



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
DE UNA PROTEÍNA INVOLUCRADA EN EL PROCESO
DE BIOMINERALIZACIÓN EN *Pteria sterna*

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Raquel Gabriela Arroyo Loranca

La Paz, Baja California Sur, julio de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 2 del Mes de julio del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Purificación y caracterización funcional de una proteína involucrada en el proceso de biomineralización en *Pteria sterna*"

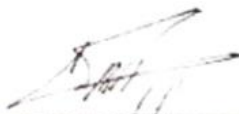
Presentada por el alumno:

Raquel Gabriela Arroyo Loranca

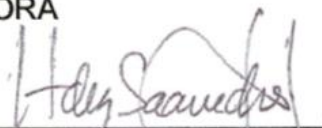
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Director/Co-Director de Tesis



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-Director/Co-Tutor



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Tutor



Dr. Enrique Rudiño Piñera
Co-Tutor



PhD. Caroline Montagnani
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
CONACyT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Luis Hernández Adame
CONACyT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM.
Co-Tutor

PhD. Caroline Montagnani
Université de Montpellier
Co-Tutora

Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Luis Hernández Adame
Dr. Enrique Rudiño Piñera
PhD. Caroline Montagnani

Jurado de Examen

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Luis Hernández Adame
Dr. Enrique Rudiño Piñera
PhD. Caroline Montagnani

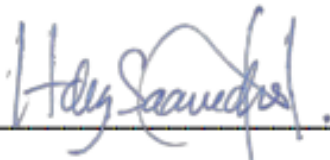
Suplentes

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola
Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Resumen

El carbonato de calcio se encuentra presente en diversos organismos biológicos como sostén de tejidos suaves, protección contra depredadores o incluso en estructuras para la reproducción. La concha de bivalvos está compuesta principalmente por dos polimorfos de carbonato de calcio: calcita y aragonita (vaterita y carbonato de calcio amorfo son menos comunes), así como de una matriz orgánica que se divide en soluble e insoluble cuando la concha es tratada con ácidos débiles como EDTA o AAG y por otras biomoléculas (polisacáridos, β -quitina). La selección del polimorfo de carbonato de calcio (calcita o aragonita), para la biomineralización de la concha, depende no sólo de la presencia de las proteínas de la matriz y su cantidad, sino del tipo de sal y la concentración de ésta, que son los factores reguladores de la deposición de carbonato de calcio. Sin embargo, el papel que desempeñan las proteínas de la matriz en la formación del nácar y la selección de polimorfo de CaCO_3 , no han sido completamente comprendidas. El objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar la proteína más abundante de la concha del bivalvo *Pteria sterna*, una especie de importancia económica que puede ser utilizada para el desarrollo de nuevas tecnologías biomiméticas, así como describir el rol que dicha proteína desempeña en la cristalización de CaCO_3 *in vitro* para tener un mejor entendimiento del proceso de biomineralización. Se encontró una proteína en la fracción insoluble en ácido-acético con un peso aproximado de ~19 kDa, que fue nombrada Ps19. La caracterización bioquímica de Ps19 mostró que es una glicoproteína con capacidad de unirse a quitina y probablemente a iones de Ca^{2+} . La secuencia parcial de aminoácidos no mostró homología con otras proteínas de la matriz de la concha previamente descritas, sin embargo, mostró una baja homología con un dominio de unión a calcio. Además, es una proteína capaz de inducir la nucleación de placas de aragonita *in vitro* parecidas a las encontradas en el nácar. Sin embargo, no se encontró evidencia de que la concentración de Ps19 o de las sales jueguen un papel en la regulación de la síntesis de cristales de carbonato de calcio. Los resultados sugieren que Ps19 es una proteína importante para la biomineralización de la concha de *P. sterna* que además de estar involucrada en la formación de placas de aragonita (nácar), también lo está en la formación de la capa prismática al formar prismas de aragonita.

Palabras clave: *Pteria sterna*, concha, carbonato de calcio, cristalización, Ps19.



