

**Estudio estructural y funcional de
perivitelinas de *Pomacea canaliculata*
(Lamarck, 1822) y *P. scalaris* (d'Orbigny, 1835)
(Architaenioglossa, Ampullariidae)**

Santiago Ituarte

TESIS | 2010

Dir. Horacio Heras
CoDir. Marcos S Dreón
FCNyM (UNLP)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP – CONICET CCT La Plata), bajo la dirección del Dr. Horacio Heras y la codirección del Dr. Marcos S. Dreon.

Las siguientes Instituciones financiaron parcialmente este trabajo: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; Universidad Nacional de La Plata; Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brasil.

Agradezco la colaboración de:

Horacio y Marcos.

RJ Pollero.

MV Cattani, desde allá.

Las 4 fantásticas: MY, Angelita, Aldana y Vicky.

MR Ceolín.

Dra. Sanchez de Rivas.

MF Silva.

CF Ituarte.

S Burela.

Agus.

Los demás integrantes del Lab 8bis: Mónica, Sabrina, Fernando.

Los demás integrantes del INIBIOLP.

A Flor y el pequeño.

INDICE

Lista de abreviaturas y símbolos	10
Resumen	12
Abstract	17
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1. Consideraciones generales	22
1.1. Los gasterópodos	22
1.2. Familia Ampullariidae	23
1.2.1. Origen y sistemática	25
1.2.2. Distribución antropogénica de especies de <i>Pomacea</i>	26
1.3. <i>Pomacea canaliculata</i>	27
1.3.1. Distribución geográfica, hábitat y variación genética y ecofenotípica	27
1.3.2. Alimentación	28
1.3.3. Reproducción	28
1.3.3.1. Apareamiento	29
1.3.3.2. Desove.....	29
2. Reservas nutricias del huevo en gasterópodos	30
2.1. Vitelogénesis	31
2.2. Síntesis de los componentes del vitelo	32
2.3. Fluido perivitelino	33
2.3.1. Componentes del perivitelo	34
2.3.2. Funciones particulares de las perivitelinas	35
3. Perivitelinas de <i>P. canaliculata</i>	36
3.1. Ovorubina (OR)	37
3.1.1. Composición y aspectos estructurales	37
3.2. PV2 y PV3	38
3.3. Biosíntesis de las perivitelinas	39
3.4. Funciones de las perivitelinas en el desarrollo embrionario	39
Objetivos	42
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Reactivos, drogas y solventes	45

2. Aislamiento y purificación de perivitelinas	45
2.1. Obtención de puestas	45
2.2. Preparación de fracción soluble de los huevos (citósol)	46
2.3. Aislamiento y purificación de perivitelinas	46
2.3.1. Ultracentrifugación en gradiente de densidad	46
2.3.2. Cromatografía líquida	47
3. Caracterización de las perivitelinas	47
3.1. Cuantificación proteica	47
3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	47
3.2.1. PAGE-Nativo	48
3.2.2. PAGE-SDS	48
3.2.3. Detección de proteínas en los geles	49
3.3. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y detección con anticuerpos policlonales (<i>western blot</i>)	49
3.3.1. Preparación de anticuerpos policlonales	49
3.3.2. Electro transferencia a membranas de nitrocelulosa	49
3.3.3. <i>Dot blot</i>	50
3.3.4. Incubación con anticuerpos policlonales	50
3.3.5. Detección por quimioluminiscencia	50
3.4. Secuencia N-terminal de escalarina	51
3.5. Detección de serinas fosforiladas	51
4. Caracterización lipídica	52
4.1. Lípidos totales	52
4.1.1. Extracción	52
4.1.2. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)	52
4.1.3. Cuantificación por TLC acoplada a detector de ionización de llama	53
4.2. Análisis de los carotenoides	54
4.2.1. Extracción	54
4.2.2. Análisis	54
5. Análisis de los carbohidratos de la escalarina	55
5.1. Composición	55
5.1.1. Contenido total de hexosas	55
5.1.2. Contenido de ácido siálico	55
5.1.3. Composición de monosacáridos	55
5.2. Análisis de oligosacáridos	57

5.2.1. Liberación y análisis de oligosacáridos O-ligados y N-ligados	57
5.2.2. Estudio de los patrones de glicosilación mediante afinidad de lectinas	58
5.3. Estudio de glicofomas	59
5.3.1. Deglicosilación enzimática	59
5.3.1.1. Deglicosilación con PNGase F	59
5.3.1.2. Sialidasa	60
5.3.2. Deglicosilación química	60
5.3.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)	61
6. Estabilidad estructural	62
6.1. Parámetros de estructura global de SC	63
6.1.1. Condiciones de medida	65
6.2. Efecto de la temperatura sobre la estructura de escalarina	65
6.3. Estabilidad de la SC y OR frente al pH	66
6.3.1. Preparación de las muestras	66
6.3.2. Medidas de espectroscopía de absorción	66
6.3.4. Medidas de emisión de fluorescencia	67
6.3.4.1. Condiciones de medida	67
6.3.5. Medidas de SAXS	68
7. Experimentos funcionales	68
7.1. Protección del componente carotenoides	68
7.2. Inhibición del crecimiento bacteriano	69
7.2.1. Cepas utilizadas	69
7.2.2. Medios de crecimiento utilizados	69
7.2.3. Ensayos en medio nutritivo sólido	70
7.2.4. Medio nutritivo líquido	70
7.2.5. Medio mínimo con leche para detección de actividad proteolítica	71
7.3. Resistencia a la proteólisis	71
7.3.1. Digestión con pepsina	71
7.3.2. Digestión con tripsina	72
7.3.3. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	72
 III. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PERIVITELINA DE <i>P. SCALARIS</i>	
Introducción	74
Resultados	75

1. Aislamiento y purificación de perivitelininas	76
2. Caracterización proteica de SC	78
3. Contenido de glúcidos	79
4. Lípidos	79
5. Caracterización de carotenoides	80
6. Dimensiones y forma de la escalarina	82
7. Reactividad cruzada con anticuerpos policlonales	83
Discusión	85

IV. CARACTERIZACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS DE OVORUBINA Y ESCALARINA

Introducción	90
Resultados	93
1. Composición de monosacáridos	93
2. Determinación del número y tipo de oligosacáridos presentes en SC	94
3. Patrón de glicosilación en SC	95
4. Deglicosilación enzimática de SC y OR	96
5. Deglicosilación química de OR y SC	97
6. Secuencias N-terminales de OR y SC	98
7. Puntos isoeléctricos de las subunidades de OR y SC	99
8. Detección de fosforilaciones	100
Discusión	101
Composición de monosacáridos y patrones de glicosilación en SC.....	101
Isoformas y fosforilación en OR y SC	103
Importancia de las modificaciones postraduccionales	104

V. ASPECTOS ESTRUCTURALES DE OVORUBINA Y ESCALARINA

Introducción	107
Resultados	108
1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad estructural de SC	108
2. Efectos del pH en la estructura de OR y SC	109
2.1. Espectroscopía de absorción	109
2.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia	110
2.3. SAXS	111
2.3.1. OR	111

2.3.2. SC	112
Discusión	114
Estabilidad térmica de SC	114
pH y estabilidad de OR y SC	115
VI. EXPERIMENTOS FUNCIONALES	
Introducción	119
Resultados	121
1. Rol de la SC en la protección de carotenoides	121
2. Rol de la OR en la Inhibición del crecimiento bacteriano	123
2.1. Ensayos en medio nutritivo sólido	123
2.2. Ensayos en medio nutritivo líquido	123
2.3. Ensayo de actividad proteolítica en medio pobre	124
3. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	125
Discusión	127
Rol de la SC en la protección de carotenoides	127
Rol de la OR en la inhibición del crecimiento bacteriano	129
Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	130
VII. CONCLUSIONES GENERALES	133
VIII. BIBLIOGRAFÍA	137

Lista de abreviaturas y símbolos

Å	Ångström [1 Å = 0,1 nm]
δ	Densidad
λ	Longitud de onda
2-DE	Electroforesis bidimensional
ABF	Azul de bromofenol
Asn	Asparagina
BSA	Albúmina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil) Dimetil-Amonio]-1-Propanosulfonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas
Fuc	Fucosa
GalNAc	N-acetil galactosamina
GC	Cromatografía gaseosa
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil glucosamina
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
Hyl	Hidroxilisina
Hyp	Hidroxiprolina
LB	Medio de Luria-Bertani
Man	Manosa
MRS	Medio de de Man, Rogosa y Sharpe
NB	Medio nutritivo (<i>nutrient broth</i>)
OR	Ovorubina
PAGE-nativo	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino con Tween-20
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PNGaseF	Peptide N-glicanase F (EC 3.5.1.52)

PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Rg	Radio de giro
SC	Escalarina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
Sias	Acidos siálicos
TFMS	Ácido trifluorometansulfónico
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina
Trp	Triptofano
u.a.	Unidades arbitrarias
Xil	Xilosa

RESUMEN

En el presente trabajo se buscó ampliar el conocimiento acerca de la biología reproductiva de los gasterópodos, estudiando las proteínas del perivitelo de dos especies de Ampullariidae: *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) y *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1835).

Los ampuláridos son gasterópodos dulceacuícolas de América, Islas del Caribe, África y Asia, alcanzando su mayor diversidad de especies en América del Sur; en nuestro país son integrantes característicos de la malacofauna continental. Esta familia presenta dos tipos de desoves: algunas especies desovan dentro del agua, adhiriendo masas gelatinosas de huevos a macrófitas u otros sustratos sumergidos. En la otra estrategia los desoves son realizados frecuentemente varios centímetros por encima del nivel del agua y los huevos se depositan en masas presentando una cáscara calcárea. La mayoría de estos huevos aéreos presentan una coloración muy llamativa y registran muy pocos casos de depredación en condiciones naturales. Al menos en una especie, *Pomacea paludosa* (Say, 1829), esta coloración se ha vinculado con la no palatabilidad de los huevos, y se ha sugerido que sería una coloración de advertencia (coloración aposemática).

La estrategia de oviposición aérea parece ser una sinapomorfía de las especies más derivadas de Ampullariidae, principalmente del llamado "grupo *Pomacea*"; las especies del Viejo Mundo y los grupos basales del Nuevo Mundo en cambio, retienen la oviposición dentro del agua o cerca de su superficie. Esta nueva estrategia de oviposición aérea podría representar un hecho clave en la evolución reciente de los Ampullariidae, cuyo carácter ventajoso desde el punto de vista selectivo queda puesto de manifiesto por el hecho de que los grupos derivados son los que incluyen mayor número de especies y exhiben una mayor distribución geográfica. Este cambio en la estrategia reproductiva fue acompañado de cambios anatómicos y fisiológicos en los adultos que les permitieron salir fuera del agua durante el desove, pero también debe haber incluido cambios drásticos en la bioquímica de los huevos para soportar las condiciones de insolación, desecación y

depredadores permitiendo así el desarrollo embrionario fuera del agua. Este tipo de adaptaciones bioquímicas han sido muy poco estudiadas.

Los huevos en esta familia, como en la mayoría de los gasterópodos, presentan un limitado contenido de vitelo, cuyas funciones son provistas por una envoltura secretada por la glándula del albumen de la hembra denominada fluido perivitelino (FPV) compuesto principalmente por polisacáridos y proteínas. Las proteínas del FPV, denominadas perivitelininas, eran consideradas tradicionalmente como reserva nutricia para el embrión, representando una fuente de aminoácidos que servirían eventualmente para sintetizar proteínas o como fuentes de energía. A medida que se ha avanzado en el conocimiento de las perivitelininas en un mayor número de especies, se ha encontrado que estas presentan múltiples funciones. Esto es, cumplen funciones biológicas específicas durante el desarrollo, antes de ser finalmente consumidas por el embrión. Las pocas perivitelininas que han sido estudiadas presentan funciones asociadas a factores de crecimiento, actividad antimicrobiana y actividad inhibitoria de proteasas.

La especie cuyas perivitelininas han sido más ampliamente estudiadas es *P. canaliculata*, una especie de estrategia de oviposición aérea. La principal perivitelinina en esta especie es la ovorubina (OR), una glicoproteína cuyo principal cofactor es el carotenoide astaxantina. Dentro de las funciones adicionales a su rol nutricional, la OR cumple las funciones de transportar y estabilizar las moléculas antioxidantes que serán utilizadas por el embrión, de otorgar coloración al huevo, que como dijimos sería una alarma aposemática, y al mismo tiempo de fotoproteger al embrión en sus primeras etapas de desarrollo. También se ha demostrado que la OR tiene la capacidad de inhibir serínproteasas, y dado que algunas de las proteasas inhibidas son de origen bacteriano y fúngico, se interpretó que esta perivitelinina cumpliría una función antimicrobiana en el huevo, aunque esto no fue nunca demostrado.

En el presente trabajo, se estudió el FPV de otra especie con la misma estrategia de oviposición, *P. scalaris*, ya que se desconocían las perivitelininas en otras especies de esta familia. También se avanzó en la caracterización estructural y funcional de la OR de *P. canaliculata*, explorando si presentaba actividad antimicrobiana, y

estudiándose su estabilidad en diferentes condiciones de pH y su susceptibilidad frente a proteasas.

Las perivitelinas de *P. scalaris* fueron aisladas mediante técnicas de ultracentrifugación y analizadas por electroforesis, observándose que el FPV de los huevos presentaba, dos perivitelinas principales, una HDL de 110 kDa y una caroteno-proteína de 380 kDa, altamente glicosilada, a la que se denominó escalarina (SC). Esta última es la proteína mayoritaria del FPV y fue purificada y caracterizada bioquímica y estructuralmente. Se determinó así que SC es un oligómero, con tres subunidades de 35,2, 28,2 y 24,3 kDa, tiene estructura globular y compacta, siendo una partícula anisométrica con un radio de giro (R_g) de 49 Å y una dimensión máxima de 200 Å determinado por dispersión de rayos-X a pequeño ángulo (SAXS). Presenta un cofactor el carotenoide que no resulta esencial para mantener la estructura cuaternaria, el que fue analizado por cromatografía en capa fina y espectrofotometría, determinándose la presencia mayoritaria de astaxantina. También se determinó que SC es una proteína con elevada proporción de carbohidratos (21 % p/p), mostrando la composición de los mismos un predominio de galactosa y manosa. También se determinó la presencia de fucosa (Fuc) y ácidos siálicos (Sias), lo que constituye la primera descripción de estos azúcares en Caenogastropoda. El patrón de glicosilación fue estudiado utilizando lectinas, resultando similar al ya descrito para la OR de *P. canaliculata*, con estructuras de oligomanosa e híbridas pero no complejas. Por medio de deglicosilaciones enzimáticas se pudo determinar que todas las subunidades de OR y SC presentan N-glicosilación y que los residuos de Sias son resistentes a la hidrólisis con sialidasa. Estudios de electroforesis bidimensional (2D-E) mostraron que las tres subunidades en ambas perivitelinas presentan múltiples isoformas con distintos puntos isoeléctricos (pI), los que son en parte debidos a la presencia de carbohidratos (probablemente Sias), lo que se confirmó por deglicosilación química. Esta última técnica también reveló que, en ambas perivitelinas, las tres subunidades previamente identificadas corresponden a tres polipéptidos con similar peso molecular (25 y 27 kDa para OR y SC respectivamente) y distinto pI. Se demostró por medio de anticuerpos policlonales la presencia de residuos de serinas

fosforilados, que seguramente contribuyen a esta multiplicidad de isoformas de pl. Es posible que algunas de estas modificaciones postraduccionales de OR y SC, especialmente Fuc, Sias y fosfatos, se relacionen con los procesos de captación y degradación por parte del embrión.

Se estudió la estabilidad de ambas perivitelinas en diferentes condiciones de pH, por medio de espectroscopía de absorción, de emisión de fluorescencia y SAXS, determinándose que tanto OR como SC son estables en un rango de pH más amplio que el del resto de las carotenoproteínas de invertebrados estudiadas hasta el momento. OR es estable entre pH 4.0 y 12.0 y SC entre pH 2.0 y 8.0. OR, si bien no resiste la incubación prolongada a pH 2.0 sin desnaturalizarse, es estable en estas condiciones por un lapso de al menos 2 h. También se determinó, por medio de SAXS, que, al igual que OR, la SC es una proteína termoestable, no sufriendo alteraciones en su estructura hasta los 80°C. La estabilidad estructural que presentan esas proteínas podría deberse a la elevada proporción de carbohidratos que poseen.

Se demostró que ambas perivitelinas presentan importantes diferencias bioquímicas y estructurales con las demás carotenoproteínas de invertebrados estudiadas hasta el momento, a pesar de poseer un cofactor carotenoide. Más aún, se determinaron las secuencias N-terminales de OR y SC observándose que si bien presentan un importante grado de homología entre ellas, no mostraban homología de secuencia con otras carotenoproteínas. Teniendo en cuenta la estrecha relación estructura-función que existe en las proteínas, estas diferencias estructurales y de estabilidad sugerían que ambas perivitelinas cumplen funciones diferentes a las de otras carotenoproteínas de invertebrados.

Para comenzar a caracterizar funcionalmente la SC, se estudió el efecto protector de ésta sobre su cofactor carotenoide. Se observó que el carotenoide unido a la SC es protegido de la degradación oxidativa por la luz, oxígeno y temperatura, al igual que fue demostrado para la OR. Por esto se especula que una de las funciones de la SC es estabilizar los carotenoides en el FPV, para que puedan ser utilizados por el embrión, además de protegerlo de la radiación y de brindar coloración de alarma al huevo.

Por otro lado, se continuó la caracterización funcional de OR determinándose si, como había sido sugerido, su actividad inhibitoria de serínproteasas se vincula a un rol

antimicrobiano. Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano, exponiendo bacterias gram + y gram – a diferentes concentraciones de OR, en medio líquido y sólido, determinándose que esta proteína carece de actividad antibacteriana. Asimismo se demostró que OR no puede inhibir la proteólisis por parte de *Bacillus subtilis in vivo*, con lo cual se descartó la hipótesis de que la capacidad antiproteasa de OR sería un mecanismo de protección antibacteriana del huevo.

Se encontró que ambas perivitelininas son estables en un amplio rango de pH, por lo que se decidió evaluar si eran resistentes al tracto digestivo. Así, mediante ensayos de digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, se observó que tanto OR como SC resisten la incubación secuencial primero con pepsina (2 h) y luego con tripsina (2 h), con mínima degradación. Teniendo en cuenta estos resultados, los antecedentes de la OR como inhibidor de proteasas, y la función ampliamente estudiada para los inhibidores de proteasas presentes en tejidos vegetales, se especula que estas perivitelininas podrían representar una defensa antinutritiva para los embriones, si bien esta especulación requiere una validación experimental *in vivo*.

En síntesis se ha puesto en evidencia que estas perivitelininas, además de su rol nutricional, forman parte de las adaptaciones bioquímicas para hacer frente a las condiciones estresantes a las que se ven expuestos los deoves durante el desarrollo. Por un lado, los carotenoides que transportan y protegen de la fotodegradación son antioxidantes esenciales, pero además dotan al huevo de una coloración aposemática, que advierte de la presencia de defensas. Estas defensas incluirían sustancias no palatables aún no identificadas, así como perivitelininas neurotóxicas y posiblemente perivitelininas con acción antinutritiva, que actuando en combinación explicarían la virtual ausencia de depredadores de los desoves de *Pomacea*.

ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to the knowledge of the reproductive biology of gastropods, studying the perivitellins of two ampularids, *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) and *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1835).

Ampularid snails inhabit South and Central America, southern North America, the Caribbean Africa and Asia. The family has two oviposition strategies: Some genera (e.g. *Marisa*, *Asolene* and *Lanistes*) deposit aquatic egg masses, which are adhered to submerged vegetation or other substrata, while others have aerial oviposition, where calcareous egg masses are cemented to vegetation or rocks, usually many centimeters above the water line. Although in most cases aerial egg masses are conspicuous brightly red or green colored, predation of the eggs has seldom been observed. In *Pomacea paludosa* (Say, 1829), the egg clutches are unpalatable, and it has been suggested that their reddish coloration would represent an aposematic signal.

This aerial oviposition strategy seems to be a synapomorphy of the most derived groups of Ampullariidae, mostly the species of the “*Pomacea*” group; Old World and basal New World taxa of this family retain aquatic eggs. This shift to aerial oviposition was probably a key event of Ampullariidae evolution, since the derived taxa are the most speciose and widely distributed. Adults have developed noteworthy anatomical and physiological adaptations to leave the water during oviposition. Similarly, eggs must have acquired new features in their biochemistry to withstand the harsh environment of aerial development. These biochemical adaptations have been scarcely studied.

The eggs in this family, as in many gastropods, contain a limited amount of vitellus, instead, they are provided with a perivitelline fluid (PVF) secreted by the female albumen gland, composed of polysaccharides and glycoproteins. These proteins, named perivitellins, were previously considered as a nutritional source only, in recent years however, other specific functions, additional to de nourishing role, were reported. Among these functions are growth factors, antimicrobial enzymes, agglutinins, neurotoxins and protease inhibitors.

The gastropod species whose perivitellins were most studied is *Pomacea canaliculata*, an aerial egg laying ampullarid. The main perivitellin in this species is ovorubin (OR), a carotene-lipo-glycoprotein which carries the carotenoid astaxanthin. Aside from its nutritional role, OR is involved in carotenoid transport and stabilization. These carotenoids are essential antioxidants for the embryo and also provide the egg with the aposematic coloration. It has also been reported that OR is a serin protease inhibitor, a property which has been related to antimicrobial protection of the eggs, but without experimental confirmation.

In this work the PVF of another aerial egg-laying *Pomacea* species, *Pomacea scalaris*, was studied to enlarge our knowledge on the perivitellins of other ampullarids, currently unknown. Also, OR structure and functions were further characterized, exploring its putative antimicrobial role, its structural stability against pH and resistance against digestive proteases.

Pomacea scalaris perivitellins were isolated by gradient ultracentrifugation, and two main proteins were found: a 110 kDa HDL and a 380 kDa highly glycosylated carotenoprotein, which was named scalarin (SC). This perivitellin is the major egg protein, and was further purified by exclusion chromatography, and biochemically and structurally characterized. SC is an oligomeric protein consisting of three subunits of 35.2, 28.2 y 24.3 kDa, with a gyration radius (R_g) of 49 Å as determined by small angle x-ray scattering (SAXS). SC has a carotenoid cofactor which is not essential to maintain the oligomeric structure. Carotenoids were extracted and further characterized by thin layer chromatography and spectrophotometry. It is mainly composed by astaxanthin, and minor amounts of another carotenoid not identified.

The carbohydrate moiety of SC, which accounts for 21% w/w of the perivitellin, was characterized and compared with that of OR. SC contains N and O-glycans which are similar to those of OR in composition and glycosylation patterns, as revealed by gas chromatography and lectin affinity analysis. The presence of fucose (Fuc) and sialic acids (Sias) was also determined for both perivitellins, constituting the first report of these sugars in Caenogastropoda. Enzymatic deglycosylation showed that all three subunits of both OR and SC bear carbohydrates, and that their Sias are resistant to digestion with sialidase. Bi-dimensional electrophoresis (2D-E) showed that all

subunits have many isoforms with different isoelectric point (iP), which are probably due to the presence of differential sialylation, as determined by complete chemical deglycosylation. This analysis also showed that the 3 subunits in both perivitellins correspond to 3 polypeptides of similar molecular weight (25 and 27 kDa for OR and SC, respectively) but different iP. The presence of phosphorylated serine residues was determined with polyclonal antibodies, which may also contribute to the iP isoforms above mentioned. Some of these postranlational modifications, especially Fuc, Sias and phosphoserines, could be implicated in the uptake and processing of the perivitellins by the embryo.

The effect of pH on the structural stability of OR and SC was studied by absorbance and fluorescence spectroscopy and by SAXS. Both perivitellins were stable in a pH range which was wider than those of all other invertebrate carotenoproteins. OR was stable between pH 4.0 and 12.0, although it withstand pH 2.5 for 2 h. SC was stable between pH 2.0 and 8.0. The thermostability of SC was studied by SAXS finding that this perivitellin is stable up to 80°C, similarly to what was reported for OR. The remarkable structural stability found in these two proteins is probably related to their high carbohydrate content.

These studies showed that although OR and SC posses a carotenoid cofactor, they clearly differ biochemically and structurally from all other invertebrate carotenoproteins. Moreover, N-terminal sequences were similar between both perivitellins but BLASTP analysis revealed no sequence homology with any other carotenoprotein.

In an initial functional characterization of SC, it was determined that this perivitellin protects its carotenoid cofactor from degradation by light and oxygen. This indicates that, similarly to OR, one of SC functions is to protect carotenoids in the PVF to provide embryos with a source of antioxidant molecules during embryogenesis, besides its role in providing eggs with a warning colouration.

The properties of OR were further studied focusing in its serin protease inhibitor activity. First we tested if it was related to a bactericidal activity, as it had been suggested. Incubations of OR with gram – and gram + bacteria in liquid and solid media showed that this perivitellin lacks antimicrobial activity. Furthermore, it was shown that despite its protease inhibitor activity, OR is unable to inhibit proteolysis

in *Bacillus subtilis in vivo*. This result provided experimental evidence that OR protease inhibitor activity has a different target.

Considering that both perivitellins were stable in a wide pH range, their resistance to proteases was explored in a simulated gastrointestinal digestion. It was found that both OR and SC were resistant to sequential proteolysis by pepsin (for 2 h at pH 2.5) and trypsin (2 h at pH 8.0). These results, together with the serin protease inhibition activity of OR, led to the hypothesis that these perivitellins could represent an antinutritive defense system in the eggs, as it has been thoroughly described for protease inhibitors in plant defenses against predators. This hypothesis however awaits *in vivo* experimental support.

The perivitellins of *Pomacea*, in addition to their nutritional role, are emerging as multifunctional proteins involved in the biochemical adaptations to cope with the harsh conditions imposed by the aerial egg development. They transport and protect from oxidation carotenoids that provide embryos with antioxidant compounds, and are a sort of sunscreen while in PVF to protect embryos from direct radiation. At the same time they provide the eggs with an aposematic coloration which warns that they are defended. These chemical defenses are composed by still unidentified unpalatable compounds, neurotoxic perivitellins and, possibly, antinutritive perivitellins, which combined explain the lack of natural predators of eggs.

I.

Introducción general

1. Consideraciones generales

1.1. Los gasterópodos

Los gasterópodos son el grupo de moluscos más diverso; se han descrito unas 40.000 especies vivientes, lo que representa aproximadamente el 80 % del total de especies del *Phylum*. La mayoría de las formas son marinas, aunque han colonizado los ambientes dulceacuícola y terrestres en varias ocasiones a lo largo de su historia evolutiva.

Se trata de moluscos cuya simetría bilateral está enmascarada por dos procesos que tienen lugar en la ontogenia temprana, la torsión y el espiralamiento de la masa visceral. Presentan una conchilla calcárea univalva, espiralada, en la que el cuerpo puede retraerse completamente, aunque muchas formas han sufrido reducción o pérdida de la misma. El proceso de torsión determina que la masa visceral y el manto roten 180° en sentido contrario a las agujas del reloj, por lo que la cavidad paleal queda hacia adelante o, en algunos casos a la derecha. En la evolución de algunos gasterópodos este proceso se ha revertido parcial o totalmente. El pie se encuentra bien desarrollado y es la estructura locomotora principal en la mayoría de las especies. La cabeza puede presentar estructuras sensoriales como tentáculos, ojos y estatocistos. Generalmente presentan rádula, una estructura quitinosa dentada desarrollada en dependencias del piso de la faringe, de estructura muy variable, que es utilizada en la alimentación para el raspado o desgarrado del alimento. El manto forma una cavidad que aloja las branquias y donde abren los sistemas digestivo, excretor y en algunos casos el reproductor. El borde del manto puede proyectarse y formar un sifón inhalante y en ocasiones uno exhalante. Las branquias pueden perderse y esta cavidad modificarse en una estructura para el intercambio de gases a modo de pulmón. En cuanto a la reproducción, los gasterópodos presentan una notable diversidad, tanto en lo que a la expresión de la sexualidad se refiere (se conocen especies gonocóricas, hermafroditas y aún casos en que la partenogénesis es el modo reproductivo habitual), como a modos de fecundación, la cual puede ser externa (común en

algunos Vetigastropoda) o interna (en la mayoría de los Caenogastropoda, Opisthobranchia y Pulmonata).

Este taxón estructuralmente tan diverso era dividido tradicionalmente en tres clases:

- **“Prosobranchia”**, que incluía la mayoría de las especies, con conchillas espiraladas o pateliformes, generalmente con opérculo. Comprendía tres órdenes, Archaeogastropoda, Mesogastropoda y Neogastropoda.
- **Opisthobranchia**, incluye formas principalmente marinas, con diverso grado de detorsión y reducción parcial o total de la conchilla, de las branquias, y la cavidad paleal.
- **Pulmonata** incluye especies principalmente terrestres o dulceacuícolas, que presentan reducción de las branquias y cavidad paleal modificada en un pulmón.

Esta clasificación resulta actualmente inaceptable debido a que, según análisis filogenéticos recientes, “Prosobranchia” no es un grupo monofilético. Se ha propuesto integrar Mesogastropoda y Neogastropoda en un clado: Caenogastropoda, y la mayoría de los Archaeogastropoda se incluyen en Vetigastropoda (Ponder & Lindberg, 1997).

En Argentina se han citado 101 especies de gasterópodos de agua dulce, siendo las familias más representativas de Caenogastropoda: Ampullariidae, Hydrobiidae y Thiaridae y de Pulmonata: Ancyliidae y Chiliniidae (Cuezzo, 2009). Teniendo en cuenta que las especies estudiadas en este trabajo de Tesis pertenecen a la familia Ampullariidae, se detallan a continuación sus características.

1.2. Familia Ampullariidae

Los ampuláridos son gasterópodos dulceacuícolas de América, Islas del Caribe, África y Asia, alcanzando su mayor diversidad de especies en América del Sur.

Comprenden nueve géneros con más de 150 especies nominales (Hayes *et al.*, 2009b) distribuidos en el Viejo Mundo: *Afropomus* Pilsbry & Bequaert, 1927, *Saulea* Gray, 1867 y *Lanistes* Montfort, 1810 en África; *Pila* Röding, 1798 en África y Asia (India); y en América del Sur: *Felipponea* Dall, 1919, *Pomacea* Perry, 1810, *Marisa* Gray, 1824, *Pomella* Gray, 1847 y *Asolene* d'Orbigny, 1838.

Las especies de esta familia presentan conchilla umbilicada y globosa, salvo en el género *Marisa* cuya conchilla es planispiral, con abertura holostomada y opérculo córneo. La región cefálica presenta palpos labiales y tentáculos largos en cuya base se ubican los ojos. La cavidad paleal presenta branquias, y está en parte vascularizada y modificada cumpliendo funciones de pulmón, lo que les permite la respiración aérea. El lóbulo cefálico del manto puede proyectarse y enrollarse, en mayor o menor grado según el género, formando un sifón que utilizan para ventilar el pulmón (Fig. I.1.A). La capacidad para respirar aire les permite a algunas especies realizar excursiones breves fuera del agua, e incluso en algunos casos sobrevivir períodos de sequía enterrados en el barro, o prosperar en cuerpos de aguas con baja tensión de oxígeno (Seuffert & Martín, 2008).

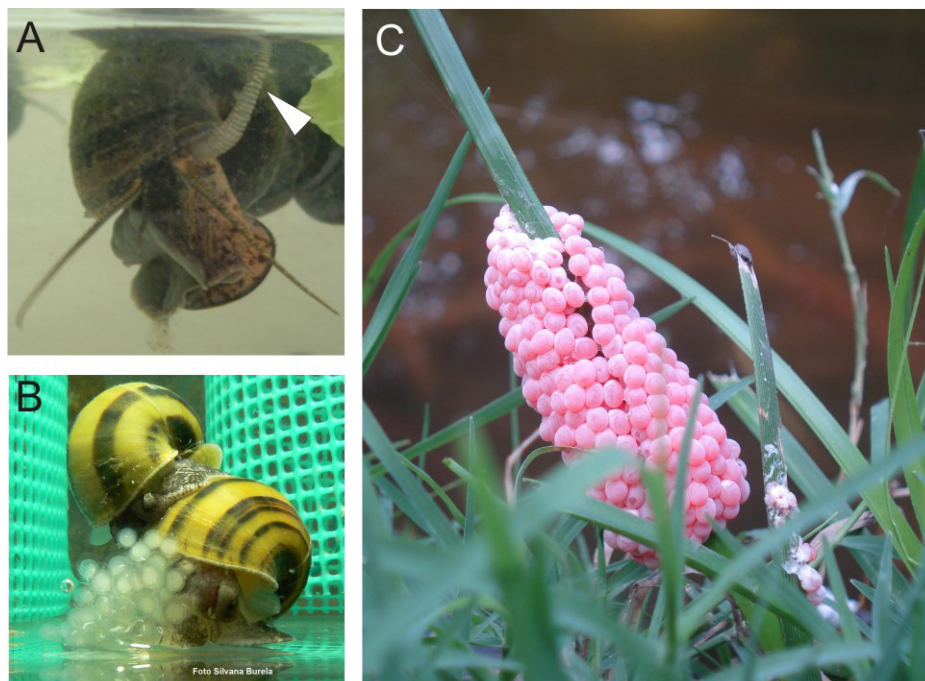


Figura I.1. A, ejemplar de *Pomacea scalaris* mostrando el sifón (punta de flecha); B, Puestas acuáticas (*Asolene* sp), C, puestas aéreas (*P. canaliculata*). B, reproducida con permiso de la autora.

Son organismos dioicos, de fecundación interna y desarrollo directo, que presentan dos tipos de desoves. *Marisa*, *Asolene* y *Lanistes* desovan dentro del agua, adhiriendo masas gelatinosas de huevos a macrófitas u otros sustratos sumergidos (Fig. I.1.B), aunque en el caso de *Marisa planogyra* Pilsbry, 1933, estas masas quedan cerca de la superficie (Hayes *et al.*, 2009b). El resto de los géneros realizan desoves fuera del agua; en estos casos, los huevos presentan una cáscara calcárea, son coloreados y se depositan en masas, a veces, varios centímetros por encima del nivel del agua (Fig. I.1.C), aunque en el caso de *Pomacea urceus* (Müller, 1774), los huevos son incoloros y son depositados en el barro e incubados por la hembra (Estebenet & Cazzaniga, 1993), y en *Pila conica* (Wood, 1828), también son blancos y se depositan sobre vegetación emergente pero cerca de la superficie (Hayes *et al.*, 2009b).

1.2.1. Origen y sistemática

La familia Ampullariidae se habría originado hace 150 millones de años en la porción del supercontinente Gondwana que actualmente corresponde a África. Según las hipótesis biogeográficas actuales, a partir del ancestro ampulárido común se habrían separado dos linajes, uno que originaría a *Afropomus* y otro al resto de los géneros (Hayes *et al.*, 2009b). Este segundo linaje daría lugar por un lado a las restantes formas del Viejo Mundo y al ancestro de los géneros neotropicales, los que se habrían diversificado sólo poco después de la separación de Sudamérica de Gondwana, hace unos 130 millones de años. Aunque las relaciones filogenéticas dentro de Ampullariidae no están resueltas por completo, es claro que tanto los linajes del Viejo Mundo como los del Nuevo Mundo conforman grupos monofiléticos (Hayes *et al.*, 2009a). La sistemática, y consecuentemente las filogenias, de los ampuláridos neotropicales son sumamente confusas, debido a que gran parte de sus descripciones específicas se basaron exclusivamente en la morfología de la conchilla, un carácter particularmente variable en algunas especies (Cazzaniga, 2002). Los análisis de Hayes *et al.* (2009a), que se basan principalmente en información de secuencias de ADN de 26 especies, evidencian la necesidad de revisiones sistemáticas de esta familia, sus resultados no sustentan la monofilia de los géneros *Marisa* y *Pomacea*.

