UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

PROPIEDADES ESTRUCTURALES E INMUNOGENICIDAD DE LA HEMOCIANINA DE *Tegula funebralis.*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

CLAUDIA MARIANA GÓMEZ GUTIÉRREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. DICIEMBRE 2011.

RESUMEN

Se evaluó el efecto O_2 en la síntesis, el potencial inmunogénico, y las propiedades estructurales de la hemocianina de *Tegula funebralis.* La respuesta a condiciones hipóxicas se evaluó en una serie de tiempo de 0, 48, 96, 144, 192 y 240 h. Después de las 240 h de exposición se observó que el succinato incrementó 13 veces más que la concentración observada en el grupo control. La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) aumentó durante las primeras 48 h, posteriormente disminuyó a las 96 h y se incrementó dramámaticamente hasta alcanzar su máxima actividad a las 192 y 240 h. Los cambios en la concentración de proteínas y los encontrados en la actividad de la LDH concuerdan con el cambio en el numero de subunidades en las muestras de hemocianina correspondientes a cada grupo de exposición. El análisis de subunidades muestra la presencia de 5, 5, 8, 3, 3 y 4 tipos de subunidades para los organismos expuestos a 0, 48, 96, 144, 192 y 240 respectivamente. Por otra parte, el número de subunidades incrementa a la par de la actividad de la LDH, alcanzando la máxima diversidad de subunidades a las 96 h en donde se observó que la concentración de proteínas alcanzó su máxima concentración. El contenido de carbohidratos en la hemocianina de *T. funebralis* osciló entre 3.13% y 25.5%. A pesar de la variación del nivel de carbohidratos mostrado a lo largo del experimento, el comportamiento general de este parámetro, después del drástico aumento en las primeras 48 h de hypoxia, presenta una tendencia general a la disminución, a diferencia del contenido de proteína total, que muestra una tendencia al aumento. Con base en el contenido de carbohidratos en la Hc* de *Tegula* se realizaron las pruebas de inmunogencidad utilizando la Hc de megathura crenulata antígeno conocido como punto de comparación. Se observó una baja producción de fluido ascítico en los

animales de experimentación inoculados tanto con Hc de *T. funebralis* como de *M. crenulata* ambas a la concentración de 0.2 mg/mL, loque indica que esta concentración es insuficiente para inducir una respuesta inmunológica. Los resultados encontrados en este trabajo indican que la Hc de *T. funebralis* en condiciones aeróbicas tiene la propiedad de activar el sistema inmunológico de mamíferos y que la Hc de *T. funebralis* en condiciones hipóxicas carece de esta característica, lo que muestra que existen diferencias estructurales entre ellas.

Lo encontrado en este trabajo sugiere que cuando *T. funebralis* se encuentra en una transición aerobiosis-hipoxia, enfrenta la escasez de oxígeno mediante una estrategia de procesos coordinados que incluyen, además de la adaptación metabólica, la inducción de la síntesis de proteínas con rasgos estructurales similares a los de la hemocianina, cuyas diferencias permitirían una mejor tolerancia del organismo a una condición anóxica prolongada.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PROPIEDADES ESTRUCTURALES E INMUNOGENICIDAD DE LA HEMOCIANINA DE *Tegula funebralis*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

CLAUDIA MARIANA GÓMEZ GUTIÉRREZ

Aprobada por:

Dra. Graciela Guerra Rivas
Director de tesis

Dra. Irma Esthela Soria Mercado
Sinodal

Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Sinodal

Dr. Enrique Ramón Angeles Anguiano
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

- Al la Dra. Graciela Guerra Rivas jefa del laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina por permitirme ser parte de ese espacio que me permitió ser gran parte de lo que ahora soy.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. de registro 169357**).**
- Al Dr. Angeles, la Dra. Cordero, el Dr. García y la Dra. Soria por los comentarios, las sugerencias y correcciones hechas a este trabajo.
- A las Oceanólogas Isajav Rivas Reyes y Xóchitl Rojas por su ayuda en la realización de este trabajo.
- Al personal del Almacén de la Facultad de Ciencias Marinas (María del Milagro, Manuel, Epigmenio y Arturo) por el apoyo brindado para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	**1**
II. ANTECEDENTES……..……	**14**
III. HIPOTESIS	**27**
IV. OBJETIVO GENERAL.....	**27**
IV.1. Particulares.....	**28**
V. METODOLOGÍA.....	**29**
V.1. Colecta y mantenimiento de organismos…….....	**29**
V.2. Bioensayos……	**30**
V.2.1. Bioensayo 1…….	**31**
V.2.2. Bioensayo 2…….	**31**
V.3. Ensayo enzimático……..……...	**33**
V.3.1. Lactato deshidrogenasa (LDH: EC 1.1.1.27) …….	**33**
V.3.2. Determinación de proteínas……...	**33**
V.4. Análisis de hemolinfa…….....	**34**
V.4.1. Extracción de hemolinfa…….	**34**
V.4.2. Cuantificación de succinato en hemolinfa……..…….	**34**
V.4.3. Determinación de pH……..	**35**
V.4.4. Aislamiento y cuantificación de hemocianina……	**35**
V.5. Análisis de hemocianina……	**36**
V.5.1. Determinación de peso molecular. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE)……..…….	**36**
V.5.2. Determinación del contenido de carbohidratos…….	**37**
V.5.3. Determinación del número de subunidades…...……	**38**
V.6. Pruebas de inmunogenicidad……...	**38**
V.6.1. Inoculación…..……..	**39**

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.6.2. Purificación y cuantificación de anticuerpos……	**41**
V.6.3. Ensayo ELISA (cualitativo)…….	**42**
V.6.3.1. Conjugación anticuerpo-peroxidasa de rábano..	**42**
V.6.3.2. Análisis por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)……	**42**
V.7. Análisis estadístico…….	**43**
VI. RESULTADOS….....	**44**
VI.1. Bioensayo 1……	**44**
VI.2. Bioensayo 2……	**45**
VI.3. Concentración de proteínas en hemolinfa…….	**47**
VI.4. Cuantificación de succinato en hemolinfa…….	**48**
VI.5. Aislamiento y cuantificación de hemocianina……	**49**
VI.6. Electroforesis fracciones columna CL-4B……..	**56**
VI.7. Porcentaje de carbohidratos……	**58**
VI.8. Determinación del número de subunidades……..	**60**
VI.9. Concentración de proteína en las fracciones eluídas de la columna DEAE CL-6B……	**64**
V.9.1. Electroforesis de las fracciones DEAE CL-6B……..	**65**
VI.10. Pruebas de inmunogenicidad……	**66**
VII. DISCUSIÓN.....	**71**
IX. CONCLUSIONES.....	**86**
LITERATURA CITADA……	**88**

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Grupos de experimentación y tiempo de exposición a condiciones hipóxicas para cada grupo (N=245; n=35).	32
II	Concentraciones de antígeno utilizadas en la prueba de inmunogenicidad. Se incluye la nomenclatura utilizada para cada grupo (N=70; n=10).	40
III	Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en cinco grupos de exposición a condiciones de hipoxia. La actividad se definió en términos de los μmoles de NADH oxidado por minuto por cada mg de proteína (μmol min^{-1} mg^{-1} prot). En todos los casos n = 10; DE = Desviación estándar.	45
IV	Concentración de proteínas correspondientes en las fracciones obtenidas de la columna de Sepharose CL-4B a partir de la hemolinfa de cada grupo de experimentación. Se indica la nomenclatura para cada muestra y las fracciones que la conforman. Se resaltan las muestras en las cuales se identificaron los dos picos de absorción máxima característicos de la hemocianina (280 y 347 nm).	55
V	Porcentaje relativo de hemocianina* en la hemolinfa de los grupos experimentales.	56
VI	Proteínas identificadas mediante electroforesis en geles de acrilamida (6.0%) para los siete grupos de experimentación. Los grupos G_C y G_0 se consideraron como los grupos de control.	58
VII	Porcentaje de carbohidratos en las muestras estándar y las muestras de los grupos experimentales.	59
VIII	Concentración de proteínas correspondientes a las fracciones obtenidas a partir de la columna DEAE CL6B.	65
IX	Volumen de fluido ascitico obtenido de ratones BALB/c-hembras de trece semanas de edad.	67

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
IX	Volumen de fluido ascitico obtenido de ratones BALB/c-hembras de trece semanas de edad.	67
X	Purificación de anticuerpos a partir del fluido ascítico obtenido de ratones inoculados con los antígenos siguientes: Mb=hemocianina *M. crenulata* 2.00 mg/mL; Tb = hemocianina *T. funebralis* 2.00 mg/mL; THb = hemocianina *T. funebralis* en condiciones hipóxicas 2.00 mg/mL. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de proteína en relación con la concentración al inicio de la purificación*.	69
XI	Resultados ensayo ELISA para el anticuerpo purificado de ratones inoculados con Hc de *M. crenulata* 2.0 mg/mL y Hc de *T. funebralis*. Antígeno=Hc *M. crenulata* y Hc de *T. funebralis*; marcador=peroxidasa de rábano; longitud de onda 450 nm.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Zonación litoral…….....……	1
2	Ruta metabólica propuesta para invertebrados en condiciones de hipoxia. Adaptado de Storey y Storey (2004)…….....	5
3	Grupo prostético denominado hemo. Se indica el átomo de hierro al cual se une reversiblemente el oxígeno…….	7
4	Estructuras representativas para la hemocianina. **A**, Estructura cuaternaria de una hemocinana representativa para moluscos (*Haliotis tuberculata*), consiste de 20 cadenas polipeptídicas, cada una con 8 unidades funcionales (FU). **B**, Estructura terciaria de una unidad funcional (FU) de hemocianina de *Octopus doflein*. Tomadas de van Holde *et al*. (2001)……	8
5	Estructuras representativas de un anticuerpo. **A**, Estructura en donde se observan las cadenas pesadas (H por sus siglas en inglés, heavy chains) en color morado, las cadenas ligeras (L por sus siglas en inglés, light chains) en color verde y puentes disulfuro intracatenarios en rojo. V=región variable; C=región constante. **B**, Modelo de listones de un anticuerpo. Tomado de Abbas y Lichtman (2004)…….	11
6	Niveles estructurales de la hemocianina de moluscos. Tomada de Decker *et al*. (2007)…….....	15
7	Ubicación geográfica de la zona de colecta, playa Ejido Eréndira, B. C (31°17’23.99 N, 116°24’13.35 W). Se observa imagen de *Tegula funebralis*……	30
8	Inoculación intraperitoneal……...	40
9	Valores de actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) correspondientes al bioensayo dos. Se observan los cinco grupos de exposición a condiciones de hipoxia y los grupos de control de cada grupo de experimentación. La actividad se expresa en μmoles de NADH oxidado por minuto por cada mg de proteína (μmol $min^{-1}mg^{-1}$ prot). En todos los casos, el número de organismos expuesto fue de 35 para los grupos de experimentación y de 5 para los grupos control (aeróbicos)……..	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Concentración de proteínas en los grupos de experimentación y en los grupos de control. En las abscisas se representa a cada grupo de exposición (línea azul) y su respectivo control (línea roja).....	47
11	Concentración de succinato en los grupos de experimentación y en los grupos de control. En las abscisas se representa a cada grupo de exposición (línea azul) y su respectivo control (línea roja).....	48
12	Espectro de elución de la columna de Sepharose CL-4B en amortiguador de fosfatos pH 7.0. Muestra: hemolinfa de *Tegula funebralis*. Velocidad de flujo: 8 mL/h, fracciones de 2.2 mL.....	49
13	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_C provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.....	51
14	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_0 provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.....	51
15	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{48} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.....	52
16	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{96} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.....	52

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
17	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{144} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm…….	53
18	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{192} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.……	53
19	Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{240} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm..……...	54
20	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al %6.5. En los carriles 2,3, 6 y 7 se observan las muestras. En el carril 4 y 9 se observan los marcadores moleculares (anhidasa carbónica (29kDa), albúmina de huevo (45 kDa), albúmina bovina (66 kDa), fosforilasa B de conejo (97.4 kDa), β-Galactosidasa de *E. coli* (116 kDa) y Miosina de músculo de conejo (200 kDa)……..	57
21	Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las muestras correspondientes a cada grupo de experimentación (r^2=0.9967)……..	57
22	Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G0}. La fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / h y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados…….	61

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
23	Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G48}. La fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / h y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados…….	61
24	Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G96}. La fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados…….	62
25	Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G144}. La fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados…….	62
26	Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G192}. La fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados…….	63
27	Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G240}. La fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados…….	63
28	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6.0 %. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a la muestra M_{G0} y los carriles 6, 7 y 8, a la muestra M_{G48}. En el carril 1 y 2 se observan los marcadores moleculares: albúmina bovina (66kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α-lactoalbúmina (14.2 kDa). Carril 9 = blanco…….	66
29	Efecto de antígenos en el abdomen de ratones de trece semanas de edad variedad BALB/c-hembras. A = Ascitis moderada; B = Ascitis severa; C = Obtención del fluído ascítico.	68

I. INTRODUCCIÓN

La zona litoral o costera es la interfase entre la atmósfera, la hidrósfera y la litósfera es la parte de la plataforma continental más cercana a tierra firme. Su ubicación le confiere características específicas como cambios del nivel del mar (mareas) y erosión. Dentro de la zona litoral se encuentra la zona intermareal, la cual está delimitada por el nivel superior de la pleamar y la zona inferior de la bajamar; su extensión es variable, aunque generalmente comprende pocos metros (Fig. 1).

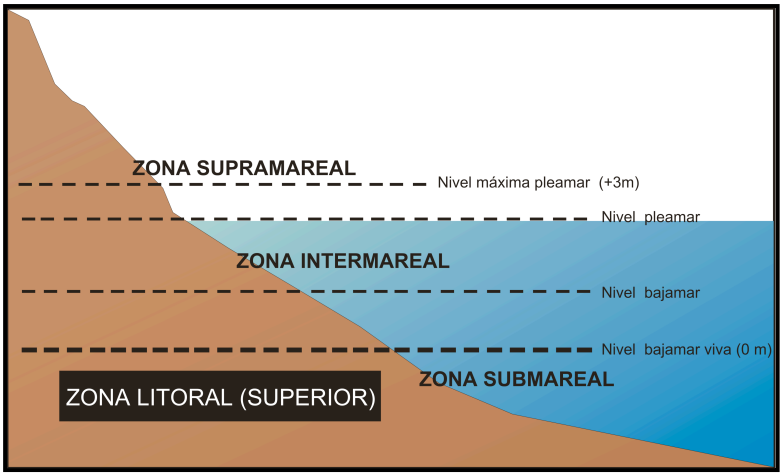

Fig. 1. Zonación litoral

La zona intermareal se caracteriza por estar expuesta al aire durante periodos a lo largo del día. Este lapso de tiempo es denominado baja marea, durante la cual los organismos que habitan esta zona son sometidos a cambios en factores tanto químicos como físicos. Estos cambios incluyen variaciones en el pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno y agua, salinidad, concentración de solutos e irradiación solar. Todo lo anterior

ocasiona que se observe una clara zonación en la vida marina, apreciable sobre todo en las partes rocosas, ya que los organismos se distribuyen en función de los factores que los condicionan. Esta distribución también está relacionada con las adaptaciones con las que cuenta cada especie para evitar o minimizar el estrés al que son sometidos durante periodos de baja marea.

Las adaptaciones que se han encontrado en los organismos intermareales pueden describirse de dos formas. La primera se relaciona con adaptaciones fisiológicas, las cuales les ayudan a evitar las condiciones de estrés mediante la migración o aislándose del medio, como en el caso de crustáceos y bivalvos. La segunda implica la modificación de su metabolismo, mediante la inhibición o activación de algunos procesos relacionados con la obtención de energía. Algunas especies se protegen mediante un solo tipo de adaptación; sin embargo, para los organismos con poca o nula movilidad es necesario que cuenten con más de un mecanismo, sobre todo cuando se presentan modificaciones en más de una variable ambiental (Slusarczyk, 2004). Cuando los organismos no tienen respuestas fisiológicas ante las variaciones de su ambiente, su sobrevivencia depende directamente de las adaptaciones a nivel metabólico.

En caso de ser necesarias, las adaptaciones metabólicas son posibles gracias a que, tanto las moléculas biológicas como las reacciones bioquímicas, son sensibles a las variaciones de los parámetros ambientales tales como la temperatura, presión, pH, fuerza iónica, concentración de solutos, disponibilidad de agua, radiación y ataque mediante radicales libres

(Hochachka y Somero, 2002). Por otra parte, todas las células y organismos necesitan mantener un aporte de energía mínimo para mantenerse viables. Ese aporte se da químicamente en forma de adenosín trifosfato (ATP), el cual es utilizado en reacciones endergónicas y en la molécula reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), ambos necesarios durante los procesos anabólicos (Nelson y Cox, 2002).

Una de las adaptaciones bioquímicas más eficaces para la sobrevivencia de los organismos intermareales cuando se presentan periodos de baja marea, es la tolerancia a condiciones hipóxicas y anóxicas. Los organismos que viven bajo estas condiciones son anaeróbicos facultativos; esto significa que tienen la capacidad de modificar su metabolismo en función de la disponibilidad de oxígeno en el medio. De esta forma, durante periodos de marea alta, cuando el oxígeno está disponible, moléculas como carbohidratos, lípidos y aminoácidos se oxidan completamente hasta moléculas de CO_2 con la producción concomitante de H_2O y ATP. Esto se debe a que tanto la glucólisis, la β-oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos están acoplados al ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, en donde se sintetiza la mayor cantidad de ATP. Sin embargo, tanto el ciclo de Krebs como la cadena respiratoria dependen directamente de la concentración de oxígeno, por lo que, cuando dicha concentración disminuye a tal grado que se considera un estado de hipoxia o anoxia, el aporte de energía depende directamente de la glucólisis, ruta anaeróbica específica para carbohidratos. Una vez que la respuesta a la condición de hipoxia comienza, la concentración de lactato, Ca^{+2}, urato y

succinato aumentan. De acuerdo con Storey y Storey (2004), lo anterior puede generar cambios a nivel celular y molecular tales como:

1. Incrementos o disminución en la expresión de algunos genes para generar cambios en los niveles de algunas proteínas.
2. Alteración de las propiedades cinéticas y regulatorias de las enzimas y las proteínas funcionales.
3. Cambios en la susceptibilidad de las enzimas a modificaciones covalentes, como fosforilaciones reversibles mediante quinasas y fosfatasas.
4. Cambios en las propiedades de interacción entre las proteínas que alteran la composición de los complejos enzima-proteína.
5. Cambios en la composición de la membrana para compensar los cambios ambientales.

Cuando las condiciones de hipoxia o anoxia se mantienen, los carbohidratos son oxidados a piruvato mediante la glucólisis y posteriormente reducidos a lactato en un proceso llamado fermentación láctica. A diferencia de la mayoría de los vertebrados, el lactato no es el único producto del metabolismo anaeróbico en moluscos. Dependiendo de la especie y de la duración de la anoxia se pueden acumular metabolitos como alanina, succinato, propionato y opinas (Kapper y Stickle, 1987). Cuando los periodos de hipoxia son prolongados, los tejidos comienzan a acidificarse, lo cual activa la transaminación del piruvato a partir del aspartato para la

producción de alanina y oxalacetato; este último, producto de la desaminación del aspartato. El oxalacetato entonces es reducido a malato en presencia de NADH, y el producto de esta reacción a su vez es reducido a succinato utilizando NADH o rodoquinona (RQH_2) como cofactor (Fig. 2), lo que se asemeja al ciclo de Krebs en sentido inverso.

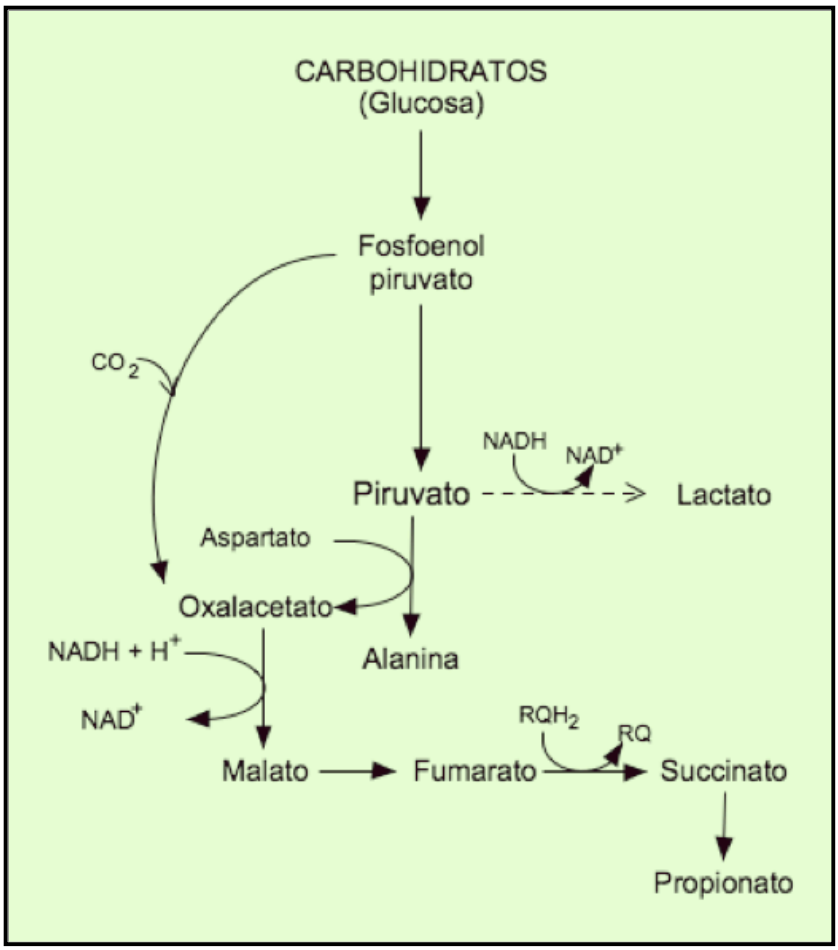

Fig. 2. Ruta metabólica propuesta para invertebrados en condiciones de hipoxia. Adaptado de Storey y Storey (2004).

Un grupo de proteínas que son afectadas durante periodos de hipoxia son las proteínas transportadoras de oxígeno (Bridges, 2001; Chausson *et al*., 2001; Decker *et al*., 2007; Decker y Föll, 2000; DeFur *et al*., 1990; Mangum, 1997; Terwilliger, 1998; Truchot, 1992). Estas moléculas son metaloproteínas que en su mayoría contienen hierro aunque un pequeño grupo contiene cobre. Las proteínas que participan en el transporte de oxígeno están adaptadas para funcionar en diferentes ambientes, en organismos con tasas metabólicas variables y en especies que tienen transiciones de ambientes durante sus diferentes estadios de vida (Hochachka y Somero, 1984).

Las principales proteínas acarreadoras de oxígeno en los organismos marinos son las hemoglobinas (Hbs), la mioglobina (Mb), las hemeritrinas (Hrs) y las hemocianinas (Hcs), siendo estas últimas las principales en la mayoría de los invertebrados (Albrecht *et al.*, 2001; Behrens *et al.*, 2002; Burggren *et al.*, 1991; Jokumsen *et al.*, 1981; Krassimira *et al.*, 1995; Markl, 1986; van Holde y Brenowitz, 1981).

Las Hbs son proteínas globulares, consisten en un grupo hemo (porfirina y hierro) (Fig. 3) unido a una proteína, tienen estructura cuaternaria y su función como proteína transportadora de oxígeno depende de la combinación reversible del hierro con el oxígeno. En algunos invertebrados, funciona como un almacenador de oxígeno que puede ser utilizado en periodos de hipoxia (Willmer *et al*., 2004).

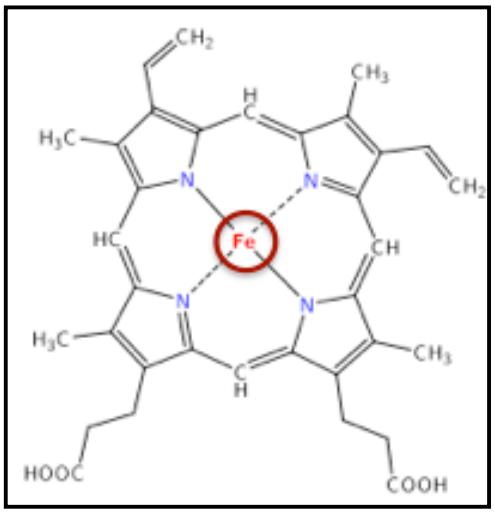

Fig.3. Grupo prostético denominado hemo. Se indica el átomo de hierro al cual se une reversiblemente el oxígeno.