Vo. Bo. Codirectora
Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

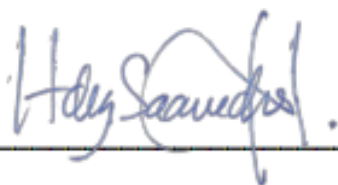


Vo. Bo. Codirectora
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Summary

Calcium carbonate is present in many biological structures such as bivalves shells, which are composed principally by two CaCO_3 polymorphs: calcite and aragonite (vaterite and amorphous calcium carbonate (ACC) are less common) and an organic matrix that consists of acetic acid- or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-soluble and insoluble proteins and other biomolecules (polysaccharides, β -chitin). Polymorph selection (calcite or aragonite) for shell biomineralization is influenced by salt composition, its concentration, the presence of shell matrix proteins (SMPs) which regulates calcium carbonate deposition, among other factors. However, the shell matrix proteins involved in nacre formation and their role in calcium carbonate polymorph selection are not fully known. Thus, the aim of this study was to identify and characterize the most abundant protein from the shell of *Pteria sterna*, as well as its role in calcium carbonate crystallization *in vitro* to have a better understanding of the biomineralization process. A protein of ~19 kDa was found in the acetic acid-insoluble fraction from the shell named in this study as Ps19 (according to its calculated molecular weight). Ps19 biochemical characterization showed that it is a glycoprotein that exhibits calcium- and chitin-binding capabilities. Ps19 partial peptide sequence did not show homology with other known shell matrix proteins, but it displayed low homology with a calcium-binding domain. Additionally, it is capable of inducing aragonite plate crystallization *in vitro*. However, no relation was identified between protein concentration and saline solution saturation that reflected a positive or negative regulation of calcium carbonate crystallization. The results suggest that Ps19 is an important protein for shell biomineralization, that may not only be involved in nacre formation, but also in the prismatic layer by forming aragonite prisms.

Key words: *Pteria sterna*, shell protein, calcium carbonate, crystallization, Ps19.



Vo. Bo. Codirectora
Dra. Norma Y. Hernández Saavedra



Vo. Bo. Codirectora
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Dedicatoria

A mis padres por siempre apoyarme y acompañarme en cada paso de mi vida, los amo y admiro muchísimo.

A mis hermanas: Pamita, Sof y Tu misma por siempre querer lo mejor para mí y apoyarme incondicionalmente.

A mis sobris queridos (Joaquín, Nicolás, Darío, Matías, Emilio, Laura y Aurora) por todo el amor y risas que me han dado.

A Hikari (de quien soy compañera de aventuras), por siempre permanecer a mi lado.

“¡Piu Avanti!

No te des por vencido ni aún vencido”

Almafuerte

Agradecimientos

A CONACyT por el apoyo económico recibido para realizar mis estudios (CVU 358437).

A CIBNOR por brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de mi proyecto y formación académica.

A Posgrado por todo el apoyo brindado y ser una cara amiga.

Al Laboratorio de Genética Molecular por recibirme con los brazos abiertos y brindarme la oportunidad de continuar mis estudios.

Al comité tutorial de la tesis: Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, Dr. Luis Hernández Adame, Dr. Enrique Rudiño y PhD. Caroline Montagnani por sus aportaciones y apoyo otorgado durante el desarrollo de este trabajo.

A la M. C. Delia Irene Rojas Posadas por todo el entrenamiento técnico, por siempre darme otra perspectiva de las cosas, estar al pendiente y compartir tu conocimiento conmigo. Pero, sobre todo, gracias por la paciencia y el apoyo que me diste durante esta travesía.

A la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, por extenderme la mano sin titubear, gracias infinitas por toda su paciencia, comprensión y no perder la esperanza en mí (espero). Siempre la recordaré con mucho cariño y admiración.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, Cris: no tengo palabras suficientes para agradecerte TODO lo que has hecho por mí. Eres una gran investigadora, amiga y persona, te admiro y respeto. Simplemente, esto no sería posible sin ti.

Al técnico Ariel Arturo Cruz Villacorta, gracias por ayudarme con las imágenes, por los consejos, las pláticas y los momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio (Cami, Jorge, Paulo, Pauli, Brianna, Rosa, Pris, Mich, Lilia...) por todos los buenos momentos compartidos, en especial a Pris y Mich, por las frustraciones, risas, consejos, el apoyo y amistad incondicional.

Al Dr. Juan Antonio de Anda, por tus consejos tanto académicos como de vida, gracias por tu amistad.

A mis amigos del CIB (Wendy, Oswa, Cristi, Vane, Pris, Mich, Karen, Bere, Beto...) por sus grandes ideas, sus consejos académicos y no académicos, por sus bromas y por su amistad.

A Tann, Mariana, Esther, Karla por nunca “dejarme abajo” a pesar de la distancia y sus múltiples ocupaciones. ¡Las amo!