1.2.2. Distribución antropogénica de especies de *Pomacea*

Algunas especies sudamericanas de esta familia son consideradas moluscos invasores. En la década del '80, ejemplares de *P. canaliculata*, *Pomacea insularum* (d'Orbigny, 1835), *Pomacea diffusa* Blume, 1957 y *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1835), fueron introducidas desde Argentina y Brasil en Taiwan, y desde ese país en Japón, China y otros países del sudeste asiático para ser cultivadas con fines alimenticios (Hayes *et al.*, 2008). Con el tiempo, las especies introducidas en aquellas áreas colonizaron ambientes naturales y campos de cultivo de arroz, ñame y taro, convirtiéndose en especies perjudiciales, lo que causó importantes pérdidas económicas (Mochida, 1991). Por otro lado, *P. canaliculata* resultó ser un hospedador intermediario adecuado para *Parangiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda, Angiostrongylidae), y se ha correlacionado la expansión de dicho nematode, y consecuentemente de la meningoencefalitis eosinofílica (el parásito es la causa infecciosa más frecuente de esta dolencia en el ser humano), con la expansión del gasterópodo a lo largo del territorio chino y su uso como alimento en muchas poblaciones (Lv *et al.*, 2009).

Algunas introducciones de ampuláridos sudamericanos también fueron detectadas en Estados Unidos, Hawaii, Papúa Nueva Guinea y República Dominicana, probablemente asociadas al intercambio entre criadores de especies de acuario (Rawlings *et al.*, 2007). En estos casos el impacto económico ha sido nulo, pero, al igual que en Asia, los individuos que colonizaron cuerpos de agua naturales pueden causar alteraciones en la dinámica a nivel de ecosistema en estos ambientes. En este sentido, se ha observado en cuerpos de agua del Sudeste asiático que *P. canaliculata*, al reducir las comunidades de macrófitas, produjo cambios en el flujo de nutrientes como el fósforo, provocando a su vez un cambio en los productores primarios de macrófitas a fitoplancton (Carlsson *et al.*, 2004). También ha desplazado poblaciones de ampuláridos autóctonos, como *P. diffusa* en Estados Unidos (Rawlings *et al.*, 2007), y de otros gasterópodos, lo que en algunos casos, como el de planórbidos, ha sido utilizado con fines sanitarios en ensayos de control biológico de estos vectores de la esquistosomiasis (Pointier & Jourdane, 2000).

1.3. *Pomacea canaliculata*

1.3.1. Distribución geográfica, hábitat y variación genética y ecofenotípica.

Pomacea canaliculata es la especie más característica del grupo en Argentina, y sobre la que se han realizado más estudios acerca de su biología (Cuezzo, 2009). Se encuentra en las cuencas Amazónica y del Plata, desde el norte de Brasil hasta el paralelo 38° en el sur de la Provincia de Buenos Aires en Argentina, siendo la discontinuidad hidrológica el factor limitante de su distribución (Martín *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2008). Habita ambientes lénticos, aunque también es frecuente en arroyos de corriente lenta, preferentemente de aguas turbias y con presencia de macrófitas (Martín *et al.*, 2001).

En las zonas tropicales de su distribución *P. canaliculata* posee un ciclo de vida corto, siendo activa durante todo el año, y presentando una tasa de crecimiento y edad de madurez mayores que en latitudes más altas (Estebenet & Martín, 2002). En climas templados, *P. canaliculata* exhibe un período de inactividad durante la época de otoño-invierno, habiéndose demostrado experimentalmente que la temperatura es el factor determinante de esta alternancia de periodos de actividad/inactividad, regulando también el ciclo reproductivo (Estebenet & Cazzaniga, 1992; Albrecht *et al.*, 1999; 2004). *P. canaliculata* exhibe una gran variabilidad interpoblacional en varios aspectos, como la talla máxima, morfología y solidez de la conchilla, tasa de crecimiento, edad de madurez y longevidad, tamaño y número de huevos por puesta. Gran parte de la variabilidad de tallas puede ser revertida experimentalmente, demostrando que la misma no se debe a diferencias genéticas sino principalmente a variación ecofenotípica (Martín & Estebenet, 2002). Sin embargo, al menos parte de la variación observada en la tasa de crecimiento y la supervivencia parece ser el resultado de estrategias adaptativas; así, aún en condiciones homogéneas de laboratorio, individuos provenientes de ambientes inestables, como arroyos de poco caudal y con poca disponibilidad de alimento, tienden a alcanzar la madurez reproductiva más rápidamente y producir mayor cantidad de huevos que los individuos provenientes de ambientes más favorables o estables (Martín & Estebenet, 2002).

1.3.2. Alimentación

P. canaliculata es una especie polífaga, su dieta primaria consiste en macrófitas, aunque también se alimenta de perifiton, partículas en suspensión e incluso animales moribundos y carroña, mostrando una variedad de mecanismos de alimentación (Cazzaniga & Estebenet, 1984). Del tubo digestivo se ha aislado mRNA correspondiente a dos celulasas multifuncionales (de la familia GFH10), habiéndose confirmado la presencia de los genes correspondientes en el DNA genómico, uno de los pocos ejemplos de celulasas en el reino animal (Imjongjirak *et al.*, 2008). En “*Ampullaria crosseana*” (tal vez se trata de *Ampullaria crosseana* Hidalgo, 1871 [= *Pomacea urceus* (Müller, 1774) según Cowie & Thiengo (2003)] aunque los autores no incluyen figuras ni refieren material *voucher*), se habrían encontrado celulasas multifuncionales (Li *et al.*, 2005), engrosando así la lista de moluscos, e invertebrados, con capacidad propia de digerir celulosa (Davison & Blaxter, 2005). La disponibilidad de alimento impone habitualmente restricciones en la historia de vida de los organismos, esta especie sin embargo, muestra notable plasticidad para adaptarse a diferente disponibilidad de recursos, pudiendo completar su ciclo vital incluso con sólo el 20 % del alimento teóricamente requerido (Tamburi & Martín, 2009).

1.3.3. Reproducción

El ciclo reproductivo de *P. canaliculata* está en gran medida determinado por la temperatura. En climas tropicales, presenta un único período reproductivo en su ciclo de vida (condición semélpara) asociado a una actividad reproductiva constante a lo largo del año y a un ciclo vital corto, 14 meses en laboratorio (Estebenet & Cazzaniga, 1992). En climas templados, como en nuestro país, el ciclo de vida es más largo, hasta 4 años, el ciclo reproductivo comprende varios momentos reproductivos (condición iterópara), alternando periodos reproductivos en los meses de primavera y verano, con períodos de inactividad durante los meses fríos del año (Estebenet & Cazzaniga, 1992; Albrecht *et al.*, 2004). La edad de primera madurez sexual tiene lugar al alcanzar una talla de alrededor de 25-40 mm, que se alcanza a los 7 meses de vida en hábitats tropicales, o entre 13 y 25 meses en climas templados, en el límite sur de distribución (Estebenet & Cazzaniga, 1992).

1.3.3.1. Apareamiento

El apareamiento ocurre dentro del agua y es precedido por una serie de comportamientos de cortejo mediante los cuales ocurriría un reconocimiento y elección de la pareja (Burela & Martín, 2009). La cópula es muy extensa, con una duración promedio de 13 h, incluyendo frecuentemente un proceso de alimentación nupcial en que el macho produce una secreción que es consumida por la hembra, lo que probablemente la estimula a permanecer en cópula durante más tiempo, asegurando así una mayor transferencia de esperma y eventualmente, evitando la polispermia (Burela & Martín, 2007). El esperma es almacenado en el receptáculo seminal de la hembra, y puede permanecer viable hasta 140 días, incluso desde una temporada reproductiva a la siguiente (Estebenet & Cazzaniga, 1993).

1.3.3.2. Desove

El desove se realiza fuera del agua, depositando masas de alrededor de 200 huevos de color rosa intenso sobre tallos (Fig.I.1.C), diversos sustratos emergentes, o directamente sobre la vegetación de la orilla. La matriz que integra las masas se solidifica al cabo de cierto tiempo, y la puesta queda fuertemente adherida al sustrato a una altura de entre 1 y 35 cm sobre la superficie del agua. El desarrollo embrionario dura entre 7 y 28 días dependiendo de la temperatura, al cabo de los cuales los juveniles rompen la cáscara del huevo, que se ha adelgazado durante el desarrollo, y caen directamente al agua (D'Orbigny, 1846; Hylton Scott, 1957). A diferencia de los adultos, los juveniles no pueden sobrevivir fuera del agua por un periodo mayor a cuatro días (Pizani *et al.*, 2005).

Esta estrategia de oviposición es poco frecuente en organismos acuáticos, ya que si bien evitaría los depredadores acuáticos y la posible baja tensión de oxígeno del agua, los huevos quedan expuestos a condiciones de deshidratación, insolación y a depredadores terrestres para lo cual deben necesariamente poseer adaptaciones ecofisiológicas. Los huevos poseen una cáscara calcárea a través de la que sólo intercambian gases con el ambiente, son cleidoicos verdaderos, y están adaptados al desarrollo aéreo, soportando la inmersión sólo por algunos días luego de los cuales la tasa de eclosión disminuye marcadamente (Pizani *et al.*, 2005).

Aún cuando las puestas de esta especie son muy llamativas por su coloración y grado de exhibición, sólo en Filipinas se ha registrado un depredador natural, la hormiga *Solenopsis geminata* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Formicidae), una especie también introducida por el hombre en esa región (Yusa, 2001). Existen pocos registros de depredadores de las puestas en otras especies de *Pomacea* (por ejemplo: Guimarães, 1981), debido posiblemente a que estos casos sean esporádicos. Snyder & Snyder (1971) no encontraron depredadores naturales de puestas de *Pomacea paludosa* (Say, 1829), y sólo bajo condiciones forzadas de cautiverio son aceptados por *Crax globulosa* Spix, 1825 (Aves, Cracidae), renacuajos, *Dineutes* sp. (Coleoptera, Gyrinidae) y ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhaut, 1769). La gran mayoría de peces, aves y hasta mamíferos omnívoros como mapaches, los evitan luego de haberlos probado en condiciones experimentales (Snyder & Snyder, 1971). Estos autores informan que las puestas tendrían un sabor desagradable (al menos para el hombre), y sugieren que el vitelo debe ser el causante de la no palatabilidad, ya que los huevos se vuelven menos desagradables, hasta tornarse insípidos, a medida que el embrión se desarrolla. También observan que los depredadores de los adultos, como el gavilán caracolero (*Rostrhamus sociabilis* Vieillot, 1817 (Aves, Accipitridae)) o el carao (*Aramus guarauna* Linnaeus, 1766 (Aves, Aramididae)), no consumen la glándula del albumen de las hembras, probablemente por el mismo motivo. Concluyen que la coloración conspicua de los huevos constituiría un caso de coloración aposemática (Snyder & Snyder, 1971).

Dicha coloración es una señal que advierte a depredadores que cazan visualmente, de la naturaleza no palatable, tóxica o perjudicial de la presa, y lo disuade de atacar. El aposematismo incluye una gran variedad de mecanismos de alarma y defensa (Ruxton *et al.*, 2004).

2. Reservas nutricias del huevo en gasterópodos

El óvulo es una célula altamente diferenciada cuyo programa celular será la producción de un nuevo individuo, permitiendo a la vez la recombinación genética (al menos en la mayoría de los casos) (Wourms, 1987). El proceso de producción de los

óvulos, la oogénesis, es determinante del programa de desarrollo que seguirá el organismo una vez que ocurra la fecundación, ya que durante su formación el óvulo sintetiza las proteínas y ácidos nucleicos que regirán el desarrollo, y acumula al menos parte de los nutrientes necesarios para este periodo. El evento fundamental de la oogénesis es la meiosis, que determina la reducción cromosómica en los oocitos. Además, es en las distintas etapas de la oogénesis que los oocitos reorganizarán su citoplasma y organelas celulares, almacenarán información fundamentalmente como RNA, y aumentarán su tamaño acumulando una variedad de metabolitos nutritivos colectivamente llamados vitelo (Wourms, 1987). Los huevos de muchos gasterópodos, como los ampuláridos, cuentan con envolturas extracelulares, algunas de las cuales contienen componentes nutritivos, por lo que en estos casos el vitelo representa sólo una parte de las reservas alimenticias del embrión.

2.1. Vitelogénesis

El proceso de acumulación del vitelo es denominado vitelogénesis, y ocurre en las etapas avanzadas de la oogénesis, generalmente durante la etapa final de la profase de la primera división meiótica (Wourms, 1987). El volumen de vitelo producido se relaciona con el modo de desarrollo de la especie en cuestión, en general aquellos gasterópodos que presentan larvas planctotróficas suelen sintetizar poco vitelo (huevos oligolecíticos) mientras que los que presentan desarrollo directo, usualmente producen huevos con abundante vitelo (polilecíticos). Algunas especies, particularmente en Neogastropoda, depositan una ovicápsula que contiene huevos que, ya sea por no estar fecundados, estar fecundados por espermatozoides anormales o presentar alguna anomalía genética no son viables y sirven de alimento a los huevos viables, son los denominados “huevos nutritivos” (Wourms, 1987). En los casos en que los huevos son provistos de envolturas nutritivas extracelulares producidas por elementos glandulares de la porción paleal del tracto genital femenino, el contenido de vitelo intracitoplasmático es, en general, reducido.

El vitelo se localiza en el citoplasma del oocito en forma de inclusiones de naturaleza proteica, carbohidratos y lípidos. Usualmente, se reconocen dos tipos de vitelo: gránulos proteicos y gotas lipídicas (Jong-Brink *et al.*, 1983).

Los gránulos proteicos son vesículas rodeadas de membrana que contienen principalmente glicoproteínas, proteínas básicas y aminoácidos, pudiendo presentar también fosfolípidos, polisacáridos como glucógeno y galactógeno, pigmentos e incluso calcio (Raven, 1972). Estos componentes se encuentran distribuidos de diversas formas en el interior de los gránulos, dando lugar a distintas morfologías, siendo algunos vesiculares, otros con regiones corticales y centrales diferenciadas por ejemplo con inclusiones cristalinas (Wourms, 1987). Un componente frecuente de estas inclusiones son los cristales de ferritina, una proteína que transporta hierro y que representa la reserva de dicho elemento en el huevo (Miksys & Saleuddin, 1986). También se han identificado enzimas hidrolíticas en los gránulos proteicos, por lo que muchas de estas vesículas se interpretan como lisosomas primarios que serían utilizados por el embrión para digerir las moléculas nutricias durante el desarrollo (Jong-Brink *et al.*, 1983).

El componente lipídico del vitelo está representado por gotas lipídicas no rodeadas por membrana, que pueden ser pequeñas y distribuirse homogéneamente en el citoplasma, o formar inclusiones más voluminosas. Están integradas principalmente por lípidos neutros, como triglicéridos y ésteres de colesterol, considerados como moléculas de reserva energética.

2.2. Síntesis de los componentes del vitelo

En los gasterópodos, a diferencia de otros moluscos, artrópodos y vertebrados, los componentes del vitelo son mayoritariamente sintetizados por los propios oocitos, recibiendo de las células accesorias (muy comúnmente referidas como foliculares), solamente precursores biosintéticos, como iones y moléculas pequeñas. Por este motivo se consideraba al vitelo en estos organismos como autosintético o endógeno. Sin embargo, se acepta que algunos componentes pueden ser incorporados como macromoléculas preformadas, por ejemplo los lípidos, que parecen provenir, en

algunas especies, de las células accesorias (Jong-Brink *et al.*, 1983). Otro componente del vitelo que el oocito incorpora ya sintetizado es la ferritina, proveniente de la glándula digestiva (Bottke, 1982). Al menos en *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata, Lymnaeidae), la ferritina presenta una isoforma exclusiva para el vitelo y su síntesis podría estar incluso bajo control endócrino (von Darl *et al.*, 1994). Otras evidencias de que algunos componentes del vitelo tienen un origen exógeno, son las especializaciones tisulares de la gónada de *L. stagnalis*, en que algunos acinos del ovotestis son contiguos a los acinos de la glándula digestiva, lo que facilitaría la incorporación de materiales por parte de los oocitos (Jong-Brink *et al.*, 1983). Se ha observado también la endocitosis de materiales por parte de los oocitos de *Runcina coronata* (Quatrefages, 1844) (Nudibranchia, Runcinidae) (Kress, 1986) y en patélidos (Hodgson & Eckelbarger, 2000), entre otros. Finalmente, se comprobó la existencia de proteínas del tipo de las vitelogeninas sintetizadas fuera del oocito que, en *Helix aspersa* (Müller, 1774) (Pulmonata, Helicidae), son sintetizadas por la glándula digestiva y en *Haliothis discus* Reeve, 1846 (Vetigastropoda, Haliotidae) en las células accesorias del ovario. En esta última especie, la vitelogenina muestra cierta homología de secuencia con vitelogeninas de bivalvos, poliquetos, artrópodos, nematodos e incluso peces (Barre *et al.*, 1991; Bride *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 2008).

2.3. Fluido perivitelino

Una vez que el óvulo es fecundado, la cigota (el huevo) es provista de envolturas externas secretadas por células glandulares del oviducto o por glándulas accesorias. Estas envolturas son características de los Caenogastropoda, Opisthobranchia y Pulmonata, y varían considerablemente en su naturaleza y volumen, pudiendo ser individuales o incluir a un grupo de huevos. En general la primera envoltura, el albumen o fluido perivitelino (FPV) es secretada por la glándula del albumen y cumple funciones nutricias, representando además, una importante fuente energética para el embrión. Este fluido es depositado en forma de gotas de tamaño uniforme sobre cada huevo a medida que estos circulan por el oviducto (Jong-Brink

et al., 1983; Wourms, 1987), polisacáridos, proteínas, y calcio, son sus principales constituyentes, y, si bien se suponía que carecía de lípidos libres (Raven, 1972), posteriormente se demostró que, al menos en un caso, los lípidos están presentes formando parte de lipoproteínas (Garín *et al.*, 1996). Externamente a la envoltura nutricia, glándulas accesorias, o porciones distales del oviducto, depositan diversos tipos de envolturas, a veces de naturaleza membranosa, con funciones protectoras (Wourms, 1987). En ciertos casos, matrices gelatinosas de mucopolisacáridos brindan cohesión o adherencia al conjunto de huevos, formando masas o cordones, pudiendo ser rígidas, incluso calcificarse, resultando en cápsulas muy resistentes (Wourms, 1987; Bramachary, 1989). Estas cápsulas pueden a su vez estar inmersas en una matriz gelatinosa (Pechenik, 1986).

2.3.1. Componentes del perivitelo

El polisacárido más frecuente sería el galactógeno, un homopolímero ramificado de galactosa (Gal), que presenta tanto D-Gal como L-Gal, con uniones β 1-3 y β 1-6. El galactógeno es sintetizado en la glándula del albumen sólo para formar parte del FPV, siendo el glucógeno el polisacárido de reserva celular del adulto (Goudsmit, 1972). En el embrión, el galactógeno sería utilizado en gran parte para la síntesis de lípidos (Raven, 1972) y como fuente energética (Heras *et al.*, 1998).

Las proteínas del FPV, llamadas perivitelinas, no han sido caracterizadas tan ampliamente como las vitelinas, proteínas del vitelo. Tradicionalmente eran consideradas simplemente como reserva nutricia para el embrión, representando una fuente de aminoácidos que servirían eventualmente para sintetizar proteínas o como fuentes de energía (Bramachary, 1989). A medida que se ha avanzado en el conocimiento de las perivitelinas en un mayor número de especies, se han encontrado casos en los que estas presentan múltiples funciones. Es decir, cumplen funciones biológicas específicas durante el desarrollo, antes de ser finalmente consumidas por el embrión. Los casos estudiados hasta el momento comprenden sólo tres especies de Pulmonata [*Helix pomatia* Linnaeus, 1758 (Pulmonata, Helicidae), *L. stagnalis* y *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) (Pulmonata, Planorbidae)] (Nagle *et al.*, 1999; 2001; Mukai *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2006), tres especies de Nudibranchia (Aplysiidae) [*Aplysia kurodai* (Baba, 1937), *Aplysia*

juliana Quoy & Gaymard, 1832 y *Dolabella auricularia* (Lightfoot, 1786)] (Yamazaki *et al.*, 1985; Iijima *et al.*, 1995; Kamiya *et al.*, 2006) y una especie de Caenogastropoda (*P. canaliculata*) (Garín *et al.*, 1996).

2.3.2. Funciones particulares de las perivitelininas

Del FPV de *L. stagnalis* se ha aislado un péptido con homología de secuencia con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que presenta actividad estimulante del crecimiento de neuronas de la misma especie, y que podría estar involucrado en la regulación del desarrollo embrionario (Nagle *et al.*, 1999).

De los huevos los nudibranchios *A. kurodai*, *A. juliana* y *D. auricularia* se han aislado las perivitelininas Aplysianina E, Julianina E y Dolabellanina E, respectivamente, que presentan actividad antineoplásica, antibacteriana y antifúngica, y su función sería la protección microbiológica de los huevos. (Yamazaki *et al.*, 1985; Iijima *et al.*, 1995; 2003; Kamiya *et al.*, 2006). En los tres casos, la actividad biológica está dada por una actividad L-aminoácido oxidasa (LAAO), estas proteínas catalizan la oxidación del grupo α -amino de un L-aminoácido con producción de H_2O_2 (Kamiya *et al.*, 2006). Otra perivitelinina que, de acuerdo con su secuencia aminoacídica, podría tener la misma actividad antimicrobiana, aunque no fue comprobada, es la HdAGP aislada en *H. duryi*. (Mukai *et al.*, 2004). De la glándula del albumen y huevos de *Helix pomatia* se ha aislado una proteína con propiedades aglutinantes, *helix pomatia agglutinin* (HPA), que podría cumplir roles antimicrobianos (Sanchez *et al.*, 2006).

Se ha observado que las masas de huevos de muchas otras especies de gasterópodos presentan actividad antibacteriana, tanto en especies acuáticas como terrestres, aunque en pocos casos se han aislado dichas sustancias. Algunas especies cuyos huevos están provistos de cápsulas duras, no presentan actividad antibacteriana, presumiblemente porque la cápsula es una barrera eficiente en impedir la entrada de microorganismos (Pechenik, 1986), sin embargo esto no constituye una “regla general”, ya que no existe una relación clara entre la presencia o ausencia de dicha actividad y la naturaleza de las envolturas del huevo (Benkendorff *et al.*, 2001).

Otra función que parecen tener algunas perivitelinas es la de inhibir proteasas. En *L. stagnalis* se ha aislado un péptido, LTI (*Lymnaea Trypsin Inhibitor*), con actividad inhibitoria de la tripsina (Nagle *et al.*, 2001), y en *P. canaliculata* su perivitelina mayoritaria, la ovorubina (OR), presenta actividad inhibitoria de serínproteasas (Norden, 1972).

La presencia de inhibidores de proteasas en huevos de moluscos no ha sido tan explorada, pero en huevos de otros organismos es frecuente, y se acepta que tendrían dos funciones: 1) regular la proteólisis prematura de componentes del vitelo o perivitelo, del mismo modo que actúan los inhibidores de proteasas intracelulares (Chye *et al.*, 2006); 2) evitar la invasión microbiana, ya que inhibirían las proteasas extracelulares secretadas por los microorganismos durante la invasión (Christeller, 2005). La primera de estas funciones está ampliamente estudiada, y es la función atribuida al LTI del perivitelo de *L. stagnalis* (Nagle *et al.*, 2001). En cuanto a la función de evitar la invasión bacteriana del huevo, en pocos casos se ha confirmado que el inhibidor de proteasas tenga efectivamente actividad antimicrobiana, por ejemplo en los huevos de *Odorrana grahami* (Boulenger, 1917) (Anura, Ranidae) (Han *et al.*, 2008). En otros estudios se vinculan ambas actividades, sin identificar cuáles serían las proteasas inhibidas y de qué posibles patógenos (Réhault, 2006), o se comprueba la actividad inhibitoria de proteasas bacterianas *in vitro*, y se especula sobre la función antibacteriana *in vivo*, pero sin evidencias experimentales. Este último es el caso de la perivitelina ovorubina de *P. canaliculata* cuya actividad inhibitoria de tripsina, subtilisina y takadiastasa, ha sido vinculada sin evidencia directa con la defensa antimicrobiana de los huevos (Norden, 1972).

3. Perivitelinas de *P. canaliculata*

P. canaliculata es la única especie de Caenogastropoda cuyas perivitelinas fueron caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y biofísico. El FPV en esta especie presenta tres perivitelinas principales: ovorubina (OR), y dos perivitelinas designadas como PV2 y PV3 (Garín *et al.*, 1996). La OR, aislada hace más de medio

siglo por Comfort (1947; 1949), es la perivitelina mayoritaria, representando el 57% de la proteína total del FPV; PV2 y PV3 representan el 7,5 y 35,5% de la proteína total de dicho fluido, respectivamente (Garín *et al.*, 1996).

3.1. Ovorubina (OR)

La OR fue descrita originalmente como una “carotenoproteína verdadera”, ya que presenta el carotenoide astaxantina [3,3'-dihidroxi 4,4'-diceto β -caroteno] unido de manera no covalente, y en una proporción estequiométrica fija (Cheesman, 1958). Desde su aislamiento se incluyó a la OR dentro de un grupo de carotenoproteínas bastante heterogéneo, cuya característica común era esta unión específica con el carotenoide. Este grupo incluye una serie de proteínas que, o bien transportan carotenoides en fluidos corporales o están involucradas en la coloración de estructuras tegumentarias (Cheesman *et al.*, 1967). Sin embargo, a medida que se avanzaba en el conocimiento de algunas de esas carotenoproteínas, particularmente de la crustacianina de *Homarus gammarus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Decapoda, Nephropidae), comenzó a sospecharse que la OR no compartía mucho más que el pigmento carotenoide con el resto de las carotenoproteínas de invertebrados, cosa que fue confirmada mediante estudios comparativos de composición aminoacídica y de reconocimiento con anticuerpos, llegando incluso a descartarse la noción de que existiera una única familia de carotenoproteínas (Zagalsky, 1972; 1995). Los avances en la caracterización bioquímica y biofísica de la OR, que se desarrollan a continuación, evidencian que esta carotenoproteína presenta características distintivas dentro del grupo de las carotenoproteínas.

3.1.1. Composición y aspectos estructurales

La OR es una glicoproteína oligomérica con un peso molecular (PM) nativo de *ca.* 300 kDa, que está compuesta por tres subunidades de *ca.* 28, 32 y 35 kDa.

Como ya mencionamos presenta al carotenoide astaxantina como cofactor, que se encuentra en forma libre o esterificado con ácidos grasos, otorgando a la OR

y al FPV, una coloración rojo-rosada característica. El carotenoide se ubica en un bolsillo hidrofóbico de la proteína, con una alta constante de afinidad, es decir fuertemente unido a esta (Dreon *et al.*, 2007). Esta unión específica a la proteína determina que el carotenoide sufra un corrimiento batocrómico (hacia el rojo) de su longitud de onda de máxima absorción, desde 480 nm en su forma libre en solución a 495 nm cuando está unido a la OR (Zagalsky *et al.*, 1990).

Presenta un elevado contenido de carbohidratos (17%), con un predominio de manosa (Man) y N-acetil glucosamina (GlcNAc), conformando oligosacáridos N- y O- ligados (Dreon *et al.*, 2004a). Por el contrario, presenta un muy bajo contenido de lípidos, 0,3% (p/p), principalmente lípidos estructurales como fosfolípidos y esteroides, además del pigmento carotenoide. La densidad de hidratación de la OR, de 1,27 g/mL, ubica a este complejo lipo-glico-carotenoproteico entre las lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL) (Garín *et al.*, 1996).

A diferencia de las otras carotenoproteínas de invertebrados, como la crustacianina, en la OR la astaxantina no es necesaria para mantener la estructura cuaternaria. La forma de OR libre de cofactor (apo-OR) puede ser preparada en el laboratorio y es estable en solución, constituyendo un modelo experimental muy útil. Inclusive, estudios de desnaturalización química demostraron que la apo-OR es prácticamente tan estable como la OR con su cofactor unido (holo-OR) (Dreon *et al.*, 2007). Otro aspecto estructural destacable de la OR es su elevada termo estabilidad, ya que se ha visto que ni holo-OR ni apo-OR sufren alteraciones estructurales hasta 95°C (Dreon *et al.*, 2007).

3.2. PV2 y PV3

Las restantes perivitelinas han sido menos estudiadas. PV2 es un oligómero de PM algo mayor que OR, *ca.* 400 kDa, compuesto por dos subunidades de 67 y 31 kDa. También posee una densidad de hidratación correspondiente a una VHDL, transportando un 3,75% (p/p) de lípidos fundamentalmente estructurales, esteroides libres y fosfolípidos, pero también de reserva energética, como triacilgliceroides (Garín *et al.*, 1996). PV2 es también una glicoproteína, aunque su contenido de

carbohidratos es moderado, 2,5% (p/p), siendo su composición de carbohidratos similar a la de la OR aunque con algunas diferencias menores en cuanto a los oligosacáridos (Dreon *et al.*, 2004a).

PV3 fue aislada originalmente como una fracción proteica heterogénea, constituida por dos proteínas PV3-h y PV3-p las que a su vez se componen de subunidades de menor PM. Estas fracciones tienen la densidad compatible con la de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y transportan un elevado contenido lipídico, que representan más del 30% de los lípidos del FPV. Los lípidos son en su mayoría de reserva energética (triacilglicérolos e hidrocarburos) y pigmento. Este pigmento es muy abundante, 30 % (p/p) del total, y contribuye, junto con la OR, a la coloración del FPV y en definitiva del huevo (Garín *et al.*, 1996).

3.3. Biosíntesis de las perivitelinas

Como vimos, la glándula del albumen es el sitio de síntesis de los componentes del FPV, esto fue demostrado experimentalmente para las perivitelinas OR y PV2 por medio de incubaciones *in vitro* con marcadores radioactivos; en estos estudios no se detectó síntesis de perivitelinas en ningún otro órgano (Dreon *et al.*, 2002; 2003). El parénquima de la glándula del albumen presenta dos tipos celulares principales: células albúmino secretoras y células laberínticas. Mediante estudios de inmunohistoquímica y microscopía electrónica se demostró que sólo las células albúmino secretoras son responsables de la síntesis de OR y PV2 siendo por tanto las productoras de estos componentes del FPV (Catalán *et al.*, 2006).

3.4. Funciones de las perivitelinas en el desarrollo embrionario

Durante el desarrollo, todos los componentes del FPV son consumidos por el embrión ya sea para ser empleados como fuente energética o como precursores estructurales. Las perivitelinas, sin embargo, no son consumidas en gran medida sino hasta estadios tardíos del desarrollo y cada una de ellas es incorporada de

manera diferencial (Heras *et al.*, 1998). Previamente a la eclosión, PV2 y PV3 se consumen totalmente, quedando únicamente OR en el FPV de los embriones, lo que sugeriría que esta perivitelina cumpliría algún otro rol específico, más allá del rol como fuente energética o estructural. Antes de la eclosión, el remanente de FPV es incorporado por el embrión pero no es digerido inmediatamente, sino que persiste en la glándula digestiva por un período de uno a tres días.

Se han descrito propiedades de OR y PV2, que muestran que estas perivitelinas, además de funciones nutricias cumplirían otros roles durante la embriogénesis. La OR contiene el cofactor carotenoide responsable de la coloración de los huevos, la cual, como hemos visto, podría representar una señal de advertencia de tipo aposemático. Esta pigmentación al mismo tiempo funciona como una suerte de pantalla solar protegiendo a los embriones, al absorber parte de la radiación a la que estos se ven expuestos (Heras *et al.*, 2007). Los carotenoides son además moléculas con gran capacidad antioxidante pero sumamente lábiles en solución (Palozza & Krinsky, 1992), especialmente cuando se exponen a luz directa, calor y oxígeno. En este sentido se ha determinado que la astaxantina, estando unida a la OR, es eficientemente protegida de la degradación (Dreon *et al.*, 2004b). Además, la elevada constante de afinidad de la OR por el carotenoide evitaría que el mismo fuese liberado al FPV, cosa que ocurriría solamente cuando la OR es incorporada y procesada por el embrión, en el cual la astaxantina cumpliría el rol de antioxidante de membrana habitual de estos compuestos (Dreon *et al.*, 2007).

En síntesis, la OR cumpliría las funciones de transportar y estabilizar las moléculas antioxidantes que serán utilizadas por el embrión, de otorgar coloración de alarma al huevo y al mismo tiempo de fotoproteger al embrión en sus primeras etapas de desarrollo.

El elevado contenido de carbohidratos de la OR también podría desempeñar un papel osmótico en el FPV, evitando la deshidratación de los huevos, al igual que se ha descrito para otras proteínas altamente glicosiladas como las mucinas (Dreon *et al.*, 2004a).

Como ya fue mencionado anteriormente, Norden (1972) demostró que la OR tiene la capacidad de inhibir las proteasas tripsina, quimotripsina, subtilisina, pronasa y takadiastasa. Dado que algunas de las proteasas inhibidas son de origen

bacteriano y fúngico, esta autora interpreta que la OR cumpliría una función antimicrobiana en el huevo, aunque esto no fue demostrado (Norden, 1972).

Recientemente se ha descrito que la perivitelina PV2 es neurotóxica en ratón cuando se la administra por vía intraperitoneal, con una dosis letal 50% a 96 h (LD50 96h) de 0,25 mg/Kg. Si bien aún no se ha estudiado la vía de administración natural de esta toxina, se sabe que en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal provoca apoptosis, y altera la homeostasis del calcio (Heras *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Existe poca información sobre los componentes del fluido perivitelino en gasterópodos, aún cuando éste representa en muchas especies la principal fuente nutricia de los embriones y juega un papel esencial en la embriogénesis. En lo referido a las perivitelininas, prácticamente las únicas caracterizaciones bioquímicas y biofísicas se han realizado en *P. canaliculata*. En estas partículas se han encontrado propiedades novedosas, relacionadas con funciones que exceden la de proveer componentes estructurales y energéticos al embrión, y posiblemente estén relacionadas con alguno de los componentes de las estrategias reproductivas del organismo.

Por esto, las propiedades identificadas *in vitro* deben ser puestas en el contexto de la biología del organismo y del grupo, para determinar a qué estrategia responden. Algunas propiedades del perivitelo como la capacidad inhibitoria de proteasas de OR o la llamativa pigmentación de los huevos, también dada por OR, aun no han sido adecuadamente interpretadas por lo que es importante profundizar en estos aspectos.

En este trabajo de Tesis se pretende ampliar el conocimiento acerca de las funciones de las perivitelininas en los gasterópodos tomando como modelo la OR de *P. canaliculata*, determinando si la presencia de perivitelininas multifuncionales es característica de las especies de la familia Ampullaridae que presentan similar estrategia de oviposición, como elemento clave en la historia de vida de la especie.

