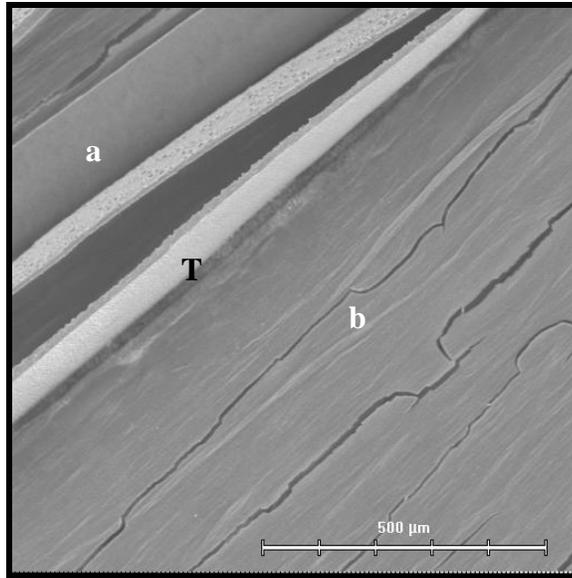


Figura 8: SEM de trozo de concha de abalón descalcificado parcialmente con ácido ortofosfórico 37% por 60 minutos, en el cual se evidencia la transición abrupta (T) entre la porción aragonítica (a) y la calcítica (b), dado por la presencia de una mesocapa y el cese de la aparición de éstas. La superficie está marcada con estrías paralelas a las mesocapas, sin mayores irregularidades, salvo algunos quiebres de la muestra, correspondientes a las ranuras oscuras, las que se dan por el secado de ésta, 170X.

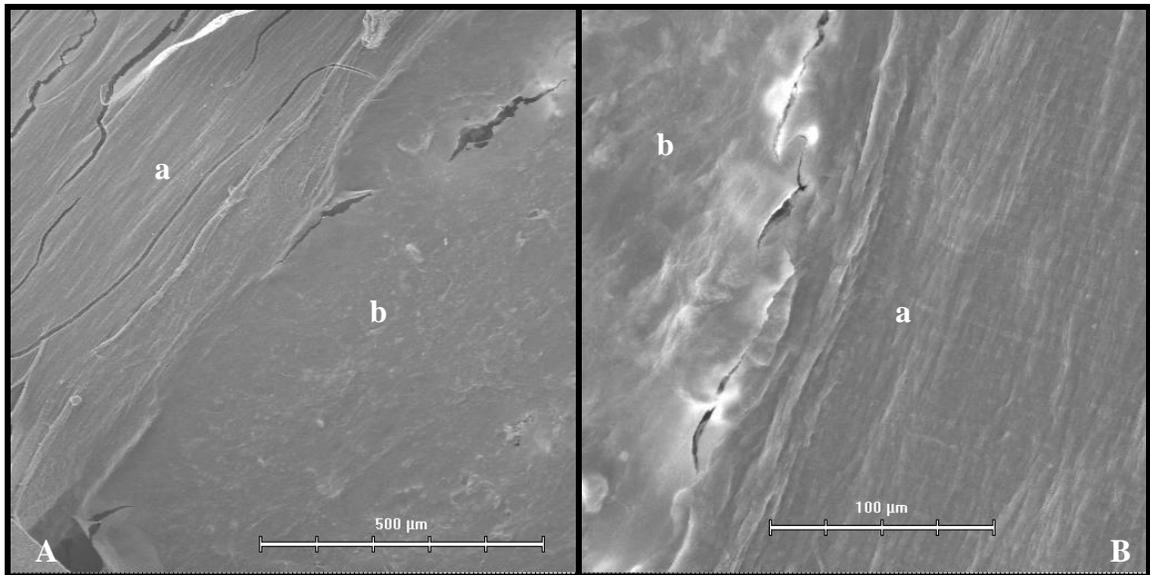


Figura 9: A) SEM de trozo de concha de abalón rojo descalcificado parcialmente con ácido ortofosfórico 37% por 60 minutos, en donde se revela la transición entre la porción de calcita (a) y el periostraco (b), 170X. B) SEM de trozo de concha de abalón rojo descalcificado parcialmente con ácido ortofosfórico 37% por 30 minutos, en donde se revela con mayor aumento la transición irregular existente entre la porción de calcita (a) y el periostraco (b), 670X.

El Grupo B está formado por aquellas muestras que fueron sometidas al mismo procesamiento que las del grupo A, aunque no se efectuó una descalcificación, sino que una desproteínización con hipoclorito de sodio 10% durante 24 y 48 horas. De estas muestras se obtuvieron pequeñas porciones aragoníticas, para ser observadas por separado en el SEM, a nivel de los bordes fracturados debido al corte de los trozos y manipulación de la muestra, y a nivel de la superficie horizontal de la muestra en donde se realizó la separación. En ciertos casos, en trozos de regiones de aragonita, esta separación se realizó a nivel de la mesocapa orgánica a través de su cara lisa que se ubica en contacto con la aragonita en bloques, la cual se desprendió de la mesocapa. También se separaron a nivel de tabletas, pero en el borde rugoso unido a la aragonita esferulítica se consiguió sólo en pequeños sectores, debido a que sus rugosidades ejercen una unión más consistente entre ambas capas. Este desprendimiento se realizó con el objeto de visualizar la región de aragonita con algún remanente de materia orgánica que mantuviera la organización y estructura normal de la concha, para que a esta matriz se unieran específicamente los anticuerpos utilizados en este estudio y así localizar los proteoglicanos que estamos buscando. El segundo anticuerpo está marcado con esferas de poliestireno de 1 μm , las cuales nos indican la presencia y ubicación de estos proteoglicanos.

En un trozo de aragonita desproteínizado por 48 horas fue posible observar uno de sus bordes en el cual se aprecian las tabletas apiladas, y muy escasa presencia de materia orgánica residual, que se encuentra a nivel intertabletas, la cual permite mantener a las tabletas unidas (Figura 10 A y B).

Las muestras que fueron desproteínizadas por 24 horas se sometieron a inmunodetección. En el caso de aquellas muestras con 2B6 (ABC) a nivel de tabletas de aragonita, se encontró esferas tanto unidas a la matriz interlaminar, que cubre a las capas de tabletas (Figura 11 A y B), como en la matriz intertabular, la que puede apreciarse claramente dado por la manipulación de la muestra y la desproteínización parcial que conservó a la matriz intertabular, en tanto que las tabletas contenidas entre ésta fueron eliminadas durante los lavados post-incubación (Figura 12 A y B). Por lo tanto estas muestras, en dichas estructuras, resultan positivas para dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato. A nivel de la mesocapa orgánica, en su cara lisa, también se encontró reacción positiva (Figura 13 A y B).

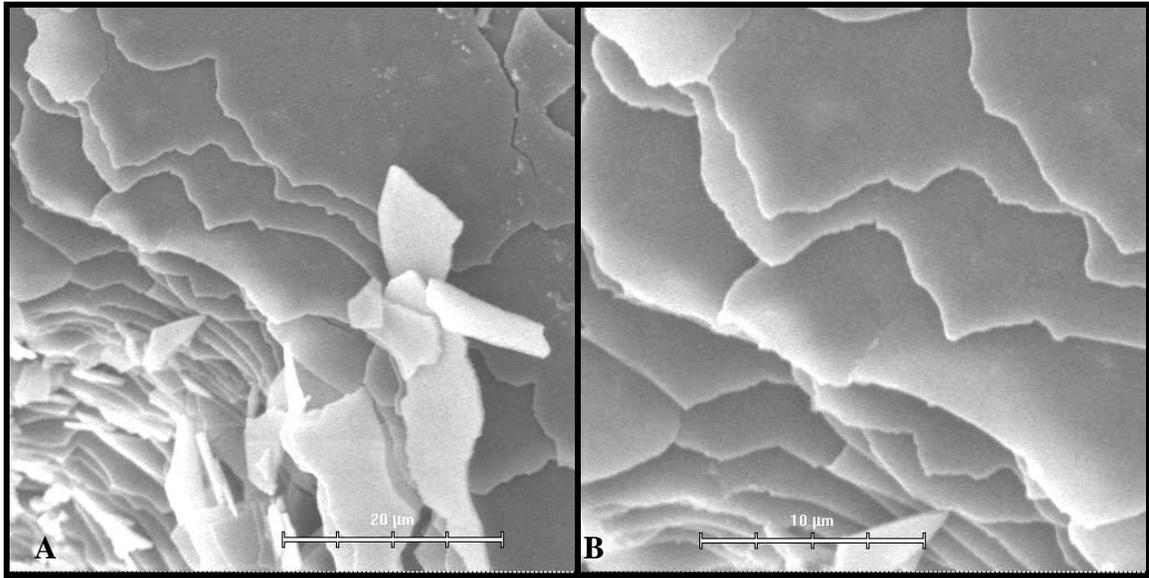


Figura 10: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 48 horas, en el que se puede ver uno de los bordes fracturados y las capas de tabletas apiladas. A) 3300X. B) 6700X.

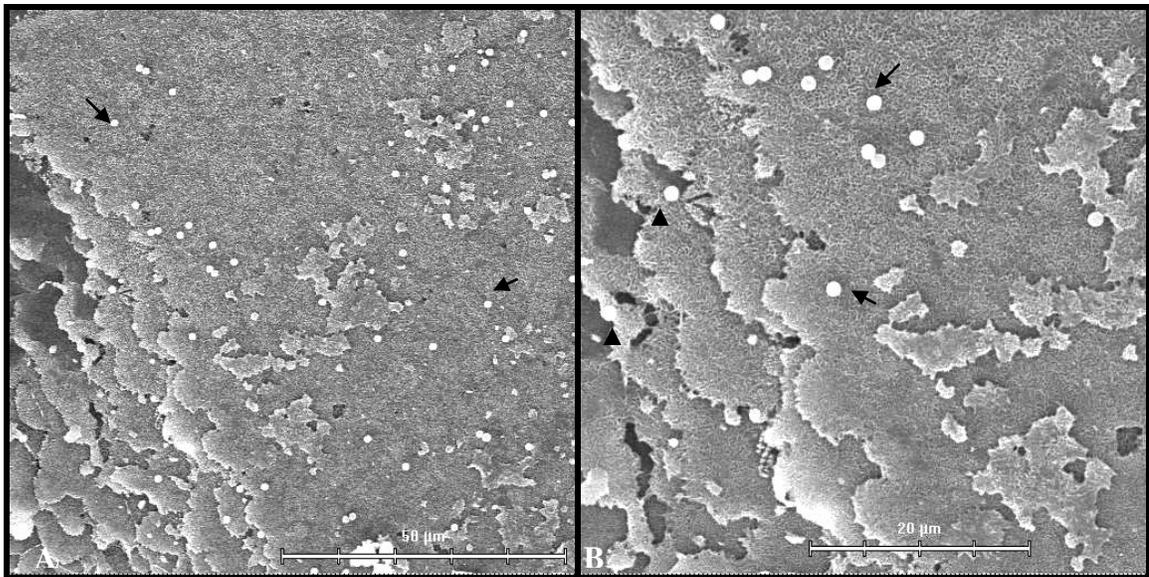


Figura 11: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de tabletas, en el que se puede ver uno de los bordes fracturados con tabletas apiladas y la matriz interlaminar en la superficie, con reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato tanto en la matriz que cubre a las tabletas (interlaminar) (flechas) como en la ubicada entre tabletas (intertabular) (puntas de flecha), A) 1700X. B) 3300X.