A Fer, mi compañero de aventuras, gracias por ser un gran pilar en mi vida, por apoyarme, comprenderme, tenerme paciencia y por enseñarme el significado de “a nadie se le deja abajo”.

A los vigilantes del CIB, en especial al turno de la tarde (Fabián, Rafael, Raúl, Luis), por su buen humor y hacer los momentos de espera más llevaderos.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biomineralización.....	1
1.2 Nácar	5
1.3 Matriz extracelular	7
1.4 Proteínas de matriz.....	8
1.5 SMPs insolubles y sus dominios.....	10
2. ANTECEDENTES	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Extracción de proteínas de la matriz.....	19
6.2 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida	19
6.3 Purificación de Ps19	20
6.4 Cuantificación de proteína	21
6.5 Análisis de espectrofotometría de masas	21
6.6 Caracterización de proteínas por tinciones.....	22
6.6.1 Azul de Coomassie	22
6.6.2 Nitrato de plata.....	22
6.6.3 Ácido periódico-Schiff	22

6.6.4 Stains-All.....	23
6.7 Ensayo de unión a quitina.....	23
6.8 Estructura del nácar de la concha	24
6.9 Cristalización <i>in vitro</i> de CaCO ₃ en presencia de Ps19 purificada	24
6.9.1 Efecto de las sales sobre la cristalización <i>in vitro</i> de CaCO ₃	24
6.9.2 Efecto de la concentración de proteína y de la concentración del cofactor divalente sobre la capacidad de cristalización de CaCO ₃ de Ps19.....	25
6.10 Raman	26
7. RESULTADOS	27
7.1 Extracción de proteínas de la matriz de la concha de <i>P. sterna</i>	27
7.2 Caracterización bioquímica de proteínas de la matriz	28
7.3 Purificación de la proteína de <i>P. sterna</i> más abundante en la concha	29
7.4 Secuenciación proteica de Ps19.....	32
7.5 Características de proteína Ps19.....	34
7.6 Ensayo de unión a quitina.....	35
7.7 Estructura microscópica del nácar.....	35
7.8 Ensayos de cristalización <i>in vitro</i> de CaCO ₃ en presencia de Ps19	36
7.8.1 Efecto de las sales sobre la cristalización <i>in vitro</i> de CaCO ₃	36
7.8.2 Efecto de la concentración de proteína y de la concentración del cofactor divalente sobre la capacidad de cristalización de CaCO ₃ de Ps19.....	37
7.9 Análisis de Raman.....	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	48
10. LITERATURA CITADA.....	49
11. ANEXOS	62
11.1 A. Ps19, a novel chitin binding protein from <i>Pteria sterna</i> capable to mineralize aragonite plates <i>in vitro</i>	62
11.2 B. Calcium carbonate polymorph modulation by ion and protein concentrations of Ps19, a shell protein from <i>Pteria sterna</i>	77