En particular se busca:

1. Analizar el fluido perivitelino de otra especie del género *Pomacea* con estrategia de oviposición aérea, *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1835), investigando la existencia de una perivitelina similar a la OR de *P. canaliculata*. Proceder a su aislamiento y caracterización bioquímica y comparación con la OR. (Capítulos III y IV).
2. Investigar la estabilidad estructural de la OR y de la perivitelina de *P. scalaris* frente a alteraciones provocadas por pH y temperatura. (Capítulo V).

3. Avanzar en la caracterización funcional de la OR de *P. canaliculata*, determinando su capacidad para inhibir el crecimiento microbiano y la relación de esta función con su actividad inhibitoria de proteasas. (Capítulo VI).

4. Estudiar la relación entre la estabilidad de la OR y de la perivitelina de *P. scalaris* frente al pH y su resistencia a proteasas en un sistema de digestión gastrointestinal simulada; discutir las implicancias funcionales de estas propiedades. (Capítulo VI).

Los objetivos 1 y 4 constituyen los primeros estudios de estos aspectos en la clase Gastropoda fuera de *P. canaliculata*.

II.

Materiales y Métodos

1. Reactivos, drogas y solventes

Las drogas y solventes utilizados fueron Carlo Erba Reagenti calidad RPE o Merck calidad *pro analysi*. Los proveedores de otros reactivos y enzimas utilizados son especificados individualmente.

2. Aislamiento y purificación de perivitelinas

2.1. Obtención de puestas

Pomacea canaliculata

Las puestas de *P. canaliculata* fueron colectadas durante la época reproductiva, en el Lago del Paseo del Bosque, La Plata (34°54'37" S, 57°56'10" W), donde se encuentra establecida una población introducida de esta especie. Como se conocían previamente las características de estas puestas, fue posible colectar las más recientes distinguiéndolas por su coloración. Las puestas fueron lavadas, pesadas y congeladas a -70°C hasta su procesamiento.

Pomacea scalaris

Se colectaron hembras de *P. scalaris* en la laguna del Yatch Club de Palermo, Ciudad de Buenos Aires (34°33'37.04"S, 58°25'44.06"W), y se colocaron en acuarios. A medida que se producían los desoves, las puestas eran pesadas y congeladas a -70°C. Las puestas utilizadas para el aislamiento de perivitelinas fueron siempre de menos de 24 h, de este modo se pudo asegurar que los embriones estaban en un estadio anterior al de mórula.

Algunos de los ejemplares de *P. scalaris* utilizados fueron depositados como material *voucher* en la colección del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN-In 37268).

2.2. Preparación de fracción soluble de los huevos (citosol)

Las puestas fueron homogeneizadas en buffer Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.1 conteniendo un coctel inhibidor de proteasas (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), guardando una relación tejido: buffer de 4: 1 v/v. El homogenato fue centrifugado a 10.000 x g durante 30 min a 4°C para separar cáscaras y restos de mayor tamaño. El sobrenadante fue luego centrifugado a 100.000 x g durante 50 min a 4°C, para sedimentar las membranas celulares y microsomales. El sobrenadante obtenido conteniendo la fracción soluble de los huevos, que denominaremos citosol, fue congelado a -70°C hasta su posterior análisis.

2.3. Aislamiento y purificación de perivitelinas

2.3.1. Ultracentrifugación en gradiente de densidad

Las perivitelinas fueron aisladas del citosol de huevo mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de NaBr; esta técnica permite separar proteínas de acuerdo a su densidad de hidratación. Para ello se colocó el citosol sobre una solución de NaBr de densidad igual a 1,28 g/mL (3,74 M) y se centrifugó a 207.000 x g durante 18 h a 10°C, en un rotor de ángulo variable SW 60.Ti (Beckman Coulter, Inc.). En la misma corrida, se centrifugó además un tubo conteniendo NaCl con una densidad de 1.07 g/mL, que se utilizó para el cálculo de densidad de las fracciones. Al terminar la centrifugación, se colectaron fracciones de 200 µL desde la parte superior del tubo y se midió la absorbancia a 280 nm para determinar el perfil proteico. También se colectaron de igual modo fracciones del tubo conteniendo NaCl, en las que se determinó el índice de refracción (IR) utilizando un refractómetro (Bausch & Lomb Inc.). Las medidas de IR fueron transformadas a valores de densidad utilizando valores tabulados (Orr et al., 1991).

2.3.2. Cromatografía líquida

Las fracciones conteniendo las perivitelininas fueron purificadas por cromatografía de exclusión. Para ello se utilizó una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 HR 10/20 (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada en buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH = 7.4, NaCl 150 mM (en adelante: PBS), el flujo fue de 0,5 mL/min, detectándose las fracciones proteicas por absorbancia a 280 nm.

3. Caracterización de las perivitelininas

3.1. Cuantificación proteica

La concentración de proteína en las muestras fue determinada por el método de Lowry (1951) que se basa en la generación de un complejo entre los enlaces peptídicos e iones Cu^{2+} en condiciones alcalinas, que reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Anedra) produciéndose un cromógeno que absorbe a 750 nm. Junto con las muestras, se miden diluciones de concentraciones conocidas albúmina sérica bovina (BSA), con las que construye una curva de calibración.

3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza de las fracciones proteicas, y la estimación de sus pesos moleculares (PM) fueron determinadas por electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE-Nativo). Esta técnica se basa en la separación de las proteínas según la relación entre su carga y su masa, mientras se mueven a través de un gel poroso por la aplicación de un campo eléctrico. La composición apoproteica de estas fracciones proteicas fue determinada por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), en las que se pierde la estructura cuaternaria permitiendo evidenciar las subunidades por separado.

3.2.1. PAGE-Nativo

Se utilizó el sistema Ornstein-Davis de buffers discontinuos (Davis, 1964; Ornstein, 1964) en una cuba electroforética Mini-Protean III (Bio Rad, Hercules, CA, USA) con geles de 0,75 x 8 x 10 cm. En este sistema se utiliza un gel concentrador, de poliacrilamida al 4 % preparado en Tris/HCl 125 mM pH 6.8, y un gel separador con un gradiente lineal de tamaño de poro preparado en Tris/HCl 375 mM pH 8.8, dicho gradiente se adecuó al PM de la muestra, siendo generalmente de 4 a 20 % (p/v) de una mezcla acrilamida/bisacrilamida (30:0,8 % p/v). Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó buffer Tris 0,3 % (p/v), Glicina 1,4 % (p/v), pH 8.3, siendo las condiciones de corrida: 120 V durante 4 h. Además de la muestra, se sembró una mezcla de proteínas estándar de PM conocido (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden). En el PAGE-nativo, la movilidad de las proteínas depende de la relación entre su carga y su masa, por este motivo, no es adecuado para la determinación del PM de las moléculas. Sin embargo, con el uso de geles en gradiente y de tiempos de corrida extensos, cada proteína llega a su poro límite (poro tal que, debido a su tamaño, la molécula no puede avanzar más), permitiendo una estimación del PM a partir de la comparación con la movilidad de las proteínas estándar.

3.2.2. PAGE-SDS

Se utilizó el sistema de buffers discontinuos de Laemmli (1970). Se emplearon geles concentradores y separadores similares a los indicados para PAGE-nativo, pero con el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% (p/v). Además, las muestras fueron desnaturalizadas antes de la corrida calentándolas a 100°C durante 5 min en presencia de SDS 0,1% (p/v) y ditiotreitol (DTT) 0,1 M. La corrida se desarrolló con un buffer de desarrollo Tris 0,3% (p/v) Glicina 1,4% (p/v), SDS 0,1% (p/v), pH 8.3, a 120 v durante aproximadamente 90 min. Además de la muestra, se sembró una mezcla de proteínas estándar de PM conocido (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden). En el PAGE-SDS, el SDS agregado unifica la carga de todas las proteínas presentes, por lo que la movilidad relativa de las moléculas depende exclusivamente de su masa. Por este motivo, es adecuado para la determinación del PM.

3.2.3. Detección de proteínas en los geles

Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos en una solución de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) 0,04% (p/v) en ácido acético:metanol:agua (10:40:50 v/ v/v) durante 12 h. Luego fueron desteñidos con reiterados lavados con ácido acético:metanol:agua (10:40:50 v/ v/v).

Cuando la masa de proteína sembrada en el gel estaba por debajo del límite de detección del Coomassie Brilliant Blue, los geles eran reteñidos con una tinción de plata (AgNO₃).

3.3. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y detección con anticuerpos policlonales (*western blot*)

3.3.1. Preparación de anticuerpos policlonales

Anticuerpos policlonales contra escalarina fueron preparados en ratones Balb-c (Harlow & Lane, 1988). Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 50 µg de escalarina en PBS emulsificada con adyuvante de Freund completo (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). Luego de 19 días, una segunda inoculación fue realizada con otros 50 µg de antígeno puro. Dos semanas más tarde los ratones fueron desangrados por punción cardíaca. La sangre colectada fue mantenida a 37°C por 1 h hasta su coagulación y luego se dejó toda la noche a 4°C; para lograr la retracción del coágulo. Luego de una centrifugación a baja velocidad, el suero obtenido fue guardado a -70°C hasta su uso.

En este trabajo también se utilizaron anticuerpos policlonales anti-ovorubina y anti-PV2, los cuales habían sido preparados previamente para otros estudios (Dreon et al., 2002; 2003).

3.3.2. Electro transferencia a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas fueron separadas mediante PAGGE o SDS-PAGGE y luego electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa Hi-bond (Amersham) empleando un Mini Trans-blot Cell (Bio Rad, Hercules, CA, USA) durante 1 h a 100 V.

Como buffer de transferencia se usó Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, 20% de metanol. Completada la transferencia se bloqueó la membrana incubando 90 min a 37°C en PBS, Tween-20 al 0,05% (v/v) (en adelante, PBST) leche en polvo descremada al 5% (p/v).

3.3.3. Dot blot

El dot blot es una alternativa rápida a la electrotransferencia, que permite analizar un alto número de muestras a la vez, siempre que la proteína a analizar se encuentre purificada (Harlow & Lane, 1988, cap. 7). Para esto se colocaron gotas de 10 µl conteniendo entre 0,25 y 5 µg de proteína purificada en tiras de nitrocelulosa (de aproximadamente 1 x 6 cm), y se las incubó en un ambiente húmedo a 37°C durante 30 min. A continuación se bloquearon las membranas a 37°C durante 90 min, y se realizaron 3 lavados con PBST de 15 min cada uno.

3.3.4. Incubación con anticuerpos policlonales

La membrana bloqueada fue incubada durante toda la noche a 4°C con el suero policlonal correspondiente, en diluciones 1:1.000 (v/v) en PBST conteniendo 1% de leche en polvo descremada. Luego de lavar la membrana de la manera antes descripta se la incubó durante 2 h con un anticuerpo anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Bio Rad, Hercules, CA, USA) diluido 1:3.000 (v/v) en una solución de leche en polvo descremada al 1% (p/v) en PBS.

Concluida esta última incubación la membrana se lavó igual que en los pasos anteriores y se reveló mediante quimioluminiscencia.

3.3.5. Detección por quimioluminiscencia

Las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa y marcadas con anticuerpos fueron reveladas por esta técnica. En este sistema la peroxidasa conjugada con el segundo anticuerpo produce la oxidación de un sustrato, el luminol (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), generando una emisión de luz que impacta sobre una placa radiográfica.

La solución de revelado consta de dos preparaciones que se mezclan justo antes de usar: 1) 5 ml de Tris 100 mM pH 8,5. Conteniendo 50 µl de luminol 4,4% ml

en dimetil sulfóxido (DMSO), 22 µl de ácido p-cumárico (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) 1,5% en DMSO. 2) 5 ml de Tris 100 mM pH 8,5 conteniendo 3,2 µl de H₂O₂.

La membrana seca se hizo reaccionar durante 1 min con la solución de revelado recién mezclada y se expuso a una placa radiográfica X-Omat, XAR-5 (Kodak, Rochester, NY), el tiempo necesario, normalmente entre 30 seg y 5 min. Una vez terminada la exposición, se utilizaron reveladores y fijadores fotográficos comerciales para el revelar la placa.

3.4. Secuencia N-terminal de escalarina

La determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la escalarina fue realizada por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO). Se analizó una muestra de escalarina deglicosilada químicamente (ver 5.3.2), electrotransferida a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

3.5. Detección de serinas fosforiladas

La presencia de residuos de serina fosforilados fue investigada utilizando un anticuerpo antifosfoserina preparado en conejo (# Ab1603, Chemicon Intl., Temecula, CA) que fue cedido gentilmente por la Dra. C. Mundiña. Se realizó un dot-blot (ver 3.3.3) colocando gotas de 250 ng de cada proteína sobre una tira de nitrocelulosa y se incubó la tira por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo en una dilución 1:250 en PBST con BSA 3% (p/v). Como control positivo se utilizó un lisado de corazón de rata tratada con adrenalina, el control negativo fue la BSA que bloqueaba la membrana. El resultado se visualizó por quimioluminiscencia (ver 3.3.5).

4. Caracterización lipídica

4.1. Lípidos totales

4.1.1. Extracción

Los lípidos fueron extraídos mediante la técnica de Bligh & Dyer (1959) modificada para muestras líquidas. Por cada 0,4 mL de solución proteica se agregó 1 mL de metanol, seguido de agitación durante 1 min; luego se agregaron 0,5 mL de cloroformo y se agitó durante 1 min; se agregaron 0,5 mL más de cloroformo y se agitó nuevamente. Finalmente se agregaron 0,5 mL de NaCl al 1,8% (p/v) seguido de agitación, lo cual produjo una emulsión de las fases. Se gaseó con N₂ para evitar la oxidación de los lípidos, se dejó reposar a 4°C y luego se centrifugó a baja velocidad para acelerar la separación de las fases. La fase acuosa superior fue retirada cuidadosamente mediante una bomba de aspiración. La fase clorofórmica inferior fue evaporada completamente con N₂, los lípidos fueron redisoluertos en n-hexano, gaseados con N₂ y almacenados a -20°C hasta su análisis.

El contenido de lípidos de la muestra fue determinado gravimétricamente. Para ello, un volumen medido del extracto fue colocado en un vial previamente tarado y se evaporó a seco con N₂ y se pesó en una balanza microanalítica. Este proceso de gaseado-pesado se repitió hasta obtener un peso constante.

4.1.2. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Antes de realizar el análisis cuantitativo de las clases de lípidos presentes, se necesitaba tener una idea de qué lípidos estaban presentes en la muestra. Para esto se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) en una placa de sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemania) en la que se sembraron 15 µg de lípidos junto a una mezcla de lípidos estándar. La placa fue desarrollada primero para lípidos neutros, con hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1 v/v/v), y luego para lípidos polares con, cloroformo:metanol:ácido acético:agua (65:25:4:4, v/v/v/v). Luego de cada desarrollo, la placa fue teñida con vapores de yodo para visualizar los lípidos.

4.1.3. Cuantificación por TLC acoplada a detector de ionización de llama

Posteriormente, las clases lipídicas presentes fueron cuantificadas por cromatografía en capa fina en varillas de sílica gel (Chromarod S-III) acoplada a un detector de ionización de llama (TLC-FID) utilizando un aparato Iatroscan TH 10 (Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japón). Esta técnica utiliza varillas de vidrio cubiertas de una fina capa de sílica gel, que son desarrolladas primeramente en un sistema de solventes que separa los lípidos neutros presentes en la muestra, dejando los pigmentos y lípidos más polares en el punto de siembra. A continuación el FID quema la varilla, cuantificando los lípidos presentes. Luego, se procede de igual modo con un sistema de solventes para separar lípidos de polaridad intermedia, dejando los más polares en el punto de siembra para un tercer desarrollo. Esta técnica permite cuantificar las clases de lípido presentes utilizando muy poca cantidad de muestra, siendo su única desventaja que hay que calibrar la respuesta del detector para cada lípido que presenta la muestra ya que su respuesta varía según la cantidad de carbono y la geometría del compuesto (Parrish & Ackman, 1985).

Se utilizaron tres sistemas de solventes para separar los tres tipos de lípido presentes: lípidos neutros, pigmentos y lípidos polares (Ackman & Heras, 1997). Para lípidos neutros se utilizó hexano: éter etílico: acetato de etilo: ácido fórmico (91:6:3:1 v/v/v/v). Para pigmentos carotenoides se utilizó acetona 100%. Para lípidos polares se utilizó metanol 100%, y no se los separó e identificó individualmente debido a su baja concentración.

Grupos de cinco varillas fueron calibradas independientemente utilizando cuatro mezclas de lípidos estándar en concentraciones decrecientes. Los estándares fueron escogidos en base al análisis cualitativo previo (4.1.2), y se agregó un lípido no presente en la muestra, el lignocerol (1-tetracosanol) como estándar interno. Para el análisis de la muestra, se sembraron 11 µg de lípido en cada varilla.

4.2. Análisis de los carotenoides

4.2.1. Extracción

Los componentes carotenoides de la escalarina fueron extraídos y comparados con los de OR. Para ello, se preparó una solución de proteína de 1 mg/mL y se agregaron 4 volúmenes de acetona enfriada en hielo, en agitación constante. A continuación se centrifugó a baja velocidad durante 5 min y se colectó el sobrenadante conteniendo los carotenoides, quedando la proteína en el precipitado. Este último fue redisolto con H₂O y reextraído con otros 4 volúmenes de acetona. Los sobrenadantes se reunieron y se extrajeron dos veces con un volumen igual de n-hexano. Este último extracto conteniendo los carotenoides, fue concentrado con N₂ y conservado a -20°C.

El residuo proteico de la extracción representado por la proteína libre de carotenoide (que llamaremos apo-escalarina) fue redisolto en PBS, centrifugado a 14.000 x g durante 10 min y conservado a -20°C para su posterior uso (6.1 y 7.1).

4.2.2. Análisis

Los carotenoides del extracto fueron separados por TLC, y analizados espectrofotométricamente. Se sembró el extracto en una placa de TLC de alta resolución, HPTLC, (Merck, Darmstadt, Germany) junto con un estándar de astaxantina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) y con un extracto de los carotenoides de OR. La placa se desarrolló primero con hexano 100% y luego con hexano:acetona (80:20, v/v). El contenido relativo de cada componente carotenoide fue estimado densitométricamente luego de rociar la placa con anisaldeído/ H₂SO₄ y calentarla a 100°C durante 5 min.

Para analizar separadamente los distintos carotenoides, el extracto total fue sembrado en una placa de TLC, que se desarrolló con las mezclas de solventes antes descritas. A continuación, cada mancha fue raspada de la placa, y los carotenoides fueron eluidos de la sílica con cloroformo:hexano (1:1 v/v), evaporados con N₂ y redisolto en cloroformo. Alícuotas de cada carotenoide fueron disueltas en distintos solventes para registrar sus espectros de absorción.

5. Análisis de los carbohidratos de la escalarina

5.1. Composición

5.1.1. Contenido total de hexosas

El contenido total de hexosas fue determinado colorimétricamente con fenol/ H_2SO_4 utilizando D-glucosa (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) como estándar (Manzi & Esko, 1995). Este método determina cuantitativamente el contenido total de pentosas, hexosas y sus derivados y se basa en que los hidratos de carbono, cuando son calentados en presencia de ácidos fuertes, se convierten en furfurales y derivados. Estos productos son capaces de reaccionar con distintas sustancias orgánicas como el fenol, para dar compuestos orgánicos coloreados que pueden ser detectados espectrofotométricamente.

Se incubaron diluciones de perivitelina purificada, y del estándar de glucosa (Glc) en una solución de fenol al 5% en H_2SO_4 concentrado por 30 min a 37°C. Luego de la incubación, el color desarrollado se detectó midiendo absorbancia a 485 nm.

5.1.2. Contenido de ácido siálico

El contenido total de ácidos siálicos (Sias) fue determinado colorimétricamente con orcinol/ $FeCl_3$ utilizando ácido N-acetilneuramínico (MP Biomedicals, Solon, USA) como estándar (Manzi & Esko, 1995). Para ello, se incubaron 200 μ L de perivitelina purificada, y de estándar en 200 μ L de orcinol 0,2% (p/v), $FeCl_3$ 0,02 % (p/v) HCl 81,4 % (v/v), a durante 15 min a 100°C. Luego se agregó 1 mL de alcohol isoamílico, se agitó y se incubó durante 5 min en hielo. Finalmente se centrifugó y se midió la absorbancia a 570 nm de la fase superior.

5.1.3. Composición de monosacáridos

El análisis de los monosacáridos presentes en las muestras fue realizado por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GLC-FID). Para esto, se deben liberar los monosacáridos del esqueleto polipeptídico, y luego deben ser transformados en derivados volátiles (metil silil glicósidos) (Manzi, 1995).

Para la liberación de los glicósidos se incubaron muestras de proteína liofilizada en 200 μL de HCl metanólico 0,5 M (metanol:cloruro de acetilo, 0,875:25 v/v) durante 16 h a 65°C. Al cabo de la incubación se evaporó el solvente y se agregaron 200 μL de piridina:anhídrido acético (1:1, v/v), se agitó durante 1 min, se evaporó y se incubó nuevamente en 200 μL de HCl metanólico 0,5 M a 65°C durante 1 h. Finalmente se evaporó con N_2 y se secó en vacío. Junto con las muestras proteicas, se procesaron de igual modo soluciones estándar con 50 nmol de Glc, D-galactosa (Gal), D-manosa (Man), L-Fucosa (Fuc), D-xilosa (Xil), D-N-Acetilglucosamina (GlcNAc), y D-N-Acetilgalactosamina (GalNAc).

Los metil glicósidos fueron a continuación derivatizados a trimetil silil glicósidos. Para ello, se disolvieron en 100 μL de hexametildisilazano: trimetilclorosilano: piridina (2: 1: 10, v/ v/ v) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se evaporó con N_2 , se redisolvió en 500 μL de n-hexano, y se centrifugó para eliminar residuos insolubles.

Los derivados volátiles obtenidos se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso con columna capilar HP6890 equipado con un FID, (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). La columna empleada fue una DB-5, de 30 m x 0.32 mm, 0.25 μm (Hewlett Packard). El programa utilizado se detalla a continuación:

Gas portador	He
Flujo de gas	2.6 mL/min.
Temperatura de de inyección	180°C
Temperatura del FID	280°C
Temperatura inicial (T_1)	50°C
Tiempo a T_1	3 min.
Temperatura 2 (T_2)	170°C
Incremento de T_1 a T_2	20°C/min.
Tiempo a T_2	0 min.
Temperatura final (T_3)	250°C
Incremento de T_2 a T_3	6°C/min.
Tiempo a T_3	5 min.

Los monosacáridos presentes en la muestra fueron identificados por comparación de los tiempos de retención observados con los de los estándares.

5.2. Análisis de oligosacáridos

Para poder determinar la presencia de oligosacáridos O- y N- ligados a la proteína, se realizó una liberación selectiva y secuencial de los mismos, y se separaron por cromatografía líquida. Primeramente se liberaron los oligosacáridos unidos por enlace O glicosídico (O-ligados) mediante β -eliminación, que consiste en el tratamiento de la muestra con NaBH_4 en condiciones alcalinas suaves, y a continuación se liberaron los unidos por enlace N glicosídico (N-ligados) por hidrólisis alcalina (Fukuda, 1995).

5.2.1. Liberación y análisis de oligosacáridos O-ligados y N-ligados

Se incubaron 500 μg de proteína liofilizada con NaBH_4 1 M en NaOH 50 mM a 45°C durante 26 h. Al cabo de la incubación, se agregaron 3 mL de ácido acético 1 M en metanol y se evaporó con N_2 . Este paso fue repetido nuevamente, y luego de evaporar se redisolvió en 200 μL de H_2O . Finalmente, centrifugó y se retiró el sobrenadante conteniendo los oligosacáridos liberados para su posterior análisis.

Los residuos N-ligados se obtuvieron a partir del precipitado de la reacción de β -eliminación, mediante incubación en condiciones alcalinas. Para esto se disolvió el precipitado en 250 μL NaOH 1 M y se lo incubó a 100°C durante 6 h. Luego de la incubación se centrifugó y se retiró el sobrenadante conteniendo los oligosacáridos liberados para su posterior análisis.

Los oligosacáridos liberados de la proteína fueron separados por cromatografía de exclusión en una columna Sephadex G 25 de 1 x 30 cm equilibrada con H_2O bidestilada, con un flujo de 0,5 mL/min. Se sembraron 0,25 mL de cada precipitado y se colectaron 42 fracciones de 1 mL. Para detectar los oligosacáridos en esas fracciones, se sembraron 25 μL de cada una de ellas, en gotas de 1 μL , sobre una placa cromatográfica de aluminio cubierta con silica gel (Merck, Darmstadt, Germany) mantenida a 70°C mediante un block de calentamiento. Una vez

sembrada, la placa fue rociada con una solución de orcinol al 0,2% (p/v) en H₂SO₄ 2M, y calentada a 100°C durante 5 min. Las fracciones conteniendo oligosacáridos desarrollaron una coloración parda, lo cual fue analizado desitométricamente con un programa de análisis de imágenes (Sigmagel v1.0, Jendel).

5.2.2. Estudio de los patrones de glicosilación mediante afinidad de lectinas

La identidad de los oligosacáridos presentes en la escalarina se realizó un análisis de afinidad de lectinas. Las lectinas son proteínas que reconocen y se unen a estructuras glucídicas, y son utilizadas para determinar la presencia de un oligosacárido particular en células o cortes de tejido. También se las puede utilizar en proteínas purificadas, para ello hay que inmovilizar las proteínas en membranas de nitrocelulosa. El análisis de unión a lectinas es una herramienta muy útil para estudiar el patrón de glicosilación de una proteína, aunque para confirmar la presencia de un oligosacárido en particular debe utilizarse espectrometría de masa. En el presente estudio se emplearon lectinas biotiniladas, inmovilizando la proteína en nitrocelulosa por la técnica de *dot blot* (ver 3.3.3) y revelando por quimioluminiscencia.

Para esto se colocaron gotas de 10 µl conteniendo entre 0,25 y 5 µg de proteína purificada en tiras de nitrocelulosa (de aproximadamente 1 x 6 cm), y se las incubó en un ambiente húmedo a 37°C durante 30 min. A continuación se bloquearon las membranas con BSA al 3% (p/v) en PBS a 37°C durante 90 min, y se lavaron con PBST. Una vez lavadas las membranas, se incubó cada una con una lectina diferente. Para esto se colocaron gotas de 10 µl conteniendo entre 0,25 y 5 µg de proteína purificada en tiras de nitrocelulosa (de aproximadamente 1 x 6 cm), y se las incubó en un ambiente húmedo a 37°C durante 30 min. A continuación se bloquearon las membranas con BSA al 3% (p/v) en PBS a 37°C durante 90 min, y se lavaron con PBST. Una vez lavadas las membranas, se incubó cada una con una lectina diferente.

Se utilizaron 15 lectinas conjugadas con biotina: PVL, BSL1, DSL, JAC, SBA, Con A, WGA, DBA, UEA 1, PNA, RCA I, ECL, VVL, PSA and LCA (Vector Labs, Burlingame, CA) (ver Tabla IV.2 para detalles, p 95), que se incubaron con las muestras durante 16 h a 4°C en recipientes de 1 mL, disueltas en PBS. Como control se incubaron tiras con la misma

solución pero sin lectina. Luego de la incubación se realizaron 5 lavados de 5 min con PBST y se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez lavadas las tiras, se revelaron mediante quimioluminiscencia (ver 3.3.5).

5.3. Estudio de glicofomas

5.3.1. Deglicosilación enzimática

Las enzimas que liberan los oligosacáridos de las glicoproteínas, son llamadas colectivamente glicosidasas, y se diferencian por su especificidad de corte. Las que hidrolizan los enlaces glucosídicos desde el extremo del oligosacárido son llamadas exo-glicosidasas, mientras que las que hidrolizan enlaces internos, incluso desde la base del oligosacárido, se denominan endo-glicosidasas. La ventaja de los tratamientos de deglicosilación enzimáticos frente a los químicos, reside en que se preserva la estructura proteica y también la integridad del oligosacárido liberado. En este trabajo se utilizaron dos glicosidasas; una endoglicosidasa, la Peptide N-Glicanasa F (PNGase F) [peptide - N^4 - (*N*-acetyl- β -glucosaminy)] asparagine amidase (EC 3.5.1.52) de *Flavobacterium meningosepticum*), y una exoglicosidasa, la Sialidasa [exo- α -sialidase, EC 3.2.1.18, de *Clostridium perfringens*].

5.3.1.1. Deglicosilación con PNGase F

La PNGase F hidroliza los enlaces entre residuos de asparagina (Asp) y GlcNAc, de este modo libera casi todos los oligosacáridos N-ligados. Como los oligosacáridos N-ligados pueden ser muy voluminosos, frecuentemente se requiere desnaturalizar previamente a la proteína para que se produzca la hidrólisis. Las incubaciones con PNGase F (NE Biolabs, #P0745) se realizaron en condiciones nativas y desnaturalizantes. En ambos casos, se incubaron 10 μ g de proteína con 1000 UE (relación enzima/proteína = 100 UE/1 μ g) durante 20 h a 37°C, en los buffers provistos con la enzima. Como control positivo de la actividad de la enzima, se incubó además RNasa B en las mismas condiciones. Los resultados fueron analizados por PAGE y PAGE-SDS.

5.3.1.2. Sialidasa

La sialidasa es una exoglicosidasa, que hidroliza los enlaces de las unidades de Sia más externos de los oligosacáridos. Existen distintas sialidasas que varían en la eficiencia de corte dependiendo del tipo de enlace que presenten las unidades de Sia. La enzima utilizada en este trabajo (NE Biolabs, #P07205) tiene una especificidad amplia, cortando enlaces α 2-3, α 2-6 y α 2-8 glicosídicos. Las incubaciones con Sialidasa se realizaron en condiciones nativas y desnaturalizantes. En ambos casos, se incubaron 6 μ g de proteína con 300 UE (relación enzima/proteína = 50 UE/1 μ g) durante 20 h a 37°C, en los buffers provistos con la enzima. Como control positivo de la actividad de la enzima, se incubó además fetuina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) en las mismas condiciones. Los resultados fueron analizados por PAGE, PAGE-SDS y electroforesis bidimensional (2-DE) (5.3.3).

5.3.2. Deglicosilación química

La deglicosilación química es la única manera de asegurar la completa eliminación de los oligosacáridos de una glicoproteína, si bien tiene la desventaja de que, los tratamientos requeridos son sumamente agresivos para la cadena polipeptídica y se recupera solo una pequeña fracción de la muestra. En este trabajo se utilizó el ácido trifluorometansulfónico (TFMS) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), el cual, siempre que se mantengan condiciones anhidras, realiza una solvólisis del enlace glicosídico sin dañar el enlace peptídico. Se agregó además anisol anhidro, el cual actúa como *scavenger* de radicales libres protegiendo a la proteína (Edge, 2003).

Muestras de 1 mg de proteína fueron liofilizadas durante 18 h con el fin de asegurar las condiciones anhidras del experimento. Luego se las redisolvió en 150 μ L de TFMS conteniendo 10% (v/v) de anisol anhidro, y se incubó durante 3 h en hielo. A continuación se procedió a neutralizar el ácido, agregando aproximadamente 150 μ L piridina 60% (v/v) en H₂O, el progreso de la neutralización se siguió mediante el agregado de un indicador de pH (6 μ L de azul de bromofenol 0,2% p/v). Como la neutralización es sumamente exotérmica, los viales de reacción fueron refrigerados con etanol a -15°C, y la piridina (enfriada en hielo) se fue agregando en gotas y mezclando continuamente. Una vez neutralizada la mezcla, se agregaron 300 μ L de H₂O con lo cual

se produjo la precipitación de la proteína. Este precipitado fue transferido a un nuevo vial, se lo centrifugó a máxima velocidad y se lo lavó 3 veces con H₂O. Finalmente fue redisoluelto en Tris/HCl 1.5 M pH 8.5, 0.2% SDS, 0.2 mM DTT, urea 2 M. Para confirmar la completa deglicosilación, se realizó un dot blot de la muestra y se la tiñó con un kit de detección de glicoproteínas (Amersham ECL glycoprotein detection system). Los resultados fueron analizados mediante PAGE-SDS y 2-DE (5.3.3).

5.3.3. Electroforesis bidimensional (2-DE)

La electroforesis bidimensional permite separar una mezcla de proteínas según dos propiedades: el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular. En un primer paso (primera dimensión), se separan a las proteínas según su pI, mediante enfoque isoeléctrico. En un segundo paso (segunda dimensión) se las separa según sus pesos moleculares. La ventaja de esta técnica es que permite analizar un gran número de proteínas en un único gel, siendo utilizada para analizar mezclas complejas de cientos o miles de proteínas. En este trabajo, se utilizó esta técnica para detectar la presencia de isoformas de ovorubina y escalarina con distintos pI pero similar PM.

El enfoque isoeléctrico se realizó utilizando geles (sobre un soporte plástico) que contienen un gradiente de pH inmovilizado (IPG strips). Los geles se cargan con la muestra y se les aplica un campo eléctrico que fuerza a las proteínas a desplazarse hasta que llegan al pH que coincide con su pI, donde su carga neta es cero y por ende dejan de migrar (quedan enfocadas). Esa tira es luego ubicada sobre un gel de poliacrilamida/SDS, y se realiza una PAGE-SDS (ver 3.2.2) que separa a las proteínas enfocadas, en virtud de su peso molecular.

Procedimiento (Görg et al., 1988)

Para hacer un análisis proteómico las proteínas a analizar deben estar completamente desagregadas, desnaturalizadas y reducidas. Para esto se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético 10% (p/v), DTT 20 mM en acetona a -20°C durante 16 h. A continuación se centrifugó a 14.000 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con DTT 20 mM en acetona. El pellet lavado se redisolvió en 100 µL de una solución de urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (v/v), DTT 0,56 % (p/v), IPG Buffer 3–10 linear 0.5% (v/v) (GE Healthcare, Uppsala,

Sweden) y azul de bromofenol, vortexeando durante 20 min. Seguidamente, se rehidrataron con la muestra tiras Immobiline dry strips (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) de 7 cm, con gradiente lineal de pH 3 – 10, durante 16 h a temperatura ambiente. Una vez rehidratadas, las tiras fueron colocadas en un equipo de isoelectroenfoque Ettan IPGphor III (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y se procedió al enfoque isoelectroenfoque utilizando el programa recomendado por el fabricante.

Luego del enfoque, las tiras fueron equilibradas mediante dos incubaciones, primero en un buffer Tris/HCl 75 mM, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) con DTT 1% (p/v) durante 20 min y luego en el mismo buffer con iodoacetamida 4,5% (p/v) durante otros 20 min . La segunda dimensión se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes, de 1,5 mm de espesor. Las tiras fueron inmovilizadas en la parte superior del gel de poliacrilamida, con una solución fundida de agarosa 0,5% ABF 0,002%. La electroforesis se desarrolló a 30 mA por gel, y se corrió hasta la salida del frente de corrida.