La Mb es parecida a las Hbs en cuanto a su función y grupo prostético; sin embargo, cuenta con una cadena peptídica de aproximadamente 153 aminoácidos, lo que le confiere un peso molecular más pequeño que aquellas (Nelson y Cox, 2002). La mioglobina se encuentra en algunos tejidos, como el músculo radular de gastrópodos y branquias de bivalvos (Prosser, 1991). Las Hrs contienen tres veces más hierro que las Hbs y a diferencia de éstas, en las Hrs el hierro está unido directamente a la proteína y no cuentan con porfirina; estas proteínas son específicas de gusanos sipuncúlidos, braquiópodos, priapúlidos y anélidos poliquetos. Las Hbs, la Mb y las Hrs son proteínas que pueden encontrarse en algunos invertebrados; sin embargo, el grupo de las hemocianinas es característico de la mayoría de los invertebrados, en especial de artrópodos y moluscos. Las hemocianinas (Hcs) son la segunda clase de pigmentos

respiratorios en los invertebrados; estas moléculas se encuentran principalmente en dos phyla: artrópodos y moluscos. Las Hcs en general, son glucoproteínas que contienen cobre unido directamente a la proteína, el cual se asocia reversiblemente al oxígeno. En su mayoría, las Hcs tienen altos pesos moleculares (4.5×10^2 a 9.0×10^3 kDa) y varias subunidades, las cuales tienden a agregarse en una compleja estructura cuaternaria (Fig. 4). La agregación de estas subunidades se debe a que son proteínas extracelulares que no están contenidas en células sanguíneas circulantes, y se encuentran en disolución en la sangre, en donde pueden estar presentes en concentraciones muy altas, representando hasta el 95 % del total de la hemolinfa (van Holde y Miller, 1995).

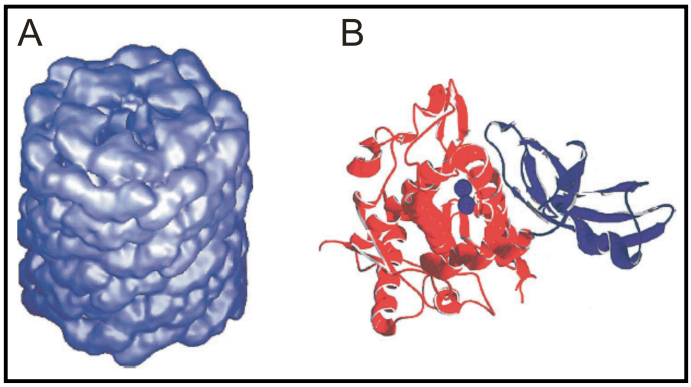

Fig.4. Estructuras representativas para la hemocianina. **A**, Estructura cuaternaria de una hemocinana representativa para moluscos (*Haliotis tuberculata*), consiste de 20 cadenas polipeptídicas, cada una con 8 unidades funcionales (FU). **B**, Estructura terciaria de una unidad funcional (FU) de hemocianina de *Octopus doflein*. Tomadas de van Holde *et al*. (2001).

Los diferentes estados de agregación de las Hcs también están relacionados con la variación en sus propiedades de unión al oxígeno (Markl y Decker, 1992). En las Hcs, una propiedad fisiológica fundamental es su capacidad para unirse al oxígeno en respuesta a efectores alostéricos como la tensión del dióxido de carbono, el pH, la temperatura, la concentración de sales, iones inorgánicos, compuestos orgánicos de bajo peso molecular, cationes divalentes, neurohormonas como la dopamina u octopamina, y productos de procesos anaeróbicos como el L-lactato y el urato (Bridges, 2001; Brouwer y Serigstad, 1989; Hartmann, 2001; Hirota *et al*., 2010; Menze *et al*., 2005; Morris y Bridges, 1986; Morris y McMahon, 1989; Nies *et al*., 1992; Petrovich *et al*., 1990; Will, 1980; Zeis *et al*., 1992).

Se ha observado que algunos pigmentos respiratorios pueden enlazar H^+ en el sitio de unión del oxígeno de tal forma que cuando el pH disminuye y por tanto la concentración de H^+ es alta, el oxígeno es desplazado, modificándose también la afinidad del pigmento por el oxígeno, comportamiento conocido como efecto Bohr (Willmer *et al*., 2004). Se han descrito efectos Bohr en las cuatro clases de pigmentos respiratorios; sin embargo, no es un fenómeno que se presente en todas las especies que los poseen (Willmer *et al*., 2004). En algunos casos, se ha observado que al bajar el pH, se produce un efecto Bohr inverso, lo que puede ser propiciado por un incremento de la tensión de CO_2 o una disminución del pH asociado a un aumento en la concentración de lactato lo que ocasiona un aumento de la afinidad del pigmento por el O_2 (Willmer *et al*., 2004). Se conoce muy poco sobre la regulación de las Hcs en su papel como transportadores de

oxígeno. Al parecer, la afinidad de la Hc por el O_2 está regulada por diferentes efectores. En periodos cortos, moduladores como el pH, lactato, cationes específicos y otros metabolitos alteran la afinidad de la Hc (Hochachka y Somero, 2002). Por otra parte, se ha establecido que la afinidad de la Hc por el O_2 ha sido una modificación evolutiva, ya que en especies que se encuentran en condiciones hipóxicas producen Hcs con mayor afinidad por el O_2 que especies en condiciones normóxicas (Hochachka y Somero, 2002). Sin embargo, la evolución de la estructura de las Hcs y sus funciones en especies y condiciones específicas son estudios que necesitan ser completados.

Las Hcs pueden ser identificadas por tres máximos de absorción, uno a 280 nm, característico de todas las proteínas, un pico de absorción dependiente del oxígeno a 570 nm, y un máximo de absorción entre 340 y 350 nm (Erker *et al*., 2004). El pico de absorción a 570 nm únicamente se observa cuando la proteína está asociada al oxígeno.

Hasta el momento, las hemocianinas se dividen en dos clases, definidas únicamente por su ocurrencia natural: las que se encuentran en artrópodos y las que se encuentran en moluscos. Es un hecho que cada clase de Hc posee propiedades únicas debido a la variabilidad de su estructura, el número de subunidades, el contenido de carbohidratos, composición de monosacáridos y su comportamiento de asociación y disociación; características que le confieren variaciones asociadas con su capacidad para ser utilizadas como inmunógenos (Idakieva *et al*., 2004; Tchorbanov *et al*., 2008).

Los inmunógenos son moléculas que desencadenan una respuesta inmunitaria en mamíferos. Esta respuesta está dada por la producción de anticuerpos específicos que se unen reversiblemente a una molécula ajena al organismo (antígeno). Los anticuepos son glucoproteínas del grupo de las inmunoglobulinas (Ig), cuya estructura se compone de dos cadenas ligeras idénticas (24 kDa), las cuales se encargan de reconocer al antígeno, y dos cadenas pesadas (55 a 70 kDa) encargadas de las funciones efectoras (Abbas y Lichtman, 2004). Cada una de las cadenas ligeras se unen a una cadena pesada y las dos cadenas pesadas se unen entre sí (Fig. 5).

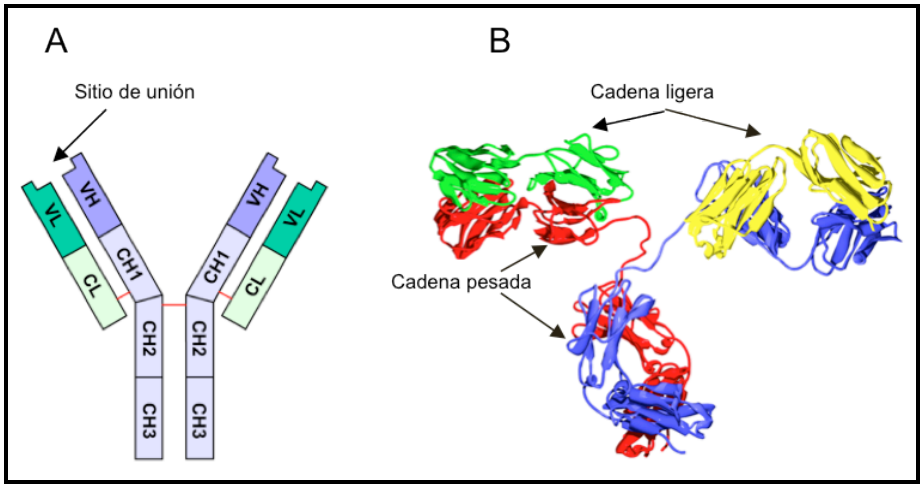

Fig.5. Estructuras representativas de un anticuerpo. **A**, Estructura en donde se observan las cadenas pesadas (H por sus siglas en inglés, heavy chains) en color morado, las cadenas ligeras (L por sus siglas en inglés, light chains) en color verde y puentes disulfuro intracatenarios en rojo. V=región variable; C=región constante. **B**, Modelo de listones de un anticuerpo. Tomado de Abbas y Lichtman (2004).

Los anticuerpos pueden reconocer como antígenos a casi todos los tipos de macromoléculas: lípidos, azúcares, hormonas, ácidos nucleicos y proteínas, entre otros. Sin embargo, no todos los tipos de moléculas tienen la misma capacidad inmunogénica, las moléculas más inmunógenas son las proteínas, los carbohidratos tienen menor capacidad y los lípidos y ácidos nucleicos únicamente son inmunógenos cuando van unidos a proteínas y carbohidratos (Zambrano-Villa, 2005). La capacidad de las diferentes moléculas para desencadenar una respuesta inmunógenica está dada por sus características físicas y bioquímicas, específicamente, el tamaño, la composición química y la heterogeneidad. Otro factor que condiciona la inmunogenicidad es el grado de extrañeza entre el antígeno y las moléculas propias; en general, las moléculas que han divergido en los distintos linajes evolutivos son buenos inmunógenos en especies heterólogas. En cambio, las moléculas evolutivamente conservadas no son buenos agentes inmunogénicos (Zambrano-Villa, 2005). Además de la naturaleza del antígeno, el tamaño de éste también impacta sobre su capacidad como inmunógeno ya que en general, moléculas de alto peso molecular (≥100 kDa) tienen mayor efecto sobre el sistema inmune que las moléculas de menos de 10 kDa. En el caso de las Hcs, se ha observado que cuando estas proteínas son inyectadas en los mamíferos en pequeñas cantidades, el sistema immune las reconoce como extrañas (antígenos), propiciando una respuesta inmunogénica inmediata, aumentando la concentración de anticuerpos específicos para esta proteína en el organismo. Otra propiedad que se ha observado en las Hcs, es su capacidad para ser transportadores

de moléculas que no son inmunógenos, llamados haptenos, los cuales no son inmunógenos. En estos casos, la hemocianina es utilizada para activar la respuesta inmunogénica pero con la producción de anticuerpos específicos para el hapteno. Por esta razón, las Hcs son consideradas inmunógenos con un alto potencial para el desarrollo de productos, ya sea para la salud humana y animal, o para el desarrollo de investigaciones en biomedicina.

II. ANTECEDENTES

Las hemocianinas se dividen en dos clases, las que se encuentran en artrópodos y las que se encuentran en moluscos. Si bien las dos contienen cobre, difieren en cuanto al tamaño de las subunidades así como en su organización estructural. A pesar de las diferencias estructurales entre las dos clases de Hcs, ambas tienen sitios activos conformados por dos iones de cobre estabilizados por tres residuos de histidina cada uno (Erker *et al*., 2004).

En los artrópodos la molécula tiene subunidades de 75 kDa aproximadamente con un sitio para enlazar oxígeno. Estas subunidades se ensamblan en estructuras hexaméricas (6 cadenas de péptidos) o multi-hexaméricas de pesos moleculares desde 450 kDa hasta aproximadamente 4000 kDa (Swerdlow *et al.*, 1996). Por otra parte, en el caso de los moluscos, estudios realizados a nivel especie indican que las Hcs de los gastrópodos y bivalvos son las más grandes; estas proteínas se componen de 20 polipéptidos y tienen un peso molecular de 9 millones (van Bruggen *et al*., 1962). En contraste, las Hcs del pulpo, calamar y quitones tienen la mitad de este tamaño (Herskovits y Hamilton, 1987; Terwilliger *et al*., 1988; Wood, 1980). A pesar de esta diferencia, las Hcs de moluscos, en particular las de gastrópodos, quitones y prosobranquios son más heterógeneas, en su mayoría mantienen subunidades de 350 a 460 kDa dobladas en una serie de siete u ocho subestructuras globulares llamadas estructuras funcionales (FUs por sus siglas en inglés, functional units). Cada una contiene un sitio

activo con dos iones de cobre al cual se une el dioxígeno (Gatsogiannis *et al*., 2007; Gielens *et al*., 1995, Idakieva *et al*.,1995; Idakieva *et al*., 2002; Keller *et al*., 1999; Lang y Van Holde, 1991) (Fig. 6).

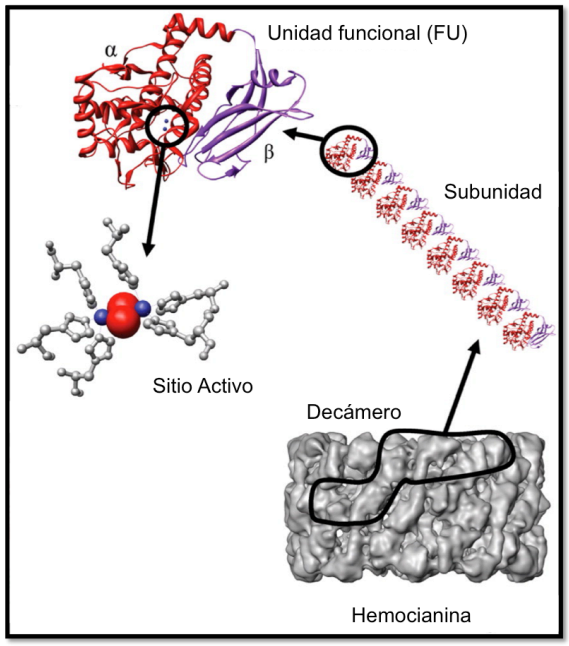

Fig.6. Niveles estructurales de la hemocianina de moluscos. Tomada de Decker *et al*. (2007).

Las unidades funcionales tienen una masa molecular variable, entre 45 y 50 kDa (Gatsogiannus *et al*., 2007), aunque se han reportado FUs de 100 y 150 kDa para *Rapana venosa* (Sabatucci *et al*., 2005). Estas FUs se ensamblan en estructuras más complejas en donde dos subunidades se parean para formar un dímero y cinco de estos dímeros se asocian en un decámero que puede tener una masa molecular de 3.5 a 5.0 x 10^6 Da (Herskovits *et al*., 1989; Lamy *et al*., 1998; Swerdlow *et al*., 1996; van Holde y Miller, 1995). Estos decaméros se asocian en estructuras multiméricas; en donde la estructura dimérica es la predominante en la mayoría de moluscos

(Herskovits *et al*., 1989). En algunos casos como en *Octopus dofeini* y *Helix pomiata* no se han observado estructuras mayores a decámeros y didecámeros (Harris *et al*., 1993); sin embargo, en prosobranquios y opistobranquios se han observado multidecámeros (Keller *et al*., 1999). En los gastrópodos marinos *Busicon contarium* y *B. carica* se han observado estructuras tri y pentadecámericas (Herskovits *et al*., 1989) y en la familia *Naticidae* (gastrópodos marinos) se han observado partículas di, tri y tetradecaméricas con masas moleculares promedio de 8.85 x 10^6, 13.3 x10^6 y 17.1 x10^6 Da respectivamente (Herskovits *et al*., 1990).

Mediante microscopía electrónica, se ha establecido que la estructura cuaternaria básica de la Hc de moluscos está dada por el acomodo de los decámeros en una molécula cilíndrica con un diámetro de 30 a 32 nm y una altura de12 a 19 nm (Mouche *et al*., 1999). Para algunos gastrópodos marinos se han observado estructuras tubulares mayores, ya que la Hc de éstos se conforma de multidecámeros (Herskovits, 1988; Herskovits y Hamilton, 1987; Idakieva *et al*., 2002; van Holde y Miller, 1995,).

La estructura cuaternaria de la Hc puede disociarse mediante variaciones de pH, fuerza iónica y por proteólisis. La asociación de componentes de más alto peso molecular ocurre a un intervalo de pH que incluye el punto isoeléctrico, mientras que la mayor disociación, es decir, la aparición de componentes de peso molecular más bajo se incrementa en los extremos ácidos y básicos del punto isoeléctrico. A valores de pH mayores que 7.5 y en ausencia de Ca^{2+} o Mg^{2+}, la disociación parcial o completa da origen a moléculas de 1/10 del tamaño total de la molécula y a

pH mayor de 9.0 se observan moléculas de 1/20 del tamaño de la molécula nativa (Hall *et al*., 1975). Para *Littorina littorea* se han encontrado fragmentos de 4.4 a 4.8x10^5 Da para las subunidades totalmente disociadas a pH de 10 y en presencia de urea 8.0 M (Herskovits *et al*., 1992). Estos fragmentos están cerca de 1/20 del peso molecular de los complejos didecaméricos que se encuentran en algunos caracoles marinos (van Holde y Miller, 1995). En estudios realizados tanto con la Hc de *Lunatia heros* como con la Hc de *Littorina littorea* se observó una disminución importante en el peso molecular en el intervalo de pH de 7.8 a 8.2. En estas dos especies, la disociación de la Hc en función del pH es gradual, para la Hc de *L. heros* las masas moleculares entre 7.9 y 1.1x10^6 Da se encontraron en el intervalo de pH de 7.8 a 8.1, con una disminución a 6.4 x 10^5, 5.8 x10^5 y 4.7 x 10^5 Da a pH 8.2, 9.9 y 10.5 respectivamente (Herskovits *et al*., 1985).

En estudios realizados con Hc aislada de *Helix pomiata* se observó que con una fuerza iónica (*I*) de 20 mM los didecámeros que la conforman se mantienen estables a un pH entre 4.5 y 5.3, no así a valores de pH mayores que 5.3, en donde se disocia en decámeros y éstos a su vez se disocian en dímeros a pH mayor que 7.5 (Gielens *et al*., 1995). Sin embargo, al incrementar la fuerza iónica el límite alcalino de disociación para los didecámeros se desplaza a valores de pH más altos (Elliott *et al*., 1972). Para la Hc de *Aplysia vaccaria* se observó un comportamiento similar en donde a pH mayor de 8.0 los didecámeros se disocian en decámeros seguidos de una disociación en dímeros y monómeros conforme el pH aumenta más arriba de 9.0 (Herskovits *et al*., 1995). Para *Rapana venosa* y

Octopus vulgaris, se obtuvieron unidades funcionales al incubar la Hc a pH alcalino alrededor de 9.5 en presencia de concentraciones alrededor de 1 mM de Zn; bajo estas condiciones se obtuvieron productos de 150, 100 y 50 kDa, todos ellos funcionales (Paccagnella *et al*., 2000).

En general, la Hc de moluscos se mantienen estable a pH menor que 7.0 y presentan un patrón de disociación que se modifica al incrementarse el pH; sin embargo, la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} tiende a estabilizar los componentes decaméricos de la Hc, por lo que se ha observado que las fracciones decaméricas aumentan aun cuando se modifique el pH (Herskowitz y Hamilton, 1987). Este efecto se ha estudiado en varios moluscos, como *Octopus bimaculoides, O. bimaculatus* (Herskowitz y Villanueva, 1986, Herskowitz y Villanueva, 1986), A*canthopleura* sp., *Cyptochiton stelleri* (Herskowitz y Villanueva, 1986), *Lunatia heros* y *L. littorea* (Herskovits *et al*., 1985), entre otros.

Si bien los iones como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} estabilizan la forma decamérica de la Hc, el incremento en la fuerza iónica del medio desestabiliza estos decámeros. El aumento de la fuerza iónica del medio puede darse cuando se adicionan compuestos químicos como sulfato de amonio, urea o clorhidrato de guanidina (GdHCl). Este aumento provoca que el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína disminuyan, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de tal forma que las proteínas se desnaturalizan, agregan y precipitan.

En general, las Hcs de moluscos son estables y resistentes al efecto de desnaturalización de la urea y el GdHCl (Herskowitz *et al*., 1983, 1985). Sin embargo, la estabilidad de la molécula estará en función de las características de las subunidades que la componen y la concentración de las sales. Un ejemplo de esta característica es la disociación de la Hc de *Lunatia heros* y *Littorina* littorea, ya que la urea en concentraciones entre 5.0 y 1.0 M propicia la formación de fragmentos de 1.0 x 10^6, 4.5 x 10^6 y 4.6 x 10^6 Da. Para este intervalo de concentraciones, prácticamente el 80% de las partículas de Hc están disociadas cuando la urea se encuentra a 1.2 M (Herskowitz *et al.*, 1985).

Estudios de reasociación molecular en la Hc de *Megathura crenulata* han demostrado que si bien es posible disociar a la molécula, también es posible reasociarla utilizando un medio con un pH de 7.4 en presencia de calcio 100 mM y una solución saturada de $MgCl_2$ a 4°C (Harris *et al*., 1997).

De la misma forma en que se ha logrado elucidar la composición y conformación de la hemocianina aislada de algunos organismos, también se han estudiado la reactividad inmunogénica cruzada y el sitio de síntesis de la Hc ya que éstas pueden variar en función de la especie de molusco y las variables ambientales (Brouwer *et al*., 1979; Gullick *et al*., 1979; Idakieva *et al*., 1993; Jeffrey, 1995; van Bruggen y Moran, 1966; Wood, 1975).

Si bien se cuenta con una descripción general a nivel estructural de las Hcs de artrópodos y moluscos, existe evidencia de que la concentración tanto de la Hc completa como sus isoformas y las subunidades que las conforman puede modificarse en función de las condiciones del medio. En

los artrópodos, se ha observado que pueden ocurrir cambios en la expresión de los genes codificadores de Hc como respuesta a diferentes condiciones, modificando con ello la composición de las subunidades. Entre las condiciones que se han reportado como causa de cambio, se encuentran: la estación del año, el oxígeno, la salinidad y la etapa de desarrollo del organismo (Decker y Föll, 2000; Oakes *et al.*, 2004; van Holde y Miller, 1995). Para los artrópodos ya se han documentado también factores de variación en el nivel de hemocianina en la hemolinfa: el sexo (Chen y Cheng, 1993; Horn y Kerr, 1969), oxígeno (Baden *et al.*, 1994; Hagerman y Vismann, 1993), salinidad y niveles de nitrógeno amoniacal (Chen *et al.*, 1994), así como la exposición a metales como el cobre (Weeks *et al.*, 1993) y la subsistencia del organismo en cuerpos de agua de mala calidad (Engel *et al.*, 1993).

Para los moluscos en general, existen evidencias de que los niveles de hemocianina se ven alterados por la salinidad en algunas especies, mientras que otras son insensibles a este factor (Mangum, 1997); también se han reportado variaciones debido a cambios en los niveles de oxígeno en el medio (Barros *et al.*, 1993) y a la estación del año (Senozan y Briggs, 1989). La mayor parte de la información que se tiene sobre la función y la estructura de las Hcs que se encuentran en este phylum se ha obtenido a partir de estudios en especies como *Helix pomatia*, *Marisa cornuarietis* (Dolashka-Angelova, *et al.*, 2003; Herskowits *et al*., 1990) y en gastrópodos pertenecientes a la familias *Muricidae* y *Fasciolariidae*; siendo la Hc de *M.*

crenulata la más estudiada debido a sus aplicaciones biofarmacéuticas (Herskovits *et al.*, 1992).

Las Hcs forman agregados que facilitan y mantienen el equilibrio osmótico (Snyder y Mangum, 1982). La formación de agregados les permiten tener propiedades alostéricas como la cooperatividad entre los sitios de unión con el oxígeno y el efecto del pH y de los iones sobre el proceso de unión (Brouwer y Serigstad1989). Las interacciones cooperativas entre los sitios de unión (interacciones homotrópicas) están dadas por las transiciones conformacionales entre los estados de alta afinidad (estados R) y los de baja afinidad (estados T). El cambio entre estos dos estados conformacionales en la ruta de oxigenación están influenciadas por efectores que se unen en posiciones diferentes del sitio activo (interacciones heterotrópicas). La naturaleza alostérica de las Hcs es un rasgo adaptativo que le permite al organismo responder a cambios en los niveles de oxígeno. Específicamente para condiciones hipóxicas se ha observado que la hipoxia crónica estimula cambios en la concentración y estructura de las moléculas de Hc de *Callinectes sapidus* (Magnum, 1997). La concentración de Hc aumenta en un 40% mejorando su capacidad para transportar oxígeno (Burnett y Stickle, 2001). De Fur *et al*. (1990) propusieron que la síntesis o degradación neta de Hc durante periodos de hipoxia produce moléculas de reemplazo que difieren de aquéllas que se producen en cangrejos normóxicos. Burnett y Stickle (2001) observaron que durante exposiciones crónicas a condiciones de hipoxia, *C. sapidus* hiperventila, produciendo una alcalosis respiratoria que propicia la elevación

del pH de la hemolinfa, aumentando de esta forma la afinidad de la Hc por el oxígeno. En las seis subunidades que se han identificado en *C. sapidus*, tres de éstas se encuentran en menor concentración con relación a las otras subunidades. El resultado neto de cambio en subunidades es el incremento en la afinidad por el oxígeno.