Lista de figuras

- Figura 1.** Estructuras que pueden formar los polimorfos de carbonato de calcio en la concha de moluscos. a) columnar (nácar), b) laminar (nácar), c) foliada (calcita), d) prismática (aragonita o calcita), e) lamelar cruzada (aragonita), f) lamelar cruzada compleja (aragonita y calcita). Modificada de Vincent (2002). 2
- Figura 2.** Esquemas de la concha y tejidos de un molusco involucrados en la biomineralización. A) Esquemización de la concha con sus partes, remarcando el espacio extrapalial y la superficie de crecimiento de los cristales. B) Esquema de una sección transversal de la concha de un molusco. Los triángulos representan las moléculas orgánicas secretadas por el manto. CN: capa nacarada; CP: capa prismática; P: periostraco; EEP: espacio extrapalial; EE: epitelio externo; PE: pliegue externo; SP: surco periostracal; PM: pliegue medio; PI: pliegue interno; V: vesículas; EI: epitelio interno; NP: nervio palial; MP: músculo palial; VE: vesículas tipo exosomal. Modificado de Kokot et al., (2016)..... 4
- Figura 3.** Modelo de nucleación y crecimiento del nácar en bivalvos (a) y gasterópodos (b). Las flechas indican los puentes minerales entre las placas de aragonita, los sitios de nucleación se muestran en blanco y las líneas negras gruesas representan la matriz interlamelar. Adaptado de Nudelman, 2015..... 6
- Figura 4.** Representación esquemática de la estructura de una proteína hipotética de la matriz ácida. Péptido señal, un dominio de unión que puede ser a otra proteína o a calcio, región ácida (como Leu, Asp y Ser) y con dominio repetitivo de Asn-Gly (GN). 9
- Figura 5.** Extracción de proteínas de la concha con AAG 10% a 4 °C de *P. sterna*. 27
- Figura 6** Perfil electroforético de proteínas de *P. sterna* de las fracciones soluble e insoluble (AAG 10%). SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. MM: marcador molecular, CBB: Coomassie Brilliant Blue, AIM: proteínas insolubles de la matriz; ASM: proteínas solubles de la matriz. 28
- Figura 7.** Caracterización mediante tinción-específica de las fracciones ASM y AIM de proteína de *P. sterna*. SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. MM: marcador molecular; CBB: Coomassie Brilliant Blue; SN: Nitrato de Plata; PAS: Ácido periódico-Schiff; Stains-All: tinción para proteínas cargadas; Stains-All/nitrato de plata: tinción para incrementar la sensibilidad del reactivo Stains-All, Ova: ovoalbúmina (control positivo en PAS y control negativo en Stains-All); AIM: proteínas insolubles de la matriz; ASM: proteínas solubles de la matriz. Las flechas indican el control positivo, control negativo o la detección de la proteína de interés en cada tinción. 29
- Figura 8.** Perfil electroforético en SDS-PAGE de poliacrilamida al 16% de las fracciones obtenidas de la electroforesis preparativa de la fracción AIM de la concha de *P. sterna* (tinción: nitrato de plata). MM: marcador de peso molecular; 1-9: muestras aleatorias entre las fracciones 76-100. La flecha indica una de las fracciones que contienen la proteína de interés..... 30

- Figura 9.** Cálculo del peso molecular de Ps19 de la matriz insoluble en AAG (AIM) de *P. sterna*. Estándares de proteína y Ps19 fueron separados en un gel SDS-PAGE de poli(acrilamida) al 16%. Los ejes representan movilidad relativa (Rf) de las proteínas y el logaritmo del peso molecular (log MW). MWS: estándar de peso molecular (Bio-Rad 1610317). 31
- Figura 10.** Caracterización bioquímica, mediante tinción-específica, de la proteína Ps19 de *P. sterna* en geles SDS-PAGE de poli(acrilamida) al 16%. MM: marcador de peso molecular, CBB: tinción Coomassie Brilliant Blue; SN: tinción con Nitrato de Plata; PAS: tinción Ácido Periódico-Schiff; Stains-All: tinción para proteínas cargadas; Stains-All/Nitrato de Plata: tinción para incrementar la sensibilidad del reactivo Stains-All, Ova: ovoalbúmina (como control positivo en PAS y control negativo en Stains-All). Las flechas indican el control positivo o la detección de la proteína de interés en cada tinción. 34
- Figura 11.** Ensayo de unión a quitina de Ps19 de *P. sterna*. Gel SDS-PAGE de poli(acrilamida) al 16% teñido con nitrato de plata. MM: marcador de peso molecular; BSA: Albúmina sérica bovina; Ps19: proteína de 19 kDa de *P. sterna*. La flecha indica a Ps19 unida a quitina. 35
- Figura 12.** Estructura de la concha (capa nacarada) de *P. sterna* visualizada por SEM. a) Estructura tipo “pared de ladrillos”, b) Vista superior de placas de aragonita; la flecha indica las placas de aragonita..... 36
- Figura 13.** Efecto de Ps19 en el crecimiento de cristales de CaCO_3 en la presencia de diferentes soluciones salinas. **a:** 40 mM CaCl_2 pH 8.2, 100 mM NaHCO_3 (solución A); **b:** 40 mM MgCl_2 pH 8.2, 100 mM NaHCO_3 (solución B); **c:** 100 mM CaCO_3 (solución C). **d, e,** and **f:** Ps19 con soluciones A, B y C, respectivamente. Las flechas indican cristales de calcita en **a**, cristales de aragonita en **b**, y placas de aragonita en **d** y **e**. Las estructuras geométricas de cada caso fueron delimitadas en blanco. 37
- Figura 14.** Efecto de Ps19 sobre la cristalización de CaCO_3 cuando se combinan cuatro soluciones salinas a 40 mM de cofactor. Proteína Ps19 incubada sola a (a) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (b) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (c) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (d) Solución 1 (40 mM MgCl_2 , 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (e-g) solución 1 con (e) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (f) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (g) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (h) Solución 2 (40 mM CaCl_2 , 100 mM Na_2CO_3) sin presencia de Ps19, (i-k) solución 2 con (i) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (j) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (k) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (l) Solución 3 (40 mM MgSO_4 , 100 mM Na_2CO_3) sin presencia de Ps19, (m-o) solución 3 con (m) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (n) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (o) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (p) Solución 4 (40 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$, 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (q-s) solución 4 con (q) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (r) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (s) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. Las estructuras fueron delimitadas con líneas blancas. 40
- Figura 15.** Efecto de Ps19 sobre la cristalización de CaCO_3 cuando se combinan cuatro soluciones salinas a 100 mM de cofactor. Proteína Ps19 incubada sola a (a) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (b) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (c) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (d) Solución 1 (100 mM MgCl_2 , 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (e-g) solución 1 con (e) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (f) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (g) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (h) Solución 2 (100 mM CaCl_2 , 100 mM