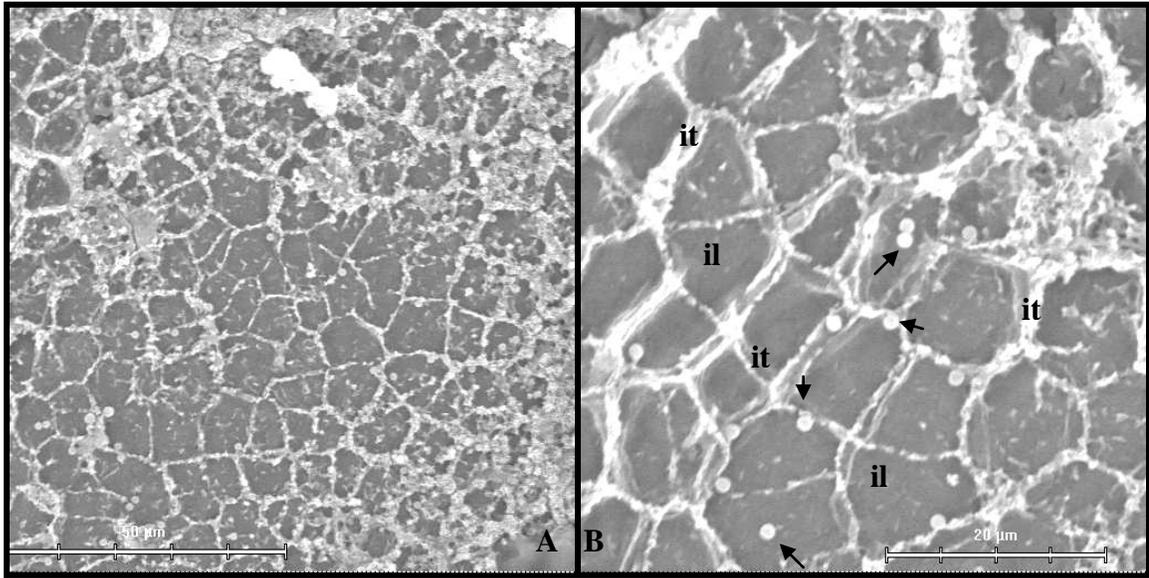


Figura 12: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteinizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de tabletas de aragonita, en el que se puede ver la matriz intertabular (it) claramente en la superficie y la matriz interlaminar (il) con reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato (flechas), A) 1700X. B) 3300X. 0

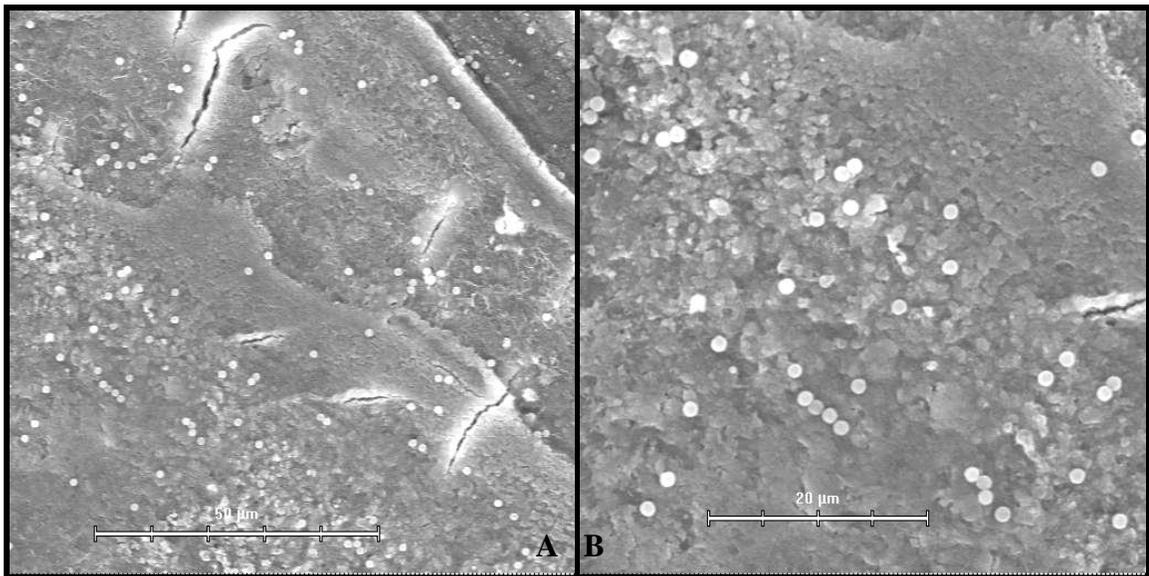


Figura 13: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteinizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de mesocapa por su lado liso, en la cual se observa reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato, A) 1.700X. B) 3.300X.

En el caso de muestras incubadas con 2B6 (ACII), se obtuvo cortes a nivel de la capa de aragonita en bloques ubicada a un lado de la mesocapa orgánica. En la Figura 14 A y B se aprecia esta superficie en un primer plano. En un segundo plano es posible ver los esferulitos correspondientes a la aragonita esferulítica, ubicada al otro lado de la mesocapa orgánica, los cuales no presentan reacción a condroitín 4 sulfato, al igual que la mesocapa. A nivel de aragonita en tabletas sí se encontró reacción positiva tanto en la matriz interlaminar como en la intertabular, aunque mayormente en esta última (Figura 15 A y B).

Al usarse 3B3 (ABC), junto con el segundo anticuerpo en concentración de 1:100, fue posible observar, a nivel de tabletas de aragonita, sobre la superficie formando hileras, lo que se puede interpretar como especificidad hacia la matriz intertabular, y en menor grado sobre la matriz interlaminar (Figura 16 A). En otra muestra, con el segundo anticuerpo diluido en proporción de 1:200, y con un mayor grado de desproteización en el sector captado producto de la desproteización desigual y parcial que sufrió la muestra, se encontró esferas sobre los bordes de una muestra fracturada a nivel de tabletas, lo que concuerda con la especificidad hacia la matriz intertabular (Figura 16 B), confirmando que esta muestra resulta positiva a Condroitín 6 sulfato, encontrándose predominantemente en la matriz intertabular. En una muestra en la que pudo obtenerse corte a nivel de aragonita esferulítica, no se encontró reacción a condroitín 6 sulfato (Figura 17 A y B). En cambio, a nivel de la mesocapa por su cara lisa, sí se encontró reacción positiva (Figura 18 A y B).

Cuando el primer anticuerpo utilizado fue 5D4, y el segundo anticuerpo diluido en proporción de 1:200, fue posible visualizar esferas unidas en mayor cantidad a la cara lisa de la mesocapa y en menor medida a la aragonita en bloques, con la cual está en contacto en condiciones naturales (Figura 19 A y B). Por lo que al parecer queratán sulfato está presente en la mesocapa en la superficie adyacente a la aragonita en bloques. En otras muestras sometidas al mismo procesamiento, pero en que el corte permitió visualizar la aragonita esferulítica, también se encontró reacción positiva a queratán sulfato en la matriz unida a esta estructura (Figura 20). En un corte a nivel de tabletas de aragonita también se encontró reacción positiva, sobre la matriz interlaminar remanente y sobre las tabletas descubiertas, vale decir, sobre la matriz intracristalina (Figura 21).

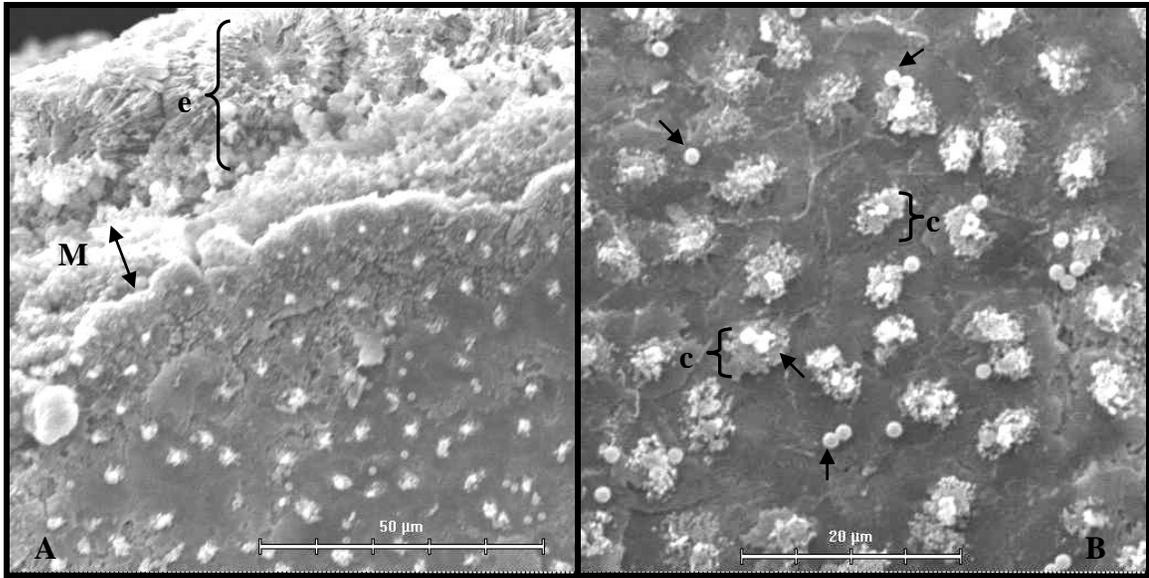


Figura 14: A) SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de aragonita en bloques, cuya superficie adyacente a tabletas de aragonita más próximas, es decir, su matriz interlaminar, da positivo a condroitín 4 sulfato. Además se observa la aragonita esferulítica (e) al otro lado de la mesocapa (M), ambas sin reacción positiva, 1700X. B) SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de aragonita en bloques, cuya matriz interlaminar y centros de tabletas (c) dan positivo a condroitín 4 sulfato (flechas), 3300X.

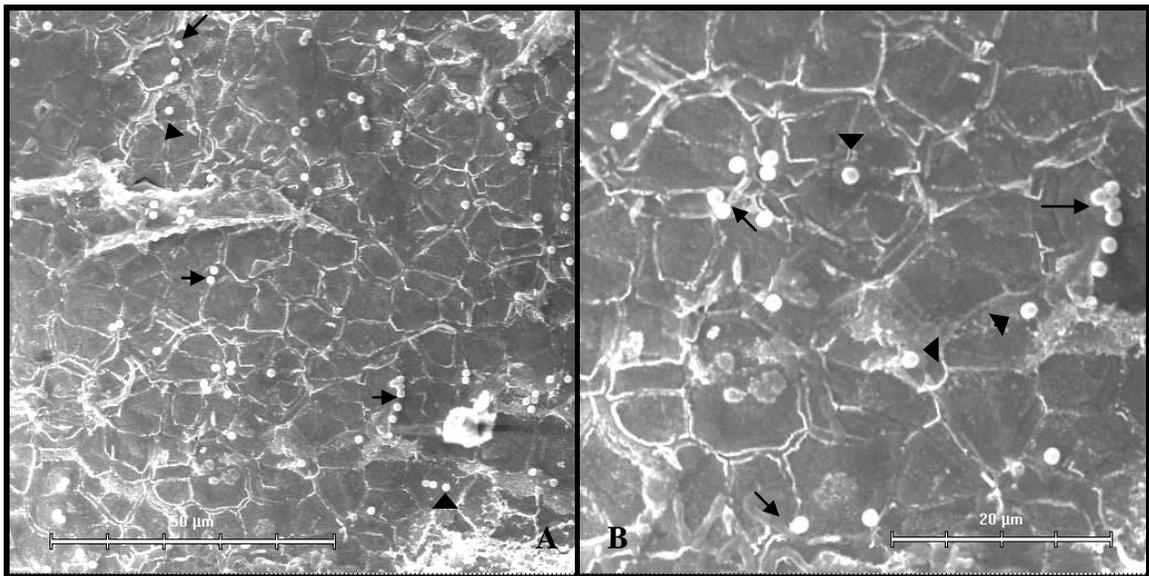


Figura 15: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 24 horas, cortado a nivel de aragonita en tabletas, en cuya superficie se diferencia claramente la matriz intertabular que delimita a cada tableta, con reacción positiva a condroitín 4 sulfato (flechas), y la matriz interlaminar sobre cada tableta con reacción positiva al mismo anticuerpo (puntas de flecha), A) 1.700X. B) 3.300X.