Los geles fueron teñidos con una solución coloidal de Coomassie Brilliant Blue G-250. Se fijaron los geles en etanol:ácido fosfórico: H₂O (30:2:68 v/v/v) en tres lavados de 30 min cada uno. Luego se lavaron 3 veces durante 20 min en ácido fosfórico al 2% (v/v). Finalmente se incubó en 20 mL (NH₄)₂SO₄ 15% (p/v) en etanol: PO₄H₃: H₂O (18,75:2:79,25 v/v/v) durante 30 min luego de lo cual se agregaron, a esa solución, 300 µL de Coomassie Brilliant Blue G-250 2% (p/v) en H₂O (Coomassie coloidal). Se incubó a temperatura ambiente, con agitación suave durante 24 h luego de lo cual se destiñó con H₂O.

6. Estabilidad estructural

Para caracterizar estructuralmente a la nueva perivitelina, y evaluar el efecto de la temperatura en su estabilidad conformacional, así como el efecto del pH sobre la ovorubina, se realizaron mediciones de emisión de fluorescencia, absorción UV/visible y dispersión de rayos X a pequeño ángulo (SAXS).

6.1. Parámetros de estructura global de SC

La escalarina fue estudiada por dispersión de rayos X a pequeño ángulo (SAXS), realizándose los experimentos en la línea D02A-SAXS2 del *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron*, Campinas, Brasil.

Esta técnica permite obtener información estructural de moléculas en solución, permitiendo realizar modelos de baja resolución que representan la forma global de la molécula. Si bien no es posible obtener mediante este método la estructura atómica de la molécula, la técnica no requiere cristalizar la molécula y permite obtener información estructural aún desconociendo la estructura primaria. En el caso de las perivitelinas estudiadas en este trabajo, no sólo no se dispone de la secuencia aminoacídica, sino que además se trata de un oligómero complejo de alto PM y no completamente caracterizado, cuya cristalización está fuera de nuestro alcance.

En los experimentos de SAXS, una solución de proteína es irradiada con un haz de rayos X, cuyos fotones, al impactar con los electrones de la molécula, son dispersados. Estos fotones dispersados se registran en función del ángulo al cual fueron dispersados, que es calculado teniendo en cuenta la distancia entre la muestra y el detector.

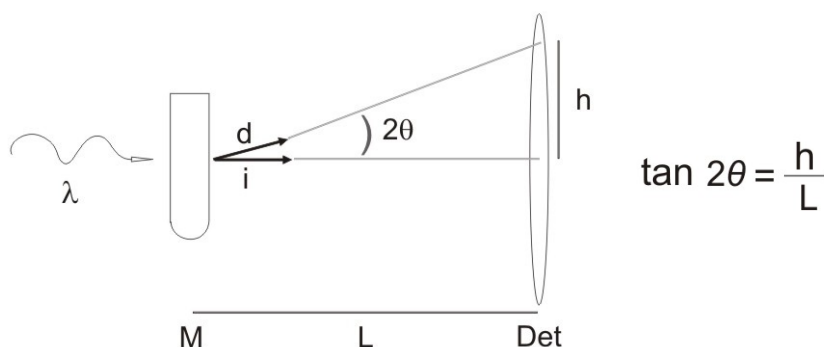


Fig. II.1. Esquema del experimento SAXS. M, muestra; Det, detector; i, haz no dispersado (incidente); d, fotones dispersados.

A partir de este ángulo y de la longitud de onda (λ) del haz incidente, se calcula el parámetro Q:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \times \sin \theta$$

El contraste electrónico entre una proteína y el solvente es pequeño. Más aún, trabajando con muestras muy diluidas para evitar la interacción entre las partículas y la dispersión múltiple de fotones, la mayor parte del haz incidente atraviesa la muestra sin ser dispersada haciendo difícil la detección de los fotones dispersados a ángulos muy pequeños (cerca del haz incidente). Por esto es necesario que el haz sea muy puntual, cosa que se logra con una fuente de rayos X muy potente que permita su adecuada colimación. A menudo la fuente de rayos X utilizada en estos experimentos es luz sincrotrón, luz emitida por electrones acelerados a velocidades cercanas a la de la luz, la cual es monocromada para obtener longitudes de onda cercanas a 1 Å (rayos X).

El diagrama de dispersión de rayos X de la muestra fue registrado mediante un detector bidimensional MARCCD, y la imagen obtenida fue analizada con el programa FIT2D v12.012 (Hammersley, 1997) que arroja valores de intensidad (I) en función de Q.

La dispersión a ángulos pequeños brinda información sobre la estructura de la molécula, y permite calcular algunos parámetros, como su radio de giro (R_g). Dicho parámetro se calcula por linealización de la región de bajo Q, conocida como "región de Guinier" ($\ln(I(Q))$ vs Q^2 , $Q \times R_g < 1$).

Los datos de dispersión permiten estimar la globularidad de las proteínas, para ello, los datos se grafican como $I(Q) \times Q^2$ vs Q. Esta representación se conoce como "gráfico de Kratky" y permite determinar de manera cualitativa la globularidad de la proteína. Para una proteína globular este gráfico presenta forma de campana; cuando la proteína pierde estructura por alguna perturbación la forma de campana de este gráfico se modifica, llegando a alcanzar una forma "sigmoidea" para proteínas desnaturalizadas.

Para estimar la dimensión máxima de la molécula, se calculó la distribución de pares de distancias $P(r)$, que representa las frecuencias de las distancias entre elementos de pequeño volumen dentro de la partícula dispersante. La $P(r)$ es sensible a la simetría de la molécula, y llega a cero en el valor correspondiente a la dimensión máxima de la misma. Esta distribución fue calculada por inversión de Fourier de la intensidad dispersada $I(Q)$ utilizando el programa GNOM (Svergun, 1992).

6.1.1. Condiciones de medida

Se midió la dispersión de rayos-X a bajo ángulo de escalarina nativa así como de apo-escalarina (ver 4.2.1), en concentraciones de 2,0 a 0,3 mg/mL.

La longitud de onda utilizada fue de 1,488 Å, la distancia muestra - detector fue de 1.498,9 mm y las medidas se realizaron a una temperatura de 25 °C. Cada experimento constó de tres medidas de 15 min para cada proteína y dos medidas del buffer, una antes y una después de la muestra. Las medidas fueron corregidas por la absorción de la muestra, el decaimiento de la intensidad del haz, y la dispersión del buffer.

6.2. Efecto de la temperatura sobre la estructura de escalarina

La termo estabilidad de la escalarina fue estudiada por SAXS. Se utilizaron las mismas condiciones de medida que las indicadas en 6.1, y se registró la dispersión de RX de la muestra a distintas temperaturas entre 25°C y 90°C, calentando la celda de medida con un baño termostatzado (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Alemania). Para cada temperatura, se tomaron 3 medidas de 10 min para la proteína, midiéndolo la dispersión del buffer antes y después del experimento.

6.3. Estabilidad de la SC y OR frente al pH

Con el fin de evaluar la estabilidad de las perivitelininas en distintas condiciones de pH, se las incubó en soluciones buffer que cubrieran un amplio rango de pH y se realizaron mediciones de SAXS, espectroscopía de absorción y de emisión de fluorescencia para estudiar los cambios producidos.

6.3.1. Preparación de las muestras

Se prepararon soluciones madre de escalarina y ovorubina de concentración conocida en H₂O milliQ que luego fueron mezcladas en relación 1:1 (v/v) con soluciones buffer a pH: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 12.0. Los buffers, preparados en H₂O milliQ, tuvieron las siguientes composiciones:

pH 2.0	PO ₄ H ₃ 0,1 M, / NaH ₂ PO ₄ 0,1 M
pH 4.0	ácido cítrico / Na ₂ HPO ₄ 0,2 M
pH 6.0	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M / NaOH
pH 8.0	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M / NaOH
pH 10.0	Na ₂ HPO ₄ 0,1 M / NaOH
pH 12.0	Na ₂ HPO ₄ 0,1 M / NaOH

Las soluciones proteicas a cada pH fueron incubadas, al menos, 18 h a 4°C antes de realizar las mediciones. También se prepararon blancos, mezclando iguales volúmenes de cada uno de los buffers con H₂O milliQ. Las muestras para cada medida espectroscópica se prepararon a partir de una misma solución madre de proteína, de este modo, se evitó corregir las medidas por la concentración de muestra.

Para evaluar el efecto a tiempos cortos, se realizó una incubación de OR a pH 2,5 que se incubó durante 30 min, y se midió sólo por SAXS.

6.3.2. Medidas de espectroscopía de absorción

Se midieron espectros de absorción entre 300 y 600 nm, de las soluciones de ovorubina y escalarina para los diferentes pH. Para cada uno se registraron tres espectros de proteína y tres del buffer, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso

óptico. Los espectros de la proteína fueron promediados y corregidos por el promedio del buffer correspondiente.

6.3.4. Medidas de emisión de fluorescencia (Lakowicz, 1991)

La fluorescencia es un fenómeno de luminiscencia, es decir desexcitación de moléculas por emisión de luz. Esto es, ciertas moléculas (los fluoróforos) cuando absorben fotones, promueven alguno de sus electrones a estados superiores de energía; cuando estos vuelven a su estado basal emiten energía en forma de luz (fluorescencia). Esta desexcitación ocurre en dos pasos, el electrón excitado desciende primeramente a un estado excitado de menor energía, disipando entonces parte de la energía en forma de calor, un proceso denominado conversión interna. A continuación retorna al estado basal con la emisión de fotones, o fluorescencia. De esta manera, los fotones emitidos son de menor energía que los absorbidos, con lo cual la λ de emisión siempre será mayor que la λ de excitación, este fenómeno es llamado corrimiento de Stokes.

Debido a que tres de los 20 aminoácidos estándar presentes en las proteínas son fluoróforos, la tirosina (Tyr), la fenil alanina (Phe) y el triptófano (Trp), las proteínas que cuenten con ellos (la gran mayoría) tendrán propiedades fluorescentes. De estos 3 residuos el que exhibe una mayor fluorescencia es el Trp, por lo que contribuye en mayor medida a la emisión de la proteína. La λ de máxima absorción (a la que se excita) es 280 nm y su máximo de emisión depende del entorno en que se encuentra: si está en un entorno muy hidrofóbico (cuando la proteína está plegada) es \approx 320 nm y si está en un entorno polar (como en la proteína desplegada) la λ de emisión es \approx 350 nm. Así, se puede seguir el curso del desplegado proteico midiendo el corrimiento en el máximo de emisión de los residuos de Trp, que se irá corriendo desde λ de emisión del estado nativo, hacia valores mayores.

6.3.4.1. Condiciones de medida

Se midieron espectros de emisión de fluorescencia de escalarina y ovorubina a diferentes valores de pH. La excitación se realizó a 295 nm y se registró la emisión de fluorescencia entre 310 y 400 nm, el “bandpass” fue fijado en 5 nm y la

velocidad de barrido en 100 nm/seg. La celda de medición fue termostatzada a 25°C con un baño de agua circulante. Para cada punto de pH se registraron tres espectros que fueron promediados y corregidos por el espectro del buffer correspondiente.

6.3.5. Medidas de SAXS

La estabilidad de ovorubina y escalarina en diferentes pH también fue estudiada por SAXS. Las condiciones de medida utilizadas fueron las indicadas en 6.1.1, registrándose la dispersión de rayos X de la muestra en tres medidas de 10 min y la del buffer correspondiente antes y después de la muestra. Los espectros fueron corregidos y analizados como se describió en 6.1.1.

7. Experimentos funcionales

Los experimentos funcionales realizados tuvieron tres objetivos, por un lado investigar el posible rol de la escalarina como protector de moléculas antioxidantes, tal como fuera observado para la ovorubina (Dreon *et al.*, 2004b); por otro lado, estudiar la capacidad de la ovorubina como agente inhibidor del crecimiento bacteriano; y finalmente, teniendo en cuenta la estabilidad conformacional de ambas perivitelinias en condiciones ácidas (Cap. V), se realizaron experimentos de digestión gastrointestinal *in vitro*.

7.1. Protección del componente carotenoide

Se preparó apo-SC, como fuera descrito en 4.2.1. A partir de esta, se preparó escalarina reconstituída con astaxantina comercial. Para ello se incubaron 2 mg de apo-escalarina con 20 µl de una solución de astaxantina estándar (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) 400 µg/mL en DMSO a 25°C, durante 1 h, en oscuridad. La astaxantina no unida a la apo-escalarina fue eliminada por cromatografía de exclusión molecular,

utilizando una columna de Sephadex G-25 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) (1 x 25 cm). Para ello, la columna fue equilibrada con 50 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y la muestra fue aplicada y eluída con el mismo buffer. El eluato fue colectado monitoreando la absorbancia a 280 nm y las fracciones conteniendo la escalarina reconstituida se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Como control de la integridad de esta escalarina reconstituida, se comparó la movilidad electroforética de ésta con la de la escalarina nativa.

Para estudiar el efecto protector de la escalarina sobre sus componentes carotenoides, se prepararon soluciones 0,5 mg/mL de escalarina nativa y escalarina reconstituida en buffer, y una solución de astaxantina 23 µg/mL en buffer vehiculizada en DMSO. Se expuso a las tres soluciones a luz fluorescente directa, a 27°C durante 440 min, siguiendo el decaimiento del carotenoide midiendo absorbancia a 490 nm, máximo de absorción de la astaxantina en DMSO.

7.2. Inhibición del crecimiento bacteriano

La capacidad de la ovorubina y del citosol de huevo de *P. canaliculata* para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, fue evaluada en medio nutritivo líquido y sólido, y en medio mínimo.

7.2.1. Cepas utilizadas

Los microorganismos utilizados provienen de la colección de cepas de la Dra. Carmen Sanchez-Rivas, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA.

Gram negativas: *Escherichia coli* (cepa: JM109) y *Salmonella typhimurium*.

Gram positivas: *Lactobacillus casei* y *Bacillus subtilis* 168 (cepa salvaje o WT y DB104 mutante triple proteasa negativa (Kawamura & Doi, 1984)).

7.2.2. Medios de crecimiento utilizados

E. coli, *S. typhimurium* y *B. subtilis* se cultivaron 24 h en medio LB [NaCl 1% (p/v), triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v)] a 37°C con agitación.

L. casei se cultivó en medio MRS sin agitación para mantener el medio con bajo contenido de oxígeno [Peptona de caseína 19 g/L, Extracto de levadura 4 g/L; extracto de carne 8 g/L, D (+) Glucosa 20 g/L, Fosfato de Potasio di-básico 2 g/L, Citrato de di-Amonio 2 g/L, Tween-80 1 g/L, Acetato de sodio 5 g/L, Sulfato de magnesio 0,2 g/L, Sulfato de manganeso 0,04 g/L].

Para los ensayos de actividad proteolítica, *B. subtilis* se cultivó en medio NB de caldo nutritivo diluido 1/4 (medio semi-pobre) y con el agregado de leche descremada 2% (p/v) para evaluar el halo de degradación.

7.2.3. Ensayos en medio nutritivo sólido

Estos ensayos se realizaron sembrando las diferentes cepas en placas de Petri compuestas con diferentes medios y colocando gotas de 10 µl con distintas concentraciones de proteína OR sobre ellas.

Cultivos de 24 h, fueron diluidos 1/5 en el mismo medio fresco y se lo incubó nuevamente a 37°C durante 1 h, para asegurar que las bacterias estuvieran en la fase exponencial del crecimiento.

Se prepararon tres placas con el mismo medio que se utilizó para el crecimiento (LB o MRS agarizado). Se sembraron en forma homogénea utilizando esferas de vidrio, 50 µL de cultivo y se dejó reposar 30 min. Se sembró una placa por cada especie utilizada. A continuación, en cada placa se colocaron gotas de 10 µL conteniendo 20 µg, 10 µg y 2 µg de ovorubina. También se colocaron gotas de 10 µL conteniendo, 30 µg y 6 µg de citosol de huevo de *P. canaliculata*. Como controles, se sembraron 10 µL de buffer de suspensión de la ovorubina estéril. Se incubó la placa 18 h a 37°C y se evaluó la aparición de halos de inhibición de crecimiento.

7.2.4. Medio nutritivo líquido

La inhibición del crecimiento bacteriano también se midió en medio líquido, utilizando las bacterias *E. coli* y *B. subtilis*.

Las bacterias fueron cultivadas en medio LB con agitación a 37°C durante una noche. Al otro día, los cultivos fueron diluidos 1/20 en medio fresco y se los incubó nuevamente a 37°C durante 90 min, para asegurar que las bacterias estuvieran en la fase exponencial del crecimiento y obteniendo una DO_{600nm} inicial baja (0,19). Se

repartieron 1 ml/ tubo de 12 cm en los cuales se agregó ovorubina con las siguientes concentraciones: 100 µg, 20 µg, 10 µg, o 2 µg. También se agregaron 60 µg o 6 µg de citosol de huevo de *P. canaliculata*. Como control se agregaron 100 µL de PBS estéril. Se incubaron los tubos con agitación a 37°C y se midió la DO_{600nm} a las 2 h, 4 h y 24 h.

7.2.5. Medio mínimo con leche para detección de actividad proteolítica

Para determinar si el efecto inhibidor de proteasas de la ovorubina podría inhibir el crecimiento bacteriano, se realizó un ensayo en medio semi pobre. Se agregó leche al medio a fin de detectar la actividad proteolítica como un halo de degradación. El microorganismo utilizado fue *B. subtilis*, dado que ha sido reportado para ovorubina la inhibición de al menos una de sus proteasas, la subtilisina (Norden, 1972). Además como control negativo se realizó el mismo ensayo utilizando una cepa de *B. subtilis* triple mutante de proteasas (cepa DB104).

Se realizaron cultivos de *B. subtilis* en medio LB de 24H y en la placa de medio semipobre se sembraron gotas de 30 µL conteniendo 15 µL de cultivo más 15 µL de ovorubina (150 µg o 30 µg) o citosol de huevo de *P. canaliculata* (90 µg o 18 µg). Como control se utilizaron 15 µL de PBS estéril. Se incubaron las placas 24 h a 37°C y se evaluó el desarrollo de crecimiento y el tamaño de los halos de degradación.

7.3. Resistencia a la proteólisis

7.3.1. Digestión con pepsina

La digestión con pepsina (EC 3.4.23.1) se realizó incubando 10 µg de perivitelina con 1,82 UE de pepsina gástrica porcina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), en solución a pH 2.5 ajustada con HCl, a 37°C durante 2 h. También se realizó una incubación en iguales condiciones pero preincubando las perivitelinas por 24 h en buffer a pH 2,5 (según la formulación descrita en 6.3.1). Como control positivo de la enzima se digirió BSA o mioglobina en iguales condiciones.

7.3.2. Digestión con tripsina

Para la digestión con tripsina (EC 3.4.21.4) se incubaron 10 µg de perivitelina con 9 UE de tripsina pancreática bovina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), en buffer Tris/HCl pH 8.0, a 37°C durante 2 y 16 h. Como control positivo de la enzima se digirió BSA o mioglobina en iguales condiciones.

7.3.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Finalmente se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro*, teniendo en cuenta las relaciones proteasa/proteína descritas por Moreno *et al.* (2005b). Como control de la actividad enzimática se incubó en iguales condiciones BSA o mioglobina equina (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). El pH de las soluciones fue controlado con azul de bromotimol como indicador.

Para la fase gástrica se preparó un fluido gástrico simulado (FGS) conteniendo NaCl 150 mM llevado a pH 2.5 con HCl. Se disolvieron 200 µg de perivitelina en 100 µL de FGS y se agregaron 36,4 UE de pepsina (relación pepsina/perivitelina 182UE/1 mg) y se incubó a 37°C durante 2 h. Terminada la incubación, se agregaron 5 µL de Tris/HCl 1,5 M pH 8,5 para terminar la fase gástrica desnaturalizando irreversiblemente la pepsina, y se tomó una alícuota de 10 µL para su análisis.

Seguidamente se realizó la fase duodenal simulada, para lo cual se agregó a la solución anterior 4,1 µL de una sal biliar, taurocolato de sodio (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), 0,125 M, y 11,7 UE de tripsina (relación tripsina/perivitelina 900UE/1 mg) tras lo cual se incubó a 37°C durante 2 h. Al cabo de la incubación se agregó buffer muestra para PAGE-SDS y se calentó a 100°C durante 5 min. Los resultados fueron analizados por PAGE-SDS.

III.

**Aislamiento y caracterización
de una perivitelina de
*Pomacea scalaris***

INTRODUCCIÓN

Como se mencionara en la introducción general, no existen estudios sobre perivitelinas de gasterópodos que permitan interpretar las propiedades de la OR en un contexto comparativo. Por este motivo, se decidió estudiar el FPV de otra especie de *Pomacea* que presentara una estrategia de oviposición aérea, para determinar si alguna de sus perivitelinas mostraba similitudes con la OR. La especie elegida fue *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1835) dado que presenta una estrategia de oviposición similar a *P. canaliculata*, siendo los huevos expuestos a condiciones de desarrollo similares (Bonetto & Ezcurra de Drago, 1966). Además, *P. scalaris* es una especie bien definida desde el punto de vista morfológico, por lo que su identificación taxonómica es inequívoca, resultando fácilmente discernible del resto de las especies de *Pomacea*, un género complicado a este respecto.

P. scalaris presenta una conchilla umbilicada, sólida, de color castaño oscuro a violáceo, a veces con una marcada banda amarillo pajizo en la parte superior de cada anfracto. La espira es breve, sub aguda, de ápice persistente y escalariforme. Anfractos angulosos, planos por encima del hombro. Comparada con otras especies del género, particularmente *P. canaliculata*, la conchilla es menos globosa, más sólida, diferenciándose claramente por la peculiar morfología de los anfractos (Hylton Scott, 1957). Las oviposiciones de *P. scalaris* difieren de las de *P. canaliculata* en la coloración, anaranjadas, y también por ser más pequeñas y más compactas, tanto que los huevos se deforman adquiriendo un contorno poligonal (Bonetto & Ezcurra de Drago, 1966).

La distribución de *P. scalaris* es más restringida que la de *P. canaliculata*, siendo sus localidades extremas Santa Cruz de la Sierra, Bolivia y Ensenada, prov. de Buenos Aires, Argentina. En nuestro país se distribuye en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco y Formosa. También ha sido citada en Paraguay (Hylton Scott, 1957).

En este capítulo se presentan los estudios de aislamiento, purificación y caracterización bioquímica y biofísica de la perivitelina mayoritaria de los huevos de *P. scalaris*. Estos resultados constituyen la primera descripción bioquímica de una molécula realizada en esta especie.

RESULTADOS

Los ejemplares de *P. scalaris* llevados al laboratorio desovaron casi inmediatamente, depositando sus puestas sobre los vidrios de los acuarios, durante el día o la noche. En acuerdo con la literatura, estas puestas son fácilmente diferenciables de las de *P. canaliculata*, presentando una coloración anaranjada, con huevos poligonales y pequeños (Fig. III.1). Durante el procesamiento de estos huevos, se pudo notar que la dureza de los mismos es algo mayor que la de los de *P. canaliculata*, observándose una abundante cantidad de cáscaras en el pellet de la primera centrifugación del homogenato.

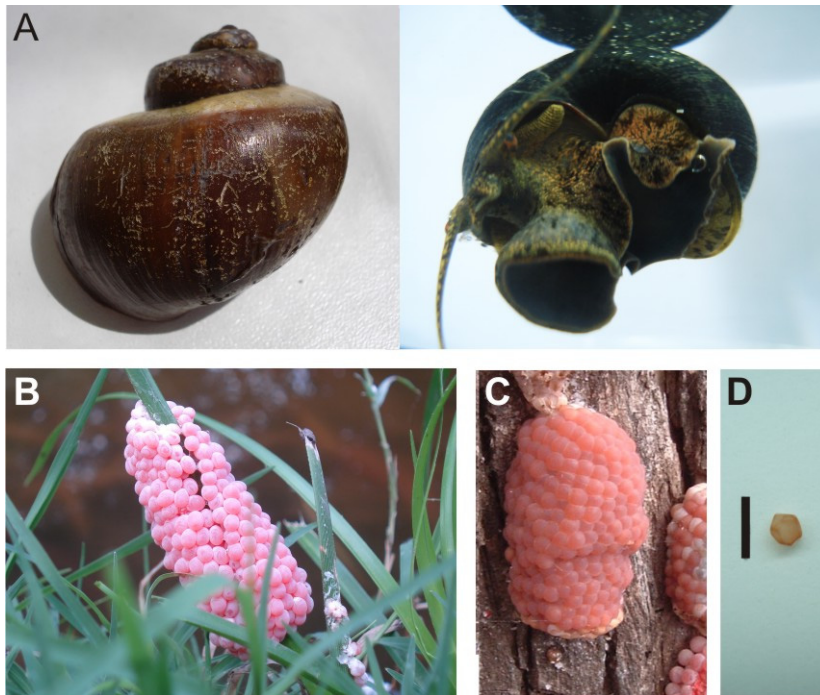


Figura III.1. *Pomacea scalaris*, diferencias de coloración con las puestas de *P. canaliculata*. A, conchilla y ejemplar vivo de *P. scalaris*; B, desove de *P. canaliculata*; C, desove de *P. scalaris*; D, huevo de *P. scalaris* (barra = 5 mm).

1. Aislamiento y purificación de perivitelinias

El citosol de huevos de *P. scalaris* fue preparado por homogeneización y centrifugación diferencial. El contenido proteico de este citosol fue de 7,6 mg de proteína/g de huevo, y presentó, en PAGE-nativo, dos bandas proteicas principales, una de ca. 370 kDa, y otra de ca. 100 kDa (Fig. III.2.A). El análisis densitométrico de estos geles mostró que la proteína de 370 kDa es la mayoritaria, representando el 60% de la proteína total.

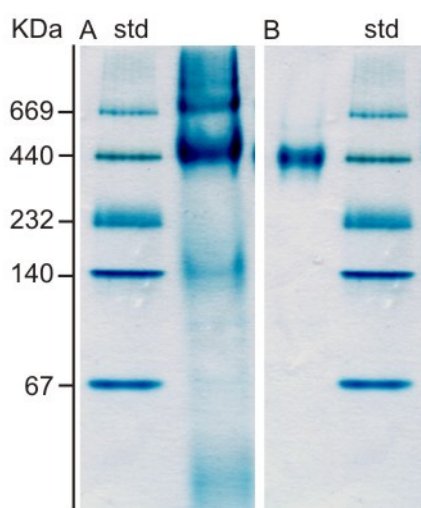


Figura III.2. Gel de PAGE-nativo de citosol de huevo de *P. scalaris* y SC purificada. A, citosol de huevo de *P. scalaris*; B, SC purificada. Std, estándar de PM.

Para aislar estas proteínas, el citosol fue ultracentrifugado en gradiente de densidad de NaBr, al cabo de lo cual se observó a simple vista una banda de coloración anaranjada (Fig. III.3.A). El perfil proteico de esta centrifugación (Fig. III.3.B) reveló la presencia de una fracción de $\delta = 1,26$ g/mL, que se correspondía con la banda coloreada, y una fracción incolora de $\delta = 1,22$ g/mL. Cuando estas fracciones fueron analizadas por PAGE-nativo se observó que la fracción de $\delta = 1,22$ g/mL corresponde a una proteína de 100 kDa, y la fracción de $\delta = 1,26$ g/mL a una proteína de 370 kDa (Fig. III.2.B).

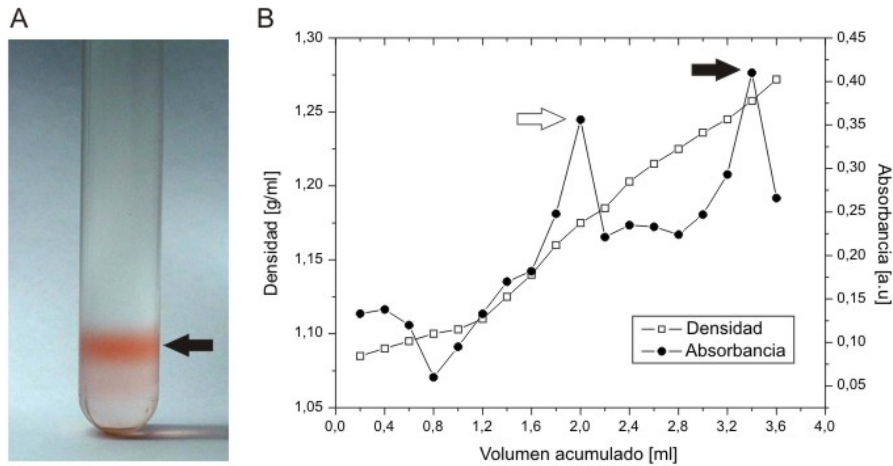


Figura III.3. Ultracentrifugación en gradiente de densidad del citosol de huevos de *P. scalaris*. A, tubo luego de la centrifugación donde se observa una banda coloreada (flecha); B, perfil proteico y de densidades del tubo de centrifugación, se tomaron fracciones de 0,2 mL desde el tope del mismo y se midió absorbancia a 280 nm. Se observan dos picos proteicos principales (flechas), uno de ellos correspondiente con la fracción coloreada (flecha llena).

La fracción coloreada obtenida por ultracentrifugación fue purificada por cromatografía de exclusión, obteniéndose un único pico mayoritario. Cuando este pico fue analizado por PAGE-nativo se observó que correspondía a la proteína de 370 kDa, que llamaremos escalarina (SC) (Fig. III.2.B). En este análisis se observaron también algunas bandas de muy alto PM, y se sospechó que correspondían a agregados de esta proteína (Fig. III.4). Para comprobarlo se cromatografiaron muestras de SC provenientes de tres tratamientos: 1) recién cromatografiadas; 2) conservadas por cinco días a 4°C; 3) congeladas a -20°C y descongeladas. Las muestras de los tratamientos 1 y 2 mostraron un único pico mientras que las del tratamiento 3 mostraron picos extra, de alto PM, el análisis por PAGE-SDS de las tres fracciones mostró un mismo perfil. El resultado de estas pruebas verificó la tendencia a la agregación que presenta la SC. Por este motivo se decidió utilizar en los experimentos posteriores, proteína fresca recién purificada y mantenida a 4 C°.

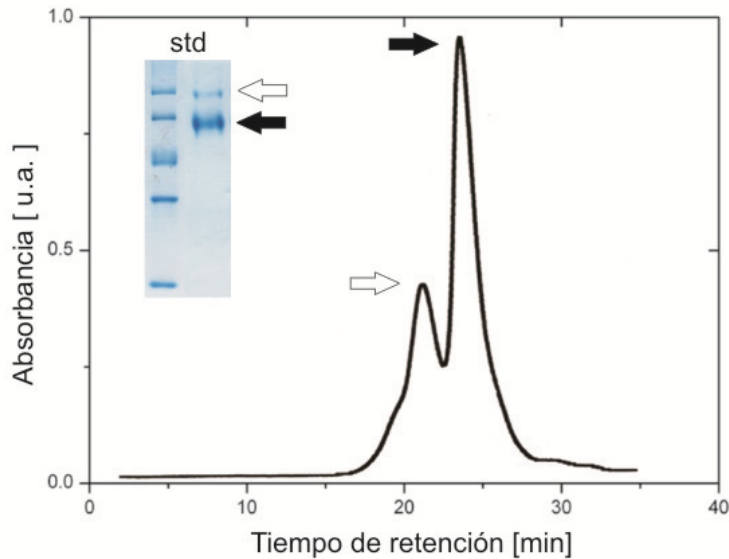


Figura III.4. Perfil de cromatografía de exclusión (FPLC), que muestra la fracción correspondiente a SC (flecha llena) y su agregado (flecha vacía). El recuadro muestra un gel de PAGE-nativo del mismo perfil, las flechas indican las mismas fracciones. Std, estándar de PM.

2. Caracterización proteica de SC

La composición de subunidades de la SC fue analizada por PAGE-SDS determinándose la presencia de tres subunidades, con PM de $35,2 (\pm 3,7)$, $28,2 (\pm 1,7)$ y $24,3 (\pm 1,3)$ kDa. La abundancia relativa de dichos monómeros, determinada densitométricamente, fue de 14,5, 37,3 y 48,2%, respectivamente. Estas subunidades se observan en los gels de electroforesis como bandas difusas y anchas, que habitualmente se asocian a la presencia de proteínas modificadas por glúcidos.

Para determinar si las subunidades de SC presentaban puentes disulfuro entre ellas, se desnaturalizó la proteína en condiciones no reductoras, y se comparó este perfil electroforético con el de la proteína completamente desnaturalizada. No se observaron diferencias entre los perfiles electroforéticos de ambos tratamientos, indicando la ausencia de puentes disulfuro entre las subunidades, lo que indica que las subunidades que integran este oligómero están unidas solo mediante enlaces no covalentes (Fig. III.5).

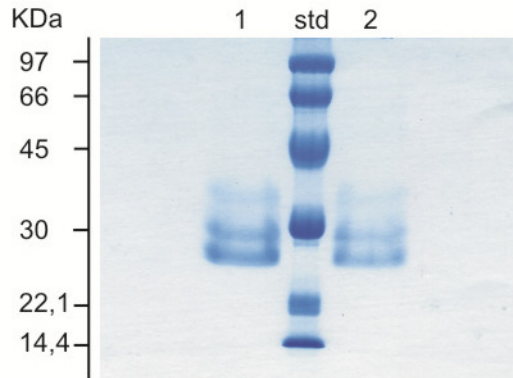


Figura III.5. Subunidades de SC y ausencia de puentes disulfuro entre ellas. Se muestra un gel de PAGE-SDS donde la SC fue desnaturalizada con (1) y sin (2) agente reductor de puentes disulfuro (DTT). Std, estándar de PM.

3. Contenido de glúcidos

El análisis de contenido total de hexosas confirmó la presencia de glúcidos asociados, como lo indicaba la forma de las bandas en los geles electroforéticos de la SC. De hecho, es una proteína altamente glicosilada, con un contenido total de glúcidos del 21% (p/p), que se estudian en el capítulo IV.

4. Lípidos

Los lípidos presentes en la SC fueron extraídos con solventes y su masa fue determinada por gravimetría. Este análisis mostró un bajo contenido lipídico, representando sólo un 0,7% de la masa.

El extracto lipídico fue luego estudiado por HPTLC, donde se observó presencia de esteroides libres y esterificados, triglicéridos, diglicéridos y lípidos polares. En este análisis también se observó que los pigmentos presentaban un perfil complejo, con tres manchas coloreadas resueltas en la placa de HPTC, con el sistema de solventes empleado. La fracción de pigmento con polaridad más baja se observó con un Rf semejante al de AGL, mientras que la fracción de polaridad más alta presentó un Rf igual al de los lípidos polares; esta última podría representar pigmentos con algún grado de degradación.

Posteriormente las clases de lípidos fueron cuantificadas mediante TLC-FID (Tabla III.1). Se observa que los pigmentos carotenoides fueron el componente predominante, sumando un 40% del total considerando como tales a la astaxantina y al pigmento no identificado de Rf similar al del ácido graso libre (ver detalles de la composición de carotenoides más adelante en este capítulo). Los siguientes lípidos en importancia fueron los lípidos polares, con un 30%, que no pudieron identificarse adecuadamente debido a que co-cromatografiaban con parte de los pigmentos. Se determinó asimismo un 11% de esteroides libres y diacilglicéridos.

Tabla III.1. Composición por clases lipídicas de SC. Composición porcentual determinada por TLC-FID, expresada como media de análisis triplicados \pm SD. a, fundamentalmente pigmento, según el análisis mediante HPTLC (ver texto).