Na₂CO₃) sin presencia de Ps19, (i-k) solución 2 con (i) 0.2 µg·µL⁻¹, (j) 0.7 µg·µL⁻¹ y (k) 1.2 µg·µL⁻¹ de Ps19 respectivamente. (l) Solución 3 (100 mM MgSO₄, 100 mM Na₂CO₃) sin presencia de Ps19, (m-o) solución 3 con (m) 0.2 µg·µL⁻¹, (n) 0.7 µg·µL⁻¹ y (o) 1.2 µg·µL⁻¹ de Ps19 respectivamente. (p) Solución 4 (100 mM CaCl₂/MgCl₂, 100 mM NaHCO₃) sin presencia de Ps19, (q-s) solución 4 con (q) 0.2 µg·µL⁻¹, (r) 0.7 µg·µL⁻¹ y (s) 1.2 µg·µL⁻¹ de Ps19 respectivamente. Las estructuras fueron delimitadas con líneas blancas. 41

Figura 16. Espectro Raman de los cristales de calcita de los controles (línea roja) y cristales de aragonita (línea negra) inducidos por la proteína Ps19 asilada de la matriz insoluble en AAG de la concha de *P. sterna*. En rojo se muestra el espectro emitido por la calcita y en negro el emitido por la aragonita. 42

Lista de tablas

Tabla I. Proteínas insolubles de la matriz de bivalvos.	11
Tabla II. Condiciones de cristalización in vitro para Ps19.	26
Tabla III. Purificación de Ps19 de la concha de <i>P. sterna</i>	31
Tabla IV. Péptidos obtenidos por secuenciación de novo y análisis de homología contra las proteínas no redundantes de Mollusca empleando BLAST.	33

Abreviaturas

AAG- Ácido Acético Glacial

AIM- Matriz Insoluble en Ácido, del inglés Acid Insoluble Matrix

ASM- Matriz Soluble en Ácido, del inglés Acid Soluble Matrix

BMSP- proteína del mejillón azul, del inglés Blue Mussel Shell Protein

BSA- Albúmina Sérica Bovina, del inglés Bovine Serum Albumin

CA- Anhidrasa carbónica, del inglés Carbonic Anhydrase

CBB- Tinción con Azul de Coomassie, del inglés Coomassie Brilliant Blue

CBD- Dominio de unión a quitina, del inglés Chitin Binding Domain

CCA- Carbonato de Calcio Amorfo

EDTA- Ácido etilendiaminetetraacético, del inglés Ethylenediaminetetraacetic Acid

LB- Amortiguador de carga, del inglés Loading Buffer

PAS- Tinción con ácido periódico-Schiff, del inglés Periodic Acid Schiff

pI- Punto isoeléctrico

PIDs- Proteínas Intrínsecamente Desordenadas

Rf- Movilidad relativa

SDS- Dodecilsulfato Sódico, del inglés Sodium Dodecyl Sulfate

SEM- Microscopía electrónica de barrido, del inglés Scanning Electron Microscopy

SMPs- Proteínas de la Matriz de la Concha, del inglés Shell Matrix Proteins

TCA- Ácido tricloroacético, del inglés Trichloroacetic acid

vWA- Dominio von Willebrand A

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biomineralización

La biomineralización es el proceso biológico mediante el cual un organismo vivo produce tejidos mineralizados con la finalidad de brindar soporte a tejidos blandos, protección contra depredadores, desecación, nutrición, reproducción, almacenamiento de iones, entre otros (Montagnani *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2019). El CaCO_3 es el biomineral más encontrado en el Phylum Metazoa formando principalmente esqueletos (Marin *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2019).