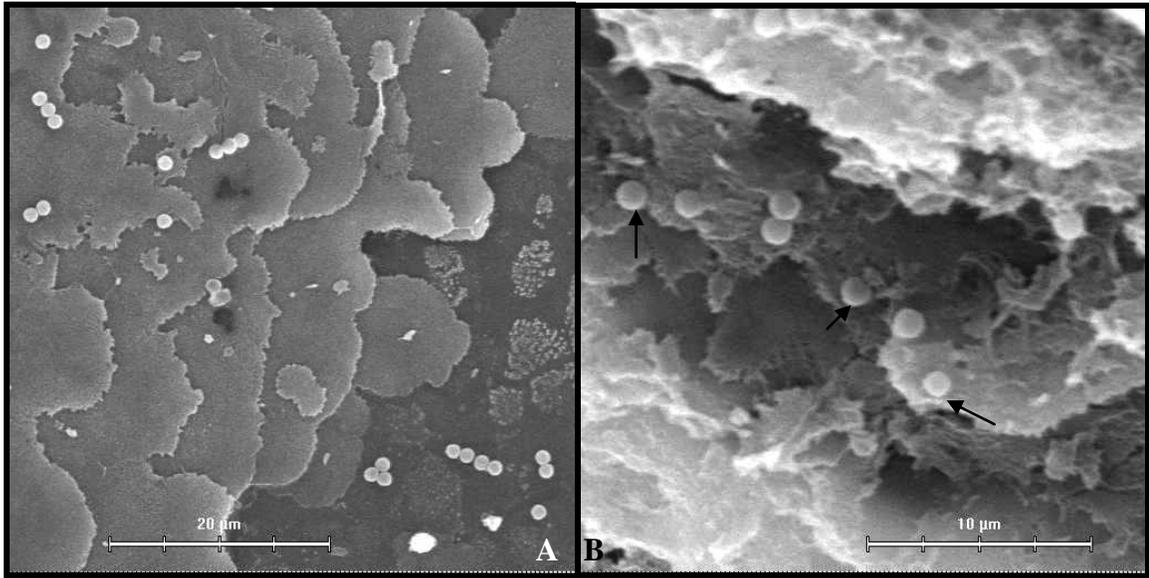


Figura 16: A) SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de tabletas, en el que se ve uno de los bordes fracturados con tabletas apiladas y la matriz intertabular en la superficie, con reacción positiva a condroitín 6 sulfato, 3300X. B) SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado por 24 horas, cortado a nivel de tabletas, en el que se ve uno de los bordes fracturados con tabletas y reacción positiva específica a condroitín 6 sulfato en los bordes donde yace la matriz intertabular (flechas), 6700X.

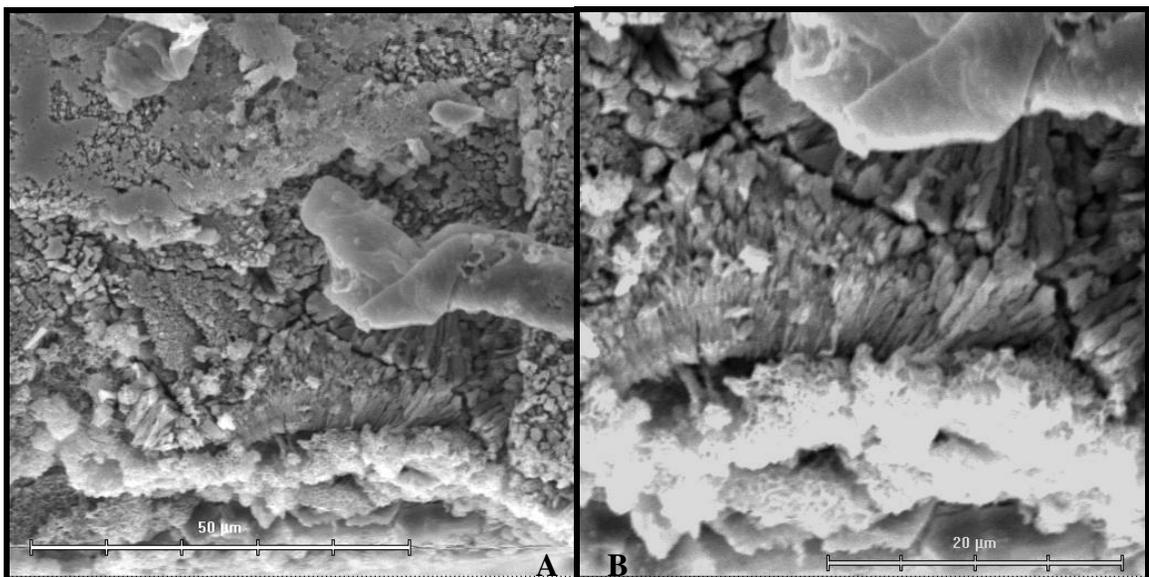


Figura 17: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de aragonita esferulítica, la cual no presenta reacción positiva a condroitín 6 sulfato, A) 1.700X. B) 3.300X.

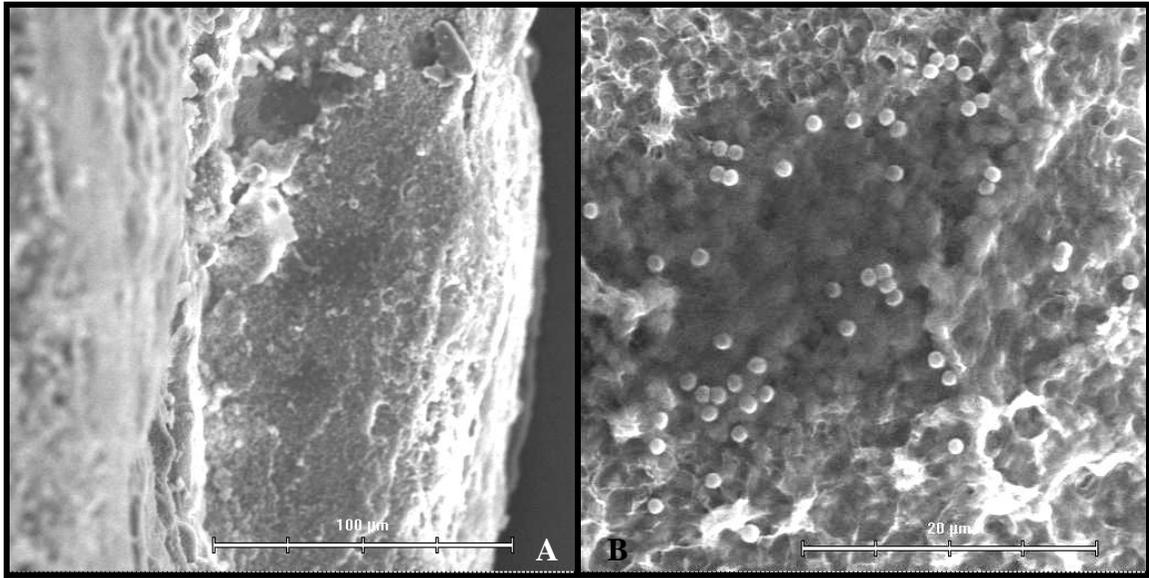


Figura 18: A) SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado por 24 horas, donde se alcanza a apreciar parte de la superficie lisa de una mesocapa, 670X. B) SEM de la misma muestra y sector anterior, en la que la mesocapa exhibe reacción positiva a condroitín 6 sulfato, 3.300X.

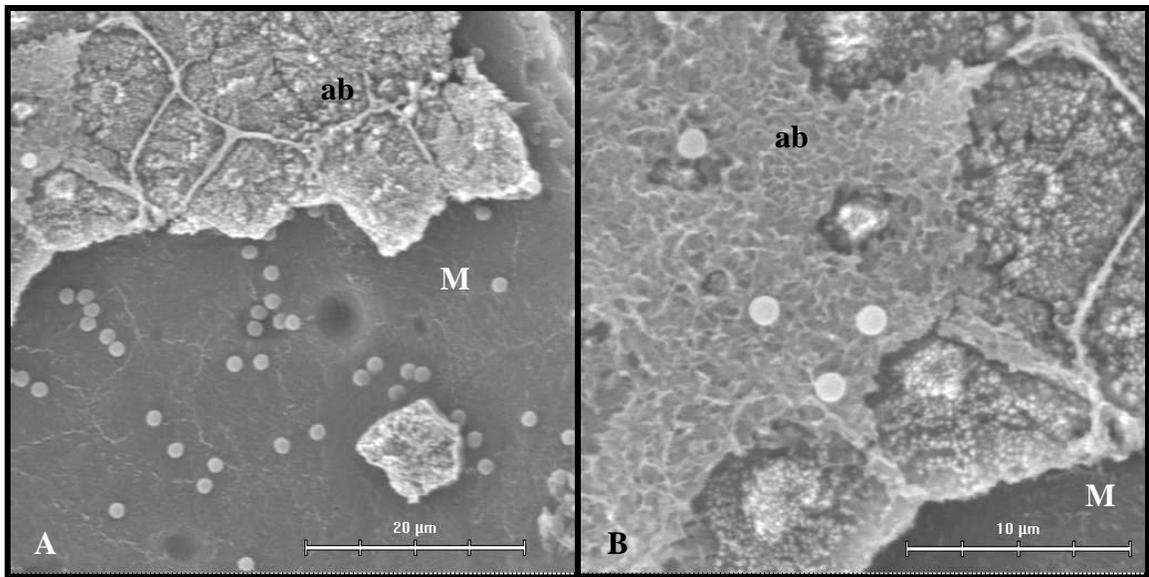


Figura 19: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de aragonita en bloques (a), donde puede visualizarse la cara lisa de la mesocapa (M) debido a la fractura y desprendimiento de una porción de la capa que la cubre. Se observa reacción positiva a queratán sulfato en la mesocapa y en la matriz que cubre a la aragonita en bloques, aunque siendo mayor en la mesocapa. A) 3300X. B) 6700X.

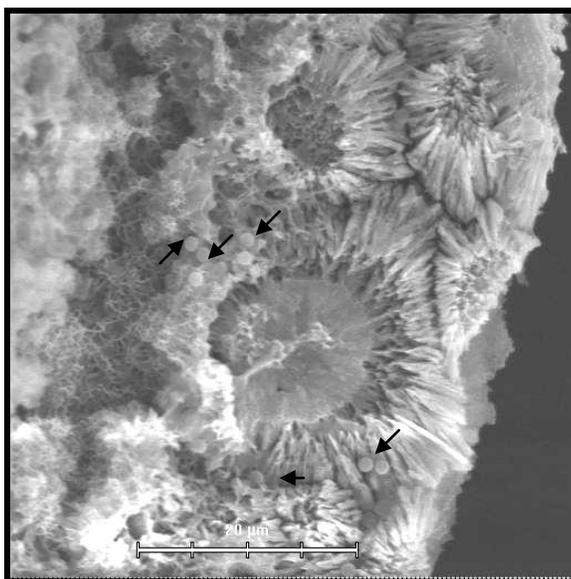


Figura 20: SEM de trozo de concha de abalón rojo desproteinizado parcialmente por 24 horas cortado a nivel de aragonita esferulítica, cuya matriz orgánica presenta reacción positiva a queratán sulfato (flechas), 3300X.

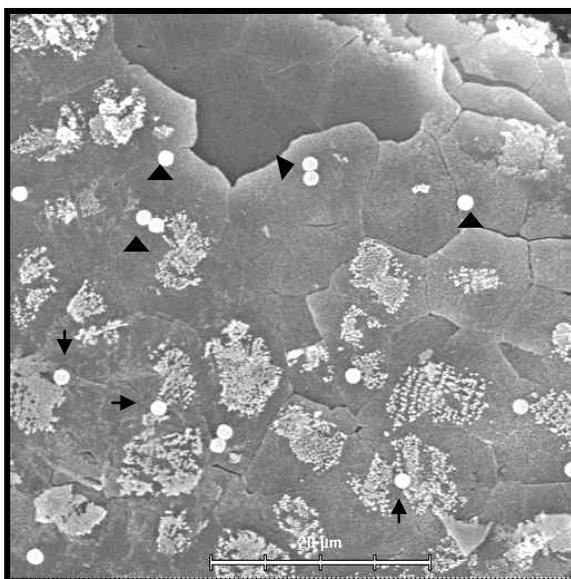


Figura 21: SEM de trozo de concha de abalón rojo desproteinizado parcialmente por 24 horas cortado a nivel de tabletas de aragonita, con reacción a queratán sulfato en la matriz interlaminar (flechas) y en su matriz intracristalina (puntas de flecha), 3300X.

Las muestras controles, obtenidas a partir de cortes a nivel de aragonita en bloques (Figura 22), de tabletas de aragonita en uno de sus bordes fracturados (Figura 23), y de aragonita esferulítica (Figura 24), fueron negativas.