Clases de lípidos	% (p/p)
Esteroides esterificados	9,6 \pm 1,4
Triacilglicéridos	6,7 \pm 1,0
Acido graso libre + pigmento carotenoides ^a	14,3 \pm 2,0
Esteroides libres + diacilglicéridos	11,2 \pm 3,7
Astaxantina	27,2 \pm 2,9
Lípidos polares	31,3 \pm 6,0

5. Caracterización de carotenoides

El análisis de los pigmentos del FPV mostró que todos están asociados a la SC, ya que tanto los carotenoides extraídos del FPV como los extraídos de la SC purificada mostraron la misma composición cuali-cuantitativa. La SC purificada

en solución acuosa presenta una coloración anaranjada, lo que se refleja en su espectro de absorción como dos bandas principales con máximos a 383 nm y a 494 nm, esta última con dos “hombros” (la presencia de dos o tres hombros en la banda de absorción de un carotenoide se denomina “estructura fina”) (Fig. III.6.A). Cuando se analizaron los carotenoides extraídos de la proteína, se observó que su espectro de absorción era marcadamente diferente, con una única banda con dos máximos a 465 nm y 490 nm y un “hombro” (Fig.III.6.A). La presencia de estructura fina en el espectro del extracto, indicaba la presencia de otro carotenoide además de la astaxantina, ya que esta última no presenta dicha característica espectral.

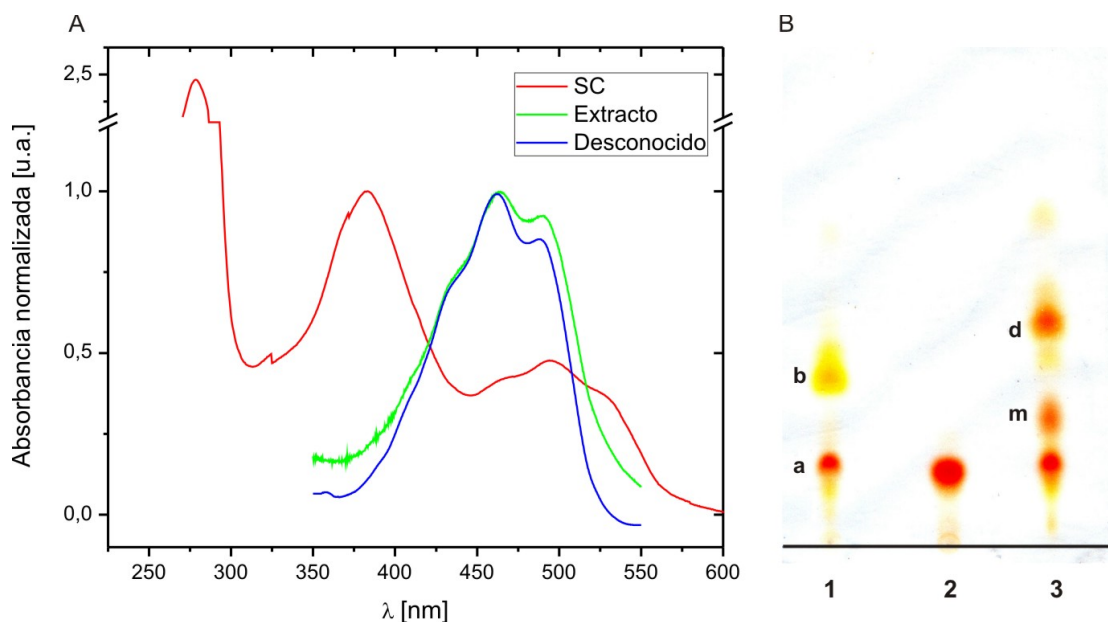


Figura III.6. Carotenoides de SC, espectros de absorción y cromatografía. A, espectros de absorción de SC, del extracto de sus carotenoides y del carotenoide desconocido; B, HPTLC del extracto de carotenoides de SC (1), estándar de astaxantina (2), extracto de carotenoides de OR para comparar (3). a, astaxantina libre; b, carotenoide desconocido; m, monoéster de astaxantina, d, diéster.

El extracto de carotenoides fue entonces analizado por HPTLC, juntamente con una muestra de los carotenoides de la OR y un estándar del carotenoide astaxantina (Fig. III.6.B). Este análisis mostró que la SC presenta un carotenoide que co-migra con el estándar de astaxantina (Fig. III.6.B, mancha a), y también otro carotenoide, amarillento, con Rf mayor, es decir, de menor polaridad (Fig.

III.6.B, mancha b). Este último, no coincide con los monoésteres y diésteres de la astaxantina presentes en la OR. Ambas manchas fueron raspadas y eluidas de la placa para registrar sus espectros de absorción. La mancha a mostró espectros de absorción coincidentes con el estándar de astaxantina, mientras que la mancha b mostró un espectro de absorción con estructura fina, con dos máximos a 462 nm y 488 nm y un “hombro” (Fig. III.6.A). La identidad de este carotenoide no pudo ser asignada, ya que no se realizaron estudios de espectrometría de masas.

El análisis densitométrico de la placa cromatográfica mostró que la astaxantina libre es el carotenoide predominante, representando el 62% del total, seguido del carotenoide no identificado con 38%.

6. Dimensiones y forma de la Escalarina

La estructura de la SC en solución con y sin sus carotenoides fue estudiada mediante SAXS. A partir del ajuste lineal en la región de bajo Q, o región de Guinier ($\ln(I(Q))$), se calculó un radio de giro (R_g) de $49 \pm 4,5 \text{ \AA}$ para la holo-SC y de $50 \pm 2,3 \text{ \AA}$ para la apo-SC. En la figura III.7.A se presentan los datos como gráficos de Kratky ($I(Q) \times Q^2$ vs. Q), mostrando para la holo-SC una forma de campana, típica de una proteína globular y compacta. El gráfico de Kratky de apo-SC es similar, lo cual indica que la remoción del carotenoide no afecta la globularidad de la molécula.

La distribución de pares de distancias calculada a partir de los datos de holo-SC (Fig. III.7.B) es coincidente con la de una proteína globular pero levemente elongada, con una dimensión máxima de 200 \AA .

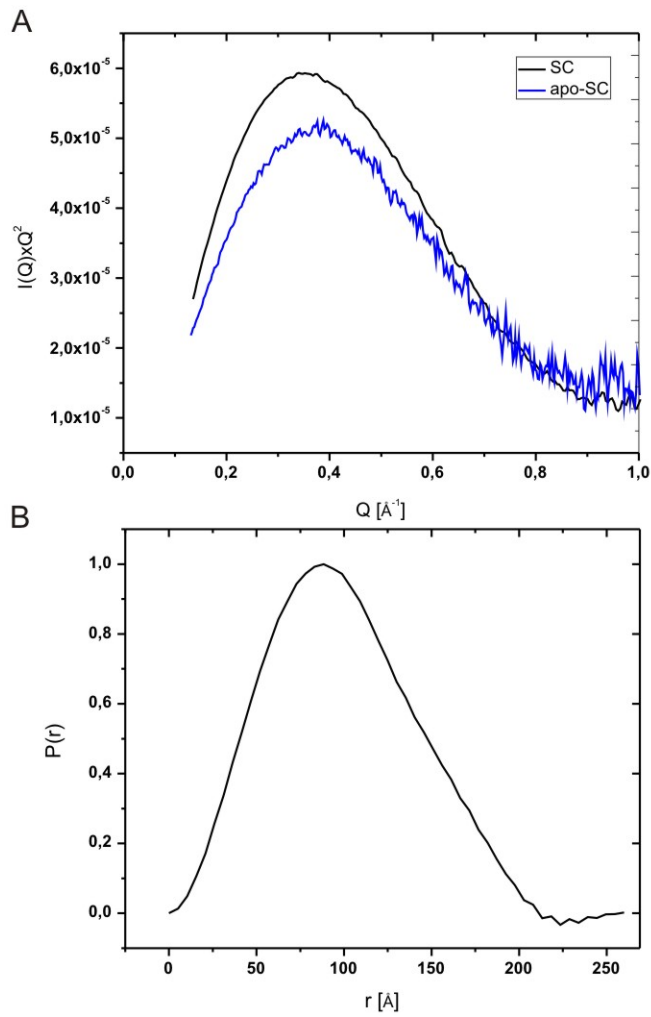


Figura III.7. Parámetros de estructura global de SC medida por SAXS. A, gráfico de Kratky de SC y apo-SC. B, distribución de pares de distancias $P(r)$ de SC.

7. Reactividad cruzada con anticuerpos policlonales

Se realizaron análisis con anticuerpos policlonales para determinar si existía reactividad cruzada entre las perivitelinas de *P. canaliculata* y *P. scalaris*. Los citosoles de huevo de ambas especies fueron separados por PAGE-nativo, transferidos a membranas e incubados con anticuerpos anti-SC, anti-OR y anti-PV2. Se observó que ninguno de los anticuerpos reconoció las perivitelinas de la otra especie (Fig. III.8).

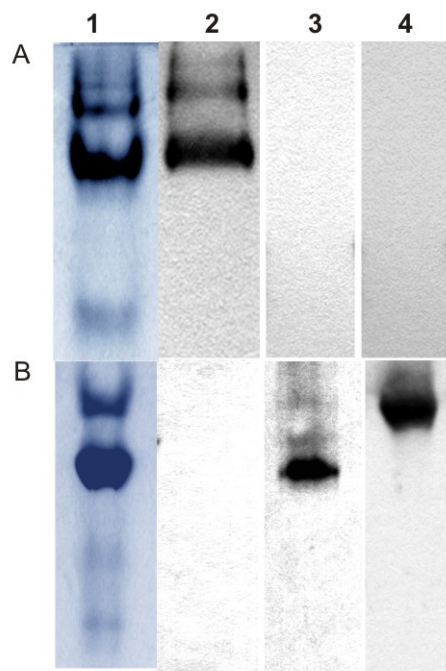


Figura III.8. Reactividad cruzada entre perivitelinas de *Pomacea*. Se muestran *western-blots* de citosol de huevo de *P. scalaris* (A) y *P. canaliculata* (B) incubados con distintos anticuerpos policlonales. 1, gel de PAGE-nativo donde se observan todas las perivitelinas de cada especie; 2, incubación con anticuerpos policlonales anti SC; 3, incubación con anticuerpos policlonales anti OR; 4, incubación con anticuerpos policlonales anti PV2.

DISCUSIÓN

En el estudio del fluido perivitelino de los huevos de *P. scalaris* se pudo determinar la presencia de dos perivitelinas principales, una de 110 kDa y otra de 380 kDa, esta última con características de una caroteno-proteína. Esto difiere del FPV de *P. canaliculata*, que presenta tres perivitelinas, dos de las cuales son caroteno-proteínas. La perivitelina mayoritaria en *P. scalaris*, la SC, presenta la densidad característica de una VHDL (1,26 g/mL) debido a su bajo contenido de lípidos y presenta un cromóforo, responsable de la coloración de los huevos. De su caracterización bioquímica surgieron interesantes similitudes y algunas diferencias con OR de *P. canaliculata*.

Al igual que OR (Garín et al., 1996), SC es una proteína oligomérica de alto peso molecular (380 kDa), con tres subunidades mayoritarias que no presentan puentes disulfuro entre ellas. Su estructura cuaternaria es globular, compacta y ligeramente elongada lo que también concuerda con la OR, aunque presenta dimensiones algo mayores a ésta (Heras et al., 2007). Otra característica estructural común entre SC y OR es que el cofactor carotenoide no resulta necesario para estabilizar la estructura oligomérica, ya que la remoción de dicho cofactor no afecta su estructura cuaternaria ni sus dimensiones. Estos aspectos estructurales comunes a OR y SC difieren marcadamente de los de la carotenoproteína de invertebrados más estudiada desde el punto de vista estructural, la crustacianina de *H. gammarus*. Esta es un octámero de dímeros, de forma elongada a modo de varilla, con una molécula de carotenoide (astaxantina) en cada dímero (Dellisanti et al., 2003). Este carotenoide resulta esencial para la estructura cuaternaria de la crustacianina, ya que la remoción del mismo conduce al desensamblado de la proteína (Zagalsky et al., 1990). Estas diferencias estructurales seguramente se vinculan a la diferencia funcional entre ambos grupos de proteínas; la crustacianina se encuentra en el exoesqueleto de *H. gammarus* cumpliendo un rol estructural, y su cofactor carotenoide provee la coloración del organismo, mientras que las perivitelinas de *Pomacea* cumplen roles no estructurales durante la embriogénesis (Heras et al., 2007).

SC presenta una estructura compleja conteniendo lípidos y glúcidos, por lo que al igual que OR, sería considerada una lipo-glico-carotenoproteína. El contenido de glúcidos es muy alto (21%), y se encuentra en el rango de lo descrito para OR (17%) (Dreon *et al.*, 2004a). Si bien la glicosilación es una modificación postraduccional muy frecuente, especialmente en proteínas de secreción, en el caso de estas perivitelinas el alto contenido de carbohidratos indica que posiblemente cumplan alguna otra función más específica (ver cap. IV). El perfil lipídico de SC es también similar al de OR, ambas contienen menos del 1% de lípido el cual está representado principalmente por los pigmentos carotenoides, y también por lípidos polares y esteroides. Probablemente, la función de proveer al embrión de lípidos no esté a cargo de estas dos proteínas, sino de otros componentes del FPV; en *P. canaliculata* existen otras dos perivitelinas cuyos contenidos lipídicos son mayores que el de OR, especialmente PV3 con ~15% (Garín *et al.*, 1996). En el caso de *P. scalaris*, podemos suponer que el transporte lipídico está a cargo de la perivitelina de 110 kDa, ya que si bien no se analizó aún su contenido lipídico, su menor densidad la ubica en el límite del rango de las HDL (1,22 g/mL) indicativo de una mayor relación lípido/proteína. En cualquier caso, los lípidos funcionalmente relevantes de SC son sin duda los pigmentos carotenoides, cuyas funciones discutiremos en el capítulo VI.

El análisis de los pigmentos en SC reveló diferencias con OR. Se encontró que el pigmento predominante es también la astaxantina, pero a diferencia de OR, no se encontraron monoésteres o diésteres de este carotenoide sino otro carotenoide de polaridad menor, que no fue identificado. Sin embargo, su espectro de absorción permite descartar un carotenoide muy frecuente en invertebrados acuáticos, la cantaxantina (4,4'-diceto- β -caroteno), ya que esta última, al igual que la astaxantina, carece de estructura fina en su banda de absorción (Zagalsky *et al.*, 1990; Britton, 1995). El hecho de que los carotenoides sufran una modificación en sus espectros de absorción al unirse a SC, indica que se hallan ubicados en un sitio de unión específico, esto nos permite incluir a SC dentro del grupo de las “verdaderas carotenoproteínas”. Estas son aquellas carotenoproteínas en las que se establecen uniones específicas entre la proteína y el carotenoide, a diferencia de otros casos, como lipoproteínas, en los que el carotenoide es transportado junto a

los demás lípidos sin un sitio de unión específico (Cheesman et al., 1967). Las diferencias encontradas en la composición de pigmentos entre SC y OR explicarían las diferencias de coloración entre ellas, si bien a esta variación en composición se sumaría también las diferentes interacciones entre ligando y proteína, que alteran fuertemente las características espectrales de los pigmentos (Zagalsky et al., 1990; Zagalsky, 2003).

En un estudio utilizando diversos anticuerpos policlonales, Zagalsky et al. (1995) determinaron que es poco probable que OR presente homología de secuencia con otras proteínas que unen carotenoides. En ese estudio se determinó que la crustacianina probablemente compartiría una misma familia proteica con la *retinol binding protein* (RBP), lo que fue más tarde confirmado por estudios de secuenciación en los que se determinó que presentan una homología del 20%. Las zonas homólogas corresponderían a dominios de unión al ligando, lo que ubica a la crustacianina dentro de la familia de las lipocalinas. Nuestros estudios de reconocimiento cruzado con anticuerpos policlonales entre SC, OR y PV2 resultaron negativos, indicando ausencia de epitopes comunes entre ellas. Esto resulta llamativo ya que pertenecen a organismos filogenéticamente próximos. Una posible explicación es que esta falta de reconocimiento se deba al gran contenido de carbohidratos que presentan SC y OR, ya que cuando el antígeno es una proteína muy glicosilada, los anticuerpos pueden estar reconociendo solo los epitopes de la porción glicídica de la proteína que enmascaran a los epitopes peptídicos. Apoyando esta hipótesis, se demuestra en el capítulo IV que existen diferencias en las porciones glicídicas de ambas proteínas, y esto podría impedir el reconocimiento cruzado entre glicoproteínas. Si bien en el capítulo IV se estudian en mayor detalle estas diferencias, para confirmar esta hipótesis se deberá conocer la estructura primaria de ambas perivitelininas. Esto permitirá asimismo conocer si presentan alguna homología de secuencia con otras carotenoproteínas como ocurrió con la crustacianina de *H. gamarus*.

En resumen: se ha descrito en el FPV de *P. scalaris* dos perivitelininas, la predominante, que llamamos SC, presenta similitudes con OR de *P. canaliculata*. Ambas son caroteno-lipo glicoproteínas oligoméricas con bajo contenido de lípidos

y altamente glicosiladas, que contienen un cofactor carotenoide y comparten características estructurales, aunque no presentan reactividad cruzada entre ellas (al menos con los anticuerpos policlonales empleados). En los capítulos siguientes trataremos de establecer si las similitudes encontradas se deben a funciones en común y si existe relación entre estas características y la inusual estrategia reproductiva que presentan estas dos especies.

IV.

**Caracterización de los
carbohidratos de escalarina
y ovorubina**

INTRODUCCIÓN

Las dos perivitelininas estudiadas aquí son proteínas altamente glicosiladas. La glicosilación es una de las muchas modificaciones postraduccionales que puede sufrir una proteína y consiste en la unión de mono u oligosacáridos (llamados colectivamente, glicanos) en residuos particulares de la cadena del polipéptido. Estas modificaciones dependen de la acción de enzimas específicas sobre residuos particulares de la proteína, y pueden incluir no solo la unión de carbohidratos, sino también de fosfatos, sulfatos, acetilos, miristoílos, amidas, carboxilos o hidroxilos, entre muchas otras (Creighton, 1993). La glicosilación es muy frecuente en las proteínas y se ha encontrado en representantes de todos los organismos vivos, implicando 16 monosacáridos y 8 residuos aminoacídicos diferentes. Se produce fundamentalmente en retículo endoplasmático (RE) y complejo de Golgi, pero también en citoplasma y núcleo (Spiro, 2002) y su función en las proteínas no es universal sino que parece ser específica de cada proteína. En algunos casos los glicanos participan directamente en la actividad biológica de la proteína, en otros casos permiten el plegado o estabilizan estructuralmente la proteína; finalmente, pueden ser señales del tránsito intracelular de las proteínas, como ocurre con las proteínas de secreción (Varki & Lowe, 2009). Los tipos de glicosilación más frecuentes, aunque no los únicos, son la N-glicosilación y la O-glicosilación (Spiro, 2002).

Se llama N-glicosilación, a la unión de GlcNAc a través de un enlace N-glicosídico con un residuo de asparagina (Asn), que se encuentre en la secuencia consenso: Asp-X-Ser/Thr (donde X es cualquier residuo excepto prolina (Pro)). Este tipo de unión es el más ampliamente distribuido en las glicoproteínas de membrana y de secreción, y ocurre de manera cotraduccional en el lumen del RE. Existen tres tipos principales de N-glicanos: oligomanosa, estructuras complejas y estructuras híbridas (Fig. IV.1). Estas tres estructuras básicas pueden contener algunas modificaciones, como elongaciones o ramificaciones.

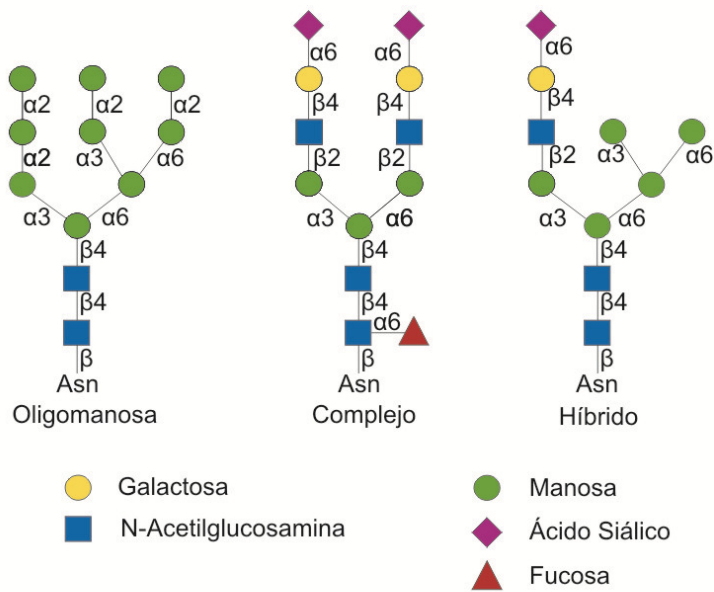


Figura IV.1. Tipos principales de oligosacáridos N-ligados presentes en proteínas.

La O-glicosilación es mucho más variada que la anterior e involucra la unión de monosacáridos a través de enlaces O-glicosídicos a hidroxilos de las cadenas laterales de serina (Ser), treonina (Thr), hidroxilisina (Hyl), hidroxiprolina (Hyp) o tirosina (Tyr), cuando la proteína se encuentra en el complejo de Golgi. Particularmente frecuente es la unión GalNAc - α -Ser/Thr, que se encuentra por ejemplo en las mucinas, Man- α -Hyl presente en los colágenos de vertebrados y Man α -Ser/Thr en colágeno de anélidos. En este caso no existe una secuencia consenso para la glicosilación, aunque se ha observado, por ejemplo en mucinas, que ocurre en zonas con repeticiones de residuos de Ser/Thr a menudo adyacentes a residuos de Pro.

Un aspecto a tener en cuenta en las modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, es que no se encuentran codificadas en el genoma. Si bien existen secuencias que señalizan los sitios de glicosilación, la unión efectiva de los carbohidratos depende de la presencia de enzimas y sustratos necesarios, en el momento necesario. Por este motivo, la glicosilación produce un alto grado de variabilidad en una población proteica, existiendo variantes de un mismo polipéptido debidas a los carbohidratos; estas variantes se denominan glicofomas

(Taylor & Drickamer, 2003). En muchos casos dicha variabilidad parece no tener una función específica, aunque en algunos parásitos, como en *Trypanosoma*, sería una estrategia para evitar el reconocimiento por el sistema inmunitario del hospedador (Taylor & Drickamer, 2003).

Las glicoproteínas de los gasterópodos están recibiendo creciente atención, porque parecen presentar estructuras y patrones de glicosilación novedosos y de posible aplicación biotecnológica (Gutternigg *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Dentro de este grupo las especies más estudiadas pertenecen principalmente a Pulmonata y salvo en el caso de investigaciones sobre los oligosacáridos de la hemocianina, los estudios se han concentrado en caracterizar los oligosacáridos y los tipos de uniones, el “glicoma”, sin discriminar en qué proteínas se encuentran dichos oligosacáridos. Se ha descrito tanto O- como N-glicosilación, esta última presentando estructuras de oligomanosa con presencia de Fuc (Staudacher *et al.*, 1999). También se han encontrado estructuras oligosacáridas y enlaces característicos de mamíferos, como Sias (Burgmayr *et al.*, 2001), y de plantas como Xil (Gutternigg *et al.*, 2007).

Casi todas las perivitelinas de este grupo son glicoproteínas, por ejemplo HdAGP, de *Helisoma duryi* (Mukai *et al.*, 2004), LTI, de *L. stagnalis* (Nagle *et al.*, 2001), HPA de *Helix pomatia* (Sanchez *et al.*, 2006), aplysianina E y Dolabellanina E de los nudibranchios *A. kurodai* y *D. auricularia*, respectivamente (Kisugi *et al.*, 1987; Kisugi *et al.*, 1989), sin embargo, las únicas perivitelinas en las que los carbohidratos fueron caracterizados son OR y PV2 de *P. canaliculata* (Dreon *et al.*, 2004a). Como vimos, SC de *P. scalaris* también presenta un elevado contenido de carbohidratos, aunque la ausencia de reactividad cruzada con anticuerpos policlonales contra SC, OR, y PV2, sugiere diferencias importantes en sus patrones de glicosilación, además de las esperables en sus estructuras apoproteicas (Cap. III).

En este capítulo se estudian algunas modificaciones postraduccionales de SC y OR. En particular se caracterizan los carbohidratos de SC, se investiga la existencia de glicofomas en OR y SC, y la presencia de fosforilación en ambas perivitelinas.

RESULTADOS

1. Composición de monosacáridos

Los monosacáridos presentes en SC fueron liberados, derivatizados a trimetilsilil derivados y analizados por GLC (Tabla IV.1), observándose un predominio de Gal (32.9 %) y Man (28,0 %) seguidos por GlcNAc (16.3 %) y Fuc (6.9 %). El contenido de Fuc fue determinado también para OR, siendo 7,5 %. También el contenido de Sias fue determinado en ambas perivitelinas, siendo 3,0 % en SC y 3,6 % en OR.

Tabla IV.1. Composición porcentual de monosacáridos de SC y OR por GC. Referencias: a, tomado de Dreon et al. (2004) excepto Fuc y Sias; b, determinado colorimétricamente.

Monosacárido	SC	OR ^a
Gal	32.9	15.8
Man	28.0	43.0
Glc	5.2	1.0
Xyl	2.5	4.7
Fuc	6.9	7.5
GalNAc	2.4	3.3
GlcNAc	16.3	18.9
Sias ^b	3.0	3.6
Otros	2.7	2.2

2. Determinación del número y tipo de oligosacáridos presentes en SC

La figura IV.2A muestra el perfil de los oligosacáridos N-ligados liberados por hidrólisis alcalina, analizados por cromatografía de exclusión y cuantificados por la técnica de orcinol/sulfúrico. En este perfil se puede observar una gran cantidad de estos residuos agrupados en al menos 3 grandes grupos. En la figura IV.2.B se observa el perfil obtenido para los residuos O-ligados liberados por β -eliminación y analizados de la misma manera que los anteriores. En este caso, estos oligosacáridos aparecen distribuidos en 2 grandes grupos.

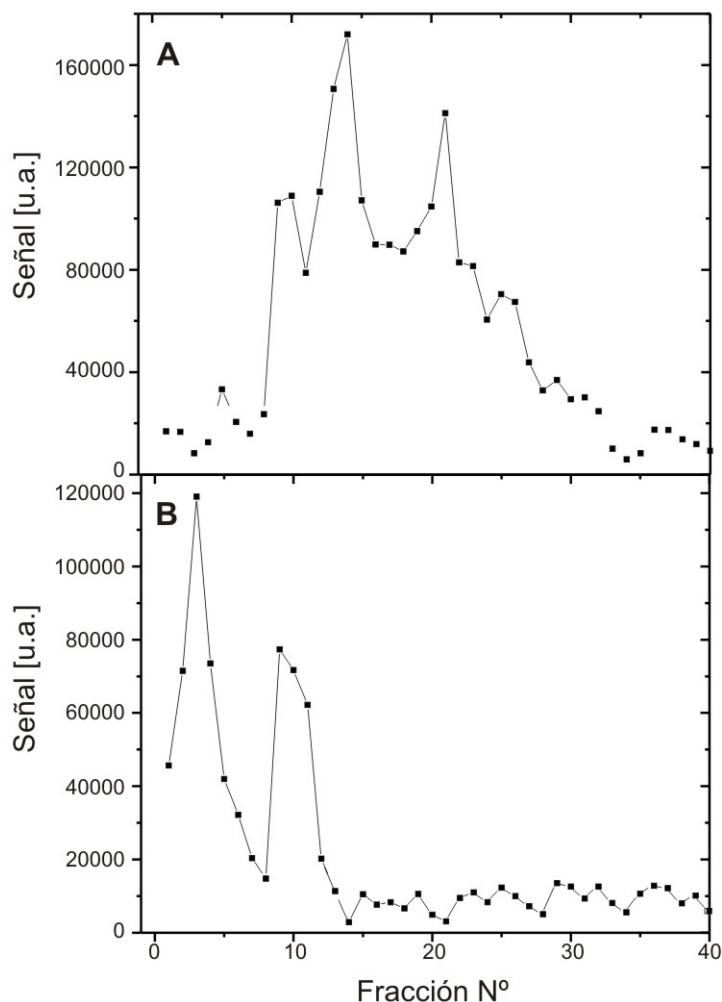


Figura IV.2. Oligosacáridos liberados de SC por métodos químicos y separados por cromatografía líquida. A, N-glicanos; B, O-glicanos.

3. Patrón de glicosilación en SC

El patrón de glicosilación de SC fue estudiado utilizando lectinas, los resultados se presentan en la tabla IV.2 y se comparan con el patrón de glicosilación de OR tomado de Dreon *et al.* (2004a).

La unión de las lectinas ConA y WGA confirma la presencia de N-glicosilación determinada químicamente, ya que estas reconocen estructuras de tipo alta manosa e híbridas, respectivamente. Las lectinas PSA y LCA, que reconocen estructuras de tipo complejo, no presentaron afinidad. En cuanto a la elongación de estas estructuras, la unión de DSL y ECL demuestra la existencia de Poli N-acetil lactosamina, es decir repeticiones de la estructura (-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-)_n. En cuanto al análisis de los monosacáridos terminales, RCA indica terminación con grupos β -galactosil, mientras que PVL indica la presencia de N-glicanos terminados en Sias.

Como se observó por las técnicas clásicas, escalarina presenta O-glicosilación, que se confirma por una elevada reactividad de la lectina JAC. Esta lectina, junto con la PNA, reconocen el antígeno-T (Gal β 1,3-GalNAc), aunque JAC también reconoce a este disacárido modificado con Sias. SBA reconoce otra estructura O-ligada muy común, el antígeno-Tn (GalNAc α -O-Ser/Thr). En cuanto al análisis de los residuos terminales de los oligosacáridos O-ligados, por medio de UEA1 se reveló la presencia de α 1,2-Fuc, y de α -GalNAc mediante DBA y BSL-1.

Tabla IV.2. Afinidad de lectinas por oligosacáridos de SC. Lectinas utilizadas para estudiar los patrones de glicosilación de SC. Referencias: a, según Cummings *et al.* (2009) y Mao *et al.* (2004); b, extraído de Dreon *et al.* (2004a).

Lectina	Acrónimo	Especificidad de unión ^a	SC	OR ^b
Concanavalin A	Con A	Man α 3[Man α 6] Man, terminal α Man; N-glicanos tipo Oligomanosa e Híbrido	+	+
Wheat germ agglutinin	WGA	Neu5Ac α 3/6/8 R;	+	+

<i>Pisum sativum</i> agglutinin	PSA	Residuos α -D-mannosyl terminales; N-acetilquitobiosa unido a Fuc	-	-
<i>Lens culinaris</i> agglutinin	LCA	N-glicanos tipo complejo Bi- y tri-antenados	-	-
<i>Datura stramonium</i> lectin	DSL	LacNAc terminal	+	+
<i>Erythrina christagalli</i> lectin	ECL	LacNAc terminal	+	-
<i>Ricinus comunis</i> agglutinin 1	RCA 1	β Gal terminal	+	-
<i>Psathyrella velutina</i> lectin	PVL	GlcNAc Neu5Ac α 26-Gal	+	-
Jacalin	JAC	Neu5Ac α 3 Gal β 1,3-GalNAc; Gal β 1,3-GalNAc	+	+
Peanut agglutinin	PNA	Gal β 13-GalNAc terminal	+	-
Soybean agglutinin	SBA	Antígeno Tn, α GalNAc terminal	+	-
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin 1	UEA1	α (1,2) L-Fuc	+	+
<i>Dolichus biflorus</i>	DBA	GalNAc α 1,3 GalNAc/Gal	+	+
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> lectin 1	BSL 1	α GalNAc $>$ α Gal	+	-

4. Deglicosilación enzimática de SC y OR

El tratamiento de SC y OR con PNGasa F en condiciones nativas dio resultado negativo en ambas perivitelinas, lo cual es frecuente en proteínas altamente glicosiladas, y se debe principalmente a que los oligosacáridos ocultan los sitios de corte de la enzima (impedimento estérico). Para lograr una mayor exposición de estos sitios de hidrólisis, ambas proteínas fueron desnaturalizadas previamente al tratamiento. En estas condiciones se observaron cambios en la movilidad electroforética de las tres subunidades de ambas proteínas (figura IV.3), indicando que todas ellas poseen N-glicanos. SC mostró bandas de *ca.* 32 kDa, 27 kDa y 25 kDa mientras que OR mostró bandas de *ca.* 34 kDa, 29 kDa, y 27 kDa.

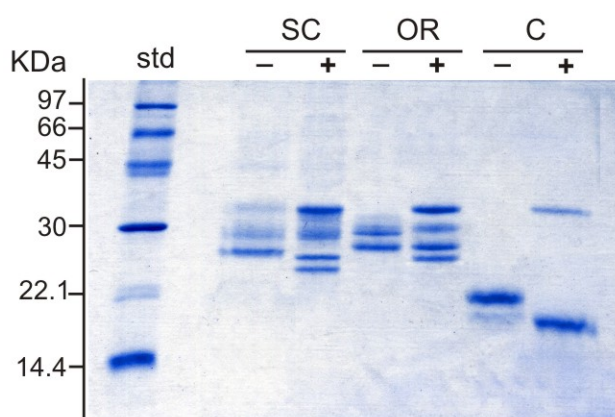


Figura IV.3. Efecto del tratamiento con PNGasaF sobre SC y OR, gel de PAGE-SDS. std, estándar de PM; C, RNasa como control positivo de la actividad de la enzima; -, sin enzima; +, con enzima.

Los tratamientos con sialidasa fueron realizados en condiciones nativas y desnaturizantes, pero en este caso, a diferencia del tratamiento con PNGasaF, no se observaron cambios en los perfiles electroforéticos de ninguna de las proteínas. Estos resultados indicarían que las formas de Sias presentes en los oligosacáridos de estas perivitelinas serían resistentes a la sialidasa de *C. perfringens*.

5. Deglicosilación química de OR y SC

Para evaluar la existencia de glicofomas, se realizó una deglicosilación completa de OR y SC mediante métodos químicos, y se analizó por PAGE-SDS. Como resultado de se observó una única banda proteica en ambas proteínas, con un PM de *ca.* 27 kDa para SC y *ca.* 25 kDa para OR (Fig IV.4). Estos resultados indican que las tres subunidades identificadas previamente serían isoformas de un mismo polipéptido, variando en el contenido de carbohidratos (glicofomas). Por otra parte se pudo observar que la deglicosilación provocó en ambas una pérdida de la solubilidad y pérdida de color.

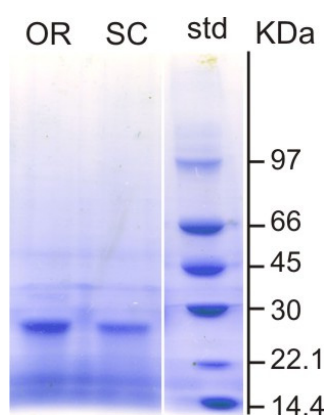


Figura IV.4. Deglicosilación completa, por métodos químicos de OR y SC, gel de PAGE-SDS. std, estándar de PM.