En moluscos, la biomineralización ocurre en la formación de su exoesqueleto, la concha, a cuya estructura se puede atribuir el gran éxito de este grupo debido a que les confiere protección y soporte (Kocot *et al.*, 2016). Existen tres polimorfos de carbonato de calcio presentes en la concha: vaterita, aragonita y calcita (Matsushiro *et al.*, 2003; Montagnani *et al.*, 2011).

La concha está compuesta entre 95-99% de carbonato de calcio, su capa más externa, conocida como periostraco, funciona como la primera defensa, no se encuentra calcificada y está formada por compuestos orgánicos (Kocot *et al.*, 2016). La calcita, el segundo polimorfo más abundante en moluscos, forma una capa prismática externa de cristales alargados que proporciona resistencia ante la penetración de la concha debido a su dureza (Bahn *et al.*, 2017; Gower, 2008; Marin, Luquet, *et al.*, 2007) (Fig. 1). Este polimorfo, bajo condiciones estándar de presión y temperatura, cristaliza en el sistema romboédrico, siendo el más estable termodinámicamente hablando, sin embargo, también se ha reportado que algunos organismos presentan una capa prismática formada por cristales alargados de aragonita (el polimorfo más abundante en moluscos), que es termodinámicamente menos estable que la calcita y cristaliza en el sistema ortorrómbico (Checa *et al.*, 2007; Dauphin *et al.*, 2018; Dauphin y Cuif, 2018; Marin *et al.*, 2012).

Por debajo de la capa prismática, cristales de aragonita forman una estructura nacarada interna compuesta por placas u hojas de nácar que en bivalvos, se ensamblan formando estructuras laminares, también conocidas como “pared de

ladrillos” y en gasterópodos, estructuras tipo “monedas apiladas” (columnares) (Barthelat, 2010; Marin *et al.*, 2012; Miyashita *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2011) (Fig. 1). El nácar tiene propiedades mecánicas conferidas por su estructura brindándole una combinación entre fuerza, dureza y rigidez que no posee el polimorfo del que está hecho por sí solo (Tushtev *et al.*, 2008).

La vaterita, el polimorfo de carbonato de calcio menos estable presente en la concha, ha sido reportado cuando la concha ha sufrido daño y debe repararse (Marin, 2012; Wilt, 2005).

Se ha reportado la presencia de carbonato de calcio amorfo (CCA) dentro de vesículas, que funcionan como almacenamiento de iones, en diferentes tejidos de moluscos. Este mineral suele ser rico en magnesio, formando una masa irregular que impide el paso de los rayos X. Se ha descrito la existencia de pequeños gránulos con CCA que podrían ser transportados hasta el sitio de mineralización donde éste actúa como un precursor en la nucleación de cristales de calcita, aragonita o vaterita (Addadi *et al.*, 2006; Neff, 1972; Towe y Hamilton, 1967; Weiner *et al.*, 2003).