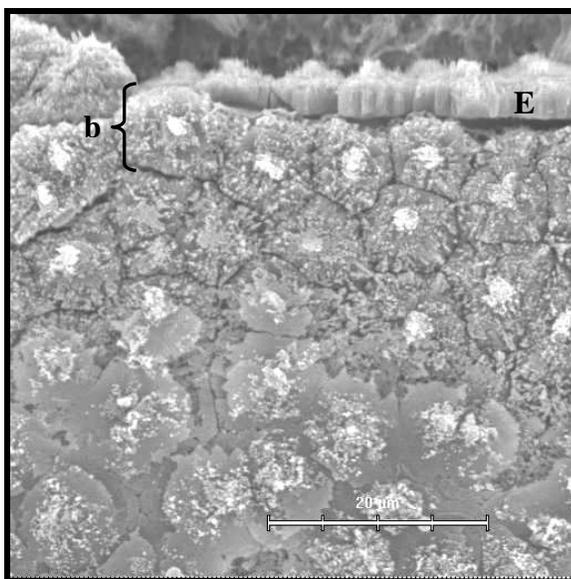


Figura 22: SEM de trozo de porción de aragonita de concha de abalón rojo desproteínizado parcialmente por 24 horas, cortado horizontalmente a nivel de aragonita en bloques, donde no se observan esferas, es una muestra control negativa. En esta imagen es posible apreciar cada uno de los bloques de aragonita (b), que en este caso son más irregulares y más gruesas que las tabletas pseudo-hexagonales de la aragonita en tabletas. En la parte superior se observa una fractura a nivel de esta capa, quedando al descubierto la cara lateral de cada una de estas tabletas y su espesor (E), 3300X.

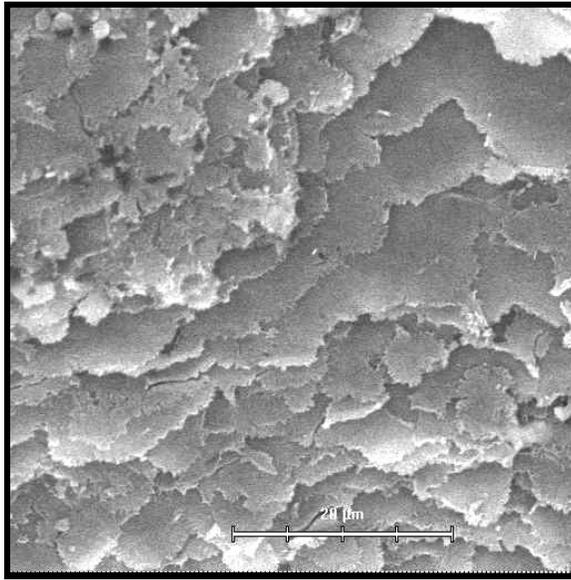


Figura 23: SEM de trozo de concha de abalón rojo desproteinizado parcialmente por 24 horas cortado a nivel de tabletas, en el cual se visualiza uno de los bordes fracturados carente de esferas, por lo tanto, es una muestra control negativa, 3300X.

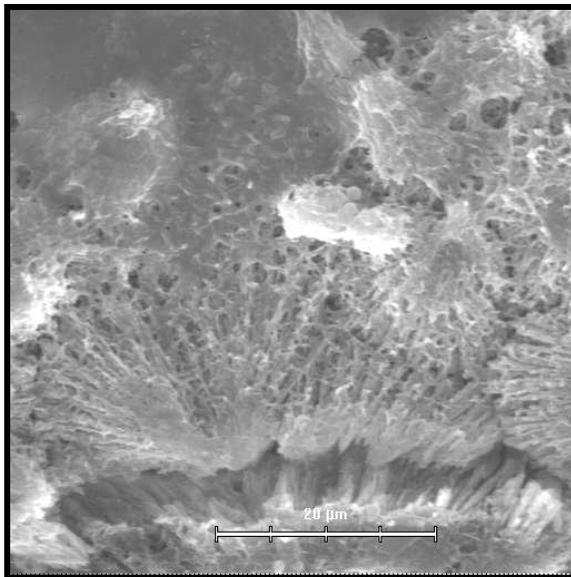


Figura 24: SEM de trozo de concha de abalón rojo desproteinizado parcialmente por 24 horas, en el cual la aragonita esferulítica aparece carente de esferas, por lo tanto es un control negativo, 3300X.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Las muestras del Grupo C fueron descalcificadas completamente y sometidas a la técnica de inmunoro para localizar los glicosaminoglicanos. Para esto se usaron los anticuerpos 2B6 (preincubación con condroitinasa ABC y condroitinasa ACII), 3B3 (preincubación con condroitinasa ABC) y 5D4.

En cortes localizados a nivel de la porción de aragonita, que contiene varias mesocapas, fue posible observar una de ellas, la que aparece como una gruesa franja, de margen liso por uno de sus lados y margen irregular por el otro, rodeada a ambos lados por delgadas franjas oscuras paralelas a ella que corresponden a las nanocapas o matriz interlaminar (Figura 25)

En otro corte, localizado en el área de tabletas de aragonita, se pudo distinguir fácilmente las nanocapas, representadas por franjas oscuras paralelas entre sí aunque de forma irregular debido a la descalcificación de la muestra que impidió la completa mantención de la estructura. Aquí se ven claramente unas líneas rectas perpendiculares a las nanocapas, correspondientes a la matriz intertabular (Figura 26).

Algunos cortes fueron incubados con 2B6 (ABC). Éstos revelaron reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato tanto a la matriz interlaminar o nanocapas como a la matriz intracristalina, vale decir, a aquella ubicada entre las nanocapas (Figura 27 A y B). A nivel de mesocapa, también se encontró reacción, tanto en su espesor medio (Figura 28 A y B) como en sus bordes, observándose mayor presencia en el borde rugoso adyacente a la aragonita esferulítica (Figura 29 A y B). En la aragonita esferulítica no se encontró esferas.

En las muestras con 2B6 (ACII) se encontró reacción a condroitín 4 sulfato tanto en la matriz interlaminar como en la intracristalina, no así en matriz intertabular ni en mesocapa y sus capas adyacentes (aragonita esferulítica y aragonita en bloques) (Figura 30 A y B).

Al incubarse con 3B3 (ABC), fue posible visualizar, a nivel de tabletas de aragonita, una reacción positiva a condroitín 6 sulfato sobre las nanocapas, y entre las nanocapas, principalmente, en donde se ubica la matriz intracristalina (Figura 31 A y B). En la Figura 28 B se observa una matriz intracristalina más densa que en la imagen contigua, posiblemente dado a la manipulación y descalcificación de la muestra que provoca un

desmoronamiento de esta matriz y su compactación en ciertos sectores del corte. En las Figuras 32 A y B, correspondientes a otros cortes pero con los mismos anticuerpos primario y secundario, también es posible ver esta reacción positiva en la matriz intracristalina. Sobre la mesocapa también existió reacción, concentrada más hacia la cara lisa de ésta a lo largo de su espesor (Figura 33 A y B), aunque también se encontró en la cara rugosa (Figura 34 A) y su aragonita esferulítica adyacente (Figura 34 B), sin embargo, estas regiones no superan en magnitud a la reacción obtenida en la matriz interlaminar ni en la intracristalina.

En el caso de los cortes tratados con 5D4, se encontró reacción a queratán sulfato mayormente sobre la mesocapa, aunque también se halló sobre las nanocapas y en menor medida sobre la matriz intracristalina (Figura 35 A y B). No se encontró reacción positiva en la matriz intertabular.

Los controles resultaron negativos a todos los anticuerpos a nivel de la matriz interlaminar, matriz intracristalina, matriz intertabular, mesocapa (Figura 36 A y B), aragonita esferulítica y en bloques (Figura 37 A y B).

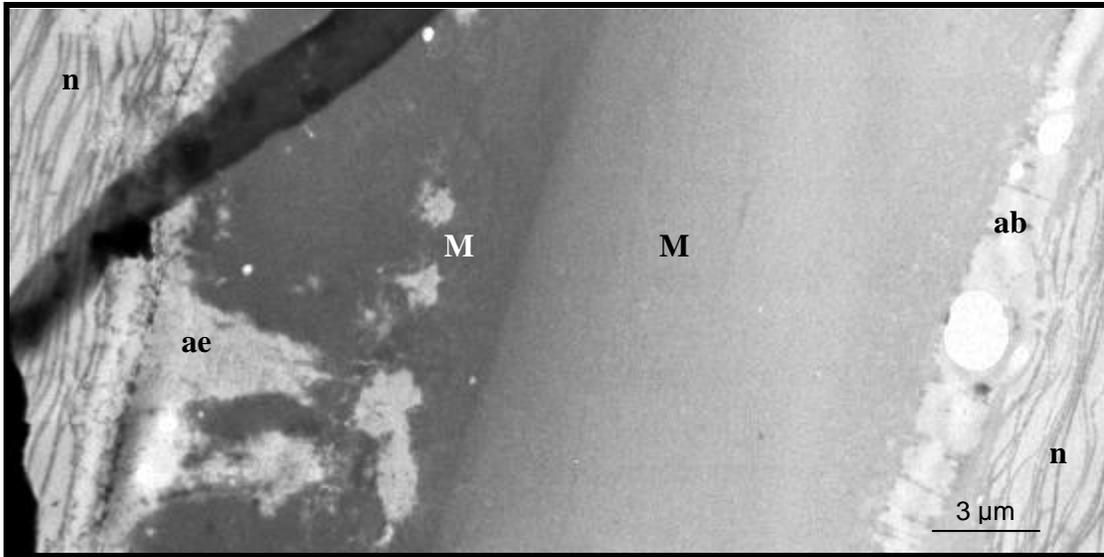


Figura 25: TEM de corte de concha de abalón rojo en el cual se aprecia una franja oscura en posición vertical, con un margen liso y otro irregular más oscuro, que corresponde a la mesocapa orgánica (M). Entre las concavidades del margen irregular se ve un material levemente denso, correspondiente a la matriz orgánica que rodea a la aragonita esferulítica (ae). En contacto con el margen liso, en cambio, se ubica un material de menor densidad, que correspondería a la materia orgánica correspondiente a la aragonita en bloques (ab). Más externamente a estas estructuras se ven muchas líneas negras onduladas paralelas, llamadas nanocapas o matriz interlaminar (n), 3.000X

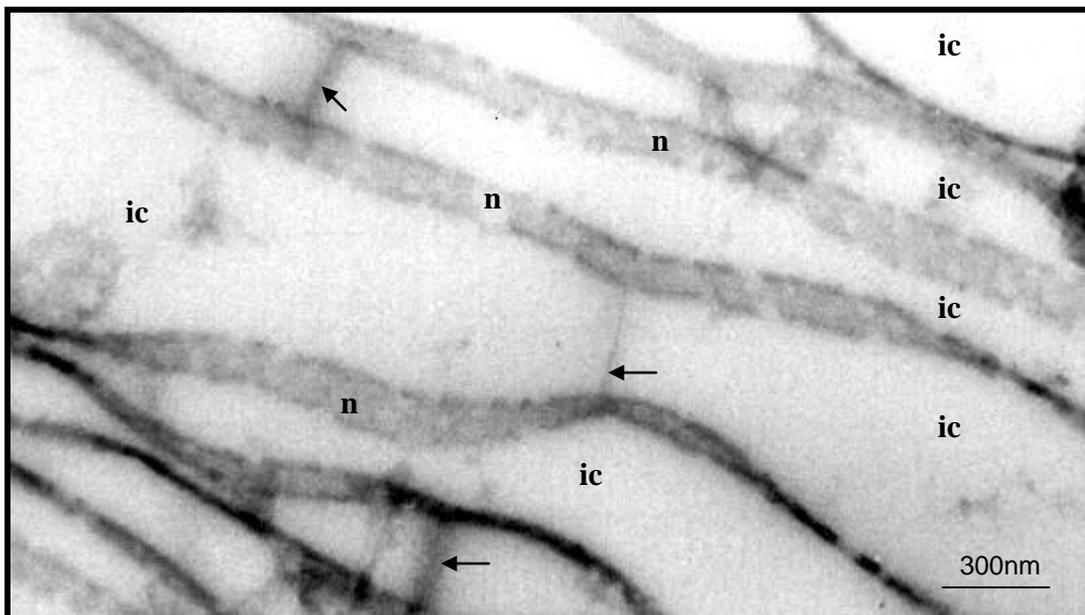


Figura 26: TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de tabletas de aragonita, en el cual se aprecian entre las nanocapas (n) unas líneas rectas oscuras (flechas) perpendiculares a ellas, correspondientes a la matriz intertabular, y ubicándose entre estas matrices más oscuras, la matriz intracristalina (ic) contenida en cada tableta de aragonita, 30.000X.