Por otra parte, Larade y Storey (2002), detectaron una reducción en la síntesis de proteínas en el hepatopáncreas de *L. littorea* expuesto a 48 h de anoxia; sin embargo, la concentración de proteínas se mantiene, lo que sugiere que se suprime tanto la síntesis como la degradación de proteínas (Larade y Storey, 2002).

Los estudios realizados en moluscos han demostrado que la Hc de este grupo presenta variabilidad en cuanto a su estructura, tamaño, número de subunidades, factores que influyen en su composición y estructura cuaternaria y en el contenido y composición de carbohidratos. Este último, parece ser la principal causa de que la Hc active el sistema inmunológico de mamíferos (Harris y Markl, 1999; Idakieva *et al*., 2004; Tchorbanov *et al*., 2008).

El mayor avance en cuanto a la caracterización de la Hc, se encuentra en la hemocianina de *Megathura crenulata* ya que ésta es ampliamente utilizada en la investigación clínica como estimulante inmunológico y en el tratamiento contra el cáncer (Harris y Markl, 1999; McFadden *et al*., 2003). La hemocianina de *M. crenulata* (KLH, por sus siglas en inglés: keyhole limpet hemocyanin) ha sido el antígeno de preferencia para algunos procedimientos inmunológicos desde el

descubrimiento de su capacidad antigénica realizada por Bartel y Campbell hace más de 52 años (1959). Recientemente, el uso de esta proteína se ha ampliado y entre sus aplicaciones se cuenta su utilidad como agente inmunoterapéutico para el tratamiento de varios tipos de cáncer incluyendo melanoma (Helling *et al*., 1994; Kirkwood *et al*., 2001; Livingston, 1995), cáncer de vejiga (Jurincic-Winkler *et al*.,1995; Lamm *et al*., 1993; Swerdlow *et al*., 1994; Wishashi *et al*., 1995), cáncer de ovario (Yacyshyn *et al*., 1995, citado por Orlova *et al*., 1997) y cáncer de seno (Longenecker *et al*., 1993, citado por Orlova *et al*., 1997, Emens *et al*., 2005). Otros usos se extienden hacia el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia (AEGIS, 1997, Lawn *et al*., 2001), el desarrollo de vacunas, entre las que se cuenta una vacuna para la prevención del abuso de cocaína (Bagasra *et al*., 1992, Koetzner *et al*., 2001) y como proteína de soporte para la producción de anticuerpos útiles en métodos analíticos para la detección y cuantificación de una gran variedad de compuestos (Pierce, 2004, Lavelin y Geiger, 2005).

A pesar de la gran variedad de aplicaciones que tiene la Hc de *M. crenulata* y la demanda que se tiene de esta molécula, la obtención de fracciones homogéneas, es decir, fracciones con propiedades inmunogénicas similares y reproducibilidad de este efecto, plantea algunos problemas. Entre ellos, los principales son: 1) la sustentabilidad del recurso, ya que la sobreexplotación y la contaminación del medio han reducido considerablemente la población de *M. crenulata* en el medio natural; 2) la variabilidad de la KLH asociada a variaciones ambientales (pH, temperatura, oxígeno, salinidad, etc.); y 3) la poca estabilidad de la molécula durante su

extracción, asociada a la naturaleza química de la molécula (Oakes *et al*., 2004). Lo anterior ha conducido al cultivo de esta especie; sin embargo, los resultados positivos no son concluyentes, por lo que se hace necesario continuar la búsqueda en este rubro y alternativamente, iniciar la prospección de nuevos organismos con características similares a *M. crenulata*. En este contexto, *T. funebralis*, especie abundante en nuestras costas, podría ser una alternativa para el desarrollo de una nueva fuente de abastecimiento de hemocianina, ya que tanto *M. crenulata* como *T. funebralis* son especies filogenéticamente cercanas pertenecientes a la clase gastropoda y a la subclase prosobranchia, esta relación podría ser un factor determinante en cuanto a la similitud de las propiedades funcionales de sus hemocianinas ya que en otros phyla se ha observado que las propiedades de las proteínas transportadoras de oxígeno son similares en especies con relación filogenética (Markl, 1986).

T. funebralis (A. Adams, 1885) es un gastrópodo prosobranquio de la familia *Trochidae* que se encuentra distribuido desde Canadá hasta la parte central de la península de Baja California, México (Abbott y Haderlie, 1980; Hellberg, 1998). Actualmente es uno de los consumidores de algas más importantes de las costas de Norteamérica; se le encuentra en gran variedad de hábitats que van desde las playas de grano medio de bahías protegidas hasta las costas rocosas expuestas a oleaje de alta energía (Petraitis, 2002). Normalmente crece hasta 3 centímetros de diámetro basal (Moran, 1997) y tiene un promedio de vida de 10-15 años (Darvy, 1964). La morfología difiere de región a región, pero en general, su concha termina en

punta y usualmente son de color oscuro (Fish y Fish, 1989). Se alimenta de diatomeas y macroalgas como *Enteromorpha* sp., *Ulva* sp. y *Porphyra* sp. (Lubchenco, 1978, 1980, 1983). En estudios de densidad, Petraitis (2002) determinó que pueden encontrarse de 300 a 500 organismos por m^2, aunque esta densidad puede variar dependiendo de la estructura de la población y de la disponibilidad de alimento en la zona. Debido a que es una especie altamente resistente, por lo general *T.funebralis* interfiere con la abundancia, diversidad y distribución de los organismos de la zona en la cual se encuentra, siendo en algunos casos la especie dominante (Carlton, 1992). Esta especie usualmente se localiza en la zona intermareal, en donde se presentan variaciones extremas de oxígeno, salinidad, disponibilidad de agua y temperatura asociada a la baja marea (Petraitis, 2002).

La variabilidad del ambiente en donde habita *T. funebralis*, permite suponer que esta especie cuenta con algún tipo de mecanismo que le ayuda a soportar cambios en la salinidad y en la disponibilidad de O_2, como se ha visto en otros organismos (Churchill y Storey, 1996; Larade y Storey *et al*., 2002, 2004; Sokolova *et al*., 2000; Yaroslavtseva y Sergeeva, 2000). Las adaptaciones de esta especie podrían reflejarse en las propiedades químicas y en la síntesis de su hemocianina. Un posible impacto de la hipoxia sería la estimulación de la producción de hemocianina, con la finalidad de incrementar la capacidad de transportar oxígeno en la sangre y cumplir con los requerimientos energéticos mínimos para sobrevivir, comportamiento observado en otras especies intermareales (De Fur *et al*.,

1990, Terwilliger, 1998). Otra posible consecuencia en condiciones hipóxicas podría ser una modificación estructural, ya que al igual que la hemoglobina y otras proteínas con estructura cuaternaria, la Hc puede presentar un comportamiento de cooperatividad.

Como se mencionó, la capacidad de la hemocianina como inmunoactivador depende del contenido de carbohidratos y en gran medida de sus propiedades estructurales, asociadas al número de subunidades y al estado de asociación y disociación de éstas, las cuales pueden ser modificadas por factores ambientales. En este contexto, *T. funebralis* podría ser una fuente alternativa de hemocianina, ya que al ser una especie de la misma subclase que *M. crenulata,* es de esperarse que tenga propiedades inmunogénicas; sin embargo, al ser una especie adaptada a cambios ambientales es probable que su Hc tenga propiedades estructurales diferentes que le confieran mayor estabilidad, característica que de encontrarse podría ser considerada como un factor determinante para proponer a *T. funebralis* como una fuente alternativa de Hc con aplicación en la biomedicina.

Esta investigación tiene el propósito de estudiar la hemocianina producida por *T. funebralis* en condiciones aeróbicas e hipóxicas para evaluar el efecto del oxígeno en su síntesis y propiedades estructurales así como la capacidad de la molécula para inducir la producción de anticuerpos en animales de experimentación comparando dichas propiedades con la Hc de *M. crenulata*.

III. HIPÓTESIS

- Los mecanismos bioquímicos de adaptación de *Tegula funebralis* al nivel de O_2 le confieren a su Hc propiedades estructurales diferentes a las que posee en condiciones normóxicas.

- La síntesis de hemocianina en *T. funebralis* es afectada en condiciones hipóxicas.

- La hemocianina de *T. funebralis* posee propiedades inmunogénicas similares a las de la Hc de *Megathura crenulata*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del O_2 en la síntesis, el potencial inmunogénico, y las propiedades estructurales de la hemocianina de *Tegula funebralis.*

IV. 1. Objetivos particulares

- Determinar el nivel de síntesis de hemocianina a partir de hemolinfa de *Tegula funebralis* expuesta a condiciones aeróbicas e hipóxicas.

- Analizar las propiedades estructurales de la Hc de *T. funebralis* expuesta a condiciones aeróbicas e hipóxicas.

- Valorar las propiedades inmunogénicas de la Hc producida por *T. funebralis* expuesta a condiciones aeróbicas e hipóxicas.

- Comparar la capacidad inmunogénica de la hemocianina de *T. funebralis* y *M. crenulata*.

V. METODOLOGÍA

V.1. Colecta y mantenimiento de organismos

Se colectaron 450 organismos adultos de la especie *Tegula funebralis*, todos entre 20 y 25 mm de diámetro basal. La colecta se realizó en una playa localizada en el Ejido Eréndira en el municipio de Ensenada, B.C. (Fig. 7).

Los especímenes fueron limpiados en el área de colecta y posteriormente transportados en hieleras en un ambiente húmedo al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas, en donde se distribuyeron en dos tanques de fibra de vidrio de 200 L. Todos los organismos se sometieron a un periodo de aclimatación de 30 días durante los cuales se mantuvieron las siguientes condiciones: temperatura ambiente constante a 17 °C, temperatura del agua a 18 °C (±0.2), aireación constante, flujo constante de agua de mar previamente pasada por filtros de 0.45 µm y un fotoperiodo de 10 h de luz por 14 h de oscuridad, el nivel del agua se mantuvo a 40 cm para evitar que los organismos emergieran. A lo largo del periodo de aclimatación, todos los organismos fueron alimentados con *Egregia* sp. recientemente colectada.

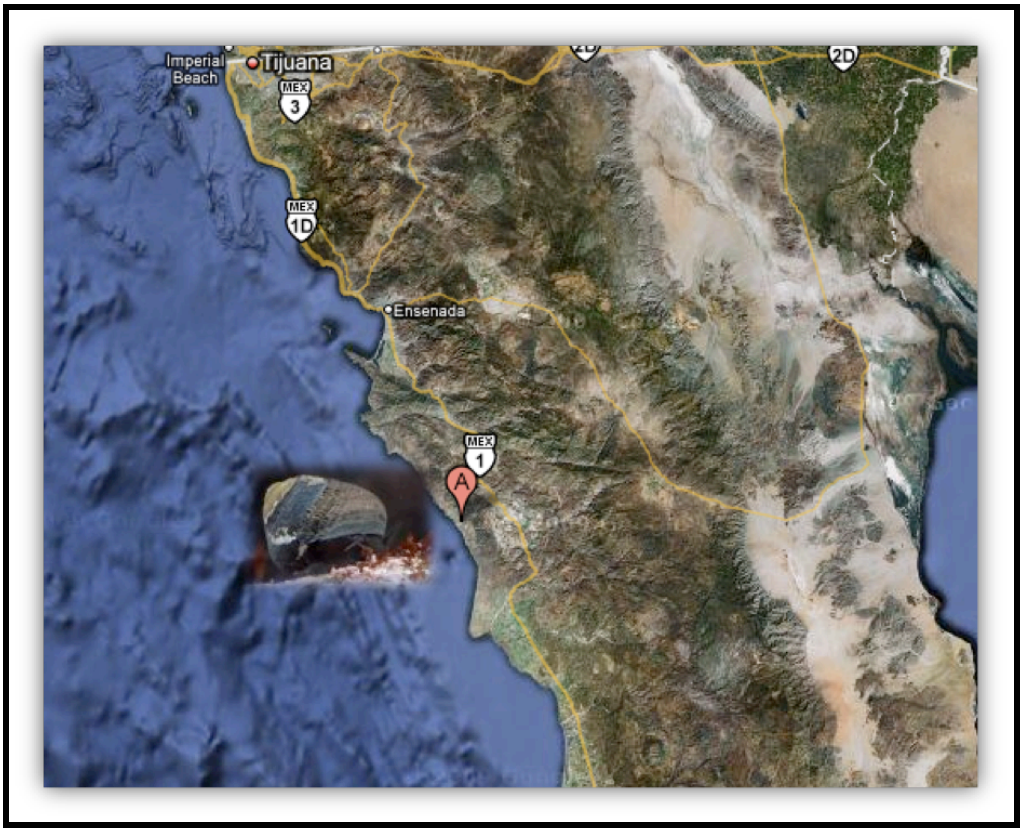

Fig. 7. Ubicación geográfica de la zona de colecta, playa Ejido Eréndira, B. C (31°17'23.99 N, 116°24'13.35 W). Se incluye foto de *Tegula funebralis.*

V.2. Bioensayos

Con la finalidad de evaluar el efecto de concentraciones bajas de oxígeno en el medio (hipoxia) sobre la concentración de la hemocianina de *T. funebralis* y su capacidad inmunogénica, se diseñaron dos biensayos. El primer bioensayo se considera de prospección en donde se hicieron las primeras pruebas para determinar los tiempos de exposición a condiciones de hipoxia el bioensayo 2 fue definitivo. En los dos bioensayos se mantuvieron las mismas condiciones experimentales: temperatura ambiente

constante a 17 °C, temperatura del agua a 18 °C (±0.2) y fotoperiodo de 10 h de luz por 14 h de oscuridad. Los organismos no fueron alimentados durante el periodo experimental.

V.2.1. Bioensayo 1

Se colocaron cinco frascos de 3.5 L con diez organismos cada uno, los frascos se humedecieron y sellaron durante el tiempo de exposición determinado para cada grupo experimental. Los tiempos para cada grupo fueron de 0, 12, 24, 36, 48 y 150 h. Después del tiempo de exposición se realizó el corte en el pie de cada organismo y se determinó la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) como se indica en el inciso 4.3.1.

V.2.2. Bioensayo 2

Se conformaron seis grupos de 35 organismos cada uno, la nomenclatura y el tiempo correspondiente a cada grupo se indican en la tabla I. Los tiempos de exposición se determinaron en función de los resultados de actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) obtenidos en los diferentes grupos del bioensayo 1. Todos los especimenes fueron colocados en recipientes previamente humedecidos con agua de mar. Posteriormente, se adicionó nitrógeno gaseoso hasta obtener una concentración de oxígeno de 18% (±2) e inmediatamente se sellaron durante el tiempo de exposición correspondiente.

Para todos los grupos de exposición se colocaron 5 organismos en condiciones aeróbicas. Estos organismos se consideraron como el grupo control aeróbico de cada grupo de exposición. Después del tiempo de exposición, se extrajo la hemolinfa y se analizó como se indica en el inciso V.4. y se realizó el corte en el pie de cada organismo tanto del grupo hipóxico como de los controles. Todos los tejidos fueron congelados inmediatamente a -20°C para determinar posteriormente la actividad de la LDH.

Tabla I. Grupos de experimentación y tiempo de exposición a condiciones hipóxicas para cada grupo (N=245; n=35).

Grupo	Tiempo de exposición (h)
G_C	Campo*
G_0	0
G_{48}	48
G_{96}	96
G_{144}	144
G_{192}	192
G_{240}	240

*Grupo de 35 organismos a los cuales se les tomaron muestras de hemolinfa y tejido del pie en la zona de colecta.

V.3. Ensayo enzimático

V.3.1. Lactato deshidrogenasa (LDH: E.C. 1. 1.1.27)

Con la finalidad de tener un punto de referencia sobre el nivel de reclutamiento de rutas aneróbicas en los organismos se midió la actividad de la LDH tanto en los grupos expuestos a condiciones hipóxicas como en los grupos control que se encontraban en condiciones aeróbicas.

El tejido del pie de cada organismo se homogenizó y centrifugó a 18,000 x g durante 20 min a 5ºC. La actividad de la LDH se determinó mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min en un espectrofotómetro helios α (Thermo electron corporation). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: amortiguador Imidazol-HCl 50 mM a pH 7.0, $MgCl_2$ 2 mM, piruvato 4 mM, y NADH 0.15 mM; la reacción se inició al adicionar la muestra (7 mg proteína/mL). La actividad enzimática se definió como μmoles de NADH oxidado por minuto, por mg de proteína ($\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ prot). El coeficiente de extinción molar utilizado para calcular las actividades fue 6200 $M^{-1}\ cm^{-1}$ (Vanderlinde, 1985).

V.3.2. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas en el tejido se determinó mediante el método de Lowry modificado (λ = 750 nm) (Lowry *et al*., 1951).

V.4. Análisis de hemolinfa

V.4.1. Extracción de hemolinfa

Se extrajo la hemolinfa de 35 organismos en el momento de la colecta, este grupo se nombró como G_C (grupo campo). Para los grupos de experimentación (G_0, G_{48}, G_{96}, G_{144}, G_{192} y G_{240}), se extrajo la hemolinfa después del tiempo de exposición tanto para los organismos expuestos a condiciones hipóxicas como a los expuestos a condiciones aeróbicas. La extracción de la muestra se realizó con jeringas de 1.0 mL y aguja de 27G x 13 mm previamente enjuagadas con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por sus siglas en inglés, Phenylmethanesulfonyl fluoride). Las muestras correspondientes a cada grupo de exposición se juntaron en una sola muestra representativa. Estas muestras fueron centrifugadas a 1100 x g durante 10 minutos a 5°C en una centrífuga Haereus 22R, el sobrenadante se dializó inmediatamente contra agua destilada. La determinación de proteínas se realizó como se indica en el inciso V.3.2.

V.4.2. Cuantificación de succinato en hemolinfa

A las muestras de hemolinfa colectadas de cada grupo de exposición se les adicionó ácido perclórico 1.0 M (PCA por sus siglas en inglés, perchloric acid) en una proporción 1:3, se agitaron y centrifugaron durante

10 minutos. Posteriormente se tomaron 0.5 mL del sobrenadante y se adicionó KOH 2.0 M hasta alcanzar un pH de 8.5. Las muestras se colocaron a 4 ℃ durante 20 min y se filtraron. El succinato se determinó en la solución filtrada utilizando un kit para la determinación de succinato (Boehringer Mannheim no. 10 176 281 035). La concentración se calculó en μg/mL de hemolinfa.

V.4.3. Determinación pH en hemolinfa

Se determinó el valor de pH de la hemolinfa inmediatamente después de su extracción. La muestra se colocó en una celda de 2.5 mL la cual se selló para evitar la interacción con el ambiente. El pH se determinó con un microelectrodo (Thermo Scienticfic).

V.4.4. Aislamiento y cuantificación de hemocianina

La hemolinfa colectada y dializada de cada grupo de exposición se diluyó en proporción 1:1 con amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7.5 que contenía $MgCl_2$ 10.0 mM y $CaCl_2$ 5.0 mM. Posteriormente se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos a 5 °C, el sobrenadante se trató mediante cromatografía líquida (FPLC por sus siglas en inglés, fast protein liquid chromatography) con una columna de Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich) con un intervalo de fraccionamiento de 60,000 a 20,000,000 Da, la fase móvil utilizada fue solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M que contenía KCl 0.1 M y EDTA 0.001 M con un flujo constante de 0.2 mL/h. Las fracciones

fueron monitoreadas con un lector UV (Biorad-UV monitor). La concentración de proteínas se determinó en todas las fracciones en las cuales se observó una absorbancia mayor de 0.2. Además de la determinación de proteínas, se hizo un barrido de 250 a 660 nm a cada fracción para determinar cuál de ellas contenía hemocianina. En todos los casos se buscaron las bandas de absorción máxima características para la hemocianina (280, 347 y 570 nm). La banda a 347 nm desapareció al adicionar KCN como se observó cuando se realizó un segundo barrido, lo que confirmó la presencia de esta molécula.

V. 5. Análisis de hemocianina

V.5.1. Determinación de peso molecular. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE)

Se utilizaron geles de poliacrilamida en medio discontinuo de 80 x 73 x 0.75 mm y con una concentración de 7.5% y 6.0% (Laemmli, 1970). Las soluciones amortiguadoras utlizadas fueron para el gel Tris-HCl pH 8.8 y Tris-glicina pH 8.3 para el sistema. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 200 V. Para los geles al 7.5% se utilizaron los siguientes marcadores: anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), albúmina bovina (66 kDa), fosforilasa B de conejo (97.4 kDa), β-galactosidasa de *E. coli* (116 kDa) y miosina de músculo de conejo (200

kDa). Para los geles al 6.0% se utilizaron albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α-lactoalbúmina (14.2 kDa).

V.5.2. Determinación del contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos en las muestras de hemolinfa de cada grupo se realizó mediante un ensayo basado en la comparación de las muestras con glucoproteínas con concentraciones de carbohidratos conocidas. Las muestras se diluyeron con un amortiguador comercial diseñado para el ensayo (Glycoprotein assay buffer, Pierce) a concentraciones de 0.25 y 2.5 mg/mL, posteriormente se adicionaron 25 μL de meta-periodato y se agitaron por 30 segundos. Se adicionó GDR (glycoprotein detection reagent, Pierce), y se agitó durante 30 segundos. Las muestras se leyeron a 550 nm en un espectrofotómetro helios α (Thermo electron corporation) y se compararon con las siguientes proteínas: lisozima, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, apo-transferrina, fetuina, α1-glucoproteína ácida y hemocianina de *M. crenulata* comercial (Sigma-aldrich).

V.5.3. Determinación del número de subunidades

Las fracciones obtenidas de la columna CL-4B en las cuales se identificaron las bandas de absorción características de la Hc (280 y 347 nm), se dializaron con amortiguador Tris-HCl que contenía EDTA 10.0 mM a pH 9.3 y una membrana Spectra/Por con un intervalo de 6,000 a 8,000 Da y se hicieron recambios cada 5 h en un periodo de 48 h. Posteriormente la muestra se fraccionó mediante cromatografía líquida utilizando una columna de intercambio iónico DEAE CL-6B, la fase móvil utilizada fue amortiguador Tris-HCl 50.0 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10.0 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2 mL/h y un gradiente de NaCl de 0 a 1.0 M. Las fracciones fueron monitoreadas con un lector UV (Biorad UV-monitor). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry modificado (Lowry *et al*., 1951) en todas las bandas en las cuales se observó una absorbancia mayor de 0.2. A la par, estas fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE con geles al 6.0% como se indica en el inciso V.5.1.

V.6. Pruebas de inmunogenicidad

Con la finalidad de evaluar la capacidad inmunogénica de la Hc de *T. funebralis*, se realizaron pruebas de inmunogenicidad en las cuales se utilizó la Hc de *M. crenulata* comercial para comparar la producción de anticuerpos.

V.6.1. Inoculación

Se utilizaron ratones de trece semanas de edad variedad BALB/c-hembras, proporcionados por Laboratorios Scantibodies S. A. de C. V. Los organismos se distribuyeron en siete grupos (10 organismos por grupo) que se nombraron de acuerdo al antígeno utilizado y a la concentración de éste (Tabla II). Se establecieron dos concentraciones del antígeno, 0.2 mg/mL y 2.0 mg/mL.

Se realizaron cuatro inoculaciones intraperitoneales (ip) (Fig.8) en un periodo de 40 días, todas se realizaron con jeringas de 1.0 mL y aguja de 27G x 13 mm. La primera inoculación consistió en 0.3 mL de adyuvante completo de Freund. La segunda inoculación se administró 14 días después, en esta se utilizó una emulsión de adyuvante completo de Freund y el antígeno en la concentración correspondiente a cada grupo. La tercera y cuarta inoculación se hicieron con siete días de separación y en ambos casos se inoculó una emulsión de adyuvante incompleto de Freund y el antígeno correspondiente.

Tabla II. Concentraciones de antígeno utilizadas en la prueba de inmunogenicidad. Se incluye la nomenclatura utilizada para cada grupo (N=70; n=10).