6. Secuencias N-terminales de OR y SC

Se obtuvieron las secuencias N-terminales de OR y SC completamente deglicosiladas, en el caso de OR, esta determinación ya había sido realizada anteriormente pero con las subunidades sin deglicosilar (Dreon, 2003). En el presente análisis se obtuvieron secuencias de 17 residuos para SC y 15 residuos para OR, con 10 residuos aminoacídicos en común (Fig. IV.5). Sin embargo, para ambas proteínas, se determinó más de una secuencia posible: para SC habría al menos dos alternativas, teniendo en cuenta variantes en las posiciones 2, 4 y 8; en el caso de OR habría al menos tres, las cuales resultaron coincidentes con las secuencias que habían sido determinadas previamente con las subunidades sin deglicosilar (Dreon, 2003). Estos resultados, entonces, indicaban que la banda única observada en PAGE-SDS luego de la deglicosilación total contenía más de un polipéptido, y, tomando en consideración las secuencias previas de OR, esos polipéptidos se corresponderían con las subunidades que se observan sin deglicosilar. Estaríamos entonces frente a tres polipéptidos con un PM muy similar, que no pueden ser resueltos por PAGE-SDS.

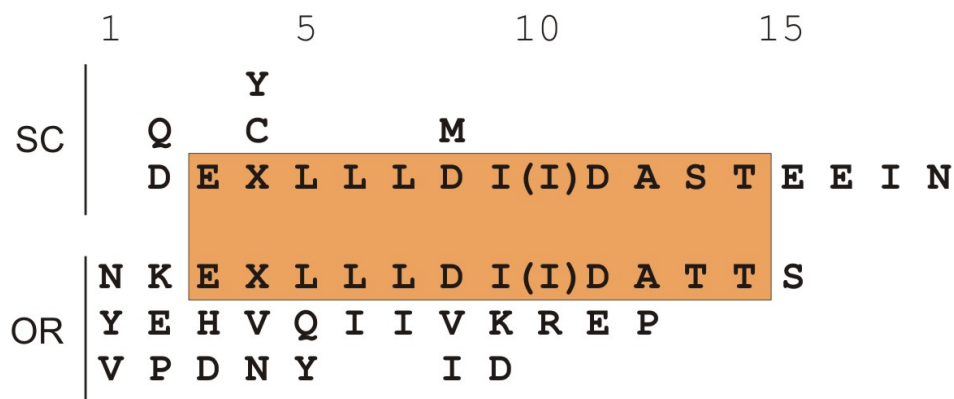


Figura IV.5. Secuencias N-terminales de SC y OR obtenidas a partir de la proteína previamente deglicosilada, se muestra coloreada la zona de secuencia común entre ambas perivitelinias. X: residuo sin asignación; los paréntesis indican baja confianza en el residuo asignado.

7. Puntos isoeléctricos de las subunidades de OR y SC

Para resolver si se trataba de varios polipéptidos, se analizaron a continuación las muestras deglicosiladas y sin deglicosilar mediante electroforesis bidimensional. El perfil obtenido para las subunidades sin deglicosilar fue complejo, observándose varias isoformas para cada subunidad (Fig. IV.6 A y B). En SC, la subunidad de 35 kDa presenta 3 isoformas principales (pIs: entre 5,9 y 7,5); la subunidad de 28 kDa tiene 2 (pIs entre: 5,5 y 7,4) y la subunidad de 24 kDa presenta 2 (pIs entre: 5,3 y 7,5). En OR, la subunidad de 35 kDa tiene cuatro isoformas principales (pIs entre: 5,0 y 5,9); la subunidad de 32 kDa tiene una (pI: 5,1) y la subunidad de 28 kDa presenta cuatro (pIs entre: 5,6 y 7,5). El perfil de las proteínas deglicosiladas representa una importante simplificación respecto del perfil nativo, observándose una serie de *spots* con similar PM pero distinto pI. OR mostró tres *spots* principales con pI alrededor de 5,5 (Fig. IV.6.C); y SC tres *spots* con pI ligeramente más alcalino, ~ 6,0 (Fig. IV.4.D); en ambos perfiles se observan otros *spots* más tenues, con PIs más básicos. Este resultado apoya la existencia de más de un polipéptido confirmando los resultados de las secuencias N-terminales.

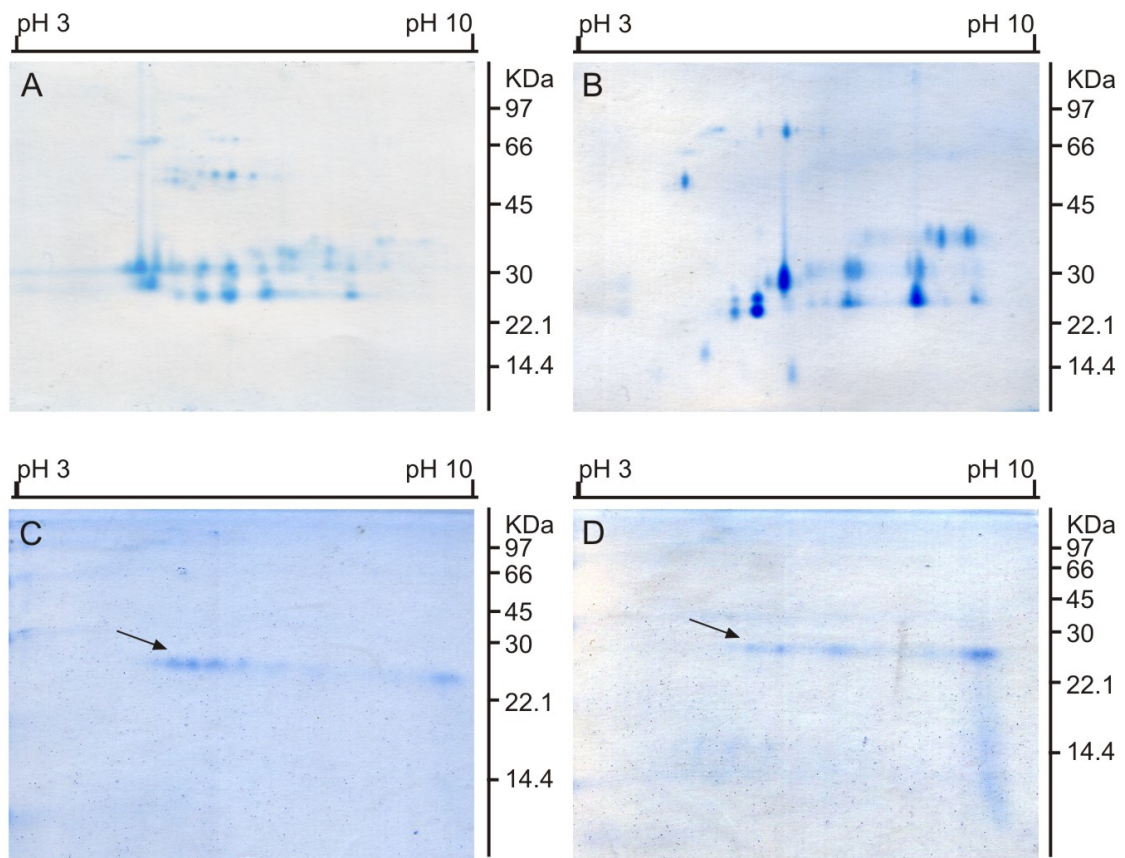


Figura IV.6. Efecto de la deglicosilación química en los perfiles obtenidos mediante electroforesis bidimensional de OR y SC. A, OR sin deglicosilar. B, SC sin deglicosilar. C, OR deglicosilada. D, SC deglicosilada. En sentido horizontal las proteínas están separadas según su pI; en sentido vertical según su PM. Las flechas indican los *spots* principales.

8. Detección de fosforilaciones

La presencia de múltiples isoformas con diferente pI observadas en los geles de 2D-E, podía también deberse a la presencia de fosforilaciones. Para investigar esta posibilidad se realizó un análisis mediante *dot-blot*, utilizando en la detección un anticuerpo contra residuos de serina fosforilados, que demostró que ambas perivitelininas presentan fosforilación.

DISCUSIÓN

La glicosilación es la modificación postraduccional más frecuente de las proteínas, y tiene diversos efectos en la estructura y función de éstas. En algunos casos dichos efectos parecen ser poco relevantes para el organismo, mientras que en otros resultan de vital importancia en procesos tales como el tránsito intracelular y el reconocimiento mediante receptores. Pocas glicoproteínas han sido estudiadas en los gasterópodos, ya que si bien existen varios estudios detallados sobre glicosilación en estos organismos, los mismos analizan la diversidad de estructuras oligosacáridas pero sin identificar la proteína en la que se encuentran (Burgmayr *et al.*, 2001; Gutternigg *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). De las pocas glicoproteínas purificadas de huevos de molusco, solamente en *P. canaliculata* se ha realizado una caracterización de los carbohidratos y patrones de glicosilación (Dreon *et al.*, 2004a) por lo que las comparaciones que se realizan a continuación están forzosamente restringidas.

Composición de monosacáridos y patrones de glicosilación en SC

Los estudios de afinidad de lectinas y técnicas bioquímicas clásicas mostraron que SC presenta oligosacáridos N- y O-ligados, como se había descrito en OR (Dreon *et al.*, 2004a). Los N-glicanos de SC parecen similares a los de OR, presentando estructuras de oligomanosa e híbridas pero no complejas, aunque en SC presentarían elongaciones con lactosamina que no se encontraron en OR. Estos N-glicanos se encuentran en las tres subunidades de ambas perivitelinas, como se determinó por deglicosilación enzimática con PNGasaF. Por otra parte, los O-glicanos presentarían similares características en ambas perivitelinas, con presencia de antígenos Tn y T, este último probablemente con terminaciones de Sias.

La composición de monosacáridos de SC también fue semejante a la de OR, mostrando diferencias sólo a nivel cualitativo. Los monosacáridos predominantes en SC son Gal y Man, mientras que en OR son Man y NAcGlc (Dreon *et al.*, 2004a), en ambos casos, estos azúcares se relacionan con la presencia de N-glicanos de tipo

oligomanosa. Se determinó la presencia de Fuc en ambas perivitelinas, representando alrededor del 7%, en coincidencia con la unión de la lectina UEA-1 que detecta estructuras fucosiladas con enlaces $\alpha 1,2$. Este monosacárido, importante en procesos de reconocimiento intracelular, se ha encontrado también en otros gasterópodos presentando este tipo de enlaces (Staudacher *et al.*, 1999).

Entre los monosacáridos minoritarios se encontró Xil. Este monosacárido, clásicamente considerado como típico de las plantas, ha sido encontrado en glicoproteínas de algunos pulmonados y considerando que con este resultado su presencia se extiende a los Caenogastropoda, parece ser característico de los N-glicanos de gasterópodos, como fuera sugerido previamente basándose en información limitada a especies de Pulmonata (Staudacher *et al.*, 1999; Gutternigg *et al.*, 2007). Sin embargo, se debe tener en cuenta que aún no existen datos de su presencia en los restantes grupos de Caenogastropoda.

Las distintas variedades del ácido siálico son abundantes en los deuterostomados y eran consideradas exclusivas de esos grupos, si bien luego fueron encontrados en bacterias, protistas e incluso en plantas (Varki *et al.*, 2009). Dentro de los gasterópodos fueron descritos sólo en pulmonados, que presentan las mismas variedades de Sias que los mamíferos (Burgmayr *et al.*, 2001). Su presencia en las dos perivitelinas estudiadas aquí, extiende la presencia de estos glúcidos también a los Caenogastropoda.

Varias funciones biológicas han sido atribuidas al Sias en las glicoproteínas, como estabilización estructural, protección contra el ataque proteolítico y aumento de la viscosidad de glicoproteínas como las mucinas (Varki & Lowe, 2009). Algunas de estas funciones podrían relacionarse con características presentes en estas perivitelinas. Por ejemplo, el Sias podría contribuir a la estabilidad térmica y química que presenta OR y, como veremos en el Capítulo V, también SC. Por otro lado, una elevada viscosidad del perivitelo, causada por la elevada concentración de las perivitelinas conteniendo Sias, podría representar una barrera contra la invasión bacteriana, como se ha sugerido para la ovomucina, glicoproteína del albumen del huevo de gallina (Stevens, 1996). Más estudios comparados demostrarán si el Sias es también característico de las glicoproteínas de los gasterópodos.

Los tratamientos con sialidasa no fueron exitosos en la remoción del Sia de OR y SC. Se ha descrito la existencia de variedades de Sias resistentes al corte con sialidasas en fluidos corporales de cerdo y caballo (Nohle *et al.*, 1985). Asimismo, Gutternig *et al.* (2007) encontraron en glicopéptidos de pulmonados glicanos resistentes a exoglicosidasas que interpretaron como una posible defensa contra la digestión, ya que podrían cubrir zonas del péptido susceptibles a proteasas. En este sentido, la resistencia del Sias a la sialidasa representaría una protección para estos glicanos, y como veremos en el Capítulo VI, esta característica junto con el elevado contenido de glicanos estaría relacionada con la resistencia de estas perivitelinas a la digestión por proteasas.

Las diferencias encontradas entre los patrones de glicosilación de OR y SC, confirman la falta de reactividad cruzada (Cap. III), indicando que si bien los carbohidratos son importantes en ambas perivitelinas, presentan significativas diferencias. Esto no necesariamente implicaría diferencias funcionales entre ambas si dichas diferencias se encuentran en la estructura fina de los oligosacáridos, ya que se sabe que en muchas situaciones, la identidad del glicano no es tan importante para la función proteica como su presencia o ausencia (Taylor & Drickamer, 2003).

Isoformas y fosforilación en OR y SC

En los primeros análisis de OR y SC se determinó que ambas eran oligómeros con tres subunidades de diferentes PM (Garín *et al.*, 1996; Cap. III). Cuando ambas proteínas fueron deglicosiladas completamente, esta multiplicidad de subunidades se redujo a una, sugiriendo la presencia de un único polipéptido que presentaba glicofomas. Las secuencias N-terminales y el análisis por electroforesis bidimensional revelan sin embargo la presencia de, al menos, tres polipéptidos de PM muy similar pero diferente pI. Las diferencias de PM observadas en los primeros análisis serían entonces debidas a diferencias en el grado de glicosilación entre las subunidades. Del mismo modo, las diferencias de pI entre las isoformas, serían consecuencia de la glicosilación y de la presencia de diferentes cantidades de Sias

(Gravel, 2002), ya que gran parte de estas isoformas desaparece cuando se deglicosila completamente, aunque también pueden deberse a la presencia de otras modificaciones postraduccionales.

La presencia de glicoformas es muy frecuente en proteínas glicosiladas, y en perivitelinas de gasterópodos la presencia de cinco glicoformas ha sido confirmada en el inhibidor de tripsina de *L. stagnalis* (Nagle *et al.*, 2001).

También se detectó la presencia de otra modificación postraducciona en estas perivitelinas, la fosforilación de residuos de serina. Los grupos fosfato presentan cargas eléctricas, que alteran el pI de las proteínas que los poseen. La presencia de fosforilación diferencial en las subunidades de OR y SC explicaría en parte las isoformas de pI, especialmente las observadas en los geles bidimensionales de las muestras totalmente deglicosiladas. La presencia de sitios de fosforilación en perivitelinas de gastrópodos sólo fue descrita en la perivitelina HdAGP de *H. duryi* a partir de un análisis de su secuencia; aunque en ese estudio no se confirmó la presencia de grupos fosfato, se especuló sobre su posible relación con la incorporación de la perivitelina por el embrión (Mukai *et al.*, 2004). Un grupo de proteínas del vitelo, las fosvitinas, poseen grupos fosfato que representan una reserva de fósforo para el embrión, además, al tener una elevada cantidad de fosfatos, las fosvitinas son agentes quelantes de metales como hierro (Anton *et al.*, 2006). La presencia de grupos fosfato en las perivitelinas podría representar una reserva de fósforo para los embriones, en los huevos que presentan perivitelo.

Importancia de las modificaciones postraduccionales

La presencia en OR y SC de monosacáridos importantes en procesos de reconocimiento como Sias y Fuc, así como de fosforilación diferencial, podrían estar involucradas individualmente o en conjunto, en la incorporación selectiva de las perivitelinas por parte del embrión. A este respecto, se ha demostrado que el embrión de *P. canaliculata* consume cada perivitelina de manera diferencial en los distintos estadios del desarrollo (Heras *et al.*, 1998).

Por otro lado, la presencia de glicanos resistentes a la digestión por glicosidasas en una perivitelina requiere que el embrión posea enzimas con capacidad de degradar dichos oligosacáridos. Si bien esto no ha sido estudiado en el embrión, diversas glicosidasas capaces de degradar oligosacáridos conteniendo Fuc y Xil han sido aisladas de la glándula digestiva del adulto (Suzuki *et al.*, 1991; Endo *et al.*, 1993). Seguramente el embrión expresa dichas enzimas, las cuales le conferirían la capacidad de hidrolizar las perivitelinas para poder incorporarlas como fuente nutritiva, energética y de antioxidantes durante la embriogénesis.

V.

**Aspectos estructurales de
ovorubina y escalarina**

INTRODUCCIÓN

Como vimos en los capítulos anteriores, la OR presenta pocas similitudes con el resto de las carotenoproteínas estudiadas en invertebrados. Sin embargo, la SC presenta similitudes bioquímicas y estructurales con aquella (ver Cap. III), como la estructura oligomérica, un elevado porcentaje de glicosilación y presencia de un cofactor carotenoide no esencial para su estabilidad estructural, así como varias similitudes funcionales como se describirá en el Capítulo VI.

Estudios previos han demostrado que la OR es una proteína con elevada estabilidad térmica, la cual podría estar relacionada con su elevada glicosilación y cuyo significado funcional sería mantener la integridad de la perivitelina (y por ende sus múltiples funciones) cuando los huevos se hallan expuestos a insolación directa durante el desarrollo (Dreon *et al.*, 2007). Dentro de sus funciones, la OR presenta actividad inhibitoria de serínproteasas demostrada *in vitro* (Norden, 1972), y se ha descrito que en general, las proteínas y péptidos inhibidores de proteasas son estructuralmente muy estables, manteniendo su estructura nativa aún en condiciones extremas de temperatura, pH, y agentes desnaturizantes porque poseen motivos estructurales que les brindan resistencia a la proteólisis por las enzimas que inhiben (Teles *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2005a; Azarkan *et al.*, 2006; Sabotič *et al.*, 2009).

Debido a que la OR presenta actividad inhibitoria de serínproteasas y es termoestable, resultaba interesante estudiar si, al igual que otros inhibidores, presentaba estabilidad conformacional a valores extremos de pH. Asimismo, y teniendo en cuenta las similitudes observadas entre OR y SC, también se estudiaron en esta última los efectos de la temperatura y el pH sobre su estabilidad estructural.

RESULTADOS

1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad estructural de SC

El efecto de la temperatura sobre la estructura cuaternaria de SC fue analizado mediante SAXS. La Fig.V.1.A muestra un gráfico de Kratky a distintas temperaturas entre 40°C y 90°C. Se observa que SC no muestra alteraciones hasta los 80°C, presentando las curvas forma de campana, típica de proteínas globulares. A 90°C se observa una desviación de la curva, indicativa de una pérdida de globularidad de la partícula. Asimismo, el Rg de la partícula no se alteró significativamente aún a temperaturas de 90°C, donde muestra una disminución de menos del 10% (Figura V.1.B).

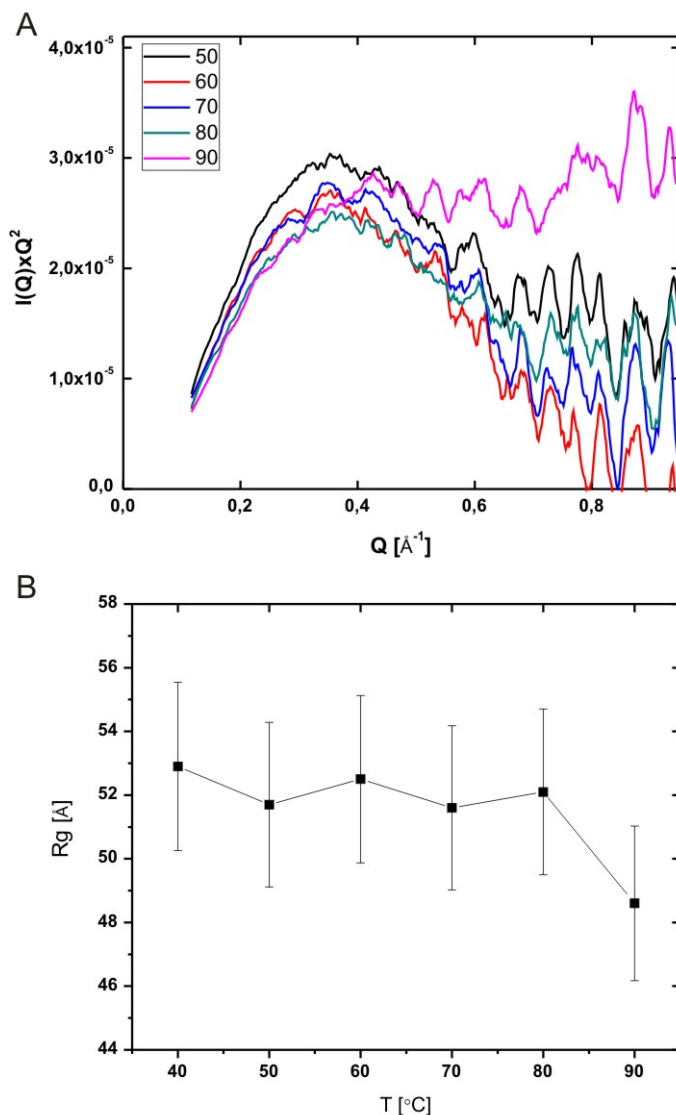


Figura V.1. Efecto de la temperatura sobre la estructura de SC medido por SAXS. A, plot de Kratky [$I(Q)Q^2$ vs Q] entre 40°C y 90 °C. B, Evolución del Rg de SC a las mismas temperaturas. Las barras representan el error del ajuste lineal en la región de Guinier (ver II.6)

2. Efectos del pH en la estructura de OR y SC

2.1. Espectroscopía de absorción

En la figura V.2 se observan los espectros de absorción de OR y SC, luego de ser incubadas durante 18 h en buffers que cubrían el rango de pH 2,0 a 12,0. La OR sólo muestra mínimos cambios de intensidad en la banda de absorción de la astaxantina, no existiendo desplazamientos de los máximos de absorción (Fig. V.2.A). La SC sólo muestra leves alteraciones a pH extremos (Fig. V.2.B). A pH 12,0 se observa en SC una disminución de la intensidad, con un muy leve desplazamiento hacia el azul de la banda de absorción de la astaxantina; a pH 2,0 se aprecia la desaparición de un pico de absorción alrededor de 320 nm.

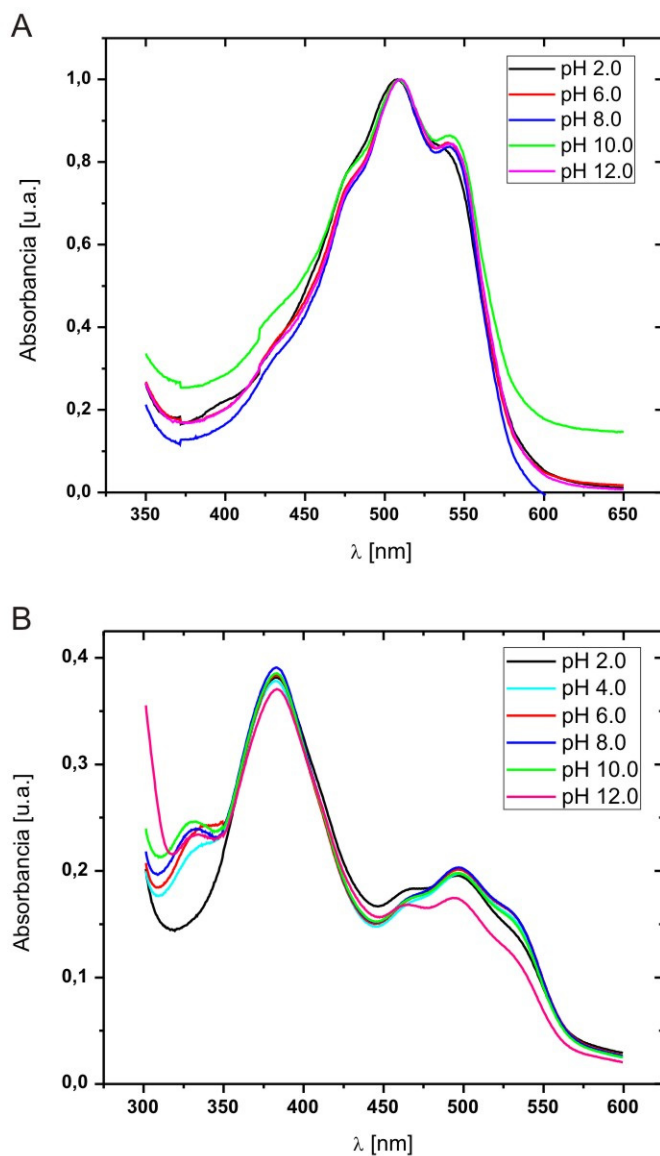


Figura V.2. Efecto del pH sobre OR y SC medido por espectrofotometría. Espectro de absorción de OR (A) y SC (B) a diferentes valores de pH entre 2.0 y 12.0.

2.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

En la figura V.3 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de OR y SC, luego de ser incubadas por 18 h en buffers a pH entre 2,0 y 12,0. La OR sólo presenta un ligero corrimiento del máximo de emisión a pH 2,0 (de 330 a 338 nm) acompañado de una caída de intensidad, indicativos de cierta exposición de residuos de Trp al entorno acuoso, pero sin una desnaturalización completa. En SC se observa un comportamiento algo diferente, ya que a pH ácido no hay alteraciones pero sí a pH alcalino, observándose una disminución de intensidad y un cierto corrimiento hacia el rojo a pH 10,0 que se hace más marcado a pH 12,0 (Fig. V.3.B). Los corrimientos observados indicarían que aún a estos pH extremos no ha ocurrido el desplegado total de las perivitelininas.

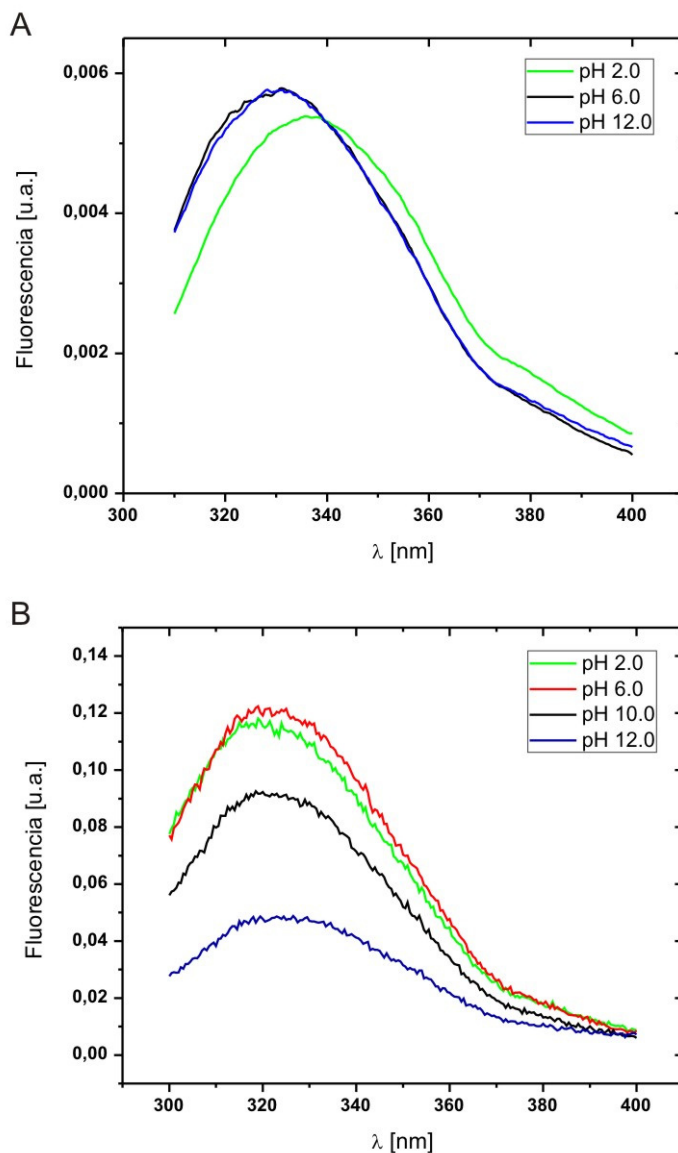


Figura V.3. Efectos del pH en OR y SC medido por fluorescencia. A, espectro de emisión de fluorescencia de OR (A) y SC (B) a diferentes valores de pH.

2.3. SAXS

2.3.1. OR

La variación del Rg de OR en función del pH se muestra en la figura V.4.A. Se observa que el Rg se mantiene constante entre pH 12,0 y 4,5, a pH 4,0 se observa un incremento en el Rg, que es seguido por una disminución brusca del mismo hasta 32 Å a pH 2,0. El incremento del Rg a pH 4,0 sería indicativo de una expansión de la molécula, que precedería al desensamblado final del oligómero evidenciado por la caída en el valor del Rg a pH más ácidos. Esta alteración a pH ácido también se aprecia como una pérdida de globularidad en los gráficos de Kratky. El análisis de los gráficos de Kratky a pH 10 y 12 también confirma que en condiciones alcalinas la globularidad de OR no se ve afectada (Fig. V.4.B).

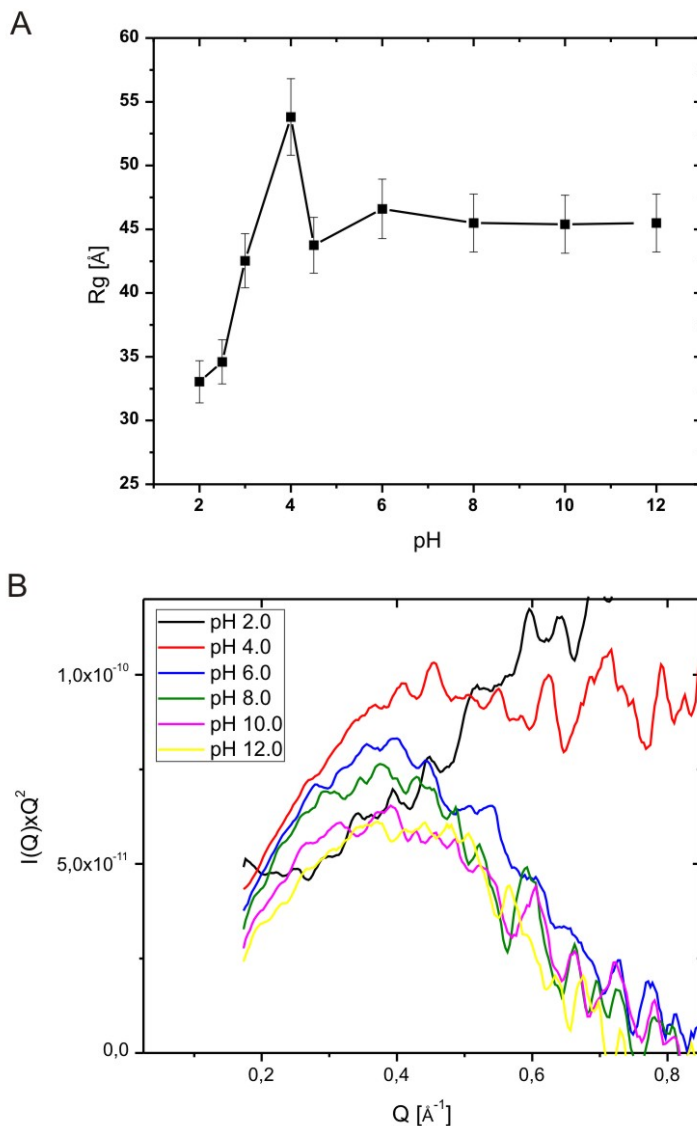


Figura V.4. Efecto del pH en la estructura de OR, medido por SAXS. A, Rg de OR a diferentes valores de pH. B, gráfico de Kratky de los datos de dispersión de OR a esos pH. Las barras representan el error del ajuste lineal en la región de Guinier (ver II.6)

Para investigar el efecto del pH ácido a tiempos cortos, las medidas fueron también realizadas con preincubación de la muestra, a pH 2,5, durante 2h a 6 h (Figura V.5). En estas condiciones no se observan alteraciones importantes en su globularidad hasta 2 h, evidenciando que, si bien OR no es estable a pH inferior a 4,5 a tiempos largos, mantiene su estructura cuaternaria durante al menos 2 h.

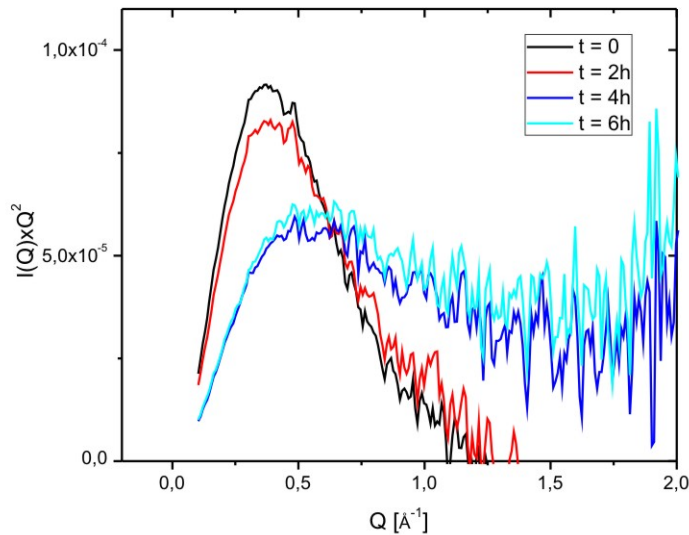


Figura V.5. Efectos de la incubación de OR a pH 2,5 por tiempos cortos medido por SAXS. Se observa una pérdida de la globularidad a partir de las 2 h.

2.3.2. SC

El efecto del pH fue diferente en SC. No se evidenciaron alteraciones del R_g a pH muy ácidos, manteniéndose constante entre pH 2.0 y 8.0, mientras que a pH alcalinos, especialmente a pH 12,0, se observó una disminución del R_g (Fig. V.6.A). Esta alteración estructural también se evidencia en los gráficos de Kratky que muestran pérdidas en la globularidad de la partícula a pH muy alcalinos (Fig. V.6.B).