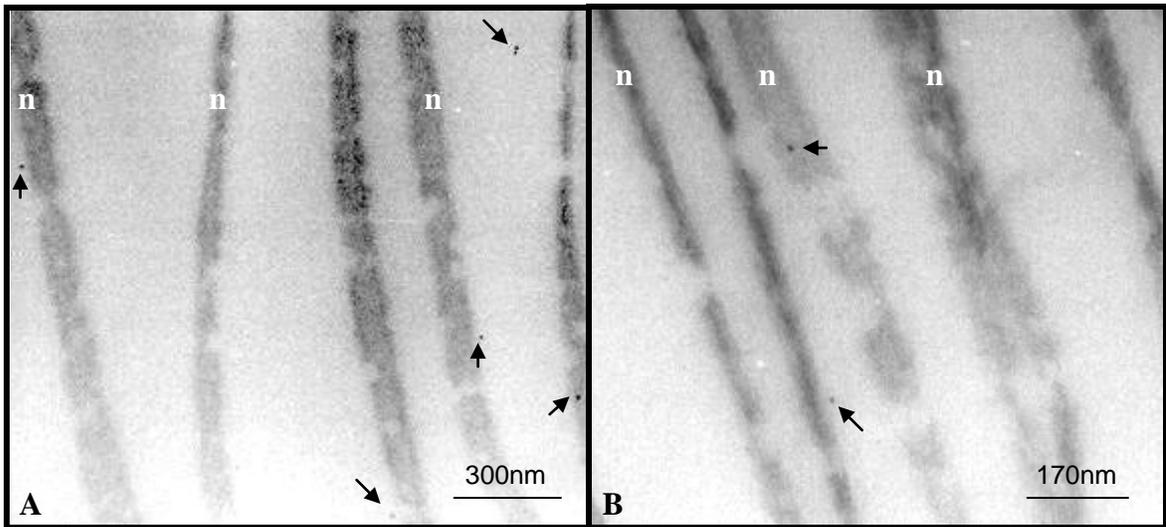


Figura 27: TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de una región de aragonita en el cual se observa reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato (flechas) sobre las nanocapas (n) y entre ellas. A) 30.000X. B) 50.000X.

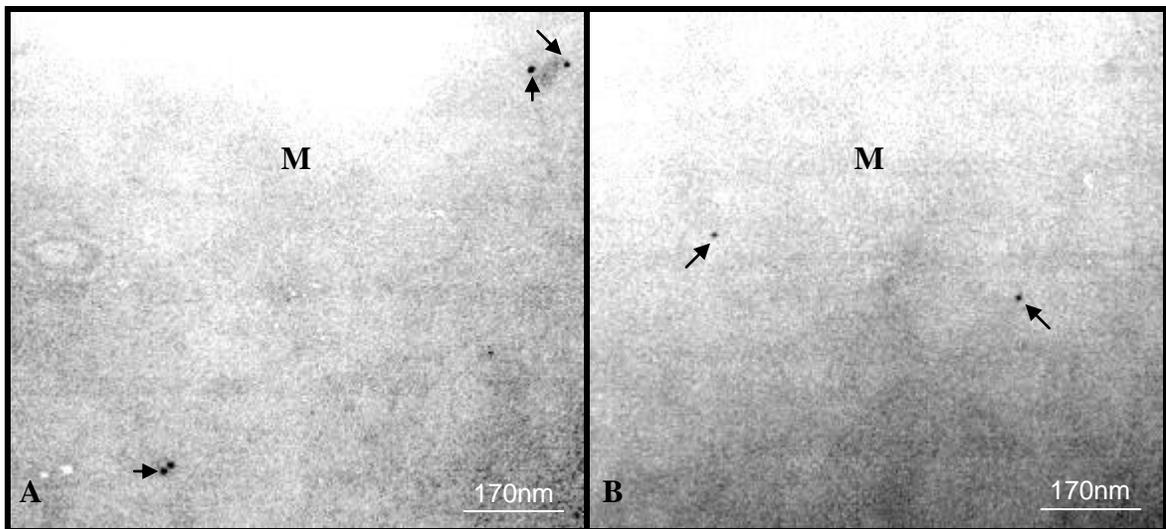


Figura 28 A y B: TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa en el cual se observa reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato sobre el espesor medio de la mesocapa (M), en dos sectores distintos. A) 50.000X, B) 50.000X.

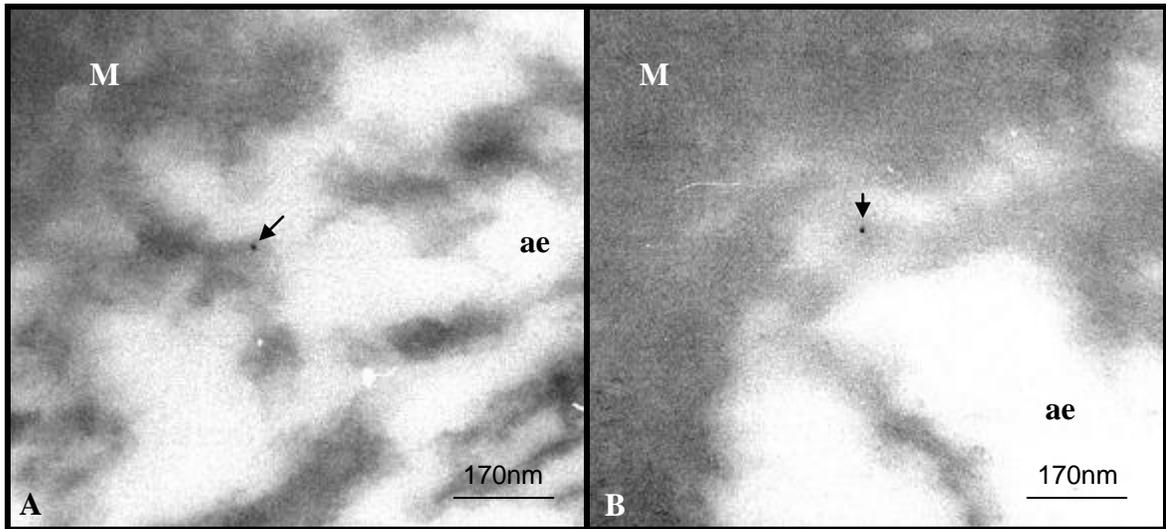


Figura 29 A y B: TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) en el cual se observa reacción positiva a dermatán sulfato y/o condroitín 4 sulfato (flechas) sobre el borde rugoso adyacente a la aragonita esferulítica (ae), A) 50.000X, B)50.000X.

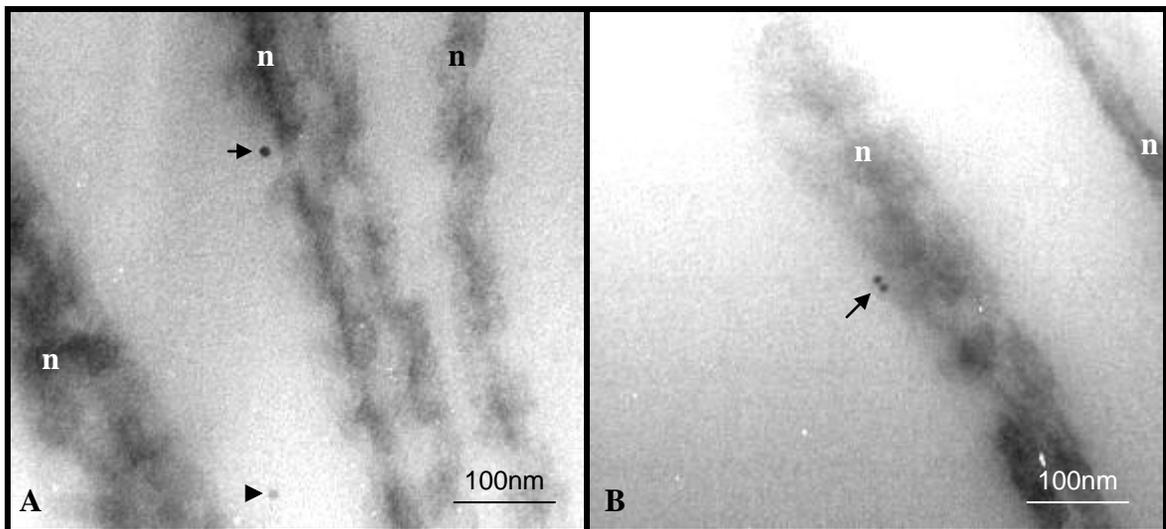


Figura 30: A) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de una región de aragonita en el cual se observa reacción positiva a condroitín 4 sulfato sobre las nanocapas (n) indicado con la flecha, y entre ellas (punta de flecha), es decir, sobre la matriz intracristalina, 85.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de una región de aragonita en el cual se observa reacción positiva a condroitín 4 sulfato sobre una nanocapa (n) en la cual se aprecian dos esferas juntas (flecha), 85.000X.

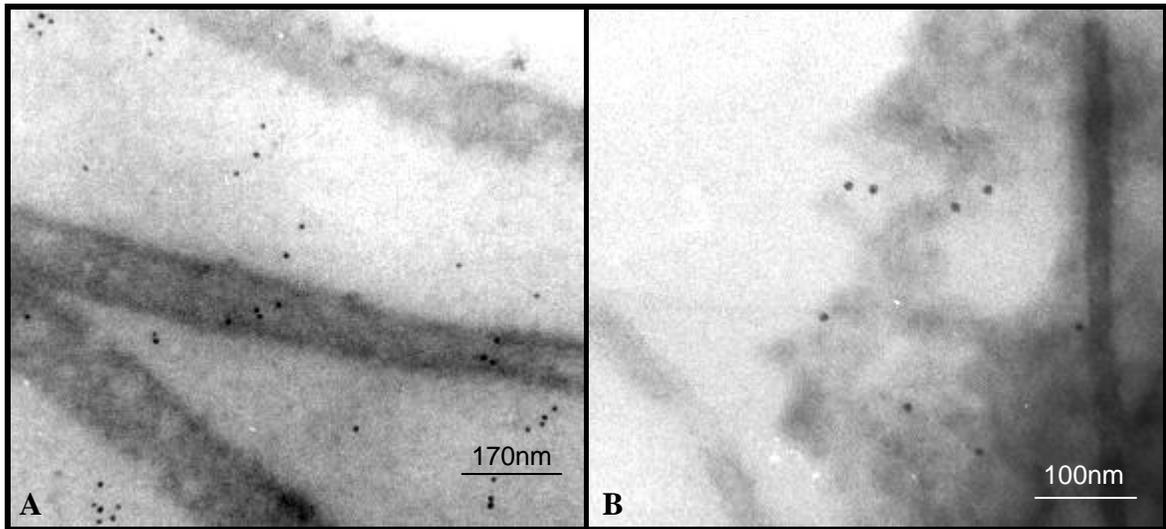


Figura 31: A) TEM de corte de concha de abalón rojo donde se encontró reacción positiva para condroitín 6 sulfato sobre las nanocapas y mayormente entre ellas, es decir, sobre la matriz intracristalina, 50.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo donde se encontró reacción positiva a condroitín 6 sulfato principalmente sobre la matriz intracristalina, 85.000X.