Antígeno	Concentración		
	0.0 mg/mL	0.2 mg/mL (a)	2.0 mg/mL (b)
Blanco*	G_B		
Hc *M. crenulata* (M)		G_{Ma}	G_{Mb}
Hc *T. funebralis* aeróbica (T)		G_{Ta}	G_{Tb}
Hc *T. funebralis* hipóxica (Th)		G_{Tha}	G_{Thb}

* Adyuvante completo de Freund sin antígeno.

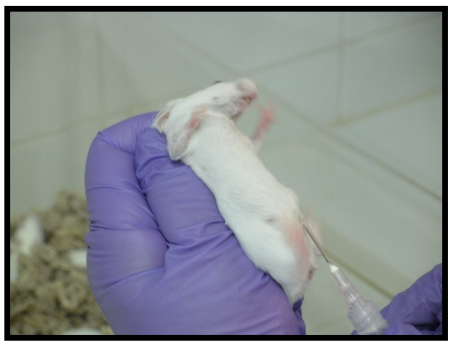

Fig. 8. Inoculación intraperitoneal.

Durante los 40 días los ratones fueron monitoreados y en función del crecimiento abdominal que presentaron se colectó el fluido ascítico el día 25 y 35 con una aguja 18G. El fluido se incubó a 37 °C durante 1 h y se colocó a 4 °C durante 14 h. Después de lo cual se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. Se removió una capa aceitosa que se formó en la superficie y el suero fue almacenado con azida de sodio al 2.0% a -10 °C.

V.6.2. Purificación y cuantificación de anticuerpos

El fluido ascítico colectado se transfirió a un vaso de precipitado, en donde se adicionó solución saturada de sulfato de sodio en una proporción 1:1 con agitación constante. Posteriormente se colocó a 4 °C durante 12 h, después de las cuales se centrifugó a 3000 x g durante 30 minutos. El pellet se suspendió en 0.5 volúmenes del volumen inicial con solución saturada de sulfato de amonio y se colocó a 4 °C durante 12 h. Esta muestra se centrifugó a 3000 x g durante 30 minutos y el pellet resultante se suspendió en solución amortiguadora de fosfatos que contenía NaCl 137 mM y KCl 2.7 mM. Posteriormente, se dializó contra un amortiguador Tris 10 mM, pH 8.5, se centriifugó para eliminar el material particulado y se pasó por una columna de DEAE-celulosa que fue eluída con un gradiente de concentración de NaCl (0 a 500 mM) (Harlow y Lane, 1988). Las fracciones se monitorearon a 280 nm en un espectrofotómetro helios α (Thermo electron corporation) y todas aquéllas en las que se obtuvo una lectura se juntaron en una sola muestra a la cual se le determinó la concentración de proteína.

La pureza de los anticuerpos en el suero se determinó mediante SDS-PAGE con geles de poliacrilamida al 6.0% de 80 x 73 x 0.75 mm en un sistema discontinuo de acuerdo al método propuesto por Laemmli (1970), se utilizaron los marcadores mencionados en la sección V.5.1.

V.6.3. Ensayo ELISA (cualitativo).

Se realizó un ensayo ELISA (por sus siglas en inglés, Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) cualitativo. En este ensayo se conjugaron los anticuerpos purificados con peroxidasa de rábano, la cual se utilizó como marcador.

V. 6.3.1. Conjugación anticuerpo-peroxidasa de rábano

Se preparó una solución de anticuerpos de 10.0 mg/mL a la que se le adicionó una solución de peroxidasa de rábano (4.0 mg/mL). Esta mezcla se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, después de lo cual se adicionaron 100 μL de borohidruro de sodio (4.0 mg/mL). Posteriormente, ésta se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos que contenía NaCl 137.0 mM y KCl 2.7 mM (amortiguador PBS) (Harlow y Lane, 1988).

V. 6.3.2. Análisis por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Una vez que se conjugó el anticuerpo con la peroxidasa de rábano, se adicionó el antígeno a los pozos de la placa en una concentración de 20.0 mg/mL), se prepararon seis diluciones para cada antígeno de 1:1000 a 1:10000, las cuales se colocaron en los pozos correspondientes. Posteriormente se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 12 h. Se lavaron con amortiguador PBS y se adicionó albúmina bovina al 3.0% con azida de sodio al 0.02%. Después de incubar por 2 h a temperatura

ambiente, la placa se lavó con amortiguador PBS y se adicionaron 50 μL del anticuerpo conjugado, la placa se lavó con amortiguador PBS y se agregó 3',3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB), sustrato de la peroxidasa de rábano. La reacción se incubó durante 20 minutos después de lo cual se detuvo agregando 50 μL de H_2SO_4 1.0 M. Las muestras se leyeron a 450 nm en un lector de placas Thermo Orion (Harlow y Lane, 1988).

V.7. Análisis estadístico

En todas las muestras en donde n ≥ 10, se realizó el análisis de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se utilizó la prueba de Bartlett para evaluar la homegeneidad de variazas. Para evaluar si había diferencias significativas (α=0.05) entre los grupos, se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA). Para establecer las diferencias (α=0.05) entre grupos se realizó la prueba de Tukey.

VI. RESULTADOS

VI.1. Bioensayo 1

En los cinco grupos de exposición del primer bioensayo, no se encontraron diferencias significativas (α= 0.05) entre los grupos expuestos a hipoxia durante 0, 12, 24 y 36 horas en la actividad de la LDH. Sin embargo, sí se observó diferencia significativa (α= 0.05) entre estos grupos y los que fueron expuestos durante 48 h y 150 h. La actividad más alta se encontró en los organismos que estuvieron en hipoxia durante 150 h, en los cuales se obtuvo una actividad promedio de 13.093 μmol min^{-1} mg^{-1} prot, que fue tres veces mayor que la observada hasta las 36 h y dos veces mayor que la observada a las 48 h (Tabla III). En función de estos resultados, los tiempos de exposición a condiciones hipóxicas se establecieron de 0 h hasta 240 h para el segundo bioensayo.

Tabla III. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) (μmol min^{-1} mg^{-1} prot) en cinco grupos de exposición a condiciones de hipoxia. La actividad se definió en términos de los μmoles de NADH oxidado por minuto por cada mg de proteína (μmol $min^{-1}mg^{-1}$ prot). En todos los casos n = 10; DE = Desviación estándar.

Tiempo (h)	Actividad LDH ± DE (μmol min^{-1} mg^{-1} prot)
0	4.053 ± 0.115[a]
12	4.020 ± 0.226[a]
24	4.130 ± 0.204[a]
36	4.671 ± 0.162[a]
48	6.104 ± 0.292 [b]
150	13.093 ± 0.428[c]

Superíndices iguales indican que no existen diferencias significativas (α=0.05)

VI.2. Bioensayo 2

La actividad de la LDH para los organismos del bioensayo dos se determinó tanto en los grupos de exposición a condiciones de hipoxia como en sus grupos control correspondientes. La actividad más baja se observó en el grupo G_0 (3.233 ± 0.625 μmol min^{-1} mg^{-1} prot). No se observaron diferencias significativas (α= 0.05) entre ninguno de los grupos control y el grupo G_0. En el grupo G_{48} la actividad fue 2.3 veces mayor (α= 0.05) en comparación con la del grupo G_0. En los grupos G_{96} y G_{144} se observó una disminución en la actividad, mostrando la del grupo G_{96} diferencias significativas (α= 0.05) con respecto a todos los grupos de exposición tanto

a condiciones hipóxicas como aeróbicas. La actividad del grupo G_{144} fue la menor en comparación con todos los grupos de exposición a condiciones hipóxicas y no se encontraron diferencias significativas (α= 0.05) entre este grupo, los grupos control y el grupo G_0. La mayor actividad se encontró en G_{192} y G_{240}, siendo la actividad de este último la más alta (12.784 ± 1.798μmol min^{-1} mg^{-1} prot). En todos se encontraron diferencias significativas (α= 0.05) con relación a sus controles a excepción de los grupos G_0 y G_{144} (Fig. 9).

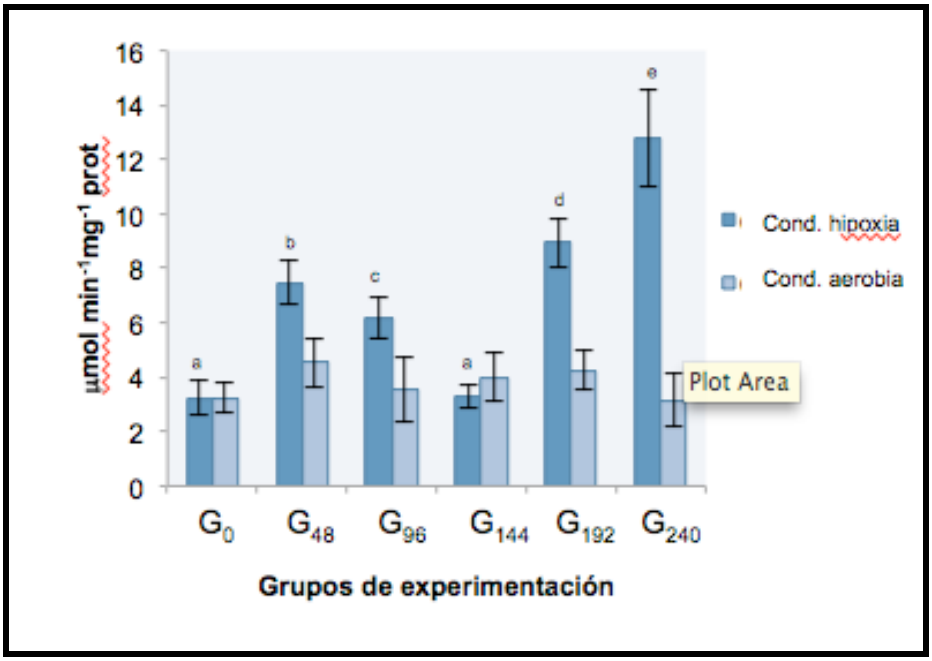

Fig. 9. Valores de actividad (μmol min^{-1} mg^{-1} prot) de la lactato deshidrogenasa (LDH) correspondientes al bioensayo dos. Se observan los cinco grupos de exposición a condiciones de hipoxia y los grupos de control de cada grupo de experimentación. La actividad se expresa en μmoles de NADH oxidado por minuto por cada mg de proteína (μmol $min^{-1}$$mg^{-1}$ prot). En todos los casos, el número de organismos expuesto fue de 35 para los grupos de experimentación y de 5 para los grupos control (aeróbicos). Superíndices iguales indican que no existen diferencias significativas (α=0.05).

VI.3. Concentración de proteínas en hemolinfa

Se midió la concentración de proteínas solubles en las muestras de hemolinfa obtenidas para cada grupo (bioensayo 2) tomando como concentración de referencia la correspondiente al grupo G_C. La concentración encontrada en los grupos control se mantuvo en un intervalo de concentración de 4.641 a 6.942 mg/mL; no se encontraron diferencias significativas (α= 0.05) entre estos grupos, el G_C y el G_{48}. Para el grupo G_o la concentración de proteínas fue 1.5 veces mayor en comparación con G_C y G_{48}. En G_{96}, se observó un incremento significativo con relación a los grupos G_C, G_0 y G_{48}. En G_{96} la concentración aumentó 1.88 veces más con relación a G_C. No se encontraron diferencias significativas (α= 0.05) entre los grupos G_{96}, G_{192} y G_{240} (Fig. 10).

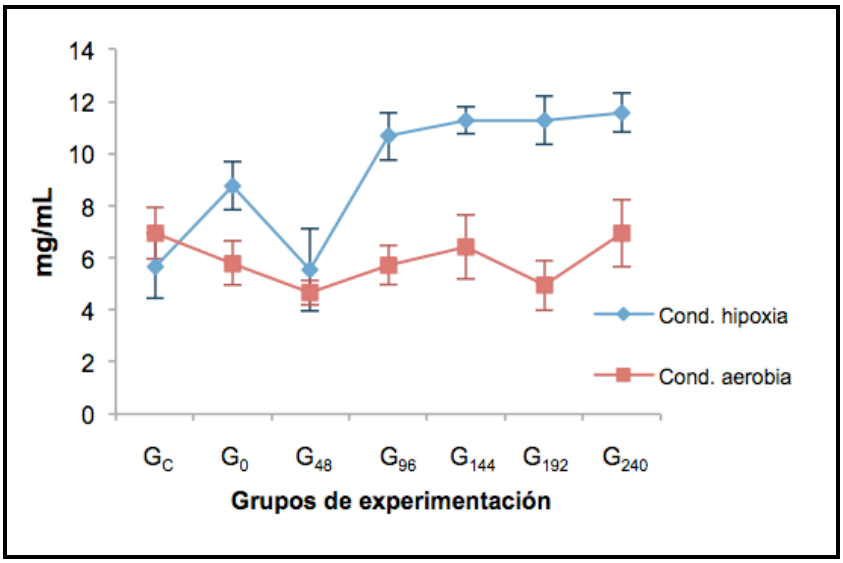

Fig. 10. Concentración de proteínas (mg/mL) en la hemolinfa de los grupos experimentación y en los grupos de control. En las abscisas se representa a cada grupo de exposición (línea azul) y su respectivo control (línea roja).

VI. 4. Cuantificación de succinato en hemolinfa

En los grupos G_C y G_0 la concentración de succinato no fue detectable mediante el método utilizado en este trabajo. En los grupos expuestos a condiciones hipóxicas se encontraron concentraciones de succinato en un intervalo de 19.45 hasta 241.1 mg/mL. Se encontraron diferencias significativas (α=0.05) entre todos los grupos a partir del G_{48} y hasta el grupo G_{240}. La concentración más baja se determinó en el grupo G_{144}, siendo 19.45±8.40 mg/mL. Las concentraciones más altas, 100.09±20.50 y 241.12±15.40 se encontraron en los grupos de mayor exposición a la hipoxia, G_{192} y G_{240} respectivamente. Estas concentraciones fueron 5.0 y 12.4 veces más altas en comparación con el grupo G_{144}.

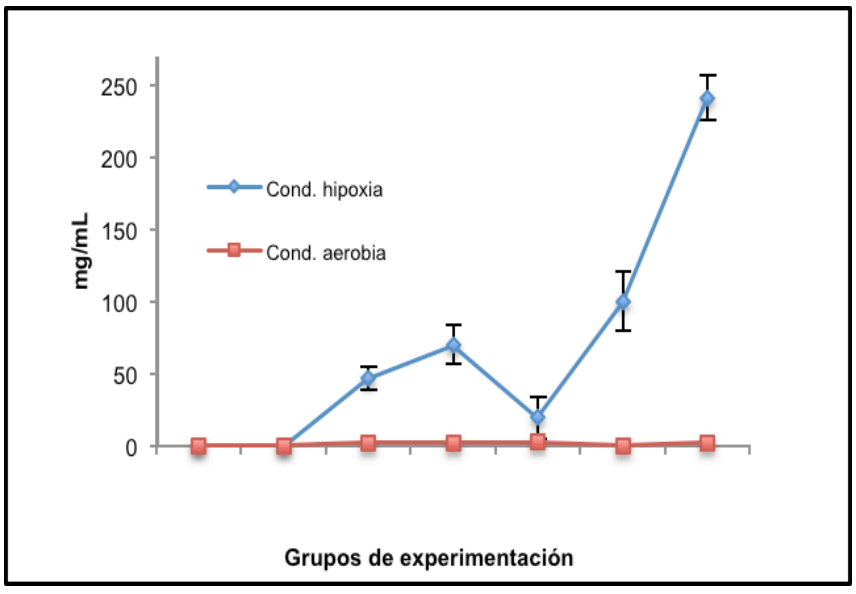

Fig. 11. Concentración de succinato (mg/mL) en los grupos de experimentación y en los grupos de control. En las abscisas se representa a cada grupo de exposición (línea azul) y su respectivo control (línea roja).

VI.5. Aislamiento y cuantificación de hemocianina

Espectros de elución de la columna de Sepharose CL-4B. Se obtuvieron los espectros de elución correspondientes a cada grupo de exposición (Fig. 12), en éstos se identificó un máximo de absorbancia a 280 nm que en la mayoría de las muestras correspondió desde la fracción 9 a la 12, y en el caso de la muestra del grupo G_C de la fracción 13 a la 16. Para las muestras de los grupos G_{144} y G_{240}, se identificó un segundo pico correspondiente a la fracción 20 el cual fue mayor en la muestra G_{240} (Fig. 12).

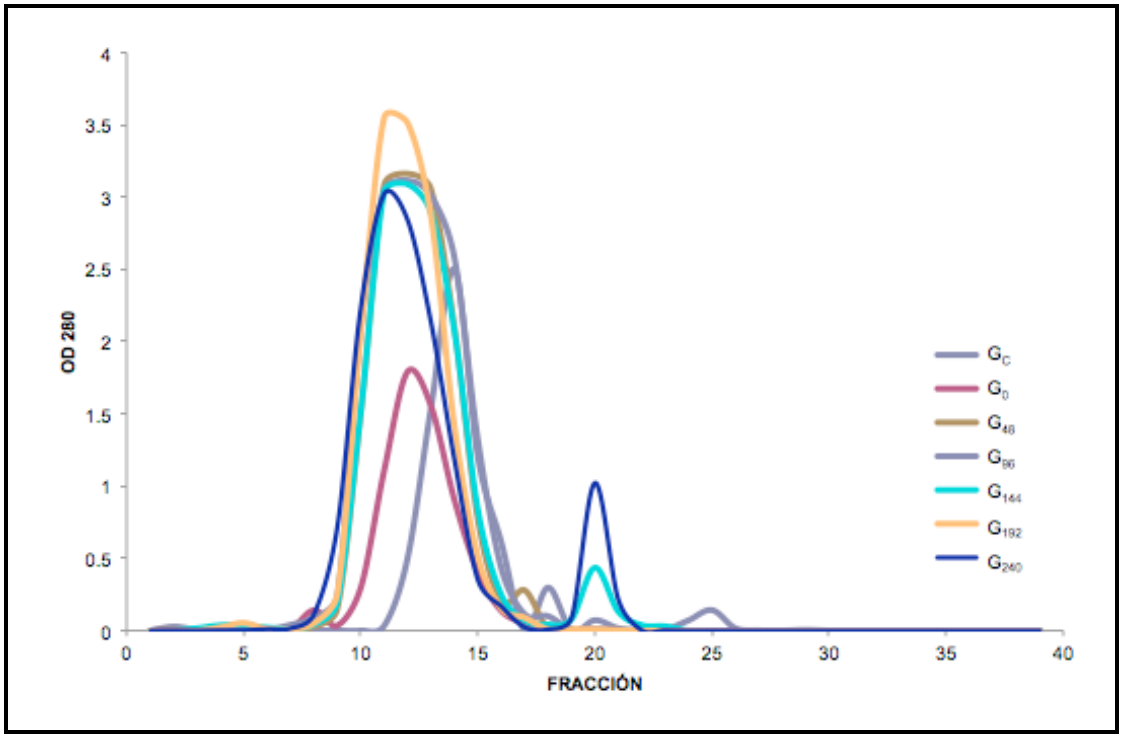

Fig. 12. Espectro de elución de la columna de Sepharose CL-4B en amortiguador de fosfatos pH 7.0. Muestra: hemolinfa de *Tegula funebralis*. Velocidad de flujo: 8 mL/h, fracciones de 2.2 mL.

***Espectros de absorción para las fracciones*.** Para cada una de las fracciones eluidas de la columna CL-4B en las cuales se obtuvo una lectura de absorbancia a 280 nm, se obtuvieron espectros de absorción en el intervalo de 250 a 660 nm. En ellos se identificaron los dos picos característicos de la hemocianina, siendo las fracciones 11, 12, 13 y 14 de todos los grupos de exposición las que mostraron una clara absorbancia en ambas longitudes de onda. Para el resto de las fracciones no se observaron los picos característicos de la Hc. En la fracción 10 de cada grupo se observó el pico a 280 nm; sin embargo, en esta fracción el pico a 347 nm no se muestra tan intenso. De la misma manera, las fracciones 15 y 16 de los grupos G_{48}, G_{144}, G_{192} y G_{240} mostraron baja absorbancia a 347 nm, mientras que a 280 nm se observó claramente una alta intensidad ($A_{280} > 0.2$) (Fig. 13, 14, 15, 16, 17, 18,19).

A todas las muestras en donde se identificaron los dos picos de absorción se les adicionó KCN y se leyó el espectro de absorción entre 250 a 660 nm; en todos los casos la absorbancia a 347 nm disminuyó a 0.005 ± 0.002. En la fracción 20 de los grupos G_{144} y G_{240} se observó un pico de máxima absorbancia a 280 nm; sin embargo, no se incluyó en tratamientos posteriores debido a la ausencia de la segunda señal de la hemocianina, es decir, el pico de máxima absorbancia a 347 nm.

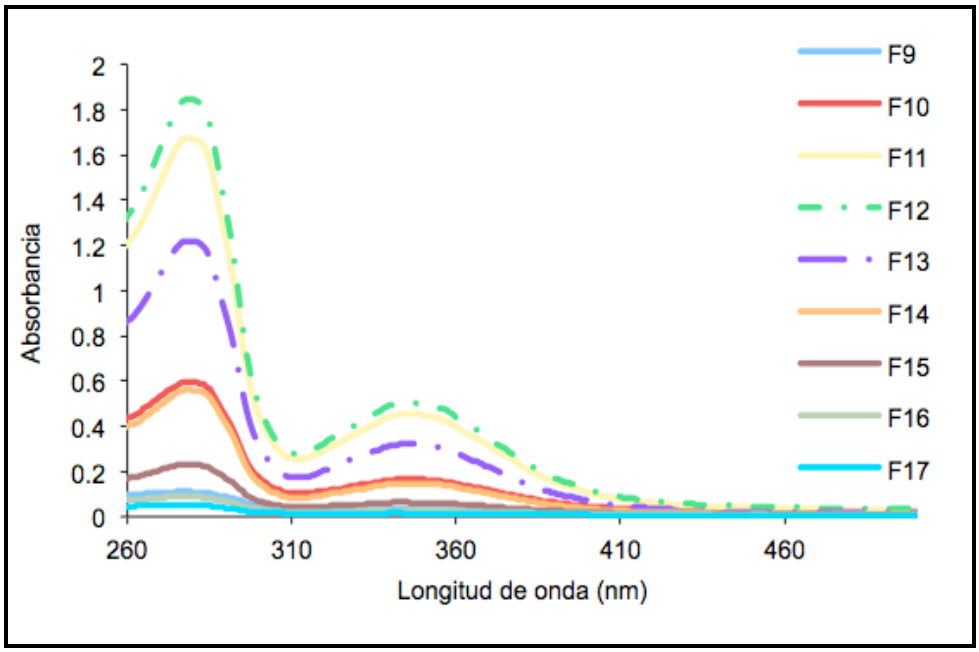

Fig. 13. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_C provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

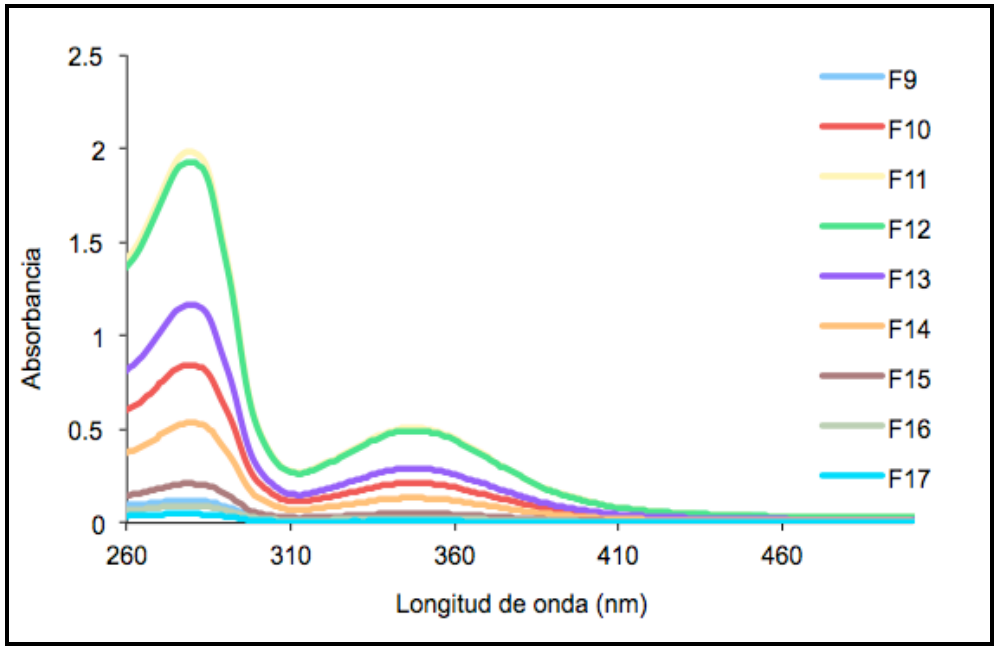

Fig. 14. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_0 provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