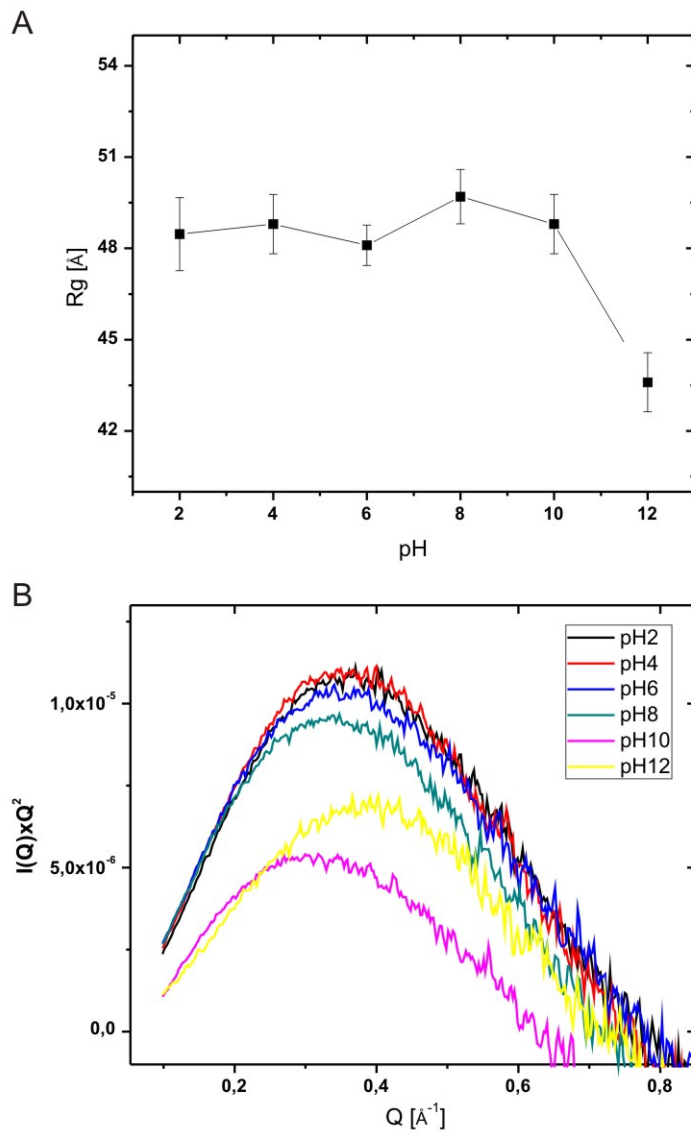


Figura V.6. Efecto del pH en la estructura de SC medido por SAXS. A, Rg de SC a diferentes valores de pH. B, gráfico de Kratky de los datos de dispersión de SC a esos pH. Las barras representan el error del ajuste lineal en la región de Guinier (ver II.6)

DISCUSIÓN

Estabilidad térmica de SC

Las medidas de estabilidad térmica mostraron que SC es una proteína termoestable, que sólo sufre alteraciones en su globularidad a partir de 80°C junto con una discreta disminución su tamaño. La termoestabilidad de esta perivitelina es por lo tanto elevada, si bien algo más limitada que la de OR, la cual mantiene su estructura prácticamente inalterada aún a 95°C (Dreon *et al.*, 2007). La elevada glicosilación que presentan ambas proteínas es un factor que seguramente juega un papel importante en su notable termoestabilidad, ya que los glicanos estabilizan conformacionalmente las proteínas (Varki & Lowe, 2009).

El significado funcional de esta termoestabilidad podría relacionarse con el hecho de que, muy a menudo, las puestas de estas especies alcanzan temperaturas elevadas cuando se ven expuestas a insolación directa, sobre todo cuando son depositadas sobre rocas (las que pueden alcanzar temperaturas mayores a 50°C, obs. pers.); en estas condiciones las proteínas del FPV deberían ser resistentes a la desnaturalización por calor para conservar su funcionalidad (Dreon *et al.*, 2007; Heras *et al.*, 2007). Por otro lado, tal vez la termoestabilidad no cumpla una función *per se*, sino que sea una consecuencia de presentar elevada estabilidad conformacional asociada a la función como inhibidor de proteasas que presenta OR, y potencialmente SC. En apoyo a esta segunda hipótesis está el hecho de que los inhibidores de proteasas suelen ser estables en condiciones extremas de pH y temperatura (Teles *et al.*, 2004; Azarkan *et al.*, 2006), como veremos a continuación. Cabe aclarar que estas 2 hipótesis planteadas no necesariamente serían excluyentes.

pH y estabilidad de OR y SC

Los resultados de las incubaciones a diferentes pH indican que ambas perivitelininas son estables en un amplio rango. La OR presenta estabilidad conformacional entre pH 4,0 y 12,0, siendo sensible a pH más ácido, aunque dicha sensibilidad no se manifiesta a pH 2,5 si es expuesta por periodos menores a las 4 h. El rango de estabilidad de SC es diferente y algo más estrecho, siendo estable entre pH 2,0 y 8,0. Por otra parte, si bien las alteraciones de SC a pH 2,0 son menores que las que sufre OR, se diferencia de esta en que es mucho menos estable a pH superior a 10,0.

Resulta interesante que a lo largo de todo el rango de pH estudiado no se observen corrimientos importantes en los máximos de absorción de ambas proteínas, ya que esto indica que las interacciones con sus carotenoides en los sitios de unión se mantienen inalteradas, implicando que estos sitios no se ven alterados en gran medida. Esto podría deberse a que los sitios de unión del carotenoide no contienen residuos ionizables o bien que estos están protegidos del entorno, y no son afectados por el pH; en ese sentido, se ha demostrado que el sitio de unión al carotenoide en la OR es hidrofóbico (o sea, conteniendo residuos no polares) (Dreon *et al.*, 2007). Por otro lado, aún en la incubación prolongada de OR a pH 2,5, en la que ocurre un desensamble del oligómero, el espectro de absorción se mantiene casi inalterado sugiriendo que, a diferencia de otras carotenoproteínas (Dellisanti *et al.*, 2003), la astaxantina no se encuentra ubicada en regiones de contacto entre subunidades, lo cual está de acuerdo con el hecho de que la presencia del carotenoide no es necesaria para mantener su estructura cuaternaria (Dreon *et al.*, 2007).

Las carotenoproteínas de invertebrados son estables en un rango relativamente amplio de pH, en la Tabla V.1 se puede observar que OR y SC tienen sin embargo el rango de estabilidad mayor, siendo OR la única descrita hasta el momento con estabilidad a pH muy alcalino. Resulta destacable que, a diferencia de las otras carotenoproteínas, tanto OR como SC son estables en condiciones de pH ácido (~ 2,5), al menos por unas horas. Esta elevada estabilidad para una carotenoproteína, quizás sea, al igual que se mencionó al discutir la elevada termoestabilidad, una consecuencia de la evolución estructural asociada a la función como inhibidor de proteasas que posee OR y potencialmente SC. En este

sentido, se sabe que los inhibidores de proteasas son estructuralmente estables, lo que les permite resistir la proteólisis por las enzimas que inhiben, particularmente los inhibidores de origen vegetal, presentes en semillas y tubérculos, son estables en condiciones extremas de pH y temperatura ya que presentan elementos estructurales que estabilizan fuertemente regiones de la molécula (Teles *et al.*, 2005; Azarkan *et al.*, 2006). La estabilidad de OR y SC frente a pH y temperatura, podría deberse a la presencia de elementos estructurales resistentes típicos de los inhibidores de serínproteasas, por otro lado, la elevada proporción de carbohidratos que presentan, podría jugar un papel a este respecto (Varki & Lowe, 2009) ya que se ha visto que la deglicosilación completa desestabiliza a estas proteínas. Si bien no existen aún datos de secuencia que confirmen que estas perivitelininas pertenecen a alguna familia de estos inhibidores, existen evidencias experimentales que demuestran la capacidad inhibitoria de OR (Norden, 1972).

Tabla V.1. Estabilidad frente al pH de carotenoproteínas de invertebrados. Rango de pH al que son estables las carotenoproteínas en las que esta propiedad fue medida. Referencias: a, Garate *et al.* (1986); b, Villarroel *et al.* (1985); c, Chayen *et al.* (2003); d, Salares *et al.* (1979); e, Armitt *et al.* (1981).

	Especie	Carotenoproteína	Rango de pH
Arthropoda: Crustacea	<i>Procambarus clarkii</i> Girard, 1852	Carotenoproteína azul	5.5 - 8.0 ^a
	<i>Upogebia pusilla</i> (Petagna, 1792)	Carotenoproteína azul	5.5 - 9.0 ^b
	<i>Homarus americanus</i> Milne-Edwards, 1837	Crustacyanina	5.0 - 8.5 ^c
	<i>H. americanus</i>	Ooverdina	4.0 - 9.0 ^d
Echinodermata: Asteroidea	<i>Marthasterias glacialis</i> (Linnaeus, 1758)	Carotenoproteína azul	4.0 - 8.5 ^e
	<i>M. glacialis</i>	Carotenoproteína púrpura	3.5 - 8.5 ^e
Mollusca: Gastropoda	<i>P. canaliculata</i>	Ovorubina	4.0 - 12.0
	<i>P. scalaris</i>	Escalarina	2.0 - 8.0

En conclusión, la elevada estabilidad de OR y SC en un rango de pH considerable, junto con la capacidad de soportar inalteradas temperaturas tan altas como 80 °C, sugieren que son capaces de tolerar una amplia variedad de condiciones, probablemente relacionadas con su rol durante la embriogénesis. En el capítulo VI se retomará este tema y se especulará sobre la posible explicación funcional de esta estabilidad.

VI.

Experimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en la introducción general, las perivitelinas presentes en el fluido perivitelino de los gasterópodos fueron inicialmente consideradas únicamente como moléculas de reserva para el embrión. En años recientes, se han descubierto algunas perivitelinas que podrían desempeñar funciones adicionales, por ejemplo, como agentes antimicrobianos (Mukai *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2006), inhibidores de proteasas (Nagle *et al.*, 2001) o inclusive como factores de crecimiento (Nagle *et al.*, 1999).

Los desoves de los gastrópodos con estrategia de oviposición aérea, como es el caso de las especies de *Pomacea*, o de hábitats intermareales, como algunos Caenogastropoda marinos, están expuestos directamente a una variedad de agentes estresantes, entre los que se destacan la deshidratación, radiación ultravioleta y fluctuaciones térmicas (Przeslawski, 2004; 2005). En particular, los desoves de la mayoría de las especies de *Pomacea* son adheridos a diversos sustratos emergentes y quedan expuestos durante varios días a condiciones de estrés como las antes mencionadas

Esta exposición de los desoves presenta sin duda ventajas adaptativas, pero requiere del desarrollo de mecanismos para evitar los efectos indeseables de estas condiciones. Los mismos son por un lado de naturaleza mecánica, relacionados a la presencia de cápsulas o masas gelatinosas que envuelven los huevos, los cuales son importantes en la protección contra la deshidratación, cambios de salinidad, o depredadores (Przeslawski, 2004). También existen agentes protectivos de naturaleza bioquímica, como la presencia de sustancias antimicrobianas (Benkendorff *et al.*, 2001) o de pantallas solares (Przeslawski *et al.*, 2005) pero que en general han sido poco estudiados. Algunas de las funciones adicionales a las tradicionalmente reconocidas para las perivitelinas, podrían constituir agentes protectivos que resulten particularmente significativos en estas especies. En particular, la OR de *P. canaliculata*, posee funciones de protección y transporte de antioxidantes en el FPV, fotoprotección del embrión e inhibición de proteasas

(Norden, 1972; Dreon *et al.*, 2004b). La protección de moléculas antioxidantes en el FPV y su transporte al embrión sería significativa en estadios avanzados del desarrollo embrionario, evitando eventuales daños producidos por foto-oxidación (Dreon *et al.*, 2004b). En cuanto a la inhibición de proteasas, Norden (1972) interpretó esta actividad como un posible sistema de defensa antimicrobiano, basada exclusivamente en la capacidad de la OR de inhibir a la subtilisina, principal proteasa de *Bacillus subtilis*, y takadiastasa, proteasa del hongo *Aspergillus*, aunque sin realizar estudios confirmatorios.

La presencia de sustancias con actividad antimicrobiana ha sido descrita en huevos de numerosas especies de gasterópodos (Benkendorff *et al.*, 2001), aunque en pocos casos se han aislado y caracterizado dichas sustancias (Sanchez *et al.*, 2006). Algunas perivitelinas de nudibranchios presentan actividad bactericida a través de actividades enzimáticas productoras de especies reactivas del oxígeno (H₂O₂) (Kamiya *et al.*, 2006), y también una perivitelina de *Helisoma duryi* podría presentar dicha actividad (Mukai *et al.*, 2004).

La presencia de inhibidores de proteasas en huevos ha sido frecuentemente señalada, aceptándose que su función sería o bien regular la proteólisis de componentes del vitelo o perivitelo, de modo análogo al de los inhibidores intracelulares (Chye *et al.*, 2006), o evitar la invasión microbiana, ya que inhibirían las proteasas extracelulares secretadas por los microorganismos durante la invasión (Christeller, 2005). En muy pocos casos, como en los huevos de *Odorrana grahami*, se ha confirmado que el inhibidor de proteasas tiene efectivamente actividad antimicrobiana (Han *et al.*, 2008), contrastando con otros estudios que vinculan ambas actividades sin una confirmación experimental, como es el caso de la OR (Norden, 1972).

En este capítulo se presentan los resultados de experimentos en los que se buscó explorar aspectos funcionales de las perivitelinas OR y SC en las puestas de *P. canaliculata* y *P. scalaris*. Por un lado se evaluó la capacidad de la SC para proteger su cofactor carotenoide contra el daño de la luz y oxígeno. Además, se estudió la posible actividad antimicrobiana de la OR. Finalmente, y basados en la elevada resistencia a un amplio rango de pH (Cap 5), se realizaron experimentos de resistencia de OR y SC a la digestión con proteasas.

Tenemos en cuenta que los factores que afectan a las puestas, o al desarrollo de los embriones, son múltiples y actúan en forma no independiente uno de otro (Przeslawski, 2004). Por esto, la presencia de un compuesto con ciertas propiedades químicas o biológicas y el hallazgo de alguna respuesta particular en condiciones *in vitro*, no refleja necesariamente lo que ocurre en la naturaleza. Sin embargo, una primera aproximación experimental en modelos más simplificados, es fundamental para comenzar a comprender las adaptaciones de los organismos a su ambiente.

RESULTADOS

1. Rol de la SC en la protección de carotenoides

Para estudiar el posible rol de la SC en la protección de su cofactor carotenoide se prepararon soluciones de: SC, SC reconstituída con astaxantina comercial (rec-SC) y un control de astaxantina (ASX) comercial libre en solución acuosa, los cuales fueron expuestos a luz fluorescente y a 27°C.

En la figura VI.1 se muestra el cambio en la intensidad de absorción de SC, rec-SC y astaxantina libre, en función del tiempo de exposición. Se puede observar que el carotenoide libre resultó mucho más afectado, observándose un decaimiento casi constante, llegando a más de un 80 % de degradación por una mayor susceptibilidad a la oxidación. Por el contrario, los carotenoides asociados a holo-SC y rec-SC, si bien muestran cierto grado de decaimiento, este es menor al 40 % luego de 7 h de exposición.

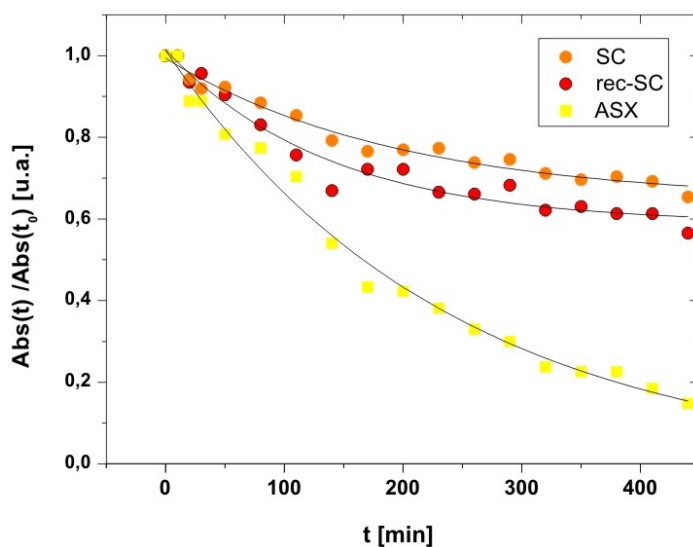


Figura VI.1. Efecto de SC en la estabilidad de su cofactor carotenoide.

Las muestras fueron expuestas a luz, O_2 a 27°C durante 440 min, se determinó la absorbancia a $\lambda = 490$ nm, banda máxima de absorción de la astaxantina, graficando $Abs(t)/Abs(t=t_0)$.

2. Rol de la OR en la Inhibición del crecimiento bacteriano

La capacidad de la OR y del citosol de huevo de *P. canaliculata* para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, fue evaluada en medio nutritivo líquido y sólido, y en medio pobre.

2.1. Ensayos en medio nutritivo sólido

Los ensayos en medio nutritivo sólido se realizaron empleando las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (cepa: JM109) y *Salmonella typhimurium* y las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* (cepa 168) y *Lactobacillus casei*. No se evidenció inhibición del crecimiento de ninguna de las especies bacterianas ensayadas, en ninguna de las condiciones de concentración de OR y citosol de huevo, que alcanzaron los 20 µg para el caso de OR y 30 µg para citosol.

2.2 .Ensayos en medio nutritivo líquido

Los resultados negativos en medio sólido no permitían de por sí descartar un efecto antimicrobiano, por ello se realizaron ensayos en medio líquido que, además, permiten el análisis durante toda la fase de crecimiento. En este caso, utilizando una cepa Gram negativa, *B. subtilis*, y una Gram positiva, *E. coli*, tampoco se observó inhibición del crecimiento respecto del control, aún luego de incubación prolongada (24 h) (Figura VI.2).

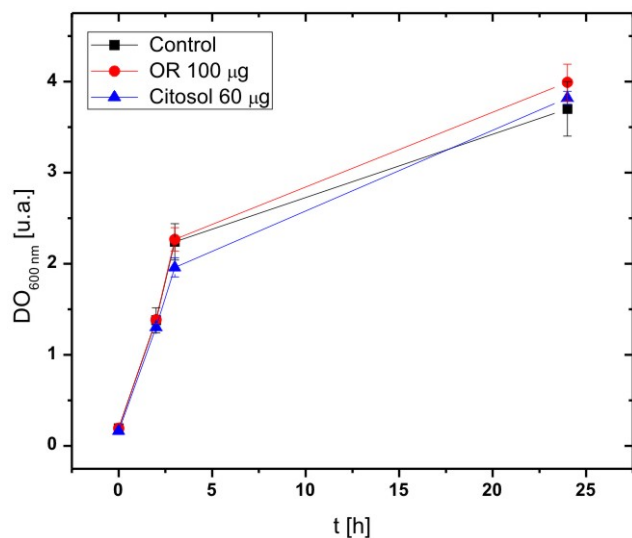


Fig. VI.2. Efecto de la OR y el citosol de huevo de *P. canaliculata* sobre el crecimiento de *E. coli* en medio líquido. Las bacterias fueron incubadas en medio LB con agitación a 37°C, se midió DO a 600 nm a 1, 2h y 24 h.

2.3. Ensayo de actividad proteolítica en medio pobre

De los experimentos anteriores se concluyó que los componentes del FPV de *P. canaliculata*, y en particular la OR, no poseen actividad antibacteriana.

Se decidió, no obstante, realizar otro experimento para comprobar si, pese a esta falta de inhibición del crecimiento bacteriano, la OR ejercía inhibición de las proteasas bacterianas *in vivo*, tal como fuera observado *in vitro* por Norden (1972). Esto permitiría determinar si la OR podría eventualmente al menos evitar o retardar la proteólisis bacteriana de algunos componentes del FPV.

El ensayo se realizó empleando *B. subtilis* debido a que, según se ha reportado, la OR inhibe *in vitro* una de sus proteasas. Se comparó la cepa salvaje y la mutante DB104, que no expresa tres de las principales proteasas de la especie (entre ellas la subtilisina). Ambas cepas se expusieron a la OR y citosol de huevo, en medio nutritivo diluido (medio semi-pobre) al cual se le agregó leche descremada, para observar la proteólisis. Luego de 24 h de incubación, la cepa salvaje (*wild type*, WT) presentó halos de proteólisis similares en todas las condiciones, sin presentar diferencias entre el control y los expuestos a la OR o citosol de huevo (Figura VI.3). La cepa DB104 presentó halos de degradación muy pequeños, pese al crecimiento, confirmando su estado de mutante de proteólisis. En este caso, parece observarse un halo levemente menor en los

tratados con citosol, pero similar al halo que presenta el control. Estos ensayos indican que, si bien la OR inhibe *in vitro* la subtilisina y otras proteasas, esta inhibición no evita la proteólisis por parte de *B. subtilis*.

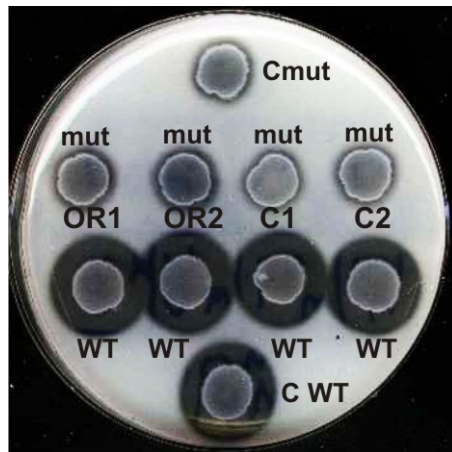


Figura VI.3. Efecto del citosol y la OR sobre el crecimiento de *B. subtilis* en medio medio NB diluído/leche descremada.

CWT, control cepa salvaje; WT, cepa salvaje; Cmut, control cepa mutante; mut, cepa mutante; OR1 y OR2, ovorubina 150 μg y 30 μg , respectivamente; C1 y C2, citosol de huevo, 90 μg y 18 μg , respectivamente.

3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

En estos experimentos se analizó la digestión gastrointestinal *in vitro* intentando simular la proteólisis que sufrirían estas perivitelinas al ser ingeridas por un depredador. Para ello se incubaron las proteínas primeramente en un fluido gástrico simulado, y al cabo de 2 h a 37°C se simuló un fluido intestinal ajustando el pH de la solución por encima de pH 7,0, agregando una sal biliar (ácido taurocólico) y la proteasa intestinal tripsina e incubándose nuevamente a 37°C por otras 2 h. En la figura VI.4 se observa que ambas proteínas resistieron tanto la fase gástrica como la fase la duodenal *in vitro*, mostrando sólo una leve digestión en la fase gástrica.

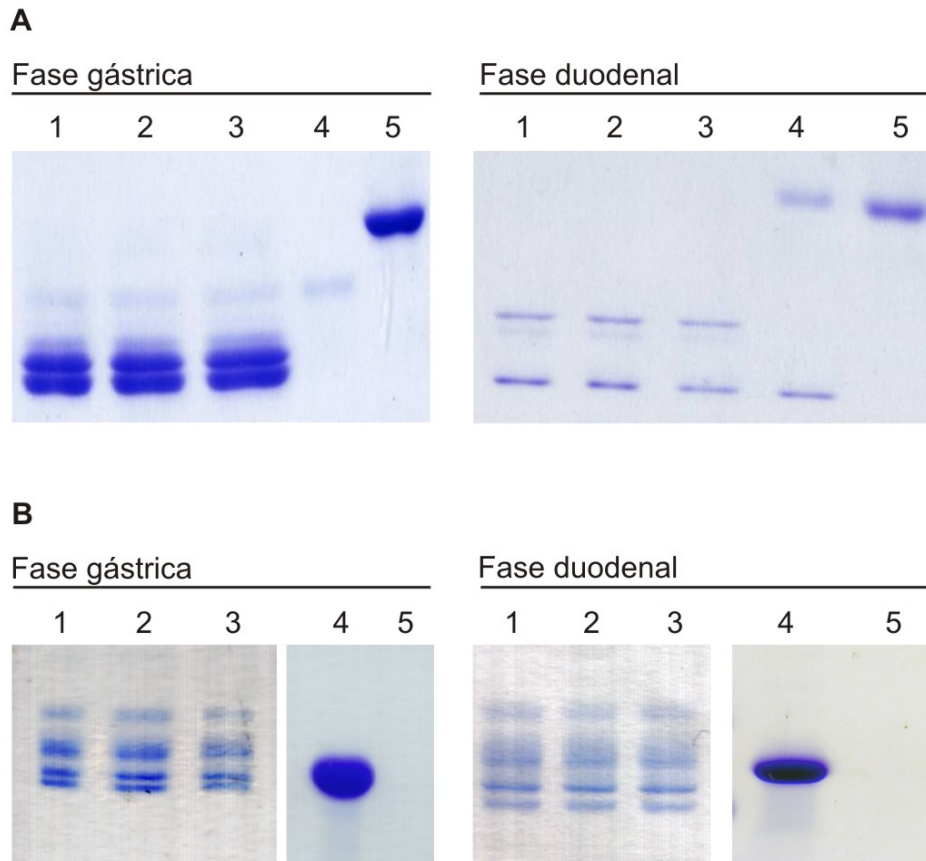


Figura VI.4. Digestión gastrointestinal *in vitro* de OR y SC.

Las proteínas fueron incubadas primero en un fluido gástrico simulado (fase gástrica) y a continuación en un fluido duodenal simulado (fase duodenal). A, digestión de OR; B, digestión de SC. 1, 30 min; 2, 60 min; 3, 120 min; 4, control negativo (albúmina o mioglobina sin enzima); 5, control positivo (albúmina o mioglobina con enzima).

La incubación de la OR y la SC con las proteasas digestivas pepsina y tripsina, mostró que ambas proteínas resisten la digestión durante 2 h (gástrica) seguida de otras 2 h (intestinal) sin sufrir cambios en sus PM, ni mostrar pérdidas de color que indiquen alteraciones estructurales importantes. Sin embargo, cuando la digestión con pepsina se realiza preincubando la OR por más de 24 h en buffer a pH 2,5, sí se observa proteólisis (Fig. VI.5).

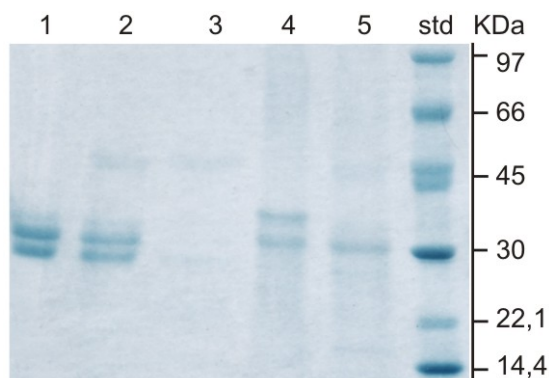


Fig VI.5. Efecto del tiempo de preincubación en la resistencia de OR a la digestión con pepsina. 1, control OR (sin enzima); 2, OR sin preincubación; 3, OR preincubada a pH 2,5 por 24 h previo a la digestión; 4, control negativo (caseína sin enzima); 5, control positivo (caseína con enzima); std estándar de PM.

DISCUSIÓN

Rol de la Escalarina en la protección de carotenoides

Como vimos previamente (Cap. III), la SC de *P. scalaris* contiene un cofactor carotenoides que no resulta indispensable para mantener su estructura oligomérica. En los experimentos presentados aquí se observa que los carotenoides unidos a la SC resultan mucho menos susceptibles a la oxidación que los libres cuando son expuestos a condiciones oxidantes y luz directa. Esta estabilización y protección de los carotenoides resulta relevante en la estrategia de oviposición aérea de *P. scalaris*, si tenemos en cuenta que muy frecuentemente las posturas quedan expuestas a una elevada insolación, la cual puede ir acompañada de elevada temperatura, condiciones en las que los carotenoides libres son muy lábiles. Se puede inferir razonablemente que uno de los roles de SC sería transportar y proteger estos antioxidantes esenciales en el FPV, para cederlos al embrión en desarrollo cuando la SC sea incorporada y degradada de modo que puedan ser utilizados como moléculas antioxidantes. En este sentido, SC cumpliría entonces el mismo rol que fuera establecido para la OR (Dreon *et al.*, 2004b).

Las cápsulas de algunas especies de gasterópodos intermareales presentan aminoácidos de tipo Mycosporinas (MAAs), que absorben la radiación UV de manera muy eficiente, y permiten a estas especies desovar sistemáticamente en sitios de plena insolación (Przeslawski *et al.*, 2005). Sin embargo, otras especies que desovan exitosamente en las mismas condiciones pero que presentan muy bajos contenidos de MAAs, poseen mecanismos para evitar los daños provocados por la radiación UV, que involucran la presencia de moléculas antioxidantes (Przeslawski, 2005). Si bien desconocemos si los huevos de las especies de *Pomacea* estudiadas aquí presentan dichos “filtros solares”, la presencia de astaxantina en las perivitelinas representa una importante reserva de moléculas con elevado poder antioxidante que podrían estar cumpliendo este rol de fotoprotección (Palozza & Krinsky, 1992; Dreon *et al.*, 2004b).

La estrategia de oviposición aérea parece ser una sinapomorfía de las especies más derivadas de Ampullariidae, principalmente del llamado “grupo *Pomacea*”; las especies del Viejo Mundo y los grupos basales del Nuevo Mundo en cambio, retienen la oviposición dentro del agua o cerca de su superficie (Hayes *et al.*, 2009b). Esta nueva estrategia de oviposición podría representar un hecho clave en la evolución reciente de los Ampullariidae. Los grupos derivados son los que incluyen mayor número de especies y exhiben una mayor distribución geográfica, poniendo de manifiesto el carácter ventajoso desde el punto de vista selectivo, de la oviposición aérea. Este cambio en la estrategia reproductiva fue acompañado de cambios anatómicos y fisiológicos que permitieron a los adultos salir fuera del agua durante el desove (Hayes *et al.*, 2009b) y la aparición de adaptaciones bioquímicas en los huevos como carotenoproteínas de efecto protector en el FPV (Heras *et al.*, 2007). Si bien, a excepción del presente trabajo y los realizados en OR, no se han realizado estudios sistemáticos al respecto, las especies que oviponen a cierta altura por encima del agua presentan una coloración llamativa, ya sea en la gama del rojo-rosado o del verde (Perera & Walls, 1996). *Pomacea urceus* que presenta huevos blancos, no los deposita sobre la vegetación sino que son protegidos por la hembra (Estebenet & Cazzaniga, 1993), evitando de este modo el posible efecto deletéreo de la exposición a la radiación ultravioleta. Entre las especies con puestas sumergidas, las de *Asolene puelchella* son incoloras y no contienen cantidades detectables de carotenoides (obs. personal), mientras que las de *Marisa planogyra* son coloreadas, aunque en este caso son depositadas cerca de la superficie (Hayes *et al.*, 2009b), lo que incrementaría su exposición a la radiación.

Las variaciones observadas en la coloración de los huevos en diferentes especies pueden explicarse por las interacciones carotenoide : proteína, las que pueden dar lugar a una amplia gama de colores (Zagalsky, 2003). En particular la asociación del carotenoide astaxantina con proteínas, genera complejos azules (como la crustacianina), verdes (como la ovoverdina), amarillos (como la crustochrina), rojos (como en la OR) y anaranjados (como en la SC). Los resultados de los estudios realizados sobre *P. canaliculata* y *P. scalaris* sugieren que en las especies con oviposición aérea el color de la puesta se debe a la presencia de perivitelininas con carotenoides asociados, los que cumplirían múltiples funciones.

Por un lado, de protección frente a la radiación UV, aportada por el carácter antioxidante de estos compuestos, así como también serían moléculas antioxidantes de fase lipídica utilizadas en los estadios tardíos de la embriogénesis. Por otra parte, como mencionamos, los agentes bióticos y abióticos actúan en conjunto (Przeslawski, 2004) y la oviposición aérea implica tanto la exposición a radiación, deshidratación y temperatura como a potenciales depredadores. En este sentido, además del transporte de antioxidantes, otro de los roles del pigmento carotenoides de estas perivitelininas sería el otorgar al huevo una coloración aposemática o de alarma que advierte sobre la presencia de un sistema de defensa en los huevos, como se desarrolla más abajo en este capítulo (ver Digestión gastrointestinal *in vitro*). No obstante, se requiere estudiar un mayor número de casos para poder realizar generalizaciones sobre la función de la coloración de los huevos de los ampuláridos.

Rol de la OR en la inhibición del crecimiento bacteriano

Las incubaciones con bacterias Gram positivas y Gram negativas demostraron que ni la OR, ni el citosol de huevo de *P. canaliculata* presentan actividad antibacteriana. También se demostró que, si bien la OR inhibe *in vitro* la principal proteasa de *B. subtilis*, esta inhibición no es suficiente para impedir el crecimiento de dicho microorganismo, ni tampoco evitar la proteólisis *in vivo*. Recientemente se ha visto que los huevos de *P. canaliculata* son susceptibles a la infección fúngica (Maketon *et al.*, 2009), estas evidencias, junto con los resultados aquí mostrados, sugieren que si bien esta perivitelinina inhibe serínproteasas del tipo de las presentes en microorganismos patógenos, su función no sería evitar la invasión del huevo por estos microorganismos, como ha sido sugerido (Norden, 1972). La ausencia de actividad antimicrobiana, está de acuerdo con lo observado en los huevos de algunos gasterópodos que presentan cápsulas duras (Pechenik, 1986; Benkendorff *et al.*, 2001).

La acción inhibitoria de serínproteasas presente en la OR, entonces, podría evitar la digestión prematura de otros componentes del FPV, tal como el inhibidor de proteasas de los huevos de *L. stagnalis* que se ha sugerido podría proteger a

sus factores de crecimiento y otros péptidos con función biológica importante (Nagle *et al.*, 1999).

Digestión gastrointestinal *in vitro*

Ambas perivitelinas estudiadas, OR y SC, presentaron resistencia a la digestión por las proteasas pepsina y tripsina. Sólo se observó digestión con pepsina cuando se incubó la OR a pH 2,5 durante 24 h previo al tratamiento enzimático, lo cual está de acuerdo con la desestabilización estructural de la proteína observada a este pH a tiempos largos (Cap. V). Los resultados indican que ambas perivitelinas presentan resistencia a un medio con pH ácido conteniendo proteasas por tiempos menores a las 2 h.

Si bien desconocemos el mecanismo responsable de este comportamiento, la demostrada estabilidad estructural a pH ácido seguramente juega un papel importante ya que la mayoría de las proteínas, en especial si son oligoméricas, sufren una desestabilización de su estructura nativa en esas condiciones, volviéndose al mismo tiempo más susceptibles al ataque proteolítico. Por otro lado, ambas proteínas presentan una elevada glicosilación, y está demostrado que la presencia de carbohidratos otorga a las glicoproteínas resistencia contra la proteólisis (Varki & Lowe, 2009).

Teniendo en cuenta los datos previos que mostraban la estabilidad de OR y SC en un amplio rango de pH, su resistencia a la acción de dos de las proteasas presentes en fluidos digestivos, y la actividad inhibidora de proteasas de la OR, se diseñaron experimentos de digestión gastrointestinal simulada a fin de evaluar la posibilidad de que estas propiedades le confirieran también resistencia dentro del tracto digestivo de un depredador. Sugestivamente, ambas perivitelinas resistieron estas condiciones sin alteraciones apreciables.