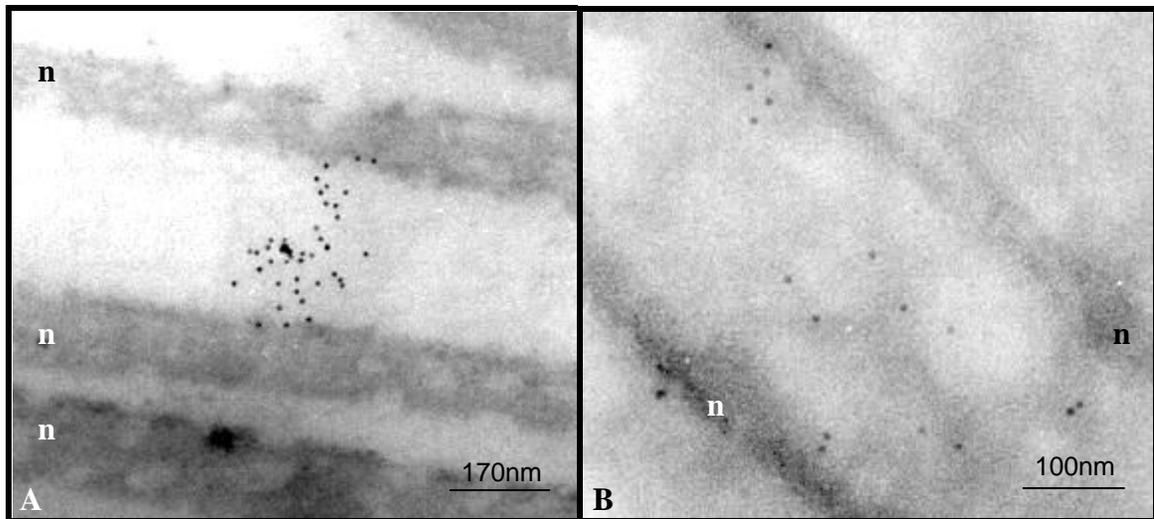


Figura 32: A) TEM de corte de concha de abalón rojo donde existe reacción positiva a condroitín 6 sulfato sobre la matriz intracristalina, en un pequeño sector concentrado entre dos nanocapas (n), 50.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo donde cuya reacción positiva a condroitín 6 sulfato es evidente entre las nanocapas (n), es decir, sobre la matriz intracristalina, 85.000X.

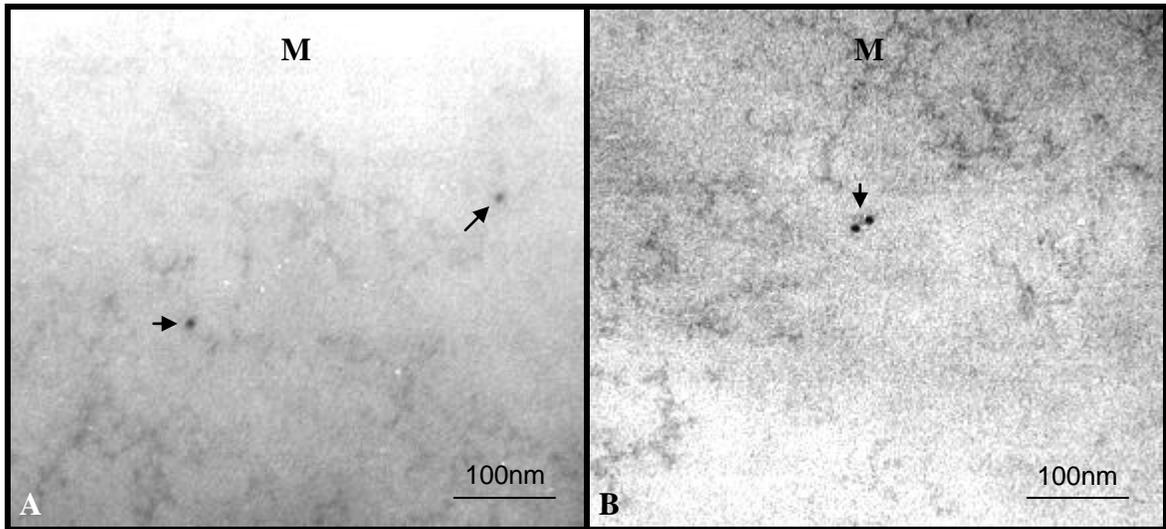


Figura 33: A) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) en el cual se observa reacción positiva a condroitín 6 sulfato (flechas) sobre el espesor de la mesocapa más cercano a la cara lisa de ésta, 85.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) en el cual se observa reacción positiva a condroitín 6 sulfato (flecha) sobre el espesor medio de la mesocapa, 85.000X.

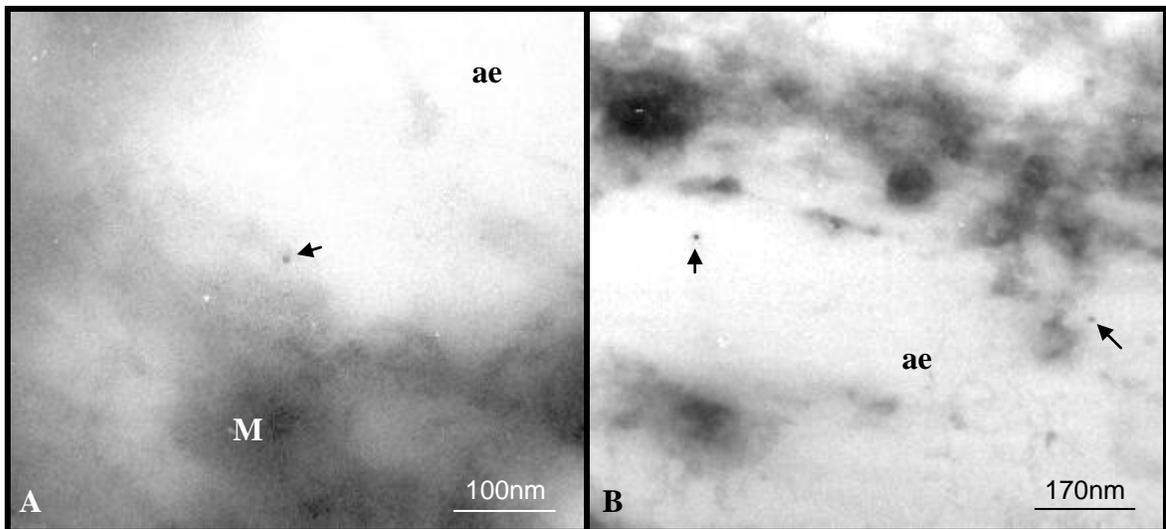


Figura 34: A) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) en el cual se observa reacción positiva a condroitín 6 sulfato (flecha) sobre el borde rugoso de la mesocapa el cual delimita con la aragonita esferulítica (ae), 85.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la aragonita esferulítica (ae) en el cual se observa reacción positiva a condroitín 6 sulfato (flechas) en su matriz, 50.000X.

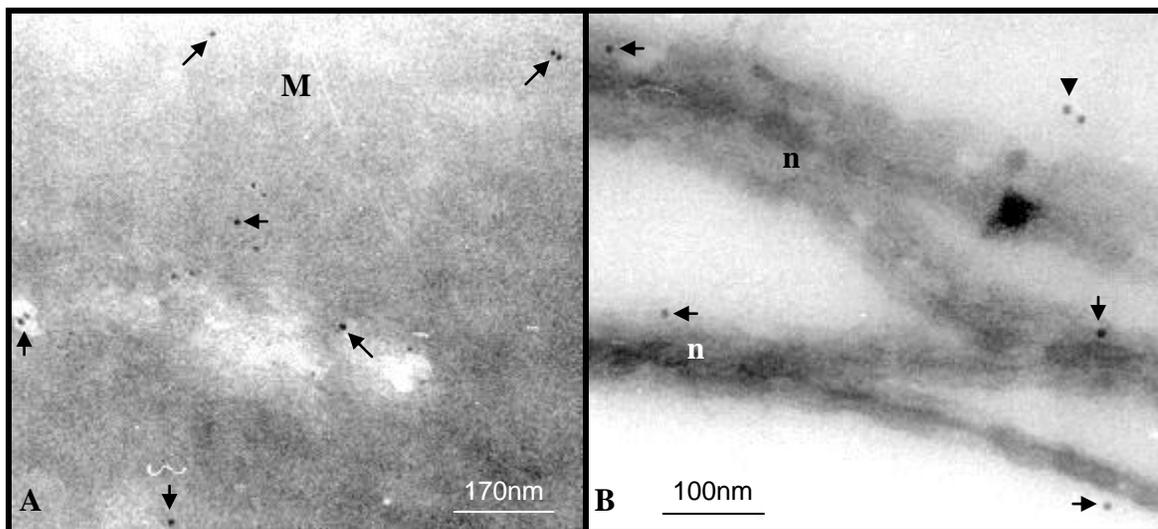


Figura 35: A) TEM de corte de concha de abalón rojo donde se encontró reacción positiva a queratán sulfato sobre la mesocapa, en mayor magnitud que en el sector de la imagen siguiente, 50.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo donde se encontró reacción positiva a queratán sulfato sobre las nanocapas (n) (flechas) y en menor cantidad sobre la matriz intracrystalina (punta de flecha), aunque no se vio asociado a la matriz intertabular, 85.000X.

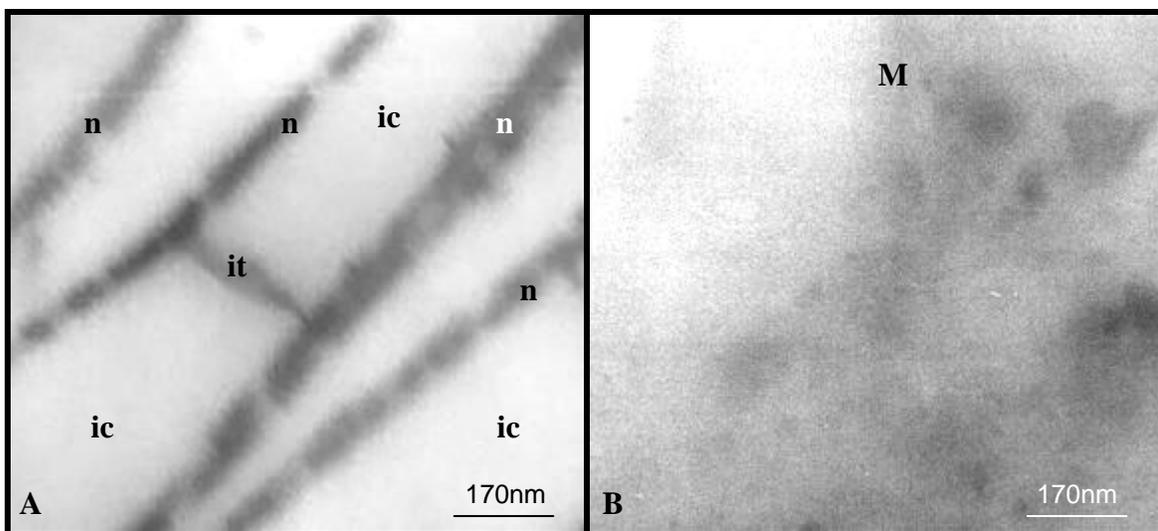


Figura 36: A) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la región de aragonita en el cual no se observa reacción sobre la matriz interlaminar (n), intracrystalina (ic) ni intertabular (it), 50.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) en el cual se observa reacción negativa en su espesor medio, 50.000X.

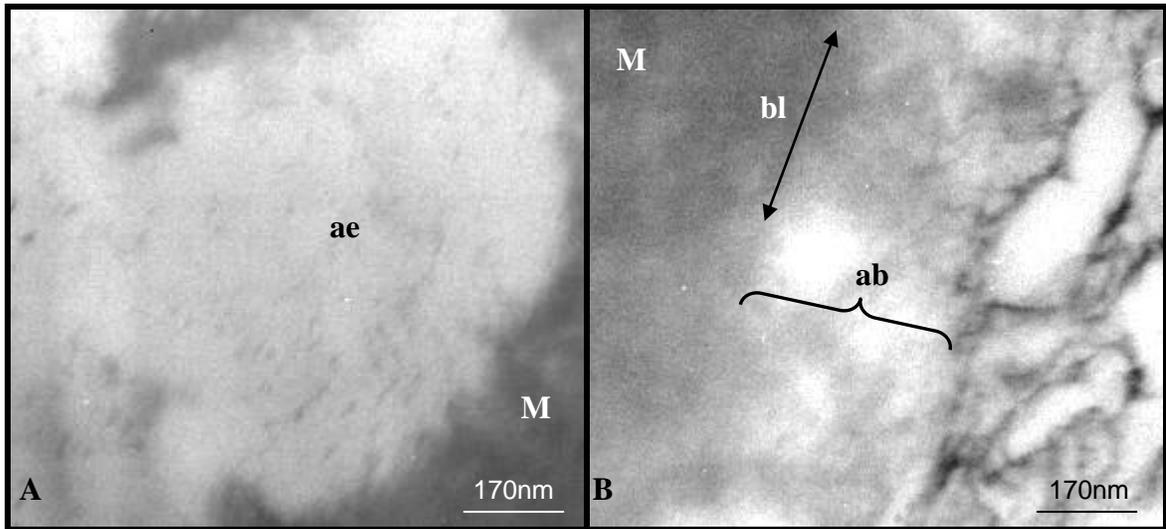


Figura 37: A) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) (zona más oscura a la derecha), en el cual no se observa reacción sobre su borde rugoso ni sobre la matriz de la aragonita esferulítica (ae) (zona más clara y con materia orgánica irregular a la izquierda), 50.000X. B) TEM de corte de concha de abalón rojo a nivel de la mesocapa (M) en el cual no se encontró reacción en su borde liso (bl) y en la matriz de la aragonita en bloques (ab), 50.000X.