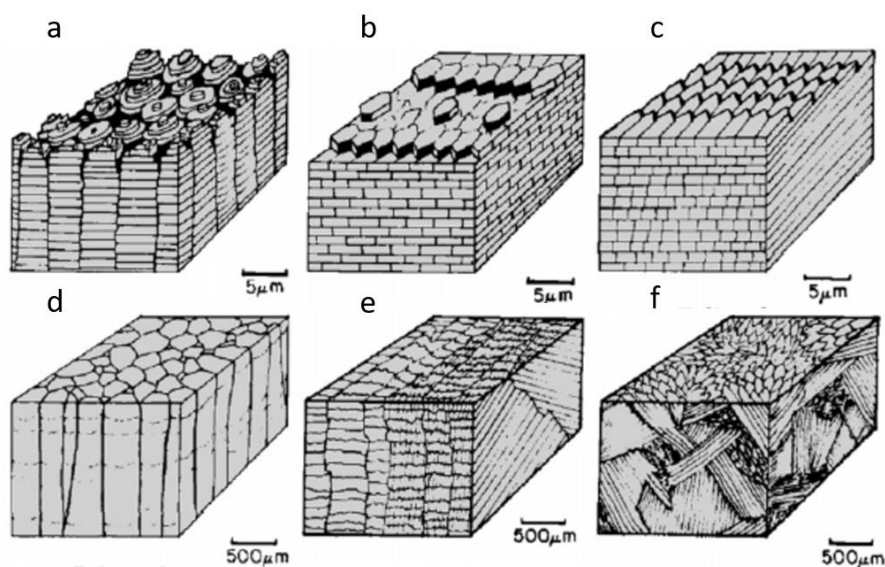


Figura 1. Estructuras que pueden formar los polimorfos de carbonato de calcio en la concha de moluscos. a) columnar (nácar), b) laminar (nácar), c) foliada (calcita), d) prismática (aragonita o calcita), e) lamelar cruzada (aragonita), f) lamelar cruzada compleja (aragonita y calcita). Modificada de Vincent (2002).

En moluscos, la formación de la concha comienza al final de la gastrulación, cuando células ectodermales se diferencian e invaginan formando la glándula de la concha, que posteriormente se expande y vuelve a diferenciarse para dar paso al manto (Kocot *et al.*, 2016), que es el órgano secretor de todos los compuestos orgánicos necesarios para la formación de los cristales, tales como proteínas, β -quitina, glicoproteínas, polisacáridos, entre otras, que forman la matriz orgánica (representa del 1-5% de la concha) y que interactúan con iones de calcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-) y elementos traza menores (Mg^{2+} , Sr^{2+}) en el espacio extrapalial, donde comienza a depositarse el carbonato de calcio en alguno de sus polimorfos (Fig. 2) (Addadi *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2013; Rousseau *et al.*, 2009).

El manto se encuentra especializado por regiones, donde cada una regula la liberación de moléculas específicas para formar las capas de la concha; por ejemplo, el periostraco es secretado por células especializadas que se encuentran en el surco entre el pliegue externo y el resto del manto (surco periostracal), la formación de la capa prismática está controlada por células epiteliales del manto dorsal externo, y la capa nacarada por células del manto interno (Fig. 2) (Kocot *et al.*, 2016; Marin y Luquet, 2004; Song *et al.*, 2019). Algunas moléculas de esta matriz orgánica se encuentran en la fase inorgánica (dentro del cristal) o entre los cristales formando una estructura de andamiaje para determinar el acomodo del mineral (Levi-Kalishman *et al.*, 2001). Se ha propuesto que la matriz orgánica garantiza la interacción entre minerales y macromoléculas, debido a que tiene un papel principal en la nucleación y crecimiento de los cristales (Belcher *et al.*, 1996). Hasta el momento, los mecanismos bioquímicos y moleculares que sigue la ruta de biomineralización para estabilizar y desestabilizar la fase mineral desordenada para convertirla en un mineral altamente estructurado, no han sido totalmente comprendidos (Bahn *et al.*, 2017), por lo que se siguen estudiando. Siendo la formación del nácar uno de los procesos más estudiados debido a las propiedades que posee este material.