Analizando las acciones de los inhibidores de proteasas en la naturaleza, se observa que presentan una función, no descrita en huevos de animales pero que sí ha sido ampliamente estudiada en plantas y que eventualmente podría corresponder al caso de estas perivitelinas. Este es el caso de ciertos inhibidores de naturaleza proteica, presentes en frutos (Wingate *et al.*, 1989), semillas (Alves García *et al.*,

2004), tejidos vegetativos (Zavala & Baldwin, 2004) y tubérculos (Walsh & Twitchell, 1991), que forman parte de un variado sistema de defensa contra depredadores herbívoros, particularmente insectos. Estas proteínas inhiben las proteasas digestivas, impidiendo al depredador digerir e incorporar los nutrientes de los tejidos consumidos (Johnson *et al.*, 1989; Chye *et al.*, 2006). En muchos de estos casos, la expresión génica de los inhibidores es inducida por la depredación, y a su vez algunos depredadores se adaptan a los inhibidores, alterando la cantidad o especificidad de sus proteasas en un ejemplo de coevolución de un sistema de ataque y defensa planta-herbívoro (Mello & Silva-Filho, 2002; Christeller, 2005). Se ha estudiado en laboratorio que estos inhibidores pueden ser perjudiciales para mamíferos (Temler *et al.*, 1984) y peces (Burrells *et al.*, 1999), produciendo a veces alteraciones en la morfología intestinal e hipersecreción de jugo pancreático e hiperplasia del páncreas, que en conjunto provocan pérdidas de nitrógeno y alteraciones en el crecimiento del animal (Barth *et al.*, 1993). Más aún, muchos de estos inhibidores presentan, al igual que la OR y la SC, una elevada estabilidad a la desnaturalización por pH, la que se ha vinculado a la necesidad de mantener el estado nativo (activo) del inhibidor en los fluidos digestivos del depredador, para poder inhibir las proteasas del tracto digestivo (Alves García *et al.*, 2004; Teles *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2005a).

No es posible extrapolar a la resistencia a la digestión de la OR y la SC demostrada aquí, a las condiciones *in vivo* sin tener evidencia experimental. Sin embargo la estabilidad estructural y funcional de estas perivitelinas frente a un amplio rango de pH, aseguraría la acción inhibitoria de serínproteasas en el aparato digestivo de una amplia variedad de organismos, incluyendo vertebrados e insectos (Nation, 2002).

Resulta llamativo que los inhibidores de proteasas presentes en huevos no hayan sido hasta ahora interpretados en este sentido, habiéndose buscado vincular esta actividad a la función de defensa antimicrobiana, aún sin identificar cuáles serían las proteasas inhibidas, de qué posibles patógenos, y sin evidencias de actividad antimicrobiana. Por otro lado, en algunos casos los huevos contienen proteínas específicamente bactericidas, además de inhibidores de proteasas. Ejemplo de esto es el caso del huevo de gallina cuyo albumen contiene inhibidores de proteasas, ovostatina, ovomucoide, ovoinhibidor y cystatina y además un reconocido bactericida, la lisozima (Baron & Réhault, 2006).

Los inhibidores de proteasas no son los únicos compuestos frecuentes en huevos que no han sido interpretados en este sentido. Otra proteína de huevo con potencial función antinutritiva no reconocida sería la avidina, no se trata de un inhibidor de proteasas sino de una proteína que une a la biotina (vitamina B8), con una de las constantes de afinidad más elevadas de la naturaleza. La avidina se encuentra en el albumen del huevo de gallina en su forma libre de biotina, el vitelo del huevo presenta otras dos proteínas que unen biotina (BBP I y BBP II), que presentan una afinidad por la biotina 1000 veces inferior a la avidina, que se corresponde con una función de transporte de la vitamina para el embrión. Si bien la avidina fue descubierta incidentalmente por la toxicidad que causa el suministro de clara de huevo cruda a ratas (Germer Lease *et al.*, 1937; György & Rose, 1941), fue interpretada originalmente como una proteína que secuestra biotina e inhibe la infección bacteriana al observar que inhibía el crecimiento de ciertas levaduras dependientes de biotina (Stevens, 1996). Inclusive, se han construido plantas transgénicas que expresan avidina, la cual les confiere resistencia al ataque por parte de insectos (Burgess *et al.*, 2002; Yoza *et al.*, 2005).

No existe evidencia concluyente *in vivo* para atribuir a las perivitelinas OR y SC un rol antinutritivo, sin embargo los resultados podrían soportar este supuesto. En este sentido, ya hemos indicado que los huevos carecen prácticamente de depredadores naturales y presentan una coloración de advertencia, la cual ha sido vinculada al hecho de ser no palatables (Snyder & Snyder, 1971). Las defensas contra depredadores, por ejemplo las estudiadas en plantas, están integradas por un conjunto amplio de sustancias, de diferente naturaleza química, que se complementan entre sí y apuntan a diferentes depredadores (Felton, 2005). En este sentido, la no palatabilidad, la presencia de una perivitelina con propiedades neurotóxicas (Heras *et al.*, 2008), de proteínas no digeribles, y de inhibidores de proteasas, podrían conformar en conjunto un sistema de defensas advertido mediante la coloración aposemática de las puestas. Tal vez la adquisición de este sistema de defensa contra depredadores fue otra innovación que impulsó la diversificación de las especies de ampelidos que desarrollaron la estrategia de oviposición aérea.

VII.

Conclusiones generales

En esta sección se listan las conclusiones más relevantes de cada capítulo.

⋮

Se avanzó en el conocimiento de la biología reproductiva de Ampullariidae, analizándose el FPV de *Pomacea scalaris* y describiéndose su principal perivitelina. En esta familia sólo se conocían las perivitelinas de una especie.

El FPV de los huevos de *P. scalaris* presenta dos perivitelinas principales, una HDL de 110 kDa y una lipo-glico-carotenoproteína de 380 kDa, altamente glicosilada, a la que se denominó escalarina (SC).

⋮

Las dos especies de *Pomacea* estudiadas hasta el momento presentan, al menos, una perivitelina con características de lipo glico-carotenoproteína, oligomérica, de alto PM, con al menos 3 subunidades, elevada proporción de carbohidratos y muy bajo contenido lipídico, especialmente carotenoides.

Todas las subunidades de SC y OR presentan N- y O-glicanos, con patrones de glicosilación semejantes, que determinan la existencia de isoformas con diferentes PM y pl. La abundante glicosilación podría estar relacionada con la elevada termoestabilidad y resistencia a la proteólisis. Se determinó la presencia de Sias y Fuc, lo que constituye la primera descripción de estos azúcares en integrantes de Caenogastropoda.

⋮

Ambas perivitelinas presentan serinas fosforiladas, las que producen isoformas con diferente pl. Esta modificación postraduccional podría relacionarse con los procesos de incorporación y degradación de las perivitelinas por parte del embrión, aunque también podrían representar una reserva de fósforo para éste.

⋮

Las perivitelinas SC y OR, presentan importantes diferencias bioquímicas y estructurales con las caroteoproteínas de otros invertebrados si bien comparten la

presencia un carotenoide como grupo prostético. Asimismo al determinar sus secuencias N-terminales se observa que si bien presentan un importante grado de homología entre ellas, no muestran homología de secuencia con otras carotenoproteínas. Esta falta de homología podría deberse a los diferentes roles que cumplen las perivitelinas estudiadas.

Las funciones de estas perivitelinas podrían relacionarse con el agresivo ambiente al que se ven expuestos los desoves. Los pigmentos carotenoides que transportan, son moléculas antioxidantes esenciales para la embriogenesis, los que son protegidos de la degradación en el FPV, hasta ser utilizados por el embrión.

A su vez, las interacciones entre la perivitelina y este grupo prostético son responsables de la llamativa coloración del huevo, para la cual se ha postulado un rol aposemático que señalaría a potenciales depredadores que los huevos están defendidos.

∴

La OR de *P. canaliculata* no presenta actividad bactericida ni bacteriostática, ni es capaz de inhibir la proteólisis por parte de *B. subtilis*, al menos en las condiciones ensayadas. Este resultado pone en duda la función en la defensa antimicrobiana sugerida para la actividad inhibitoria de serínproteasas de esta perivitelina.

∴

OR y SC son proteínas muy termoestables, y son estables en un amplio rango de valores de pH. Son asimismo resistentes a la acción de al menos dos de las proteasas más frecuentes en fluidos digestivos de potenciales depredadores, ya sean vertebrados o invertebrados. Teniendo en cuenta estos resultados, los antecedentes de la OR como inhibidor de proteasas, y la función defensiva ampliamente estudiada para los inhibidores de proteasas de tejidos vegetales, se especula que estas perivitelinas podrían representar una defensa antinutritiva para los embriones. Estas especulaciones deberán ser contrastadas con evidencia experimental *in vivo*.

∴

Se ha puesto en evidencia un nuevo rol en perivitelinas de Gasterópodos, las que, además de sus funciones como sustancias de reserva para el embrión, formarían parte de un sistema de defensa bioquímico que incluiría las sustancias no palatables y perivitelinas neurotóxicas previamente descritas, y posiblemente también perivitelinas antinutritivas. Estas defensas del huevo estarían advertidas por la coloración aposemática o de alarma, también proporcionada por las perivitelinas, y explicarían la virtual ausencia de depredadores de los desoves.

VIII.

Bibliografía

- Ackman RG & Heras H. **1997**. Recent applications of HPLC-FID methodology. En: New Technology and applications in lipid analysis. McDonald RE & Mossoba, MM (Eds.), pp. 325-340. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Albrecht EA, Carreño NB, Castro-Vazquez A. **1999**. A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the south American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *J.Mollus.Stud.* 65: 241-250.
- Albrecht EA, Koch E, Carreño NB, Castro-Vazquez A. **2004**. Control of the seasonal arrest of copulation and spawning in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae): Differential effects of food availability, water temperature, and day length. *Veliger* 47: 169-174.
- Alves García V, Machado Freire MdG, Novello JC, Rodrigues Macedo ML. **2004**. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Prot.J.* 23: 343.
- Anton M, Castellani O, & Guérin-Dubiard C. **2006**. Phosvitin. En: *Bioactive egg compounds*. Huopalahti R, López-Fandiño, R, Anton, M, & Schade, R (Eds.), pp. 17-24. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Armitt GM. **1981**. *Studies on invertebrate carotenoproteins. Ph.D. Thesis.*, University of Liverpool.
- Azarkan M, Dibiani R, Goormaghtigh E, Raussens V, Baeyens-Volant D. **2006**. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. *Biochim.Biophys.Acta* 1764: 1063-1072.
- Baron F & Réhault S. **2006**. Compounds with antibacterial activity. En: *Bioactive egg compounds*. Huopalahti R, López-Fandiño, R, Anton, M, & Schade, R (Eds.), pp. 191-198. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Barre P, Bride M, Beliard R, Petracca B. **1991**. Localization of yolk proteins and their possible precursors using polyclonal and monoclonal antibodies, in *Helix aspersa*. *Cell Mol.Biol.* 37: 639-650.
- Barth CA, Lunding B, Schmitz M, Hagemester H. **1993**. Soybean trypsin Inhibitor(s) reduce absorption of exogenous and increase loss of endogenous protein in miniature pigs. *J.Nutr.* 123: 2195-2200.
- Benkendorff K, Davis AR, Bremner JB. **2001**. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *J.Invert.Path.* 78: 109-118.

- Bligh EG, Dyer WJ. **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37: 911-917.
- Bonetto AA, Ezcurra de Drago ID. **1966**. Notas malacológicas IV. 1) Moluscos paranenses en aguas uruguayas y del sur de Brasil. 2) Notas sobre desoves de algunos gasterópodos dulceacuícolas. *Physis* 26: 121-127.
- Bottke W. **1982**. Isolation and properties of vitellogenic ferritin from snails. *J Cell Sci.* 58: 225-240.
- Bramachary RL. **1989**. Mollusca. En: *Reproductive Biology of Invertebrates.*, vol. IV Pt. A. Fertilization, development and parental care. Adiyodi KG & Adiyodi, RG (Eds.), pp. 281-348. John Wiley & Sons, New York.
- Bride M, Petracca B, Faivre D. **1992**. The synthesis of vitellogenins by the digestive gland of *Helix aspersa*: evidence from cell-free translation of mRNA. *Cell Mol.Biol.* 38: 181-187.
- Britton G. **1995**. UV / visible spectroscopy. En: *Carotenoids*, vol. 1B. Britton G, Liaaen-Jensen, S, & Pfander, HP (Eds.), pp. 13-62. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Burela S, Martín PR. **2007**. Nuptial feeding in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 49: 465-470.
- Burela S, Martín PR. **2009**. Sequential pathways in the mating behavior of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 51: 203-210.
- Burgess E, Malone LA, Christeller JT, Lester M, Murray C, Philip BA, Phung M, Tregidga E. **2002**. Avidin expressed in transgenic tobacco leaves confers resistance to two noctuid pests, *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Transgenic Research* 11: 185-198.
- Burgmayr S, Grabher-Meier H, Staudacher E. **2001**. Sialic acids in gastropods. *FEBS Lett.* 508: 95-98.
- Burrells C, Williams PD, Southgate PJ, Crampton VO. **1999**. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 72: 277-288.
- Carlsson NOL, Brönmark C., Hansson LA. **2004**. Invading Herbivory: The golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology* 85: 1575-1580.
- Catalán M, Dreon MS, Heras H, Pollero RJ, Fernández SN, Winik B. **2006**. Pallial oviduct of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda): ultrastructural studies of the parenchymal cellular types involved in the metabolism of perivitellins. *Cell Tissue Res* 324: 523-533.
- Cazzaniga NJ, Estebenet AL. **1984**. Revisión y notas sobre los hábitos alimentarios de los Ampullariidae (Gastropoda). *Historia Natural* 4: 213-224.
- Cazzaniga NJ. **2002**. Old species and new concepts in the taxonomy of *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae). *Biocell* 26: 71-81.

- Chayen NE, Cianci M, Grossmann JG, Habash J, Helliwell JR, Nneji GA, Raftery J, Rizkallah PJ, Zagalsky PF. **2003**. Unravelling the structural chemistry of the colouration mechanism in lobster shell. *Acta Crystallogr. D* 59: 2072-2082.
- Cheesman DF. **1958**. Ovorubin, a chromoprotein from the eggs of the gastropod mollusk *Pomacea canaliculata*. *Proc.R.Soc.Lond.[Biol.]* 149: 571-587.
- Cheesman DF, Lee WL, Zagalsky PF. **1967**. Carotenoproteins in invertebrates. *Biol Rev* 42: 132-160.
- Christeller JT. **2005**. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J.* 272: 5710-5722.
- Chye ML, Sin SF, Xu ZF, Yeung EC. **2006**. Serine proteinase inhibitor proteins: Exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42: 100-108.
- Comfort A. **1947**. Lipochromes in the ova of *Pila*. *Nature* 160: 333-334.
- Comfort A. **1949**. Lipochromes in the ova of *Pila canaliculata* (Lamarck). *Proc.Malac.Soc.Lond.* 27: 262.
- Cowie RH, Thiengo SC. **2003**. The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): A nomenclatural and type catalogue. *Malacologia* 45: 41-100.
- Creighton TE. **1993**. Biosynthesis of Proteins. En: *Proteins. Structures and molecular properties*. pp. 49-104. W. H. Freeman and Company, New York.
- Cuezzo MG. **2009**. Mollusca Gastropoda. En: *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y biología*. Domínguez E & Fernández,HR (Eds.), pp. 595-629. Fundación Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán.
- Cummings RD & Etzler ME. **2009**. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. En: *Essentials of Glycobiology*. Varki A, Cummings,RD, Esko,JD, Freeze,HH, Stanley,P, Bertozzi,CS, Hart,GW, & Etzler,ME (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- d'Orbigny A. **1846**. *Voyage a l'Amerique Meridionale*. Vol. 5, parte 3.
- Davis BJ. **1964**. Disc electrophoresis -II- method and application to human serum proteins. *Ann.NY Acad.Sci.* 121: 404-427.
- Davison A, Blaxter M. **2005**. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Mol.Biol Evol.* 22: 1273-1284.
- Dellisanti CD, Spinelli S, Cambillau C, Findlay JBC, Zagalsky PF, Finet S, Receveur-Brechot V. **2003**. Quaternary structure of alpha-crustacyanin from lobster as seen by small-angle X-ray scattering. *FEBS Lett.* 544: 189-193.

- Dreon MS, Lavarías S, Garín CF, Heras H, Pollero RJ. **2002**. Synthesis, distribution, and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J.Exp.Zool.* 292: 323-330.
- Dreon, MS **2003**. *Perivitelinas de moluscos gasterópodos. Origen, caracterización y funciones. Tesis Doctoral.* Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Dreon MS, Heras H, Pollero RJ. **2003**. Metabolism of overubin, the major egg lipoprotein from the apple snail. *Mol.Cell Biochem.* 243: 9-14.
- Dreon MS, Heras H, Pollero RJ. **2004a**. Characterization of the major egg glycolipoproteins from the perivitellin fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Mol.Reprod.Dev.* 68: 359-364.
- Dreon MS, Schinella G, Heras H, Pollero RJ. **2004b**. Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of overubin. *Arch.Biochem.Biophys.* 422: 1-8.
- Dreon MS, Ceolín M, Heras H. **2007**. Astaxanthin binding and structural stability of the apple snail carotenoprotein overubin. *Arch.Biochem.Biophys.* 460: 107-112.
- Edge AS. **2003**. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem.J* 376: 339-350.
- Endo T, Tsukada T, Hiraiwa M, Uda Y, Kobata A. **1993**. Purification and characterization of an alpha -L-fucosidase from *Pomacea canaliculata*. *Arch.Biochem.Biophys.* 302: 152-160.
- Estebenet AL, Cazzaniga NJ. **1992**. Growth and demography of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under laboratory conditions. *Malacol Rev* 25: 1-12.
- Estebenet AL, Cazzaniga NJ. **1993**. Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *APEX* 8: 129-138.
- Estebenet AL, Martín PR. **2002**. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell* 26: 83-89.
- Felton GW. **2005**. Indigestion is a plant's best defense. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 102: 18771-18772.
- Fukuda M. **1995**. β -elimination for release of o-GalNAc-linked oligosaccharides from glycoproteins and glycopeptides. En: *Current Protocols in Molecular Biology*. pp. 17.15.4-17.15.9. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Garate AM, Milicua JCG, Gomez R, Macarulla JM, Britton G. **1986**. Purification and characterization of the blue carotenoprotein from the caparace of the crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Biochim.Biophys.Acta* 881: 446-455.

- Garín CF, Heras H, Pollero RJ. **1996**. Lipoproteins of the egg perivitellin fluid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda). *J.Exp.Zool.* 276: 307-314.
- Germer Lease J, Parsons HT, Kelly E. **1937**. A comparison in five types of animals of the effects of dietary egg white and of a specific factor given orally or parenterally. *Biochem J.* 31: 433-437.
- Görg A, Postel W, Günther S. **1988**. The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531-546.
- Goudsmit EM. **1972**. Carbohydrates and carbohydrate metabolism in Mollusca. En: *Chemical Zoology*, vol. 7, Mollusca. Florkin M & Scheer, BT (Eds.), pp. 219-243. Academic Press, New York.
- Gravel P. **2002**. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes using lectin blotting. En: *The Protein Protocols Handbook*. Walker JM (Ed.), pp. 779-793. Humana Press Inc., New Jersey.
- Guimarães CT. **1981**. Algumas observações de campo sobre biologia e ecologia de *Pomacea haustum* (Reeve, 1856) (Mollusca, Pillidae). *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 76: 343-351.
- Gutternigg M, Burgmayr S, Poltl G, Rudolf J, Staudacher E. **2007**. Neutral N-glycan patterns of the gastropods *Limax maximus*, *Cepaea hortensis*, *Planorbarius corneus*, *Arianta arbustorum* and *Achatina fulica*. *Glycoconj.J.* 24: 475-489.
- György P, Rose CS. **1941**. Cure of egg-white injury in rats by the "toxic" fraction (avidin) of egg white given parenterally. *Science* 94: 261-262.
- Hammersley, A. P. **1997**. *Fit2D. An Introdution and overview* (ESRF Internal Report ESRF97HAO2T). European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France, (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>).
- Han YP, Yu HN, Yang XB, Rees HH, Liu JZ, Lai R. **2008**. A serine proteinase inhibitor from frog eggs with bacteriostatic activity. *Comp.Biochem.Physiol.* 149B: 58-62.
- Harlow E & Lane D. **1988**. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH. **2008**. Out of South America: Multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Divers.Distrib.* 14: 701-712.
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC. **2009a**. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biol.J.Linn.Soc.* 98: 61-76.

- Hayes KA, Cowie RH, Jørgensen A, Schultheiß R, Albrecht C, Thiengo SC. **2009b**. Molluscan models in evolutionary biology: apple snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. *Amer.Malacol.Bull.* 27: 47-58.
- Heras H, Garín CF, Pollero RJ. **1998**. Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J.Exp.Zool.* 280: 375-383.
- Heras H, Dreon MS, Ituarte S, Pollero RJ. **2007**. Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Arquitaenioglossa). *Comp.Biochem.Physiol. C* 146: 158-167.
- Heras H, Frassa MV, Fernández PE, Galosi CM, Gimeno EJ, Dreon MS. **2008**. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon* 52: 481-488.
- Hodgson AN, Eckelbarger KJ. **2000**. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in six species of patellid limpets (Gastropoda: Patellogastropoda) from South Africa. *Invertebr.Biol.* 119: 265-277.
- Hylton Scott MI. **1957**. Estudio morfológico y taxonómico de los ampuláridos de la República Argentina. *Rev.Mus.Argentino Cienc.Nat."Bernardino Rivadavia"* 3: 1-333.
- Iijima R, Kisugi J, Yamazaki M. **1995**. Antifungal activity of aplysianin E, a cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *Dev.Comp.Immunol.* 19: 13-19.
- Iijima R, Kisugi J, Yamazaki M. **2003**. L-Amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. *Dev.Comp.Immunol.* 27: 505-512.
- Imjongjirak C, Amparyup P, Sittipraneed S. **2008**. Cloning, genomic organization and expression of two glycosyl hydrolase family 10 (GHF10) genes from golden apple snail (*Pomacea canaliculata*). *DNA Seq.* 19: 224-236.
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C. **1989**. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86: 9871-9875.
- Jong-Brink M, Boer HH, & Joosse J. **1983**. Mollusca. En: *Reproductive Biology of invertebrates*, vol. 1. Oogenesis oviposition and oosorption. Adiyodi KG & Adiyodi, RG (Eds.), pp. 297-355. John Wiley & Sons, New York.
- Kamiya H, Sakai R, & Jimbo M. **2006**. Bioactive molecules from sea hares. En: *Molluscs. From chemo-ecological study to biotechnological application*, vol. 43. Cimino G & Gavagnin, M (Eds.), pp. 215-239. Springer-Verlag, Berlin.
- Kawamura F, Doi RH. **1984**. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J.Bacteriol.* 160: 442-444.

- Kisugi J, Kamiya H, Yamazaki M. **1987**. Purification and characterization of aplysianin E, an antitumor factor from sea hare eggs. *Cancer Res.* 47: 5649-5653.
- Kisugi J, Yamazaki M, Ishii Y, Tansho S, Muramoto K, Kamiya H. **1989**. Purification of a novel cytolytic protein from the albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Chem.Pharm.Bull.* 37: 2773-2776.
- Kress A. **1986**. Ultrastructural study of oogenesis and yolk formation in an opisthobranch mollusc, *Runcina*. *Tissue Cell* 18: 915-935.
- Laemmli UK. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lakowicz JR. **1991**. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (2 ed.), Plenum Press, New York.
- Li YH, Guo R, Yin QY, Ding M, Zhang SL, Xu GJ, Zhao FK. **2005**. Purification and characterization of two endo-beta-1,4-glucanases from mollusca, *Ampullaria crossean*. *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)* 37: 702-708.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall R. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, Chen Z, Wang LY, Utzinger J+, Zhou XN. **2009**. Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Negl.Trop. Dis.* 3: e368.
- Maketon M, Suttichart K, Domhom J. **2009**. Effective control of invasive apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck) using *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Malacologia* 51: 181-190.
- Manzi AE. **1995**. Total Compositional Analysis by High-Performance Liquid Chromatography or Gas-Liquid Chromatography. En: *Current Protocols in Molecular Biology*. pp. 17.19.1-17.19.25. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Manzi AE & Esko JD. **1995**. Direct chemical analysis of glycoconjugates for carbohydrates. En: *Current Protocols in Molecular Biology*. pp. 17.9.1-17.9.11. John Wiley & Sons, Inc.
- Mao X, Luo Y, Dai Z, Wang K, Du Y, Lin B. **2004**. Integrated lectin affinity microfluidic chip for glycoform separation. *Anal. Chem.* 76: 6941-6947.
- Martín PR, Estebenet AL, Cazzaniga NJ. **2001**. Factors affecting the distribution of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) along its southernmost natural limit. *Malacologia* 43: 13-23.

- Martín PR, Estebenet AL. **2002**. Interpopulation variation in life-history traits of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Malacologia* 44: 153-163.
- Matsumoto T, Yamano K, Kitamura M, Hara A. **2008**. Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp.Biochem.Physiol. A* 149: 293-298.
- Mello MO, Silva-Filho MC. **2002**. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz.J.Plant Physiol.* 14: 71-81.
- Miksysis SL, Saleuddin AS. **1986**. Ferritin as an exogenously derived yolk protein in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can.J.Zool.* 64: 2678-2682.
- Mochida O. **1991**. Spread of freshwater *Pomacea* snails (Pilidae, Mollusca) from Argentina to Asia. *Micronesica* 3: 51-62.
- Moreno FJ, Maldonado BM, Wellner N, Mills EN. **2005a**. Thermostability and *in vitro* digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). *Biochim.Biophys.Acta* 1752: 142-153.
- Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MS, Bottrill AR, Mills EN. **2005b**. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant *in vitro* gastrointestinal digestion. *FEBS J.* 272: 341-352.
- Mukai ST, Hoque T, Morishita F, Saleuddin AS. **2004**. Cloning and characterization of a candidate nutritive glycoprotein from the albumen gland of the freshwater snail, *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Invertebr.Biol.* 123: 83-92.
- Nagle GT, Akalal DBG, Painter SD. **1999**. Maternal impact on egg development in *Lymnaea stagnalis*: A growth factor is produced by the albumen gland in the reproductive tract. *Invertebr.Reprod.Dev.* 36: 171-174.
- Nagle GT, Painter SD, Li KW. **2001**. Structure, localization and potential role of a novel molluscan trypsin inhibitor in *Lymnaea*. *Eur.J.Biochem.* 268: 1213-1221.
- Nation JL. **2002**. Digestion. En: *Insect physiology and biochemistry*. pp. 27-63. CRS Press, Boca Raton.
- Nohle U, Shukla AK, Schroder C, Reuter G, Schauer R, Kamerling JP, Vliegenthart JF. **1985**. Structural parameters and natural occurrence of 2-deoxy-2,3-didehydro-N-glycoloylneuraminic acid. *Eur.J.Biochem.* 152: 459-463.
- Norden DA. **1972**. The inhibition of trypsin and some other proteases by ovorubin, a protein from the eggs of *Pomacea canaliculata*. *Comp.Biochem.Physiol. B* 42: 569-576.
- Ornstein L. **1964**. Disc electrophoresis -I- background and theory. *Ann.NY Acad.Sci.* 121: 321-349.

- Orr JR, Adamson GL, & Lindgren FT. **1991**. Preparative ultracentrifugation and analytic ultracentrifugation of plasma lipoproteins. En: *Analyses of fats, oils and lipoproteins*. Perkins EG (Ed.), pp. 525-554. AOCS press, Champaign, Illinois.
- Palozza P, Krinsky NI. **1992**. Astaxanthin and cantaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch.Biochem.Biophys.* 297: 291-295.
- Park Y, Zhang Z, Laremore TN, Li B, Sim JS, Im AR, Ahn MY, Kim YS, Linhardt RJ. **2008**. Variation of acharan sulfate and monosaccharide composition and analysis of neutral N-glycans in African giant snail (*Achatina fulica*). *Glycoconj.J.* 25: 863-877.
- Parrish CC, Ackman RG. **1985**. Calibration of the Iatroscan-Chromarod system for marine lipid class analyses. *Lipids* 20: 521-530.
- Pechenik JA. **1986**. The encapsulation of eggs and embryos by Molluscs: An overview. *Am.Malacol.Bull.* 4: 165-172.
- Perera G & Walls GH. **1996**. *Apple Snails in the Aquarium.*, T.F.H. Publications Inc., Neptune, 121pp.
- Pizani NV, Estebenet AL, Martín PR. **2005**. Effects of submersion and aerial exposure on clutches and hatchlings of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Am.Malacol.Bull.* 20: 55-63.
- Pointier JP, Jourdane J. **2000**. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Trop.* 77: 53-60.
- Ponder WF, Lindberg DR. **1997**. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: Analysis using morphological characters. *Zool.J.Linn.Soc.* 119: 83-265.
- Przeslawski R. **2004**. A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Moll.Res.* 24: 43-63.
- Przeslawski R. **2005**. Combined effects of solar radiation and desiccation on the mortality and development of encapsulated embryos of rocky shore gastropods. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 298: 169-177.
- Przeslawski R, Benkendorff K, Davis AR. **2005**. A quantitative survey of mycosporine-like amino acids (MAAS) in Intertidal egg masses from temperate rocky shores. *J.Chem.Ecol.* 31: 2417-2438.
- Raven CP. **1972**. Chemical embryology of Mollusca. En: *Chemical Zoology*, vol. 7, Mollusca. Florkin M & Scheer, BT (Eds.), pp. 155-185. Academic Press, New York.
- Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, Collins TM. **2007**. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC.Evol.Biol.* 7: 97.
- Réhault S. **2006**. Antiproteases. En: *Bioactive egg compounds*. Huopalahti R, López-Fandiño, R, Anton, M, & Schade, R (Eds.), pp. 85-92. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Ruxton GD, Sherratt TN, & Speed MP. **2004**. The form and function of warning displays. En: *Avoiding attack. The evolutionary ecology of crypsis, warning signals and mimicry*. pp. 82-103. Oxford University Press, Oxford.
- Sabotič J, Popovic T, Puizdar V, Brzin J. **2009**. Macrocybins, a family of cysteine protease inhibitors from the basidiomycete *Macrolepiota procera*. *FEBS J.* 276: 4334-4345.
- Salares VR, Young NM, Bernstein HJ, Carey PR. **1979**. Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins The resonance raman spectra of ovoverdin and the crustacyanins. *Biochim.Biophys.Acta* 576: 176-191.
- Sanchez JF, Lescar J, Chazalet V, Audfray A, Gagnon J, Alvarez R, Breton C, Imberty A, Mitchell EP. **2006**. Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J.Biol.Chem.* 281: 20171-20180.
- Seuffert ME, Martín PR. **2008**. Influence of temperature, size and sex on aerial respiration of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from southern pampas, Argentina. *Malacologia* 51: 157-166.
- Snyder NFR, Snyder HA. **1971**. Defenses of the Florida apple snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour* 40: 175-215.
- Spiro RG. **2002**. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12: 43R-56R.
- Staudacher E, Altmann F, Wilson IB, Marz L. **1999**. Fucose in N-glycans: from plant to man. *Biochim.Biophys.Acta* 1473: 216-236.
- Stevens L. **1996**. Egg proteins: what are their functions? *Sci. Prog.* 79 (Pt 1): 65-87.
- Suzuki M, Yoshida K, Ashida K. **1991**. Purification and characterization of xylanase from the mid-gut gland of the apple snail (*Pomacea canaliculata*). *Agric Biol Chem* 55: 693-700.
- Svergun DI. **1992**. GNOM 4.5. *J.Appl.Cryst.* 25: 495-503.
- Tamburi NE, Martín PR. **2009**. Reaction norms of size and age at maturity of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under a gradient of food deprivation. *J.Mollus.Stud.* 75: 19-26.
- Taylor ME & Drickamer K. **2003**. *Glycobiology.*, Oxford University Press Inc., New York.
- Teles RC, de Souza EM, Calderon LA, de Freitas SM. **2004**. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Phytochem.* 65: 793-799.
- Teles RC, Calderon LA, Medrano FJ, Barbosa JA, Guimaraes BG, Santoro MM, de Freitas SM. **2005**. pH dependence thermal stability of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Biophys.J* 88: 3509-3517.

- Temler RS, Dormond CA, Simon E, Morel B, Mettraux C. **1984**. Response of rat pancreatic proteases to dietary proteins, their hydrolysates and soybean trypsin inhibitor. *J.Nutr.* 114: 270-278.
- Varki A & Lowe JB. **2009**. Biological roles of glycans. En: *Essentials of Glycobiology*. Varki A, Cummings,RD, Esko,JD, Freeze,HH, Stanley,P, Bertozzi,CS, Hart,GW, & Etzler,ME (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Varki A, Freeze HH, & Gagneux P. **2009**. Evolution of Glycan Diversity. En: *Essentials of Glycobiology*. Varki A, Cummings,RD, Esko,JD, Freeze,HH, Stanley,P, Bertozzi,CS, Hart,GW, & Etzler,ME (Eds.), pp. 281-292. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Villarroel A, Garate AM, Gomez R, Milicua JCG. **1985**. A blue carotenoprotein from *Upogebia pusilla*. Purification, characterization and properties. *Comp.Biochem.Physiol.* B 81: 547-550.
- von Darl M, Harrison PM, Bottke W. **1994**. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L. *Eur.J Biochem.* 222: 353-366.
- Walsh TA, Twitchell WP. **1991**. Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.* 97: 15-18.
- Wingate VP, Broadway RM, Ryan CA. **1989**. Isolation and characterization of a novel, developmentally regulated proteinase inhibitor I protein and cDNA from the fruit of a wild species of tomato. *J.Biol.Chem.* 264: 17734-17738.
- Wourms JP. **1987**. Oogenesis. En: *Reproduction of marine invertebrates. Vol IX. General aspects: seeking unity in diversity*. Giese AC, Pearse,JS, & Pearse,VB (Eds.), pp. 49-178. Blackwell Sci. Publ., Pacific Grove.
- Yamazaki M, Kisugi J, Kamiya H, Kimura S, Mizuno D. **1985**. Purification of antineoplastic factor from eggs of a sea hare. *FEBS Lett.* 185: 298.
- Yoza K, Imamura T, Kramer KJ, Morgan TD, Nakamura S, Akiyama K, Kawaski S, Takaiwa F, Ohtsubo K. **2005**. Avidin expressed in transgenic rice confers resistance to the stored-product insect pests *Tribolium confusum* and *Sitotroga cerealella*. *Biosci.Biotech.Biochem.* 69: 966-971.
- Yusa Y. **2001**. Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. *J.Mollus.Stud.* 67: 275-279.
- Zagalsky PF. **1972**. Comparative studies on the amino acid compositions of some carotenoid-containing lipoglycoproteins and a glycoprotein from the eggs and ovaries of certain aquatic invertebrates. *Comp.Biochem.Physiol.* B 41: 385-395.

- Zagalsky PF, Eliopoulos EE, Findlay JB. **1990**. The architecture of invertebrate carotenoproteins. *Comp.Biochem.Physiol.* B 97: 1-18.
- Zagalsky PF, Mummery RS, Winger LA. **1995**. Cross-reactivities of polyclonal antibodies to subunits, CRTA and CRTC, of the lobster carapace carotenoprotein, α -crustacyanin, and of monoclonal antibodies to human serum retinol-binding protein against carotenoproteins of different types and from separate invertebrate species. *Comp.Biochem.Physiol.* B 110: 385-391.
- Zagalsky PF. **2003**. β -Crustacyanin, the blue-purple carotenoprotein of lobster carapace: consideration of the bathochromic shift of the protein-bound astaxanthin. *Acta Crystallogr.* D 59: 1529-1531.
- Zavala J, Baldwin IT. **2004**. Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BMC Ecology* 4: 11.