DISCUSIÓN

La concha de abalón rojo, así como la de los moluscos en general, está compuesta por tres secciones macroscópicamente identificables en un corte transversal de ella: en su parte más externa, cubriendo por completo a la concha, se encuentra el periostraco, que es una estructura proteica; la sección intermedia corresponde a una gran capa o porción de calcita, y hacia el interior, en contacto con el manto, se ubica una gruesa capa o porción de aragonita (Zaremba *et al.*, 1996). A través de microscopía de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) fue posible reconocer cada una de estas zonas, e identificar la organización particular de la porción de aragonita y de sus componentes orgánico y mineral. Está formada por bandas orgánicas, las mesocapas, separadas por espacios ocupados por las tabletas de aragonita, las regiones de aragonita, cuyas tabletas a su vez están rodeadas y compuestas por matriz orgánica (Lin y Meyers, 2005).

Estudios realizados en variadas biocerámicas han demostrado la presencia de ciertas moléculas en la matriz orgánica de éstas. Los proteoglicanos han sido hallados en concha del picoroco (Fernández *et al.*, 2002), en las formaciones calcáreas de algunos corales, en gastrolitos y en estructuras óseas. Es por esto que no se puede descartar su presencia en la concha de abalón, y su posible participación en el proceso de mineralización y consecuente crecimiento de la concha, lo que estaría atribuido a sus moléculas sulfatadas y su contribución en el proceso de formación de los cristales de carbonato de calcio (Arias *et al.*, 2004). Además se han encontrado sulfatos en la matriz orgánica de la concha de otros moluscos (Nudelman *et al.*, 2006), por lo que estas moléculas sulfatadas contenidas en proteoglicanos podrían estar presentes en la concha del abalón.

Utilizando anticuerpos monoclonales específicos reconocidos por segundos anticuerpos marcados con esferas de poliestireno de 1 μm se determinó la presencia de dermatán sulfato, condroitín 4 sulfato, condroitín 6 sulfato y queratán sulfato a través de SEM. También se buscaron a través de TEM, en este caso se realizó la técnica de inmunoro y se usaron segundos anticuerpos marcados con esferas de oro de 10 nm. Todos los proteoglicanos fueron hallados en la matriz orgánica de la concha de abalón rojo, pero con una distribución diferente.

Dermatán sulfato y condroitín 4 sulfato se ubicaron tanto en la matriz interlaminar, o sea, en aquella que cubre a las tabletas, como en la intertabular que se encuentra entre tabletas, viéndose una mayor intensidad de condroitín 4 sulfato en la matriz intertabular. La reacción observada sobre la matriz interlaminar también puede deberse a una reacción sobre la matriz intracristalina, la cual es difícil distinguir a través de SEM, pero por medio de TEM sí es posible, y es así como corroboramos la presencia de dermatán sulfato y condroitín 4 sulfato en aquella matriz. A nivel de la mesocapa, en su cara lisa y rugosa se encontró dermatán sulfato, pero sólo en la cara lisa se halló condroitín 4 sulfato (aunque no se lograron obtener imágenes de esto) y también en la matriz de la aragonita en bloques adyacente.

Condroitín 6 sulfato fue hallado en la matriz intertabular e interlaminar, aunque a través de TEM se confirmó su presencia en la matriz intracristalina en mayor magnitud que en la matriz interlaminar o nanocapas. No se halló sobre la matriz que rodea a la aragonita esferulítica.

Queratán sulfato fue encontrado en la mesocapa, matriz interlaminar e intracristalina, en orden decreciente de intensidad, no así en la intertabular. También a nivel de la matriz que cubre a la aragonita esferulítica, y en la matriz de la aragonita en bloques, aunque en menor magnitud.

Los controles en ambas técnicas, SEM y TEM resultaron negativos para los resultados expuestos, por lo tanto se considera que existe una presencia y distribución particular de estos glicosaminoglicanos a través de la materia orgánica de la concha de este molusco, pero no se puede necesariamente descartar su existencia en algunos casos, debido a la ausencia de cortes que exhiban correctamente algunos sectores específicos de la concha, situación que se generó a causa de la manipulación de las muestras y a la desproteización parcial, factores que crearon zonas con diferente cantidad de matriz orgánica y mantención de la estructura. Sólo podemos descartar la presencia de condroitín 6 sulfato en la matriz de la aragonita esferulítica, y determinar variaciones en la intensidad de distribución de cada proteoglicano a lo largo de la concha, tal como se describió en el párrafo anterior.

El crecimiento de la concha ocurre en ondas sucesivas posterior a la aparición de la calcita y el periostraco, y se caracteriza por la aparición cíclica de las mesocapas entre

regiones de tabletas de aragonita (Su *et al.*, 2002; Lin y Meyers, 2005). Las primeras estructuras en generarse son la calcita y el periostraco. Probablemente la primera capa en crearse a partir del manto es una mesocapa orgánica, a modo de sustrato para las siguientes capas de tabletas de aragonita, tal como sucede en la concha de picoroco, en la que una lamela, formada por quitina y otras moléculas orgánicas, aparece en una primera fase para dar origen a la calcita (Fernández *et al.*, 2002). Sucede algo similar en el modelo de biomineralización de la cáscara de huevo de gallina, en la cual se genera en primer lugar las membranas de la cáscara formadas principalmente por colágeno tipo X actuando a modo de sustrato para el depósito de las mamilas o centros de nucleación que darán origen a la palisada calcítica (Arias y Fernández, 2001). Ya creada una región de aragonita aparece nuevamente otra mesocapa y así sucesivamente, tal como ocurre en la concha de picoroco, en la que hay alternancia entre lamelas y regiones de calcita (Fernández *et al.*, 2002).

Dentro de los componentes encontrados en la mesocapa se encuentra el queratán sulfato, el cual estaría involucrado en el proceso de biomineralización al participar en la nucleación de cristales de carbonato de calcio, tal como se ha visto en variadas biocerámicas, tales como concha de picoroco (Fernández *et al.*, 2002), urolitos (Escobar, 2006) y cáscara de huevo (Arias y Fernández, 2001). En la concha de abalón encontramos a este glicosaminoglicano principalmente localizado en la mesocapa, lo cual es concordante con lo anteriormente propuesto. También fue encontrado en otros sectores, con excepción de la matriz intertabular, cuya ausencia en esta zona no podemos confirmar plenamente, pero podríamos sospechar que no se halla aquí ya que esta situación sería concordante con el hecho de que en general el queratán sulfato se encuentra asociado a la quitina (Fernández *et al.*, 2002; Arias y Fernández, 2003b), y la matriz intertabular carece de ella, a diferencia de la matriz interlaminar y la mesocapa, en las cuales podemos confirmar la presencia de este proteoglicano.

Los otros proteoglicanos presentan distintas preponderancias en cada sector de la concha. Condroitín 6 sulfato se encontró mayormente asociado a la matriz intracristalina, es decir, a aquella contenida dentro de cada tableta de aragonita, y en la matriz interlaminar, y en menor medida en la intertabular y mesocapa. Esto también tiene cierta semejanza con la distribución que se da en la concha de picoroco, en la que este proteoglicano se ubica sólo entre las lamelas, entre los cristales de calcita (Fernández *et al.*, 2002). Dermatán sulfato y

Condroitín 4 sulfato también se ubican en estas zonas, sin mostrar grandes diferencias en la intensidad entre distintas zonas, pero siendo menor ésta sobre la mesocapa. En la cáscara de huevo se observa algo similar; la palisada, formada por columnas de calcita y matriz orgánica, contiene un proteoglicano llamado ovoglican, que está formado por dermatán sulfato y un tipo de condroitín no sulfatado. En cambio, en la estructura desde la cual se genera la palisada, vale decir, en las mamilas, que corresponden a los centros de nucleación, se encuentra el proteoglicano mamilán, formado por queratán sobresulfatado, encargado de ligar moléculas de calcio para la biomineralización y formación de la palisada (Arias y Fernández, 2001). Morfológicamente existe otra similitud en esta zona en particular. La mesocapa posee un lado liso y otro rugoso, el cual está en contacto con la aragonita esferulítica. Este tipo de aragonita es el primero en aparecer posterior a una mesocapa, la cual presenta a este nivel una serie de irregularidades dadas por concavidades y montículos, los cuales se asemejarían a las mamilas, para dar origen a los esferulitos y posteriormente a la aragonita en tabletas, en el huevo, a la palisada calcítica. Posterior a la aragonita en tabletas aparece en forma abrupta una capa de aragonita en bloques y una nueva mesocapa, lo que a su vez coincide con el cese la mineralización con el depósito de una capa de proteínas hidrofóbicas llamada cutícula en la cáscara de huevo (Arias y Fernández, 2001), cumpliendo una función semejante a la mesocapa.

Toda esta secuencia de eventos debe ocurrir mediada por una matriz orgánica, la cual está compuesta, entre otras moléculas, por proteoglicanos. De acuerdo a los resultados antes detallados, existe una distribución diferencial de estos glicosaminoglicanos en la región de aragonita y sus distintos elementos. Según aquello, la matriz interlaminar posee los proteoglicanos de dermatán sulfato, condroitín 4 sulfato, condroitín 6 sulfato y queratán sulfato, pudiendo tener todos alguna función en el proceso de ensamblaje de las tabletas de aragonita, hasta que se genera una capa de aragonita en bloques, en cuya matriz encontramos condroitín 4 sulfato y queratán sulfato. En este caso estos proteoglicanos estarían involucrados en el cambio de morfología de aragonita en tabletas a la forma en bloques, aunque probablemente condroitín 4 sulfato cumpla una función más importante. De esta manera se da paso a la mesocapa, la cual posee todos los proteoglicanos, aunque que el queratán se encontró en mayor cantidad al comparar su ubicación en otras regiones de la concha. A continuación se genera la aragonita esferulítica, con una matriz que

contiene sólo queratán sulfato, para dar origen consiguientemente a otra etapa de tabletas, como si éste proteoglicano estuviera involucrado significativamente en la nucleación de la aragonita esferulítica y de las tabletas de aragonita. Los otros proteoglicanos estarían influenciando, por lo tanto, la disposición y morfología de los cristales de aragonita, principalmente, determinando su presencia en la forma de tabletas o bloques.

Gracias a este estudio nos hemos acercado un poco más al entendimiento de la formación de la concha, al confirmar la presencia de estas particulares moléculas en la concha de este molusco y corroborar la existencia de una distribución desigual a través de las distintas estructuras de ella, revelando la intervención diferencial de estos proteoglicanos en la formación de la concha.