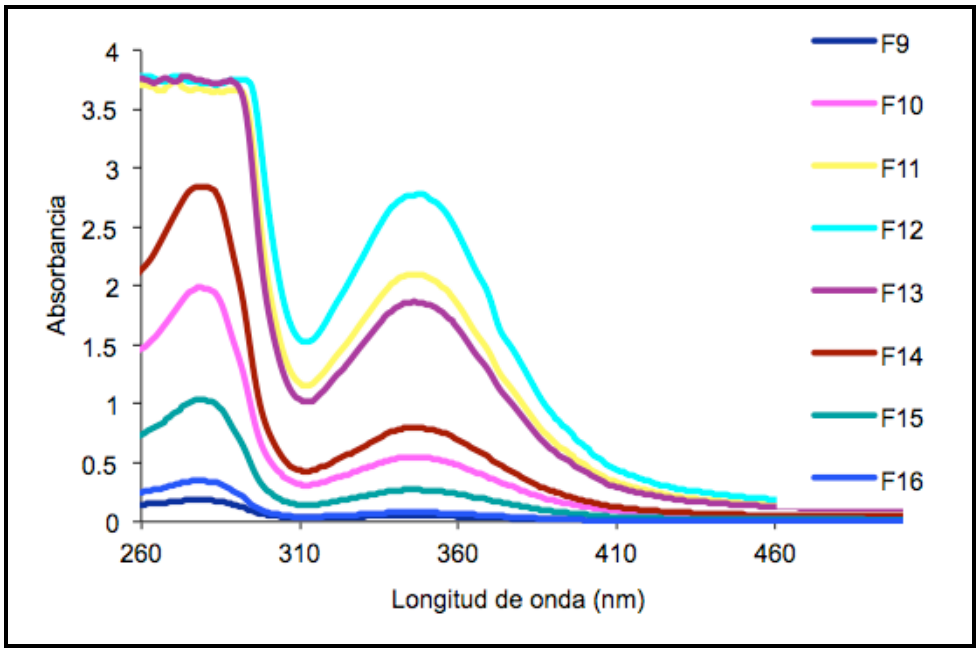

Fig. 15. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{48} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

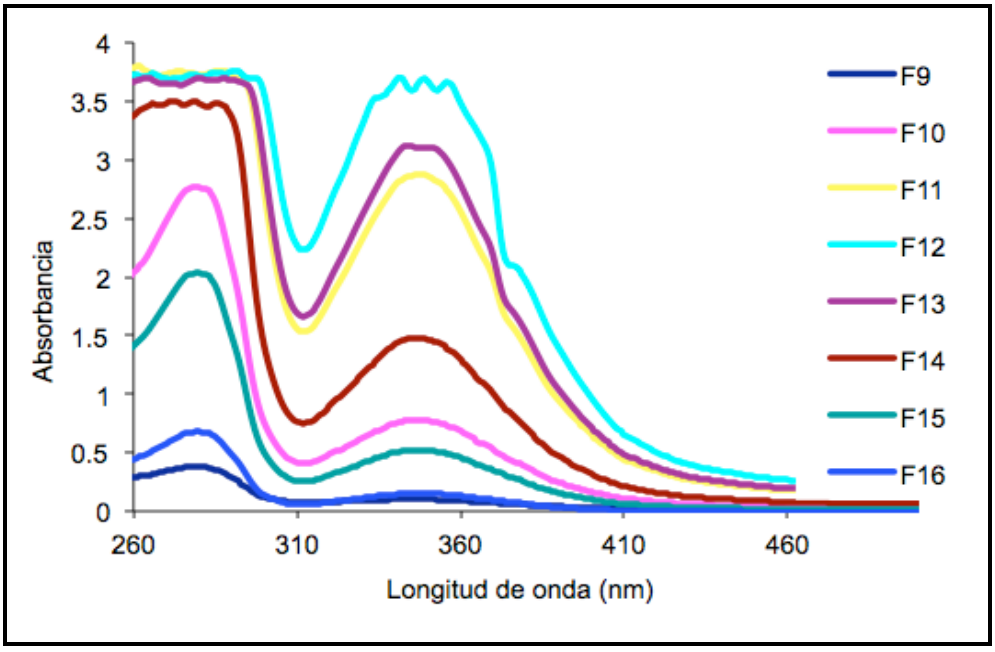

Fig. 16. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{96} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

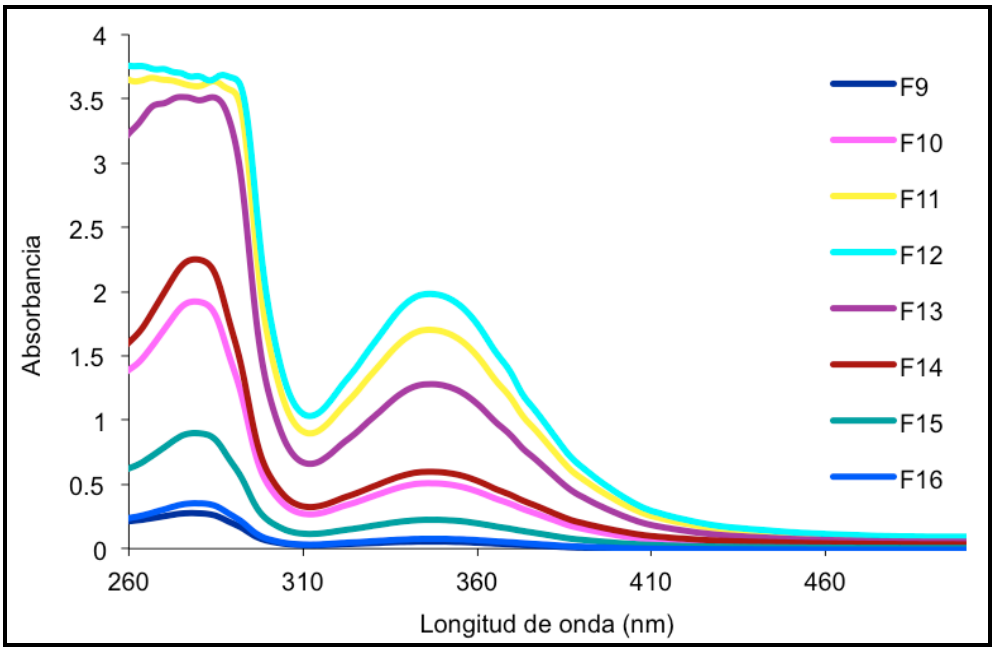

Fig. 17. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{144} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

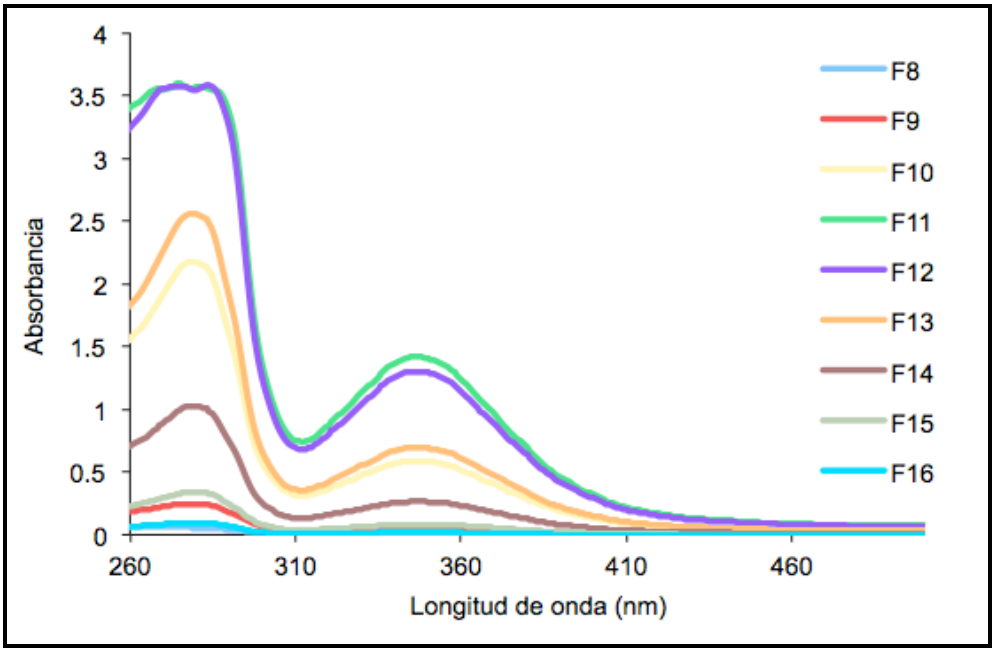

Fig. 18. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{192} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

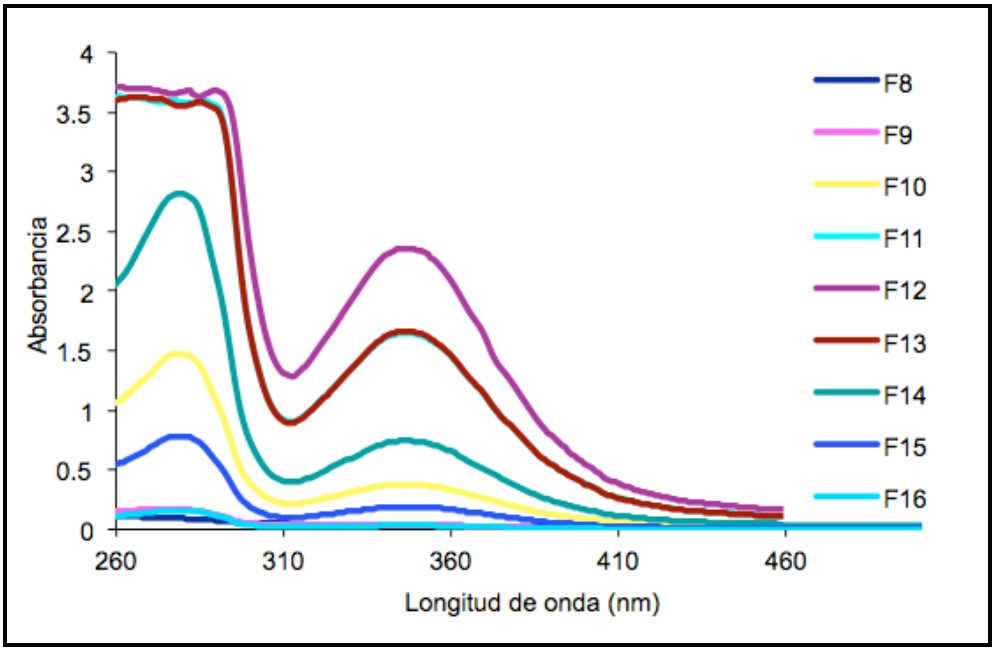

Fig. 19. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas para la muestra de hemolinfa del grupo G_{240} provenientes de la columna de Sepharose CL-4B. Se muestran únicamente los espectros de las fracciones en las cuales se obtuvo absorbancia a 280 nm.

Determinación de proteína en las fracciones. Las fracciones de cada grupo en las cuales se observaron las bandas de absorción características de la proteína (280 y 347 nm), se juntaron en una sola muestra y se nombraron como se indica en la tabla V. La concentración más baja se encontró en el grupo G_0; sin embargo, se utilizaron los resultados del grupo G_C (campo) como punto de referencia para todos los grupos experimentales. En general se observó un incremento en la concentración de proteína en relación al tiempo de exposición (r=0.854). La concentración en los grupos G_{48} y G_{96} fue respectivamente 3.2 y 1.97 veces mayor en comparación con la encontrada en el grupo G_C. En cuanto al grupo G_{144} se observó un aumento en un factor de 4.77; en el grupo G_{192} la concentración

disminuyó con relación al grupo G_{144}. La concentración más alta se encontró en el grupo G_{240} cuya concentración, 2.609 mg/mL, fue similar a la encontrada en el grupo G_{144} que fue de 2.399 mg/mL (Tabla IV).

Con la concentración de proteína que se determinó en las muestras de cada grupo de exposición (Tabla IV), se calculó el porcentaje de proteína (presuntamente hemocianina) con respecto a la concentración total de proteína en la hemolinfa (Tabla V). De acuerdo con estos resultados, la mayor variación en este porcentaje se observa durante las primeras 96 horas de exposición ya que durante este periodo se obtuvieron tanto el porcentaje más bajo (6.26%) como el más alto (27.92%). A partir del grupo G_{144} el porcentaje relativo no presenta diferencias.

Tabla IV. Valores de concentración de proteínas (mg/mL) en las fracciones obtenidas de la columna de Sepharose CL-4B a partir de la hemolinfa de cada grupo de experimentación. Se indica la nomenclatura de cada muestra y las fracciones que la conforman. Se resaltan las muestras en las cuales se identificaron las dos bandas de absorción máxima característicos de la hemocianina (280 y 347 nm).

Grupo	Muestra (M)	Fracciones	Concentración** (mg/mL)
G_C	M_{GC}	F13, F14, F15, F16	**0.503***
G_0	M_{G0}	F13, F14, F15, F16	0.316
G_{48}	M_{G48}	F11, F12, F13, F14	**1.609***
G_{96}	M_{G96}	F9, F10, F11, F12	**0.990***
G_{144}	M_{G144}	F12, F13, F14	**2.399***
G_{192}	M_{G192}	F11, F12, F13	**1.973***
G_{240}	M_{G240}	F12, F13, F14	**2.609***

*La concentración corresponde a la muestra conformada por todas las fracciones

Tabla V. Porcentaje relativo de hemocianina* en la hemolinfa de los grupos experimentales.

Grupo	Concentración de proteína en la hemolinfa (mg/mL)	% Hc en la hemolinfa
G_C	4.734	19.90
G_0	5.046	9.90
G_{48}	5.763	80.09
G_{96}	10.661	25.52
G_{144}	11.289	43.80
G_{192}	11.572	36.04
G_{240}	13.520	46.48

* Presuntamente hemocianina

VI.6. Electroforesis de las fracciones eluidas de columna CL-4B

Las muestras de cada grupo (Tabla IV) fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizó una curva de calibración para cada gel (Fig. 20, 21). Todas las curvas de calibración fueron similares ya que se utilizaron los mismos marcadores moleculares. De acuerdo con lo observado en las electroforesis, se identificaron al menos tres proteínas en un intervalo de 150 a >200 kDa. En las muestras de todos los grupos experimentales se identificó una proteína de 163 kDa, la proteína de menor pesor molecular se observó en la muestra M_{G48}; sin embargo, en el resto de los grupos experimentales no se identificó. En las muestras M_{G96}, M_{G144}, M_{G192} y M_{G240} se identificó la proteína de mayor peso molecular (>200 kDa) (Tabla VI).

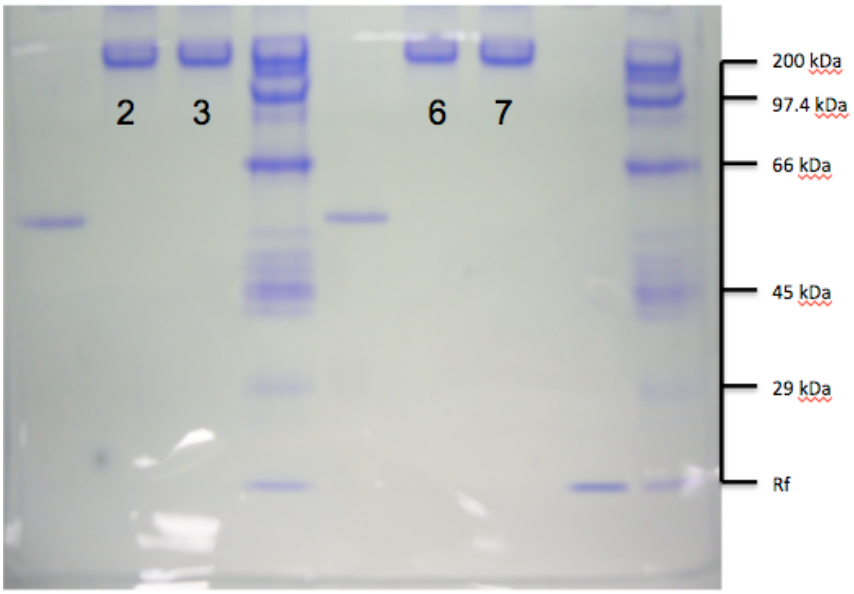

Fig. 20. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6.5%. En los carriles 2,3, 6 y 7 se observan las muestras grupo G_{48}. En el carril 4 y 9 se observan los marcadores moleculares (anhidasa carbónica (29kDa), albúmina de huevo (45 kDa), albúmina bovina (66 kDa), fosforilasa B de conejo (97.4 kDa), β-Galactosidasa de *E. coli* (116 kDa) y Miosina de músculo de conejo (200 kDa).

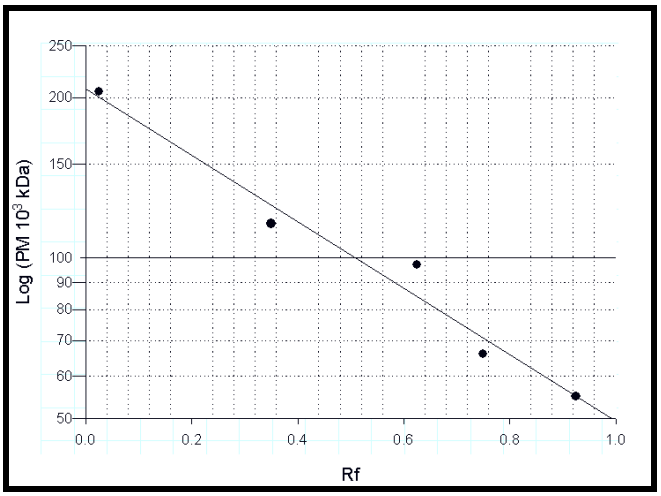

Fig. 21. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las muestras correspondientes a cada grupo de experimentación (r=0.998). Rf = Relación frontal.

Tabla VI. Proteínas identificadas (X) mediante electroforesis en geles de acrilamida (6.0%) para los siete grupos de experimentación. Los grupos G_C y G_0 se consideraron como los grupos de control.

Muestra	Proteína 1 (150 kDa)	Proteína 2 (163 kDa)	Proteína 3 (>200 kDa)
M_{GC}		X	
M_{G0}		X	
M_{G48}	X	X	
M_{G96}		X	X
M_{G144}		X	X
M_{G192}		X	X
M_{G240}		X	X

VI.7. Porcentaje de carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos más bajo se encontró en las muestras M_{GC} y M_{G0}, 3.13 y 3.36% respectivamente. En la muestra del grupo expuesto por 48 h se encontró el porcentaje de carbohidratos más alto de todos los grupos experimentales. Comparativamente, el porcentaje aumentó en un factor de 7 en relación a las muestras M_{GC} y M_{G0}; dicho porcentaje fue similar al encontrado en la fetuína, uno de los controles positivos utilizados. En la muestra M_{G192} el contenido de carbohidratos aumentó hasta un 20.88%; en M_{G192} se observó el segundo porcentaje más alto. El contenido más bajo de carbohidratos se obtuvo en la muestra $MG_{240,}$ en la que se encontraron niveles traza (Tabla VII). El porcentaje de carbohidratos en los grupos expuestos a condiciones hipóxicas (M_{G48}, M_{G96}, M_{G144} y M_{G192}) fue

mayor al encontrado en la Hc de *Megathura crenulata* comercial, no así en las muestras M_{GC} y M_{G0} (Hc de *T. funebralis*) en donde la concentración fue considerablemente menor. No se observó una correlación entre el porcentaje de carbohidratos y el tiempo de exposición a condiciones de hipoxia.

Tabla VII. Porcentaje de carbohidratos en las muestras estándar y las muestras de los grupos experimentales.

Proteína	mg proteína/mL	%Carbohidratos
Lisozima	2.5	0
Albúmina	2.5	0
Ovoalbúmina	2.5	Traza
Apo-transferrina	2.5	3.2
Fetuína	2.5	22.9
Alfa 1 glicoproteína ácida	2.5	41.4
Hemocianina *M. crenulata*	2.5	7.5
Hemocianina* M_{GC}	2.5	3.13
Hemocianina* M_{G0}	2.5	3.36
Hemocianina* M_{G48}	2.5	25.57
Hemocianina* M_{G96}	2.5	15.69
Hemocianina* M_{G144}	2.5	10.54
Hemocianina* M_{G192}	2.5	20.88
Hemocianina* M_{G240}	2.5	Traza

* Presuntamente hemocianina

VI.8. Determinación del número de subunidades

Se obtuvo un patrón de elución para las muestras correspondientes a cada grupo de exposición (Tabla IV). En las muestras M_{G0} y M_{G48} se identificaron 5 bandas, en ambas se identificó la absorción de las fracciones 80 y 290; el resto de los picos corresponden a las fracciones 58, 145 y 244 para M_{G0} y a las fracciones 44, 98 y 120 para M_{G48} (Fig. 22, 23). En la muestra M_{G96} se encontró el mayor número de picos de absorción, que correspondieron a las fracciones 80, 87, 98, 120, 132, 145, 214 y 269 (Fig. 24). En las muestras M_{G144} y M_{G192} se observó el menor número de bandas de absorción, y en la muestra M_{G240} se identificaron 4 bandas de absorción correspondientes a las fracciones 80, 120, 138 y 192 (Fig. 25, 26, 27). En todas las muestras, a excepción de la M_{G144} se encontró una banda de absorción en la fracción 80. En todas las muestras exceptuando la M_{G144} se identificó una banda de absorción correspondiente a la fracción 120. La muestra M_{G144} presentó una banda de absorción común correspondiente a la fracción 192 con las muestras M_{G192} y M_{G240}.

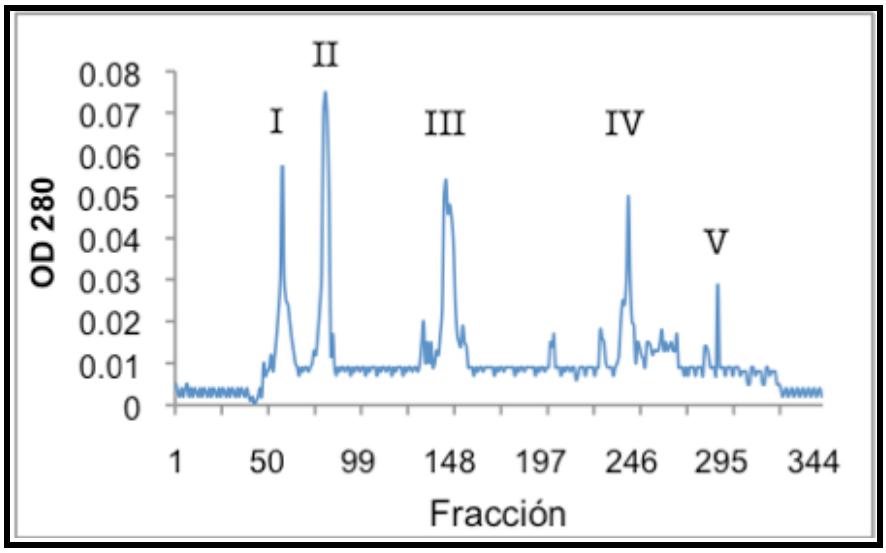

Fig. 22. Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G0}. La fase móvil utilizada fue solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / h y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican las bandas de máxima absorción identificados con números romanos.

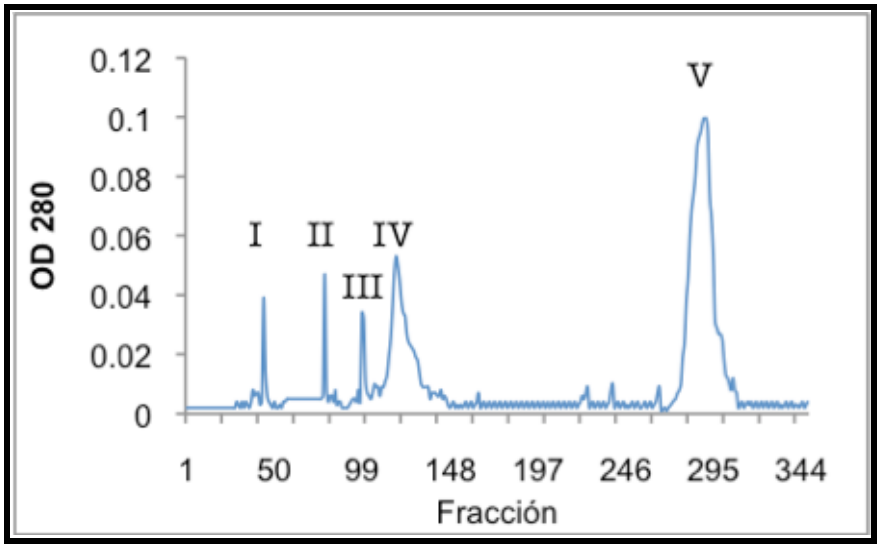

Fig. 23. Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G48}. La fase móvil utilizada fue solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / h y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican los picos de máxima absorción identificados.

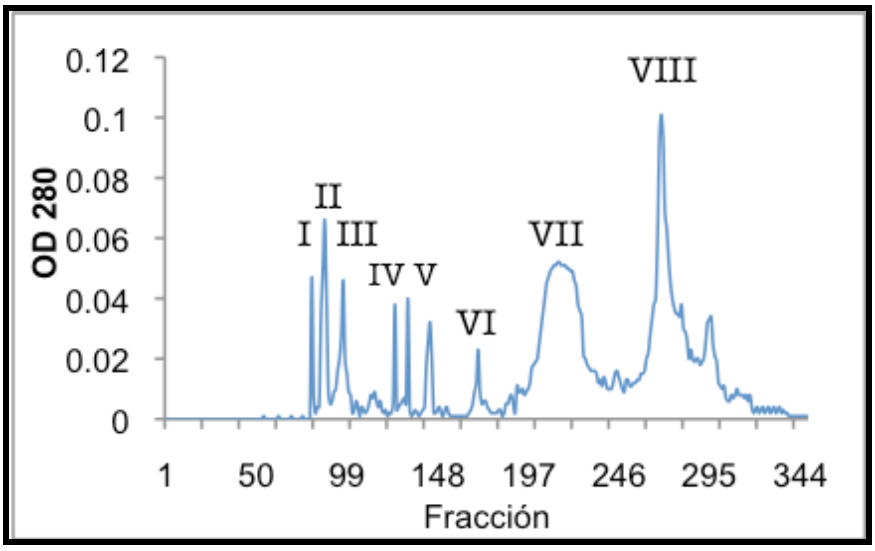

Fig. 24. Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G96}. La fase móvil utilizada fue solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican las bandas de máxima absorción identificados con números romanos.

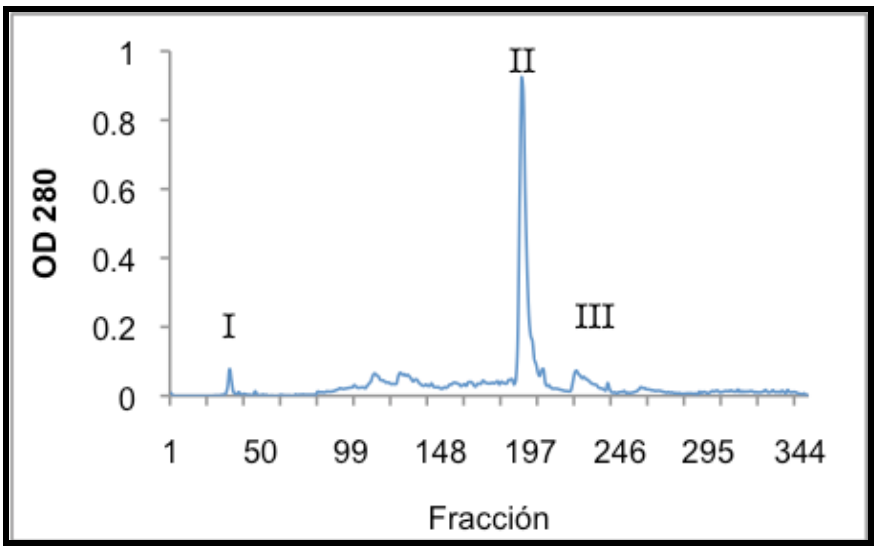

Fig. 25. Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G144}. La fase móvil utilizada fue solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican las bandas de máxima absorción identificados con números romanos.

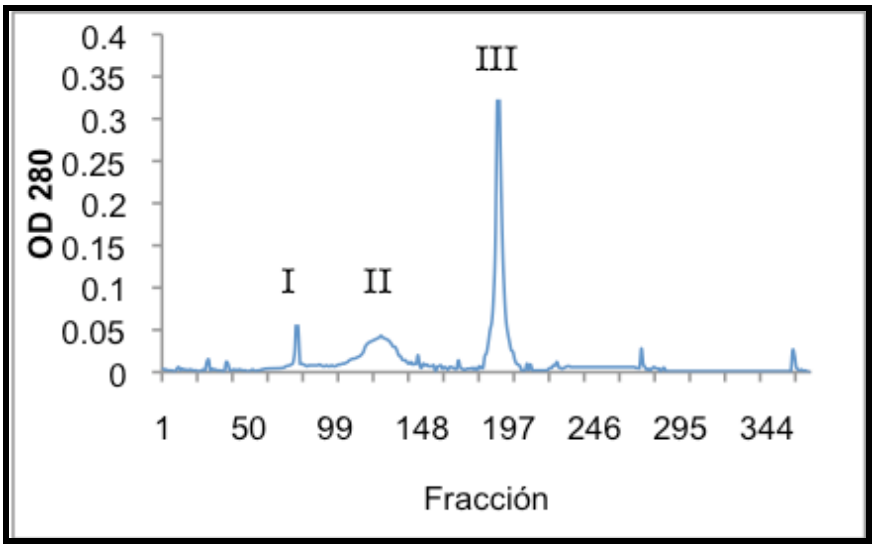

Fig. 26. Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G192}. La fase móvil utilizada fue solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican las bandas de máxima absorción identificados con números romanos.

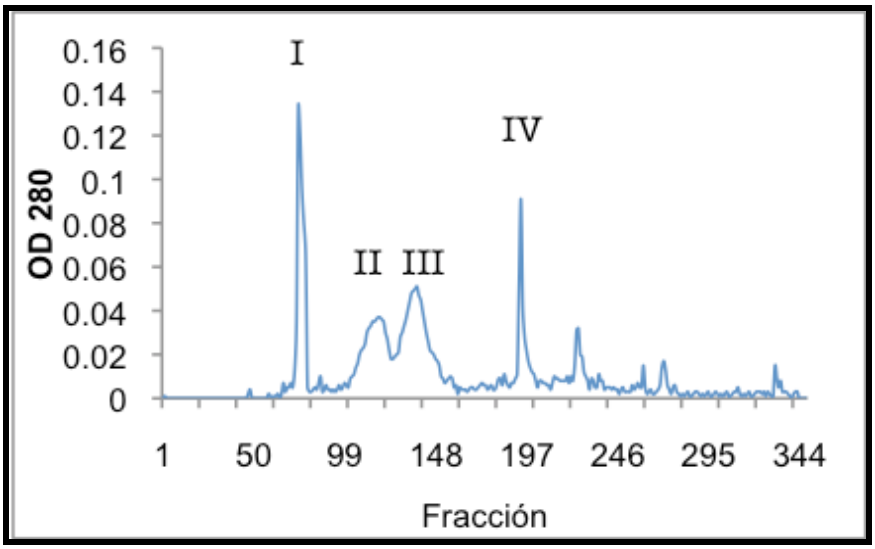

Fig. 27. Espectro de elución de la columna DEAE CL-6B; muestra M_{G240}. La fase móvil utilizada fue solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8.5 que contenía EDTA 10 mM, se mantuvo un flujo constante de 0.2mL / hr y un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se indican las bandas de máxima absorción identificados con números romanos.

VI.9. Concentración de proteína en las fracciones eluídas de la columna DEAE CL-6B

Se determinó la concentración de proteínas en cada una de las fracciones en donde se identificó una banda de máxima absorción. En la muestra M_{G0} se identificaron 5 máximos de absorbancia; sin embargo, únicamente en las fracciones 80 y 145 se cuantificó el contenido de proteínas ya que en las tres fracciones restantes no se detectó. En la muestra M_{G48} se encontró que la fracción 120 contenía la mayor concentración de proteína (170.83 μg/mL), y la fracción 80 la de menor contenido (10.89 μg/mL). En la muestra M_{G96}, en donde se identificaron el mayor número de fracciones, se encontraron concentraciones similares en las fracciones 80, 98 y 120, la menor concentración se determinó en la fracción 145 (13.66 μg/mL) y la mayor en la fracción 269 (318.04 μg/mL). En la muestra M_{G144} se encontró la mayor concentración de proteínas de todas las fracciones analizadas conteniendo 1099.86 μg/mL en la fracción 192. De la misma forma, en las muestras M_{G192} y M_{G240}, se encontró la mayor concentración de proteínas en la fracción 192 (Tabla VIII).

Tabla VIII. Concentración de proteína en las fracciones eluidas de la columna DEAE CL-6B.

Muestra	M_{G0}	M_{G48}	M_{G96}	M_{G144}	M_{G192}	M_{G240}
Fracción	**Concentración (µg/mL)**					
33				115.15		
44		88.46				
58	Nd					
80	170.83	10.89	139.24		76.90	114.60
87			237.35			
98		56.71	100.53			
120		170.83	108.12		98.87	290.85
132			nd			
138						156.12
145	122.89		13.66			
192				**1099.86**	397.45	411.13
214			40.876			
221				212.45		
244	Nd					
269			318.04			
290	Nd	94.44				

VI.9.1. Electroforesis de las fracciones DEAE CL-6B

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a las fracciones de la tabla VIII en las cuales se determinó que contenían

proteína. En todos los casos se obtuvo el mismo patrón electroforético; es decir, se observó una franja similar que corresponde a un peso molecular aproximado de 66 kDa (Fig. 29) que se determinó a partir de una curva de calibración.

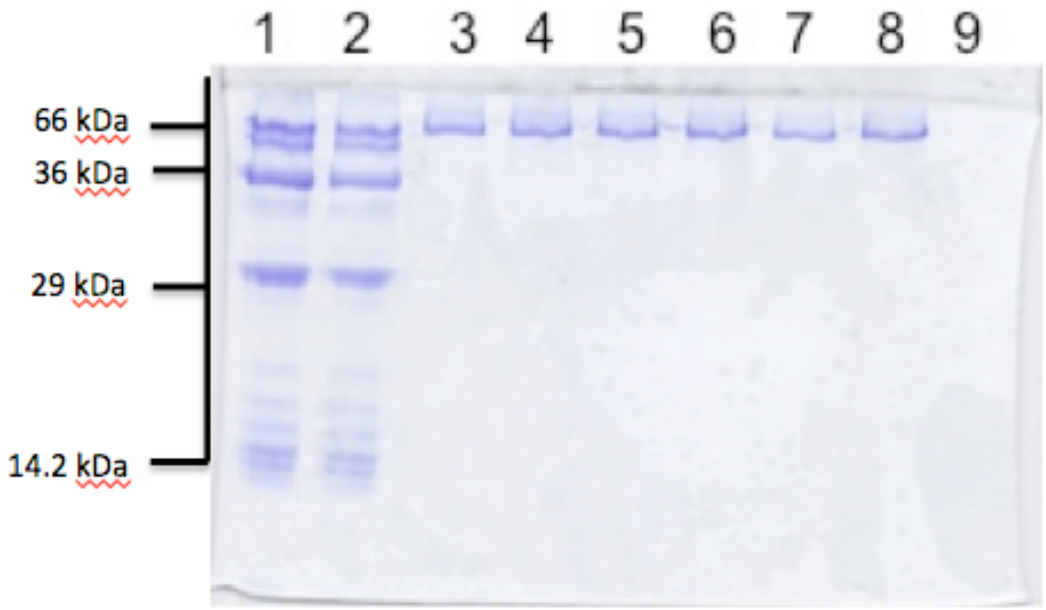

Fig. 28. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6.0 %. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a la muestra M_{G0} y los carriles 6, 7 y 8, a la muestra M_{G48}. En el carril 1 y 2 se observan los marcadores moleculares: albúmina bovina (66kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α-lactoalbúmina (14.2 kDa). Carril 9 = blanco.

VI.10. Pruebas de inmunogenicidad

La ascitis producida por los antígenos inoculados se clasificó como mínima, moderada o severa. En todos los ratones inyectados con una

concentración del antígeno de 0.2 mg/mL se observó una ascitis moderada en donde la producción de fluido ascítico fue mínima y por lo tanto no se pudo extraer. En los organismos inyectados con el antígeno en una concentración de 2.0 mg/mL se observó una distensión abdominal moderada en los individuos en los cuales se utilizó Hc de *T. funebralis* extraída de caracoles expuestos a condiciones aeróbicas, el total de fluido extraído fue tres veces menor que el obtenido de los organismos inyectados con Hc de *Megathura crenulata* en los cuales se observó una distensión abdominal importante (Fig. 29). Este efecto también se manifestó en los organismos inyectados con Hc de *T. funebralis* extraída de organismos expuestos a condiciones hipóxicas (Tabla IX).

Tabla IX. Volumen de fluido ascítico (mL) obtenido de ratones BALB/c-hembras de trece semanas de edad.

Antígeno		Clave	Antígeno (mg/mL)	Ascitis	Fluido ascítico mL
Control	-	B	Blanco	-	0.0
Hc *M. crenulata*	-	Ma	0.2	-	0.0
Hc *M. crenulata*	-	Mb	2.0	++	30.0
Hc *T. funebralis*	Aeróbico	Ta	0.2	-	0.0
Hc *T. funebralis*	Aeróbico	Tb	2.0	+	10.0
Hc *T. funebralis*	Hipóxico	Tha	0.2	-	0.0
Hc *T. funebralis*	Hipóxico	THb	2.0	++	44.2

- : Ascitis mínima + : Ascitis moderada ++ : Ascitis severa

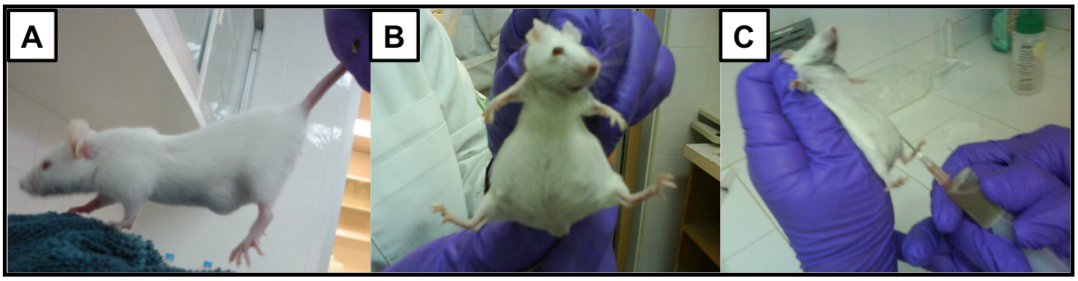

Fig. 29. Efecto de antígenos en el abdomen de ratones de trece semanas de edad variedad BALB/c-hembras. A = Ascitis moderada; B = Ascitis severa; C = Obtención del fluido ascítico.

La mayor concentración de anticuerpos (56.67 mg/mL) se obtuvo en el fluido ascítico extraído de ratones inyectados con hemocianina de *T. funebralis* en concentración de 2.00 mg/mL (muestra Tb, Tabla X). La concentración del fluido obtenido de los organismos inoculados con Hc de *T. funebralis* 2.00 mg/mL (muestra Tb) fue 41.7 % mayor que la de la muestra de *M. crenulata* 2.00 mg/mL (muestra Mb). La Hc de *T. funebralis* en condiciones hipóxicas, inyectada en concentración 2.00 mg/mL (muestra Thb) produjo la menor concentración de anticuerpos, la cual fue 90.82%, menor que la que se obtuvo en la muestra Tb.

En la primera etapa de purificación, las proteínas se precipitaron con sulfato de sodio y se determinó la concentración de proteínas a las tres muestras (Mb, Tb y THb), en este punto no fue posible determinar la concentración de proteína en la muestra THb. En las muestras Mb y Tb, se obtuvo el 71.18 y 80.80 % respectivamente, en relación a la concentración en la muestra centrífugada. En el segundo paso de purificación, la concentración de la muestra Mb disminuyó al 69.05% y la muestra Tb al

72.18 %, también en relación con la concentración de la muestra inicial* (Tabla X).

Tabla X. Concentración de proteínas (mg/mL) en los diferentes pasos de la purificación de anticuerpos a partir del fluido ascítico obtenido de ratones inoculados con los antígenos siguientes: Mb=hemocianina de *M. crenulata* (2.00 mg/mL); Tb = hemocianina de *T. funebralis* (2.00 mg/mL); THb = hemocianina de *T. funebralis* en condiciones hipóxicas (2.00 mg/mL). Los números entre paréntesis indican el porcentaje de proteína con relación a la concentración al inicio de la purificación (*).

Paso	Concentración de proteínas (mg/mL)		
	Mb	**Tb**	**THb**
Centrifugación*	39.91	56.57	5.19
Precipitación sulfato de sodio	28.41 (71.18%)	45.71 (80.80%)	-
Cromatografía DEAE-Sepharose	27.56 (69.05%)	40.83 (72.18%)	-

En el ensayo ELISA, se encontró que a partir de una concentración de 0.1128 mg/mL se obtiene una respuesta positiva para el ensayo realizado con la Hc de *M. crenulata*. Para el ensayo con la Hc de *T. funebralis* la prueba positiva se obtuvo a partir de una concentración de 0.141 mg/mL. (Tabla XI).

Tabla XI. Resultados del ensayo ELISA para el anticuerpo purificado de ratones inoculados con Hc de *M. crenulata* 2.0 mg/mL y Hc de *T. funebralis*. Antígeno=Hc *M. crenulata* y Hc de *T. funebralis*; marcador=peroxidasa de rábano; longitud de onda 450 nm. En todos los casos n = 5; DE = Desviación estándar.

	Antígeno=Hc *M. crenulata*		**Antígeno=Hc *T. funebralis***	
Concentración (mg/mL)	Absorbancia ± DE		Absorbancia ± DE	
1.128	3.07 ± 0.09	+	2.52 ± 0.07	+
0.564	2.46 ± 0.08	+	1.98 ± 0.01	+
0.282	2.21 ± 0.02	+	1.36 ± 0.04	+
0.188	1.76 ± 0.08	+	1.01 ± 0.05	+
0.141	1.09 ± 0.05	+	0.57 ± 0.03	+
0.1128	0.11 ± 0.02	+	0.17 ± 0.03	-
Control negativo	0.08 ± 0.01	-	0.18 ± 0.01	-

VII. DISCUSIÓN

Una de las formas de evaluar el desarrollo de una condición anaeróbica incluyendo su transición aerobiosis-hipoxia, es el monitoreo de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en los tejidos de los organismos expuestos a cambios en la concentración de oxígeno. La actividad de esta enzima ha sido ampliamente estudiada como un indicador de condiciones hipóxicas, ya que desempeña un papel fundamental dentro del metabolismo anaeróbico (Boutilier y St-Pierre, 2000; Michaelidis *et al*., 1999; Pinz y Pörtner, 2002). En este estudio, *Tegula funebralis* fue expuesta a hipoxia durante periodos más prolongados en comparación con otros estudios realizados bajo estas condiciones. En el primer bioensayo se observó un incremento significativo en la actividad de la LDH con respecto al grupo control en el grupo sometido a hipoxia durante 48 h, no así en los grupos que se expusieron durante menos tiempo (12, 24, 36 h). Lo anterior podría indicar que *T. funebralis* no modifica su metabolismo durante las primeras 48 h de hipoxia. En este bioensayo el tiempo de mayor exposición fue de 150 h y la actividad de la LDH aumentó con relación a la actividad del grupo expuesto durante 48 h. Lo anterior permitió considerar un segundo bioensayo en donde se aumentó el tiempo de hipoxia en intervalos de 48 h hasta alcanzar un total de 240 h.

Al igual que en el primer bioensayo, la actividad de la LDH en el segundo aumentó 1.7 veces en el grupo expuesto durante 48 h (G_{48}) con respecto a su grupo control y 2.3 veces con respecto a la actividad del grupo G_0. Los resultados de ambos ensayos sugieren que a partir de las 48 h de

hipoxia *T. funebralis* cambia su metabolismo aeróbico a anaeróbico, lo que le permitiría sobrevivir por un periodo más prolongado de exposición a condiciones hipóxicas. De esta forma, la sobrevivencia estaría dependiendo principalmente de la capacidad de este caracol para satisfacer su requerimiento energético a partir de la producción de ATP asociada a la glucólisis, una respuesta típica en los organismos tolerantes a hipoxia (Churchill y Storey, 1996; Greenway y Storey, 2001; Larade y Storey, 2002; Marshall y McQuaid, 1993). Este comportamiento ha sido observado en otros moluscos marinos como los bivalvos, los cuales han sido ampliamente estudiados (Larade y Storey 2002). Por otra parte, el aumento en la actividad de la LDH a las 48 h contrasta con la disminución en la actividad de esta enzima en los organismos expuestos durante 96 y 144 h, en los que se observaron las actividades más bajas, en particular en el grupo G_{144} en donde se encontró una actividad comparable a la observada en el grupo G_0. Esta respuesta metabólica coincide con la descrita en el caracol *L. littorea*, una especie en la cual se ha observado una reducción significativa en la actividad de la LDH después de 6 días de exposición a anoxia (Greenway y Storey, 2001) y una acumulación de lactato en baja concentración a las 72 h (Churchill y Storey, 1996). Para *T. funebralis*, a pesar de la marcada disminución en la actividad de la LDH, se observó que ésta aumentó significativamente en los grupos G_{192} y G_{240} en comparación con el resto de los grupos de exposición. Lo anterior indica que los organismos de los grupos G_{192} y G_{240} están bajo condiciones tales que su metabolismo es predominantemente anaeróbico. El análisis de succinato en la hemolinfa de

los organismos reveló un incremento en la concentración de este producto terminal del metabolismo anaeróbico en los organismos expuestos durante 48 y 96 h a condiciones hipóxicas. En el grupo G_{48}, aumentaron tanto la concentración de este metabolito como la actividad de la LDH, lo que podría indicar que *T. funebralis* durante las primeras 48 h comienza a cambiar su metabolismo de aerobio a anaerobio, abasteciendo a la glucólisis de NAD^+ mediante la reducción de moléculas como el piruvato (sustrato de la LDH) y el oxalacetato (precursor del succinato). La acumulación de succinato durante periodos cortos de exposición a anoxia se ha reportado para caracoles tanto terrestres como marinos (Churchill y Storey, 1989; Sokolova y Portner, 2001; Wieser, 1981) y otros invertebrados (Anestis *et al*., 2007; Ortmann y Grieshaber, 2003). Al parecer, una disminución en el metabolismo, combinado con un incremento en el nivel de sustratos fermentables como el succinato, son cruciales para la sobrevivencia durante periodos prolongados de emersión (Sokolova y Portner, 2001). La concentración de succinato en *T. funebralis* no mantuvo su tendencia al aumento, sino que en los organismos del grupo G_{144} disminuyó drásticamente hasta 19.95 mg/mL, siendo 3.6 veces menor que el encontrado en el grupo G_{96}. Sin embargo, en los grupos G_{192} y G_{240}, el nivel de succinato aumentó paralelamente al incremento en la actividad de la LDH. Estos incrementos simultáneos sugieren que a partir de las 192 h el metabolismo de *T. funebralis* podría estar sustentado en la reducción de metabolitos involucrados en las rutas anaeróbicas. Tanto el piruvato como el oxalacetato satisfacen este modelo, el cual estaría respaldado por el

incremento de la actividad de la LDH y por la aparición de uno de los productos de la reducción del oxalacetato, el succinato. Se sabe que algunos gastrópodos almacenan los productos terminales de las diversas reacciones asociadas a la degradación anaeróbica de la glucosa; siendo los más comúnmente encontrados el lactato y el succinato (Giokas *et al*., 2005; Michaelidis *et al*., 1999; Sokolova y Portner, 2001; Wieser, 1981). Por otra parte, la acumulación de succinato ha sido reportada por otros autores como una preparación para la recuperación de un entorno normóxico. De acuerdo con Bacchiocchi y Principato (2000) los niveles elevados de succinato durante la anaerobiosis permiten a la mitocondria permanecer metabólicamente activa e intacta hasta que el oxígeno esté disponible y se inicie la respiración. Este comportamiento ha sido demostrado en el crustáceo estuarino *Lepidophthalmus louisianensis* (Holman y Hand, 2009) en anoxia de 72 h. Para *T. funebralis*, el aumento en la concentración de succinato y la elevada actividad de LDH observado en este trabajo sugieren que este organismo cambia a un metabolismo predominantemente anaeróbico a partir de las 192 h de hipoxia.