Resumiendo, el proceso de biomineralización ha conservado un patrón general dado por las moléculas involucradas, algunas de las cuales se conservan en todas las biocerámicas, y otras que irán variando dependiendo el tipo de organismo que la genere, las condiciones en las que se encuentra, el tipo de mineral a formarse ya sea aragonita, calcita o vaterita, el sustrato en el cual se crea, y una serie de factores que probablemente aún no conocemos.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. La concha de abalón rojo está constituida por tres estructuras macroscópicamente identificables: el periostraco, porción de calcita y porción de aragonita.
2. En la porción de aragonita existe una organización jerárquica dada por la alternancia de capas gruesas de materia orgánica (mesocapas), entre las cuales se genera otro tipo de orden determinado por pilas de tabletas ensambladas entre finas capas de matriz orgánica (matriz interlaminar e intertabular), a su vez que cada tableta posee un entramado orgánico entre sus cristales (matriz intracristalina).
3. En la matriz orgánica de la concha de abalón rojo se identificó la presencia de dermatán sulfato, condroitín 4 sulfato, condroitín 6 sulfato y queratán sulfato.
4. Estos proteoglicanos presentan ubicaciones diferentes en la región de aragonita de la concha: queratán sulfato se encuentra principalmente en la mesocapa orgánica, dermatán sulfato y condroitín 4 sulfato especialmente en la matriz interlaminar e intertabular, y condroitín 6 sulfato en la matriz intracristalina con mayor importancia., también en la interlaminar e intertabular. Condroitín 4 sulfato también se encontró en la matriz que cubre a la aragonita en bloques.
5. La nucleación de los cristales de aragonita estaría influenciada por queratán sulfato, debido a su ubicación principal en la mesocapa orgánica, estructura de aparición anterior a la aragonita. Queratán sulfato además estaría determinando la morfología esferulítica de la aragonita.
6. Los otros proteoglicanos también estarían involucrados ya sea funcionalmente o estructuralmente en el desarrollo de la concha, dada su distribución diferencial, influenciando posiblemente la morfología de los cristales de aragonita ya sea en la forma de tabletas o bloques.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Addadi, L.; Joester, D., Nudelman, F.; Weiner, S. 2006.** Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry European Journal*. 12: 980-987.
2. **Anderson, G. 2003.** Marine science lesson: Abalone. Biological Sciences Department, Santa Barbara City College. Santa Barbara, California, USA. [en línea] <<http://www.biosbcc.net/ocean/index.htm>> [consulta: abril, 2006]
3. **Arias, J.L.; Fernández, M.S. 2001.** Role of extracellular matrix molecules in shell formation and structure. *World's Poultry Science Association*. Vol. 57. pp. 349-357.
4. **Arias, J.L.; Fernández, M.S. 2003a.** Biomimetic processes through the study of mineralized shells. *Materials Characterization* 50: 189-195.
5. **Arias, J.L.; Fernández, M.S. 2003b.** Extracellular matrix and biomineralization. *Microsc. Microanal.* 9 (2): 1516-1517
6. **Arias, J.L.; Neira-Carrillo, A.; Arias, J.I.; Escobar, C.; Boderó, M.; David, M.; Fernández, M.S. 2004.** Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering. *Journal of Materials Chemistry*. 14: 2154-2160.
7. **Bauder, C. 2005.** Metridium Fields website. *Miscellaneous Monterrey Critters*. Colección fotográfica. [en línea] <<http://www.metridium.com/monterey/other/other.html>> [consulta: noviembre, 2007]
8. **Belcher, A.M.; Wu, X.H.; Christensen, R. J.; Hansma, P.K.; Stucky, G.D.; Morse, D. E. 1996.** Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* 381, 56 – 58. <<http://www.nature.com/nature/journal/v381/n6577/abs/381056a0.html>> [consulta: abril, 2007]
9. **Blank, S.; Arnoldi, M.; Khoshnavaz, S.; Treccani, L.; Kuntz, M.; Mann, K.; Grathwohl, G.; Fritz M. 2003.** The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *Journal of Microscopy* 212 (3), 280–291. <<http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1365-2818.2003.01263.x/abs/>> [consulta: mayo, 2007]

10. **Escobar, C. 2006.** Influencia de la matriz extracelular en procesos de mineralización patológica. Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp. 55-85.
11. **Fallu, R. 1991.** Abalone Farming. Fishing News Books. Omey Mead. Oxford OX2 0EL. England. 1: 1-5. 2: 6-9. 32: 177-182.
12. **Fernández, M.S.; Moya, A.; López, L.; Arias, J.L. 2001.** Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in egg shell formation. *Matrix Biol.* 19: 793-803.
13. **Fernández M.S.; Vergara, I.; Oyarzún, A.; Arias, J.I.; Rodríguez, R.; Wiff, J.P.; Fuenzalida, V.M.; Arias, J.L. 2002.** Extracellular matrix molecules involved in barnacle shell mineralization. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 724.* 50: 189-195.
14. **Haaker, P.L.; Henderson, K.C.; Parker, D.O. 1986.** California Abalone, Marine Resources Leaflet No. 11. State of California, The Resources Agency, Department of Fish and Game, Marine Resources Division, Long Beach, CA.
15. **Heinemann, F.; Treccani, L.; Fritz, M. 2006.** Abalone nacre insoluble induces growth of flat and oriented aragonite crystals. *Biochem Biophys Res Commun.* Epub. 6; 344(1):45-49.
16. **Heuer, A.H.; Fink, D.J.; Laraia, V.J.; Arias, J.L.; Calvert, P.D.; Kendall, K.; Messing, G.L.; Blackwell, J.; Rieke, P.C.; Thompson, D.H.; Weeler, A.P.; Veis, A.; Caplan, A.I. 1992.** Innovative materials processing strategies: A biometric approach. *Science.* 225: 1098-1105.
17. **Huaquín, L.G. 2002.** Guía de Características e Identificación de Moluscos de Importancia económica para Chile. Apunte del Curso “Moluscos de Importancia Económica”. Departamento de Ciencias Biológicas Animales. Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
18. **Imai, H.; Oaki, Y. 2007.** The hierarchical architecture of nacre and its mimetic materials. In: *Handbook of Biomineralization, Biomimetic and Bioinspired Chemistry.* Editado por Peter Behrens y Edmund Breuerlein. Ed. WILEY – VCH. 1: 89-107.

19. **Kono, M.; Hayashi, N.; Samata, T. 2000.** Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem Biophys Res Commun*, 269(1): 213-218(6) (resumen)
<<http://www.ingentaconnect.com/content/ap/rc/2000/00000269/00000001/art02274>> [consulta: mayo, 2007]
20. **Lin, A.; Meyers, M.A. 2005.** Growth and structure in abalone shell. *Materials Sciences & Engineering A*. 390: 24-41.
21. **Lin, A.Y.M.; Meyers, M.A.; Kenneth, S.V. 2006.** Mechanical properties and structure of *Strombus gigas*, *Tridacna gigas*, and *Haliotis rufescens* sea shells: A comparative study. *Material Science & Engineering C*. 26:1380 – 1389.
22. **Mann, K.; Weiss, I.M.; Sabine, A.; Gabius, H.; Fritz, M. 2000.** The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein Perlucin: Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity. *Eur. J. Biochem*. 267, 5257-5264.
<<http://content.febsjournal.org/cgi/content/full/267/16/5257>> [consulta: marzo, 2007]
23. **Marin, F.; Corstjens, P.; De Gaulejac, B.; De Vrind-De Jorge, E. 2000.** Mucins and molluscan calcification: Molecular characterization of Mucoperlin, a novel muin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna Nobilis* (Bivalvia, Pteriomorphia). Vol. 275, No. 27, pp. 20667–20675.
<<http://www.jbc.org/cgi/reprint/275/27/20667>> [consulta: mayo, 2007]
24. **Miyashita, T.; Takagi, R.; Okushima, M.; Nakano, S.; Miyamoto, H.; Nishikawa, E.; Matsushiro, A. 2000.** Complementary DNA cloning and characterization of Pearlin, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar Biotechnol (NY)*. 2(5):409-418. (resumen)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11246407&dopt=Abstract> [consulta: mayo, 2007]
25. **Morse, D.E.; Cariolou, M.A.; Stucky, G.D.; Zaremba, Ch.M.; Hansma, P.K. 1993.** Genetic coding in biomineralization of microlaminate composites. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 292(Biomolecular Materials), 59-67. (resumen)

<<http://chemport.cas.org/cgi-bin/sdcgi?APP=ftslink&action=reflink&origin=npng&version=1.0&coi=1:CAS:528:DyaK3sXlsFCitr0%3D&pissn=0028-0836&pyear=1996&md5=b502797a8101987830ea351b4e9c450b>>
[consulta: abril, 2007]

26. **Nudelman, F.; Gotliv, B.A.; Addadi, L.; Weiner, S. 2006.** Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic components underlying a single tablet in nacre. *Journal of Structural Biology*. 153: 176-187.
27. **Olguín, I.; Serviere, E.; Pérez, R.; Hernández, A.; Ramade, M. 2003.** Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería de abalón. *Biología, ecología, repoblación y cultivo del recurso*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), México. 6: 12-22.
<http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/resources/PDFContent/784/Abulon_Cadena_Productiva1.pdf> [consulta: abril, 2006]
28. **Price, R.J.; Tom, P.D. 1997.** *Seafood Products and Department of Food Science & Technology*, University of California, Davis, California, USA. [en línea]
<<http://seafood.ucdavis.edu/pubs/abalone.htm>> [consulta: abril, 2006]
29. **Robinson, C.; Shore, R.C.; Bonass, W.A.; Brookes, S.J.; Boteva, E.; Kirkham, J. 1998.** Identification of human caries lesions of enamel: The role of putative inhibitors of remineralization. *Caries Research*. 32: 193-199.
30. **Samata, T.; Hayashi, N.; Kono, M.; Hasegawa, K.; Horita, C.; Akera, S. 1999.** A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett*. 462(1-2):225-9. (resumen)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10580124&dopt=Abstract> [consulta: mayo, 2007]
31. **Schäffer, T.E.; Ionescu-Zanetti, C.; Proksch, R.; Fritz, M; Walters, D.A.; Almqvist, N.; Zaremba, Ch.M.; Belcher, A.M.; Smith, B.L.; Stucky, G.D.; Morse, D.E.; Hansma, PK. 1997.** Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? *Chem. Mater.*; 9(8); 1731-1740.

32. **Shen, X.; Belcher, A.M.; Hansma, P.K.; Stucky, G.D.; Morse, D.E. 1997.** Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* 272(51): 32472-32481.
<<http://www.jbc.org/cgi/content/full/272/51/32472>> [consulta: marzo, 2007]
33. **Su, X.; Belcher, A.M.; Zaremba, Ch.M.; Morse, D.E.; Stucky, G.D.; Heuer, A.H. 2002.** Structural and microstructural characterization of the growth lines and prismatic microarchitecture in red abalone shell and the microstructures of abalone "flat pearls". *Chem. Mater.*, 14 (7), 3106 -3117.
34. **Thompson, J.; Paloczi, G.; Kindt, J.H.; Michenfelder, M.; Smith, B.L.; Stucky, G.; Morse, D.E.; Hansma, P.K. 2000.** Direct observation of the transition from calcite to aragonite growth as induced by abalone shell. University of California Santa Barbara, California, USA. *Biophys J*, p. 3307-3312, Vol.79, No.6.
<<http://www.biophysj.org/cgi/content/full/79/6/3307>> [consulta: marzo, 2006]
35. **Treccani, L.; Mann, K.; Heinemann, F.; Fritz, M. 2006.** Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophys J.* 91:2601-2608. (resumen)
<<http://www.biophysj.org/cgi/content/abstract/91/7/2601>> [consulta: marzo, 2007]
36. **Walters, D.A.; Smith, B.L.; Belcher, A.M.; Paloczi, G.T.; Stucky, G.D.; Morse, D.E.; Hansma, P.K. 1997.** Modification of calcite crystal growth by abalone shell proteins: An atomic force microscope study. *Biophys J.* 72: 1425-1433.
37. **Weiss, I.M.; Kaufmann, S.; Mann, K.; Fritz, M. 2000.** Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem Biophys Res Commun.* 267(1):17-21. (resumen)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10623567&dopt=Abstract> [consulta: abril, 2007]
38. **Weiss, I.M.; Gohring, W.; Fritz, M.; Mann, K. 2001.** Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(2):244-9. (resumen)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10623567&dopt=Abstract> [consulta: mayo, 2007]

39. **Weiss, I.M.; Renner, C., Striegl, M.G.; Fritz, M. 2002.** A simple and reliable method for the determination and localization of chitin in abalone nacre. *Chem. Mater.*, 14 (8), 3252 -3259.

<<http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/cmaterx/2002/14/i08/abs/cm001217v.html>>
[consulta: abril, 2007]

40. **Wustman, B.A.; Weaver, J.C.; Morse, D.E.; Evans, J.S. 2003.** Structure-function studies of the Lustrin A polyelectrolyte domains, RKSY and D4. *Connective Tissue Research*. 44(Suppl. 1): 10–15.

<http://bimat.princeton.edu/assets/pdf/ucsb_03_44wustman.pdf> [consulta: marzo, 2007]

41. **Zaremba, C.M.; Belcher, A.M.; Fritz, M.; Li, Y.; Mann, S.; Hansma, P.K.; Morse, D.E.; Speck, J.S.; Stucky, G.D. 1996.** Critical transitions in the biofabrication of abalone shells and flat pearls. *Chem. Mater.*; 8(3); 679-690.