De manera paralela a los cambios en la actividad de la LDH y la concentración de succinato, los valores de proteína en la hemolinfa se estuvieron modificando a medida que la condición hipóxica se extendía, mostrando a las 48 h una disminución en el nivel de proteína que concuerda con la información reportada a la fecha para la mayoría de los sistemas en hipometabolismo (Ferreira-Cravo et al., 2010). Esto sugiere una disminución en la síntesis de proteína o un incremento en su degradación o bien, ambos

procesos ocurriendo de manera concomitante como un mecanismo para reducir el consumo energético y sobrevivir al bajar las concentraciones de oxígeno. A las 96 h de exposición a la hipoxia, a la par de una disminución de la actividad de la LDH, el nivel de proteínas en *T. funebralis* se elevó de manera consistente hasta alcanzar un valor 2 veces mayor que su grupo control. La concentración de proteína se mantuvo constante en los grupos G_{144}, G_{192} y G_{240} sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Este hecho permite suponer que en *T. funebralis*, la disminución inmediata de proteína no es un factor involucrado en la supresión metabólica global inducida por exposición a la hipoxia como ocurre en los caracoles *L. littorea*, *H. aspersa* y *O. lactea*, en los cuales se ha demostrado que la velocidad en la síntesis y degradación de proteína se modifica rápidamente de una manera coordinada (Larade y Storey, 2002; Pakay *et al*. 2002; Ramnanan *et al*., 2010). Lo que observamos en este trabajo para *T. funebralis* en condiciones hipóxicas por más de 48 h (96, 144, 192 y 240 h) parece oponerse a la idea general de que los anaerobios facultativos resisten largos periodos de hipoxia y anoxia debido a su capacidad de suprimir procesos metabólicos que son energéticamente costosos como la síntesis de proteínas (Larade y Storey, 2002). Siendo ésta de una alta inversión de energía, era de esperarse que en *T. funebralis* disminuyera ante la baja tensión de oxígeno. Sin embargo, con base en los resultados, podemos asumir que para este caracol, el metabolismo de proteínas sólo muestra un periodo de ajuste que incluye la disminución de la proteína en la hemolinfa durante las primeras 48 h de hipoxia. El incremento posterior podría ser parte de un mecanismo de

sobrevivencia involucrando la síntesis de alguna proteína útil en la optimización del oxígeno remanente en los tejidos. Esta proteína permitiría al organismo un periodo de adaptación durante el cual adopta un metabolismo anaeróbico con alta actividad de LDH para satisfacer su demanda energética a través de la glucólisis.

Lo observado en el segundo bioensayo para *T. funebralis* puede ser explicado con base en el comportamiento general de los moluscos tolerantes a la anoxia, los cuales muestran una respuesta de dos fases ante las tensiones de oxígeno decrecientes (Storey y Storey, 2004). En la primera fase, durante la transición aerobiosis-hipoxia, estaría ocurriendo un período intermedio de hipoxia en el cual se produciría un incremento gradual en el catabolismo de carbohidratos para la producción de ATP anaeróbico como un mecanismo compensatorio para mantener los valores normales de recambio de ATP. En la segunda fase, provocada por una intensificación de la hipoxia y la actividad fermentativa sostenida, se estimularía la transición hacia mecanismos tendientes a la conservación del organismo, más que a la compensación de necesidades inmediatas.

La anaerobiosis de los tejidos, con la consiguiente acumulación de productos ácidos de fermentación, los cuales pueden aportar H^+ que a su vez, disminuyen el pH del medio, afecta el enlazamiento del oxígeno por la Hc (efecto Bohr). El papel del succinato acumulado por *T. funebralis* en el presente trabajo puede ser explicado a través de los modelos existentes para explicar el papel del lactato como modulador conocido para proteínas transportadoras de oxígeno (Bridges, 1994; Hirota *et al*., 2010; Johnson *et*

al., 1984; Mangum, 1983; Truchot, 1980). El succinato, a pesar de su capacidad de daño potencial, tendría el efecto de elevar la afinidad de la hemocianina por el oxígeno actuando como efector alostérico positivo, papel que se ha demostrado para el lactato (Hirota *et al*., 2010). Comparado con H^+, el lactato tiene un efecto opuesto, ya que aumenta la afinidad entre la hemocianina y el oxígeno, al igual que la cooperatividad en el enlazamiento. Hirota *et al.* (2010) demostraron la acción de lactato a un pH de 6.5 ocurriendo a través de cambios estructurales que conducen a formar rápidamente un enlace entre la hemocianina y el oxígeno. Siendo el lactato un producto del metabolismo anaeróbico, su concentración es dependiente de la deuda de oxígeno, y la producción de este enlace depende, por lo tanto, de la velocidad de la disminución del oxígeno. Se ha demostrado que en condiciones normóxicas, la concentración de lactato es muy baja y sufre sólo un pequeño incremento después de 72 h de hipoxia en *L. littorea* (Churchill y Storey, 1996), por lo que no es de esperarse que exista un papel fisiológico importante para este metabolito en *L. littorea*. Sin embargo, la elevada actividad de LDH en *T. funebralis* sugiere que bajo las condiciones de acidosis por hipoxia, la importancia fisiológica del lactato sería la de aportar succinato mediante los esquemas metabólicos conocidos (Fig. 2). Posteriormente, el succinato, al ser capaz de aumentar la afinidad de la Hc por el oxígeno, tendría la función de contrarrestar el efecto Bohr en la hemocianina para poder mantener la afinidad de ésta por el oxígeno durante la instauración de la hipoxia con el fin de aprovechar al máximo las bajas concentraciones de oxígeno en los tejidos. Un cambio en la afinidad Hc-O_2

en respuesta a la disminución de oxígeno en el entorno sería equivalente a una disminución en la síntesis de proteínas, lo que sería eficiente en el mantenimiento de las necesidades energéticas, al menos en la etapa hipóxica inicial. Lo anterior podría explicar el decremento en la síntesis proteica durante las primeras 48 h como una respuesta rápida a la disminución de oxígeno en el entorno, utilizando la fermentación con la doble función de aumentar la afinidad de la Hc por el O_2 mediante la producción del efector y de satisfacer las necesidades energéticas del organismo. Por otra parte, el alargamiento del período de disminución de oxígeno propició además otro tipo de cambios en *T. funebralis,* los que están relacionados con el nivel de proteínas. Este tipo de cambios, en particular el aumento de la síntesis proteica o el decremento de su degradación para ocasionar un aumento neto en el nivel de proteínas en periodos mayores que 48 h, sólo puede ser justificado por la importancia fisiológica de las proteínas involucradas.

Los resultados obtenidos en la elución de la columna Sepharose CL-4B despliegan un patrón que sugiere que todos los grupos de caracoles expuestos a baja concentración de oxígeno poseen una proteína similar en tamaño, siendo la del grupo G_C una proteína de peso molecular ligeramente menor que la de todos los demás. El análisis espectroscópico permitió identificar a la hemocianina en las primeras fracciones, ya que mostró que, además de la absorbancia a 280 nm en todas ellas, el espectro presenta una banda a 347 nm, la cual es típica de las hemocianinas oxigenadas y refleja la formación del complejo oxígeno-hemocianina. La desaparición de

la absorbancia a 347 nm después de la adición de KCN, comprueba que la proteína obtenida en los primeros volúmenes de elución es hemocianina. En la proteína eluída en la fracción 20, además de no mostrar la señal a 347 nm, no se observó el color azul característico de la hemocianina oxigenada al contacto de la muestra con el aire. Esto permite suponer que la hemocianina no está presente en esta fracción de los grupos G_{144} y G_{240}, los que permanecieron en hipoxia durante períodos más largos. Al parecer, en *T. funebralis* la instauración de la hipoxia es un disparador que eleva el nivel de proteína total, lo cual podría estar dirigido parcialmente a la producción de hemocianina. Para *T. funebralis* en condiciones aeróbicas y recientemente extraído de su hábitat, el 20 % de su contenido neto de proteína es hemocianina, mientras que a medida que se va instaurando y prolongando la hipoxia, la hemocianina presenta una fluctuación pero con una tendencia al aumento. Una disminución inicial al 10 % (G_0), con un posterior aumento al 80 % (G_{48}) y una tendencia a la estabilidad alrededor del 40 % (G_{144}) indica un período de adaptación que concuerda con la tendencia mostrada por *T. funebralis* de mantener sus necesidades vitales mediante el metabolismo anaeróbico, a la vez que mejora sus capacidades para optimizar el uso del oxígeno.

La capacidad para adaptarse a cambios en la temperatura mediante plasticidad fenotípica ha quedado demostrada para *T. brunnea, T. montereyi* y *T. funebralis* (Tomanek, 2005), por lo que la modulación en la expresión de proteínas puede ser considerada como un posible mecanismo de adaptación de *T. funebralis* ante factores de estrés ambiental. De esta forma, además

de respuestas rápidas mediante el uso de moduladores sobre las capacidades de la hemocianina, la síntesis de nuevas proteínas con propiedades que mejoraran la función de la Hc aseguraría la eficiencia sostenida. Para soportar un período largo de hipoxia, la entrega de oxígeno a los tejidos en los que el metabolismo aeróbico permanece como un suplemento del metabolismo anaeróbico debe ser garantizada. El aumento en la afinidad de la Hc por el oxígeno asegura una mayor oxigenación para la hemocianina y garantiza una reserva de oxígeno en la hemolinfa, lo que aportaría protección contra la hipoxia interna si la descarga en los tejidos fuera adecuada. Los cambios en el tipo de subunidades de la fracción identificada como hemocianina, detectados mediante la fraccionación posterior en Sepharose CL-6B de esta fracción, sugieren que la expresión proteica está siendo modificada por *T. funebralis* a lo largo de su exposición a la hipoxia. Los resultados con relación a los cambios observados en el nivel proteico y en la actividad de LDH, fueron coincidentes con cambios en el número de subunidades de la fracción identificada como hemocianina. Mediante el análisis de subunidades de esta fracción para cada grupo, fue posible identificar la presencia de 5, 8, 5, 3 y 3 tipos de subunidades para exposiciones de 48, 96, 144, 192 y 240 h respectivamente. De manera notable, el efluente de esta columna muestra que el número de picos de elución aumenta al mismo tiempo que disminuye la actividad de LDH, alcanzando la máxima diversidad de subunidades a las 96 h, tiempo en el cual también inicia el estado estacionario en el nivel de proteínas. Así mismo, es de notarse que no se observan diferencias significativas entre los

organismos expuestos a 192 y 240 h de anoxia, en relación a sus niveles de proteína, la actividad de LDH y los tipos de subunidades, las cuales son indistinguibles entre sí por su comportamiento electroforético.

En el presente estudio, el contenido de carbohidratos para *T. funebralis* osciló entre 3.13% y 25.5%. En el grupo G_C el contenido de carbohidratos fue similar al reportado para los prosobranquios *R. thomasiana* (2.6%) (Idakieva *et al*., 2004), *M. crenulata* (3.3%) (Idakieva *et al*., 2004; Kurokawa *et al*., 2002; Van Kuik *et al*., 1990) y *H. tuberculata* (4.5%) (Idakieva *et al*., 2004). En los grupos G_C y G_0, se determinó que el contenido cae dentro del intervalo de 2.0 a 9.0% reportado para las Hcs íntegras de los moluscos (Hall y Wood, 1976). Por otra parte, el nivel de carbohidratos en estos dos grupos fue similar, lo que indica que el periodo de aclimatación en el laboratorio no tuvo efecto sobre este parámetro. En cambio, para los organismos expuestos a 48 h de hipoxia, el contenido se elevó hasta 25.57%, siendo 7.7 veces más alto que en condiciones normóxicas. Considerando que el porcentaje de carbohidratos está cuantificado sobre la Hc* obtenida, el incremento está asociado con una disminución del contenido total de esta proteína en la muestra. Por lo anterior, la elevación a 25.57% indica modificaciones que podrían estar relacionadas con cambios estructurales, ya que como se observa en la tabla VI, este gran incremento con respecto al control G_0 coincide con la aparición de una proteína de bajo peso molecular (150 KDa) que no se identificó en ningún otro grupo. En los organismos expuestos durante 96 y 144 h, el contenido de carbohidratos disminuyó en comparación con el grupo G_{48}. Los

valores encontrados para estos dos grupos hipóxicos, G_{96} y G_{144}, son parecidos a los reportados para la Hc de *R. thomasiana* (8.9 %) y la isoforma RtH1 de *R. thomasiana* (12.8 %) (Idakieva *et al*., 1995), valores que corresponden a organismos en normoxia, por lo que no es posible la comparación de resultados. En los organismos expuestos durante 192 h el contenido aumentó hasta 20.88% y en el grupo G_{240} se observa una disminución que sólo pudo determinarse como valor traza. A pesar de la variación del nivel de carbohidratos mostrado a lo largo del experimento, el comportamiento general de este parámetro, después del drástico aumento en las primeras 48 h de hypoxia, presenta una tendencia general a la disminución, a diferencia del contenido de proteína total, que muestra una tendencia al aumento.

La presencia de carbohidratos en una proteína inmunogénica tiene una alta correlación con su capacidad para ocasionar una respuesta inmunológica (Gebauer *et al*., 1999). Sin embargo, este tipo de proteínas deben contener una organización específica para que este proceso ocurra. Para la hemocianina de *M. crenulata*, la molécula presenta epítopes que contienen un oligosacárido con una galactosa enlazada al nitrógeno de galactosamina mediante un enlace **β 1➔**3, así como fucosa, todo ello en arreglos estructurales considerados como productos de la glicosilación de la proteína (glicanos) y que, en conjunto con su secuencia de aminoácidos, generan epítopes altamente inmunogénicos para los mamíferos (Gielens *et al*., 2005). La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes en la célula y una de sus funciones es la regulación de las

características biofísicas de las proteínas (Shental-Bechor y Levy, 2008). Desde el punto de vista evolutivo, se ha postulado que la glicosilación es una manera efectiva de generar diversidad funcional en las proteínas, ya que los glicanos sirven como puntos de reconocimiento, son mediadores en la interacción con agentes patógenos, modulan respuestas inmunológicas y regulan el recambio de proteínas (Shental-Bechor y Levy, 2008). Con base en el contenido de carbohidratos en la Hc* de Tegula se realizaron las pruebas de inmunogencidad para probar la hipótesis de que existe semejanza entre la hemocianina de *M. crenulata* y la Hc* de *T. funebralis* en su capacidad para generar una respuesta inmunogénica, ya que ambas son proteínas que poseen carbohidratos en su estructura. La baja producción de fluido ascítico en los animales de experimentación inoculados con ambas a la concentración de 0.2 mg/mL, muestra que en ambos casos, esta concentración es insuficiente para inducir una respuesta inmunológica. Por otra parte, la muestra de *M. crenulata*, la de *T. funebralis* en condiciones aeróbicas y la de *T. funebralis* en condiciones hipóxicas, generaron ascitis al ser administradas en una concentración de 2.0 mg/mL, aunque en diferente grado. Si atendemos exclusivamente a la respuesta de producción de fluido ascítico, era de esperarse que la proteína con mayor contenido de carbohidratos produjera un mayor volumen de este fluido, lo cual fue observado en este experimento. Sin embargo, al considerar la concentración de proteínas en el fluido ascítico, se observa que no existe correspondencia entre producción de fluido y concentración de proteína. Como se ve en las Tablas IX y X, el contenido de anticuerpos de la fracción obtenida en la

primera fase de purificación de anticuerpos fue tan bajo que no se continuó su purificación. Esto sugiere que si bien la muestra de *T. funebralis* en condición hipóxica es una proteína con un alto contenido de carbohidratos, posee propiedades que no le confieren inmunogenicidad. Este resultado, aunado al hecho de que en los organismos del grupo G_{48} se identificó una proteína con un peso molecular de 150 kDa, indica que esta molécula posee diferencias estructurales con respecto a la proteína inoculada obtenida de los organismos del grupo G_C. Esta afirmación es consistente con el hecho de que tanto la Hc de *M. crenulata* como la Hc* de *T. funebralis* (aeróbica) muestran un comportamiento similar de inmunogenicidad. Por otra parte, la prueba de ELISA realizada a nivel cualitativo, mostró que los anticuerpos anti-Hc y los anticuerpos anti-Hc* presentan reacción positiva con sus antígenos, lo que indica que existe especificidad antígeno-anticuerpo (Tabla XI). En resumen, estos resultados indican que la Hc* de *T. funebralis* en condiciones aeróbicas tiene la propiedad de activar el sistema inmunológico de mamíferos y que la Hc de *T. funebralis* en condiciones hipóxicas carece de esta característica, lo que muestra que existen diferencias estructurales entre ellas.

Con un enfoque integrador, lo encontrado en este trabajo sugiere que cuando *T. funebralis* se encuentra en una transición aerobiosis-hipoxia, enfrenta la escasez de oxígeno mediante una estrategia de procesos coordinados que incluyen, además de la adaptación metabólica, la inducción de la síntesis de proteínas con rasgos estructurales similares a los

de la hemocianina, cuyas diferencias permitirían una mejor tolerancia del organismo a una condición anóxica prolongada.

IX. CONCLUSIONES

- El aumento en la concentración de succinato y la elevada actividad de LDH observado en *Tegula funebralis* sugieren que este organismo cambia a un metabolismo predominantemente anaeróbico a partir de las 192 h de hipoxia.
- En el prosobranquio *T. funebralis* la disminución inmediata de proteína no es un factor involucrado en la supresión metabólica global inducida por exposición a la hipoxia.
- *T. funebralis* utiliza la fermentación para aumentar la afinidad de la Hc por el O_2 mediante la producción del succinato y para satisfacer las necesidades energéticas durante la etapa hipóxica inicial.
- *T. funebralis* modifica la expresión proteica a lo largo de su exposición a la hipoxia.
- El contenido de carbohidratos en la Hc de *T. funebralis* (3.13%) en el campo y en condiciones normóxicas de laboratorio se encuentra dentro del intervalo de 2.0 a 9.0 % reportado para las Hcs íntegras de los moluscos.
- El contenido de carbohidratos en la Hc de *T. funebralis* después del drástico aumento en las primeras 48 h de hypoxia, presenta una tendencia general a la disminución, a diferencia del contenido de proteína total, que muestra una tendencia al aumento.
- El valor mínimo de proteína y el valor máximo de carbohidratos encontrados en la Hc de *T. funebralis* a 48 h de hipoxia, que

coinciden con la síntesis de una proteína de 150 KDa no identificada en ninguno de los otros grupos indican modificaciones estructurales en la molécula de hemocianina con respecto a la Hc de todos los demás grupos.

- La máxima diversidad de subunidades en la Hc de *T. funebralis* ocurre a las 96 h de hipoxia, lo que coincide con el estado estacionario en el nivel de proteínas y la baja actividad de la LDH.
- El contenido de carbohidratos en la Hc de *T. funebralis* en condición hipóxica no le confieren inmunogenicidad a la molécula.
- La Hc de *T. funebralis* en condiciones aeróbicas tiene la propiedad de activar el sistema inmunológico de mamíferos mientras que la Hc de *T. funebralis* en condiciones hipóxicas carece de esta característica, lo que muestra que existen diferencias estructurales entre ellas.

LITERATURA CITADA

- Abbas, A., A. Lichtman. 2004. Inmunología celular y molecular. 5a edición. Saunders. España. 560 p.
- Abbott, D.P. y E.C. Haderline. 1980. Mollusca: introduction to the phylum and to the class Gastropoda. In: Morris, R.H., Abbott, D.P., Haderlie, E.C (eds). Interdial invertebrates of California. Stanford University Press, Stanford, California. 227-307 p.
- AEGIS 1997. Keyhole-Limpet Hemocyanin used as control agent in immune response studies on AIDS patients. AIDS Education Global Information System. http://www.aegis.com/aegis/drugs/217.html•top
- Albrecht, U., H. Keller, W. Gebauer y J. Markl. 2001. Rhogocytes (pore cells) as the site of hemocyanin biosynthesis in the marine gastropod *Halliotis tuberculata*. Cell Tissue Res. 304: 455-462.
- Anestis, A., A. Azou, H.O. Pörtner y B. Michaelidis. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. Comp. Ev. Physiol. 293(2): R911-R921.
- Bacchiocchi, S. y G. Principato. 2000. Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis. J. Exp. Zool. 286: 107-113.
- Baden, S. P., M.H. Depledge y L. Hagerman. 1994. Glycogen depletion and altered copper and manganese handling in *Nephrops norvegicus*

following starvation and exposure to hypoxia. Mar. Ecol. Prog. Ser. 103: 65-72.

- Bagasra, O., S.R Hauptman, H.W. Lischner, M. Sachs y R.J. Pomerantz. 1992. Detection of human immunodeficiency virus type I provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. N. Engl. J. Med. 326: 1385-1391.
- Barros, R. M., M.A. Cruz-Höfling y M.S.A. Maatsura. 1993. Functional and dissociationn properties and structural organization of the hemocyanin of *Ampullaria canaliculata* (gastropoda, mollusca). Comp. Biochem. Physiol. 105B(3-4): 725-730.
- Bartel, A. H. Y D. H. Campbell. 1959. Some immunochemical differences between associated and dissociated hemocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 82(1): 232-234.
- Behrens, J.W., J.P. Elias, H.H. Taylor y R.E. Weber. 2002. The archaeogastropod mollusk *Haliotis iris*: tissue and blood metabolites and allosteric regulation of haemocyanin function. J. Exp. Biol. 205: 253-263.
- Boutilier, R. G. y J. St-Pierre. 2000. Surviving hypoxia without really dying. Comp. Biochem. Physiol. 126A: 481-490.
- Bridges, C. R. 1994. Bohr and Root effects in cephalopod haemocyanins—paradox or pressure in *Sepia officinalis*. En: , H. O. Pörtner, R. K. O'Dor y D. MacMillan (eds.). Physiology of Cephalopod Molluscs—Lifestyle and Performance Adaptations. Gordon and Breach, Basel. 121–130 p.

- Bridges, C.R. 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. J. Exp. Biol. 204: 1021-1032.
- Brouwer, M. y B. Serigstad. 1989. Allosteric control in *Limulus polyphemus* hemocyanin: functional relevance of interactions between hexamers. Biochem. 28(22): 8819-8827.
- Brouwer, M., M. Wolters, y E.F.J. van Bruggen. 1979. Proteolityc fragmentation of *Helix pomiata* a-hemocyanin: isolation of a functionally active chemically pure domain and evidence for subunit heterogeneity. Arch. Biochem. Biophys. 193: 487-495.
- Burggren, W., B. McMahon, y D. Powers. 1991. Respiratory functions of blood. En: C. Ladd-Prosser (ed.). Environmental and Metabolic Animal Physiology. Wiley-Liss. New York. 592 p.
- Burnett, L. E. y W.B. Stickle. 2001. Physiological responses to hypoxia. En: N.N. Rabalais y R.E. Turner (eds.). Coastal Hypoxia: consequences for living resources and ecosystems. American Geophysical Union, Washington D.C. 20-25 p.
- Carlton, J. T. 1992. Introduced marine and estuarine mollusk of North America: an end-of-the-20th-century perspective. J. Shellfish. Res. 11: 489-492.
- Chausson, F., C.R. Bridges, P.M. Sarradin, B.N. Green, R. Riso, J.C. Caprais y F.H. Lallier. 2001. Structural and functional properties of hemocyanin from *Cyanagraea praedator*, a deep-sea hydrothermal vent crab. Proteins. 45(4): 351-359.

- Chen, J. C., C. Chung-Tin, y S.Y. Cheng. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentration of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Prog. Ser. 110: 85-94.
- Chen, J. C. y S.Y. Cheng. 1993. Haemolimph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to ureotelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol: 106B(2): 293-296.
- Churchill, T. A. y K.B. Storey. 1989. Intermediary energy metabolism during dormancy and anoxia in the land snail *Otala lactea*. Physiol. Zool. 62: 1015-1030.
- Churchill, T. A. y K.B. Storey. 1996. Metabolic responses to freezing and anoxia by the periwinkle *Littorina littorea*. J. Therm. Biol. 21: 1-57.
- Darby, R. L., 1964. On growth and longevity in *Tegula funebralis*. Veliger 6S: 5-7.
- Decker, H., y Föll. 2000. Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus*. Comp. Biochem. Physiol. 127(B): 147-154.
- Decker, H., N. Hellman, E. Jaenickle, B. Lieb, U. Meissner, y J. Markl. 2007. Minireview: Recent progress in hemocyanin research. Int. Comp. Biol. 4: 631-644.

- DeFur, P. L., C.P. Mangum y J.E. Reese. 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. Biol. Bull. 178:46-54.
- Dolashka-Angelova, P., H. Schwarz, A. Dolashki, S. Stevanovic, M. Fecker, M. Saeed y W. Voelter. 2003. Biochem. Biophys. Acta. 1646: 77-85.
- Elliot, F. G., R. Witters, H. Borginon, y R. Lontie. 1972. The haemocyanin of *Pila leopoldvillensis*-III. The dissociation studied by ultracentrifugation. Comparison with the α-haemocyanin of *Helix pomiata*. Comp. Biochem. Physiol. 42B: 649-657.
- Emens, L. A., R.T. Reilli, y E.M. Jaffee. 2005. Breast cancer vaccines: maximizing cancer treatment by tapping into host immunity. Endocrine-Related Cancer. 12: 1-17.
- Engel, D. W., M. Brouwer, y S. McKenna. 1993. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser. 93: 235-244.
- Erker W, A. Schoen, T. y H. Decker. 2004. Fluorescence labels as sensors for oxygen binding of arthropod hemocyanins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 324: 893–900.
- Ferreira-Cravo, M., A. F. Welker y M. Hermes-Lima. 2010. The connection between oxidative stress and estivation in gastropods and anurans. . En: Navas, C. A. y J. E. Carvalho(ed.). Aestivation: Molecular and Physiological Aspects, Progress in Molecular and Subcellular Biology 49. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 48-61 p.

- Fish, J.D. y S. Fish. 1989. A student's guide to the seashore. Unwin Hyman Ltd., London 75 p.
- Gatsogiannis, C., A. Moeller, F. Depoix, U. Meissner y J. Markl. 2007. *Nautilus pompilius* hemocyanin: 9 A cryo-EM structure and molecular model reveal the subunit pathway and the interfaces between the 70 functional units. J. Mol. Biol. 374(2): 465-86.
- Geabauer, W., J.R. Harris, H. Hans, M. Suling, R. Hillenbrand, S. Sohngen, A. Wegener-Strake y J. Markl. 1999. Quaternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH 1 and KLH 2. Zool. 98:51-68.
- Gielens, C., L. Declercq y G. Préaux. 1995. Limited proteolysis of the haemocyanin of the gastropod *Pila leopoldvillensis*. Isolation and characterization of the fragments. Comp. Biochem. Physiol. 110B: 565-575.
- Gielens, C., K. Idakieva, V. Van den Bergh, N. I. Siddiqui, K. Parvanova y F. Compernolle. Biochem. Biophys. Res. Comm. 331: 562-570.
- Giokas, S., P. Pafilis, y E. Valakos. 2005. Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (pulmonata: clausiliidae). J. Mollus. Stud. 71(1): 15-23.
- Greenway, S. y K. Storey. 2001. Effects of seasonal change and prolonged anoxia on metabolic enzymes of *Littorina littorea*. Can. J. Zool. 79: 907-915.
- Gullick, W. J., D.G. Herries, y E.J. Wood. 1979. Characterization of domains obtained from a mollusk haemocyanin by limited proteolytic digestion. Biochem. J. 179: 593-602.

- Hagerman, L. y B. Vismann. 1993. Anaerobic metabolism hypoxia and hidrogen sulfide in the brackish water isopod *Saduria entomon* (L.). Ophelia 38(1): 1-11.
- Hall, R. L., J.S. Pearson y E.J. Wood. 1975. The haemocyanin of *Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda: Pulmonata). Comp. Biochem. Physiol. 52(2): 211-218.
- Hall, R. L. y E.J. Wood. (1976). The carbohydrate content of gastropod haemocyanins. Biochem. Soc. Trans. 4(2): 307-309.
- Harlow, E. y D. Lane. 1988. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 726 p.
- Harris, J. R., W. Gebauer y J. Markl. 1993. Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*): A parallel subunit model. J. Struct. Biol., 111: 96-104.
- Harris, J. R., W. Gebauer, S.M. Söhngen, M.V. Nermut y J. Markl. 1997. Keyhole limpet hemocyanin (KLH), II: Characteristic reassociation properties of purified KLH1 and KLH2. Micron. 28:43-56.
- Harris, J. R. y J. Markl. 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH):a biomedical review. Micron. 30:597-623.
- Hartmann, H. 2001. The Allosteric Effector L-Lactate Induces a Conformational Change of 2x6-meric Lobster Hemocyanin in the Oxy State as Revealed by Small Angle X-ray Scattering. J. Biol. Chem. 276(23): 19954-19958.

- Hellberg, M. E. 1998. Sympatric sea shells along the sea's shore: the geography of speciation in the marine gastropod *Tegula*. Evolution. 52: 1311-1324.
- Helling F, A. Shang, M. Calves, S. Zhang, S. Ren, R.K. Yu, H.F. Oettgen y P.O. Livingston. 1994. GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. Cancer Res. 54: 197–203.
- Herskovits, T. T., S.E. Carbery y R.C. San George. 1983. Subunit structure and dissociation of *Homarus americanus* hemocyanin. Effects of salts and ureas on the acetylated and unmodified hexamers. Biochem. 22: 4107-4112.
- Herskovits, T. T., L.J. Mazzella y G.B. Villanueva. 1985. Light-scattering investigation of the Dissociation Behavior of *Lunatia heros* and *Littorina littorea* Hemocyanins. Biochem. 24: 3862-3870.
- Herskovits, T. T. y G.B. Villanueva. 1986. Light-scattering investigation of the subunit structure and dissociation of octopoda hemocyanins. Biochem. 25: 931-939.
- Herskovits, T. T. y M.G. Hamilton. 1987. Hemocyanin of the chiton, *Stenoplax conspicua* (Dall). Comp. Biochem. Physiol, 88B(1): 127-132.
- Herskovits, T.T. 1988. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. Comp. Biochem. Physiol. 91B: 597–611.
- Herskovits, T. T., P.A. Blake, J.A. Gonzalez, M.G. Hamilton y J.S. Wall. 1989. Subunit structure and higher order assembly of the hemocyanins of the melongenidae family: *Melongena corona* (Gmelin), *Busycon*

canaliculatum (Limné), *B. carica* (Gmelin), *B. contrarium* (Conrad), and *B. spiratum* (Lamarck). Comp. Biochem. Physiol. 92B(2): 415-421.

- Herskovits, T. T., R.M. Otero, y M. G. Hamilton. 1990. The hemocyanin of the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Linné). Comp. Biochem. Physiol. 97B(4): 623-629.
- Herskovits, T. T., R.R. Rodriguez, y M.G. Hamilton. 1990. Subunit structure and higher order assembly of the hemocyanins of five members of the Naticidae family of marine gastropods: *Calinaticina oldroydii* (Dall), *Euspira heros* (Say), *Neverita duplicata* (Say), *Polinices draconis* (Dall), and *Polinices lewisii* (Gould). Comp. Biochem. Physiol. 97B(4): 631-636.
- Herskovits, T. T, J. Zou y M.G. Hamilton. 1992. Physical studies of the hemocyanin of the marine gastropod, *Kelletia kelleti* (Forbes). Comp. Biochem. Physiol. 103B(2): 447-53.
- Herskovits, T. T., M.D. Edwards, y M.G. Hamilton. 1995. The hemocyanin of the Californian black sea hare, *Aplysia vaccaria* Winkler. Comp. Biochem. Physiol. 110B (3): 515-521.
- Hirota, S., N. Tanaka, S. Nagao, I. Micetic, P.D. Muro, M. Beltramini, L. Bubacco y J. Peisach. 2010. Structural basis of the lactate-dependent allosteric regulation of oxygen binding in arthropod hemocyanin. J. Biol. Chem. 285(25): 19338-19345.
- Hochachka, P. W y G.N. Somero. 1984. Biochemical Adaptation. Princeton University Press, New Jersey. 535 p.

- Hochachka, P. W y G.N. Somero. 2002. Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York. 466 p.
- Holman, J. D. y S.C. Hand. 2009. Metabolic depression is delayed and mitochondrial impairment averted during prolonged anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 376(2): 85-93.
- Horn, E. C. y M. Kerr. 1969. The hemolymph proteins of the blue crab *Callinectes sapidus*. I. Hemocyanins and certain other major protein constituents. Comp. Biochem. Physiol. 29: 493-508.
- Idakieva, K., S. Severov, I. Svendsen, N. Genov, S. Stoeva, M. Beltramini, G. Tognon, P. Di Muro y B. Salvato. 1993. Structural properties of *Rapana thomasiana* Grosse hemocyanin: Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of two different dissociation products. Comp. Biochem. Physiol. 106B(1): 53-59.
- Idakieva, K., S. Stoeva, W. Voelter y N. Genov. 1995. Functional unit of the *Rapana thomasiana* (Grosse) (marine snail, gastropod) hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol. 112B(4): 599-606.
- Idakieva, K., H. Schwarz, N. Genov, W. Voelter, y S. Stoeva. 2002. *Rapana thomasiana* hemocyanin (RtH): dissociation and reassociation behavior of two isoforms, RtH1 and RtH2. Micron. 33(1): 7-14.
- Idakieva, K., S. Stoeva, W. Voleter, y C. Gielens. 2004. Glycosylation of *Rapana thomasiana* hemocyanin. Comparison with other prosobranch (gastropod) hemocyanins. Comp. Biochem. Physiol. 138(B): 221-228.

- Jeffrey, S. B. 1995. Hemocyanin synthesis by the pore cells of the marine prosobranch gastropod *Littorina littorea*. Thesis, California State University, Long Beach 111 p.
- Johnson, B. A., C. Bonaventura y J. Bonaventura. 1984. Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-lactate. Biochem. 23: 872-878.
- Jokumsen, A., R.M.G. Wells, D. Ellerton y R.E. Weber. 1981. Hemocyanin of the giant Antartic isopod, *Glyptonotus antarticus*. Structure and effects of temperature and pH on its oxigen affinity. Comp. Biochem. Physiol. 78A: 91-95.
- Jurincic-Winkler, C., K.A. Metz, J. Benth, J. Sippel y K. F. Klippel. 1995. Effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) and Bacillus calmette-guérin (BCG) instillation on carcinoma in situ of the urinary bladder. Anticancer Research. 15: 2771-2776.
- Kapper, M. A. y W.B. Stickle. 1987. Metabolic responses of the estuarine gastropod *Thais haemastoma* to hypoxia. Physiol. Zool. 69: 159-173.
- Keller, H., Lieb, B. Altenhein, D. Gebauer, S. Richter, S. Stricker y J. Markl. 1999. Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1). Organization of the approximately 400 kda subunit and amino acid sequence of its functional units f, g and h. Eur. J. Biochem. 264: 27-38.
- Kirkwood, J.M., J. Ibrahim, D.H. Lawson, M.B. Atkins, S.S. Agarwala y K. Collins. 2001. High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: Results

of the multicenter Eastern Cooperative Oncology Group phase II trial E2696. J. Clin. Onc. 19: 1430-1436.

- Koetzner, L., S. Deng, T.L. Sumpter, M. Weissltz, R.T. Abner, D.W. Landry y J.H. Woods. 2001. Titer-dependent antagonism of cocaine following active immunization in Rhesus monkeys. J. Pharm. Exp. Ther. 296(3): 789-796.
- Krassimira, I., S. Stoeva, W. Voelter y N. Genov. 1995. Functional unit of the *Rapana Thomasiana* (Grosse) (marine snail, gastropod) hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol., 112B(4):599-606.
- Kurokawa, T., M. Wuhrer, G. Lochnit, H. Geyer, J. Markl y R. Geyer. 2002. Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(beta1-6)Man-motifs. Eur. J. Biochem. 269(22): 5459-5473.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature. 227: 680-685.
- Lamm D. L, J.I. DeHaven, D.R. Riggs, A. Delgra y R. Burrell. 1993. Immunotherapy of Murine Transitional Cell Carcinoma with Immucothel, a Modification of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Urol Res. *21: 21*-33.
- Lamy, J., V. You, J.C. Taveau, N. Boisset y J.N. Lamy. 1998. Intramolecular localization of the functional units of *Sepia officinalis* hemocyanin by immunoelectron microscopy. J. Mol. Biol. 284(4):1051-1074.
- Lang, W. H. Y H.K.E. van. 1991. Cloning and Sequencing of *Octopus dofleini* Hemocyanin cDNA: Derived Sequences of Functional Units Ode

and Odf. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88(1): 244-248.

- Larade, K. y K.B. Storey. 2002. Characterization of a novel gene upregulated during anoxia exposure in the marine snail, *Littorina littorea*. Gene. 23: 145 -154.
- Larade, K. y K.B. Storey. 2004. Anoxia-induced transcriptional upregulation of sarp-19: cloning and characterization of a novel EF-hand containing gene expressed in hepatopancreas of *Littorina littorea*. Biochem. Cell Biol. 82: 285-293.
- Lavelin I. Y B. Geiger. 2005. Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with focal adhesions and the actin cytoskeleton. J. Biol. Chem. 280 (8): 7178–7185.
- Lawn, S. D., S.T. Butera y T.M. Folks. 2001. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. Clin. Microbiol. Rev. 14, 753-777.
- Livingston, P. O. 1995. Approaches to Augmenting the Immunogenicity of Melanoma Gangliosides: From Whole Melanoma Cells to Ganglioside-KLH Conjugate Vaccines. Imm. Rev. 145-147.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lubchenco, J. 1978. Plant species diversity in a marine intertidal community: importance of herbivore food preference and algal competitive ability. Am. Nat. 112: 23-39.

- Lubchenco, J. 1980. Algal zonation in the New England rocky intertidal community: an experimental analysis. Ecol. 61: 333-344.
- Lubchenco, J. 1983. *Littorina* and *Fucus*: effects of herbivores, substratum heterogeneity, and plant escapes during succession. Ecol. 64: 1116-1123.
- McFadden, D.W., D. Riggs, B. Jackson y L. Davis, L. 2003. In vitro effects of Keyhole Limpet Hemocyanin in Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. Am. J. Surgery. 186: 552-555.
- Mangum, C. P. 1983. Adaptability and inadaptability among HcO_2 transport systems: an apparent paradox. En: Wood, E.J (ed.). Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins. Life Chem. Reports (Suppl. 1). Chur (Switzerland): Harwood Academic Publishers. 333–352 p.
- Mangum, C. 1997. Salt sensitivity of the hemocyanin of euryhaline and stenohaline squids. Comp. Biochem. Physiol. 99A: 159-161.
- Markl, J. 1986. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. Biol. Bull. 171: 90-115.
- Markl, J. y H. Decker. 1992. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. En: Mangum, C.P. (Ed.). Advances in Comparative and Environmental Physiology, Blood and Tissue Oxygen Carriers, vol. 13. Springer, Heidelberg, 325–376 p.
- Marshall, D. J, C.D. McQuaid. 1993. Differential physiological and behavioural responses of the intertidal mussels, *Choromytilus meridionalis* (Kr.) and *Perna perna* L., to exposure to hypoxia and air: a basis for spatial separation. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 171: 225–237.

- Michaelidis, B., E. Rofalikou y M.K. Grieshaber. 1999. The effects of hypercapnia on force and rate of contraction and intracellular pH of perfused ventricles from the land snail *Helix lucorum* (L). J. Exp. Biol. 202: 21-27.
- Menze, M. A., N. Hellmann, H. Decker y M.K. Grieshaber. 2005. Allosteric models for multimeric proteins: oxygen-linked effector binding in hemocyanin. Biochem. 44: 10328-10338.
- Moran, A. L. 1997 Spawning and larval development of the black turban snail *Tegula funebralis* (Prosobranchia: Trochidae). Mar. Biol. 128: 107-114.
- Morris S y Bridges CR. 1986. Novel non-lactate cofactors of haemocyanin oxygen affinity in crustaceans. En: Linzen, B. (ed.). Invertebrate oxygen carriers. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 353–7 p.
- Morris, S. y B.R. McMahon, B. R. 1989. Neurohumor effects on crustacean haemocyanin oxygen affinity. J. Exp. Zool. 249 (3): 334-337.
- Mouche, F., N. Boisset, J. Lamy, F. Zal y J.N. Lamy. 1999. Structural comparison of cephalopod hemocyanins: phylogenetic significance. J. Struct. Biol. 127:417-437.
- Nelson, D. L. y M.M. Cox. 2002. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers, 3ra edición. New York. 1152 p.
- Nies, A., B. Zeis, C.R. Bridges y M.K. Grieshaber. 1992. Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. II. Characterization of specific effector binding sites. J. Exp. Biol. 168: 111-124.

- Oakes, F. R., S. McTee, J. McMullen, C.S. Culver y D.E. Morse. 2004. The effect of captivity and diet on KLH isoform ratios in *Megathura crenulata*. Comp. Biochem. Physiol. 138(A): 169-173.
- Orlova, E. V., P. Dube, J.R. Harris, E. Beckman, F. Zemlin, J. Markl y M. Van Heel. 1997. Structure of keyhole limpet hemocyanin type I (KLH 1) at 15 A resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. J. Mol. Biol. 271: 417-437.
- Ortmann, C. y M.K. Grieshaber. 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. J. Exp. Biol. 206: 4167-4178.
- Paccagnella, M., P. Di Muro, A. Sabatucci, L. Bubacco, M. Beltramini y B. Salvato. 2000. Zinc induced depolymerization of molluscan hemocyanin. Proceeding at the XIIth International Conference of Invertebrate Dioxygen Binding Proteins Art. 19, 13. Roscoff, France.
- Pakay, J. L., P.C. Withers, A.A. Hobbs y M. Guppy. 2002. In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix aspersa* during estivation. Am. J. Physiol.-Reg. I. 283: R197-R204.
- Petraitis, P. S. 2002. Effects of intraespecific competition and scravening on growth of the periwinkle *Littorina littorea*. Mar. ecol. Prog. Ser. 236: 179-187.
- Petrovich, D., S. Morris y B. McMahon. 1990. Oxygen binding by the hemocyanin of *Busycon canaliculatum*. Comp. Biochem. Physiol. 97B(4): 745-750.
- Pierce Chemical Company 2004. Catalog of products. Rockford, Ill.

- Pinz, I. y H.O. Pörtner. 2002. Metabolic cost induced by lactate in the toad *Bufo marinus*: new mechanism behind oxygen debt?. J. App.Physiol. 94(3): 1177-1185.
- Prosser, C. L. (ed.) 1991. Comparative Animal Physiology, Environmental and Metabolic Animal Physiology (Comparative Animal Physiology, Set) (v. 1). Wiley-Liss. 4a edición. 592 p.
- Ramnanan, C., D.C. McMullen, A.G. Groom y K.B. Storey. 2010. The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. Mol. Cell. Biochem. 335: 91-105.
- Sabatucci, A., P. Vachette, M. Beltramini, B. Salvato y E. Dainese, E. 2005. Comparative structural análisis of low molecular mass fragments of *Rapana venosa* hemocyanin obtained using two different procedures. J. Struct. Biol. 149: 127-137.
- Senozan, N. M. y M. Briggs, M. 1989. Hemocyanin levels in the giant keyhole limpet *Megathura crenulata* from the coast of California. Comp. Biochem. Physiol. 94A(2): 195-199.
- Shental-Bechor, D. y Y. Levy. 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 8256–8261.
- Snyeder, G. K. y C.P. Mangum. 1982. The relationship between the size and shape of an extracellular oxygen carrier and the capacity for oxygen transport. En: Bonaventura, J., J. Bonaventura, C. Tesh y R. A. Liss (eds.). Physiology and Biology of Horseshoe Crabs. Inc., New York. 245 p.

- Slusarczyk, M. 2004. Environmental plasticity of fish avoidance diapause response in *Daphnia magna*. J. Limnol. 63(1): 70-74.
- Sokolova, I. M., C. Bock y H.O. Portner. 2000. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp. I: Anaerobic metabolism and energetics. J. Comp. Physiol. 170 (B): 91-103.
- Sokolova, I. M. y H.O. Portner. 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *Littorina saxatilis*. Mar. Ecol. Progress. 224, 171-178.
- Storey, K. B. y J.M. Storey. 2004. Functional metabolism: Regulation and Adaptation. Wiley-Liss, New York. 415-442 p.
- Storey, K. B. y J.M. Storey. 2004. Biochemical adaptation to extreme environments. Integrative Physiology in the Proteomics and Post-genomics Age. Humana Press, New Jersey. 169-200 pp.
- Swerdlow, R. D., T.L. Ratcliff, M. Regina, J.K. Ritchey y R.F. Ebert. 1994. Immunotherapy with keyhole limpet hemocyanine: Efficacy and safety in the MB.49 intravesical murine bladder tumor model. J. Urology. 151: 1718-1722.
- Swerdlow, R. D. , R.F. Ebert, P. Lee, C. Bonaventura y K. Miller. 1996. Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers. Comp. Biochem. Physiol.13B(3): 537-548.
- Tchorbanov A., K. Idakieva, N. Mihaylova y L. Doumanova. 2008. Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin. Int Immunopharmacol. 8: 1033-1038.

- Terwilliger, N. B., R.C. Terwilliger, E. Meyhöfer y M.P. Morse. 1988. Bivalve hemocyanins- A comparison with other molluscan hemocyanins. Comp. Biochem. Physiol. 89B(1): 189-195.
- Terwilliger, N. B. 1998. Functional Adaptations of oxygen-transport proteins. J. Exp. Biol. 201: 1085-1098.
- Tomanek, L. 2005. Two-dimensional gel analysis of the heat-shock response in marine snails (genus *Tegula*): interspecific variation in protein expression and acclimation ability. J. Exp. Biol. 208: 3133-3143.
- Truchot, J. P. 1980. Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. J. Exp. Zool. 214(2): 205-208.
- Truchot, J. P. 1992. Acid-base changes on transfer between sea- and freshwater in the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. Resp. Physiol. 87(3): 419-427.
- Vanderlinde, R. E. 1985. Measurement of total lactate dehydrogenase activity. Ann. Clin. Lab. Sci. 15: 13–31.
- Van Bruggen, E. F. J. y H. Fernandez Moran. 1966. Re-association of hemocyanins from subunit mixtures. J. Mol. Biol. 16: 208-211.
- Van Bruggen, E. F. J., E.H. Wiebenga y M. Gruber. 1962. Structure and properties of hemocyanin. I. Electron micrographs of hemocyanin and apohemocyanin from *Helix pomiata* at different pH values. J. Mol. Biol. 4: 1-7.
- Van Holde K. E. y M. Brenowitz. 1981. Subunit structure and physical properties of the hemocyanin of the giant isopod, *Bathynomus giganteus*. Biochem. 20: 5232-5239.

- Van Holde, K. E. y K. Miller. 1995. Hemocyanins, in: Adv. in Protein Chemistry. 47: 1-81.
- Van Holde, K. E., K.I. Miller y H. Decker. 2001. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. J. Biol. Chem. 276(19): 15563-15566.
- Van Kuik J. A, J.P. Kamerling y J.F.G. 1990. Carbohydrate analysis of hemocyanins. En: Préaux, G. Y R. Lontie (eds.). Invertebrate dioxygen carriers. Leuven, Belgium: Leuven University Press. 157-163 p.
- Weeks, J. M., F.B. Jensen y M.H. Depledge. 1993. Acid-base status, haemolymph composition and tissue copper accumulation in the shore crab *Carcinus maenas* exposed to combined copper and salinity stress. Mar. Ecol. Prog. Ser. 97: 91-98.
- Will, R. W. 1980. Fisiología animal comparada: un enfoque ambiental. Ed. Reverte. Barcelona, España. 883 pp.
- Willmer, P., G. Stone y I. Johnston. 2004. Environmental Physiology of Animals. Wiley-Blackwell, 2da edición. United Kingdom. 768 p.
- Wieser, W. 1981. Responses of *Helix pomiata* to anoxia: changes of solute activity and other properties of the haemolymph. J. Comp. Physiol. 141B: 503-509.
- Wishahi, M. M., I.M.H. Ismail, H. Ruebben y T. Otto, T. 1995. Keyhole-Limpet Hemocyanin Immunotherapy in Bilharzial Bladder: New Treatment Modality? Phase II Trial: Superficial Bladder Cancer. J. Urology.153(3): 926-934.
- Wood, E. J. 1980. The oxygen and transport proteins of invertebrate. Essays Biochem. 16: 1-48.

- Wood, E. J. 1975. Immunochemical properties of the haemocyanins from *Buccinum undatum* (L.) and *Neptunea antique* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 52B: 219-225.
- Yaroslavtseva, L. M. y E.P. Sergeeva. 2000. Salinity Adaptations of the gastropods *Littorina mandshurica* and *L. squalida* from a Marine bay and an Estuary. Russ. J. Mar. Biol., 27(4): 245-250.
- Zambrano-Villa, S. A. 2005. Inmunología básica y clínica. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A de C. V. Mexico D.F. 125 p.
- Zeis B, A. Nies, C. Bridges y M. Grieshaber. 1992. Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Specific and additive effects on haemocyanin oxygen affinity. J. Exp. Biol. 168: 93–110.