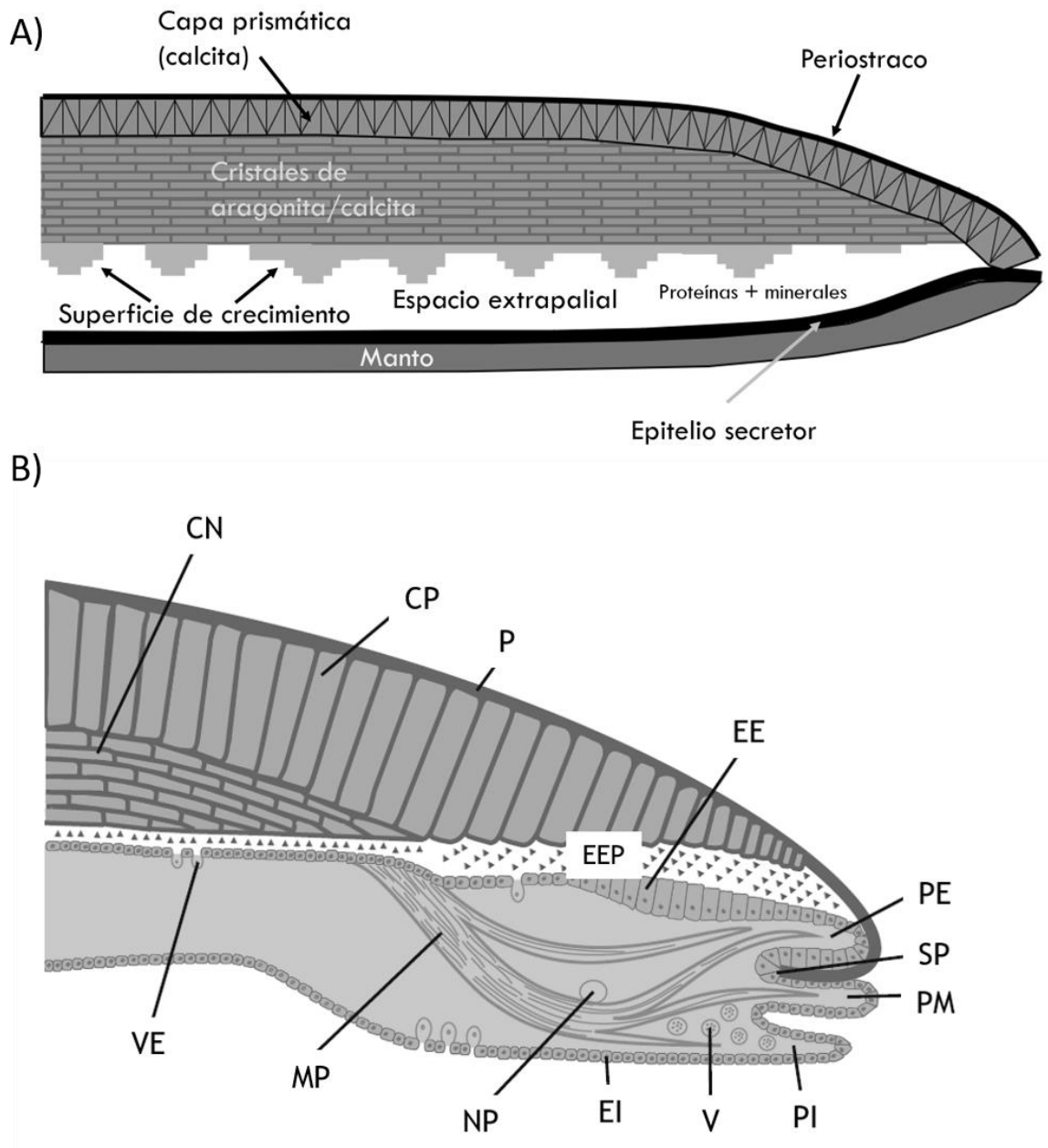


Figura 2. Esquemas de la concha y tejidos de un molusco involucrados en la biomineralización. A) Esquematización de la concha con sus partes, remarcando el espacio extrapalial y la superficie de crecimiento de los cristales. B) Esquema de una sección transversal de la concha de un molusco. Los triángulos representan las moléculas orgánicas secretadas por el manto. CN: capa nacarada; CP: capa prismática; P: periostraco; EEP: espacio extrapalial; EE: epitelio externo; PE: pliegue externo; SP: surco periostracal; PM: pliegue medio; PI: pliegue interno; V: vesículas; EI: epitelio interno; NP: nervio palial; MP: músculo palial; VE: vesículas tipo exosomal. Modificado de Kokot *et al.*, (2016).

1.2 Nácar

La formación del nácar ha sido ampliamente estudiada debido a que es un material con alta resistencia, dureza y ligereza, cualidades que le confieren importancia no sólo científica, sino económica y social. Las proteínas de la matriz (SMPs, del inglés Shell Matrix Proteins), son unas de las proteínas más estudiadas dada su capacidad de producir nácar *in vitro*, lo que podría resultar en el desarrollo de nuevas tecnologías como la formación de biomateriales (Duplat *et al.*, 2007; Evans, 2008). El sintetizar materiales *in vitro* como el nácar, tendría una repercusión directa tanto en el ámbito social como en el económico, pues como se ha mostrado en algunos estudios, las SMPs son capaces de afectar la proliferación y diferenciación de células relacionadas con la formación del hueso (Huang *et al.*, 2017; Mouries *et al.*, 2002) lo que podría llevar al desarrollo de prótesis, tratamiento de fracturas o fisuras, por mencionar algunos ejemplos. También podrían desarrollarse materiales de construcción más ligeros y resistentes (Tushtev *et al.*, 2008), así como mejorar la producción de las perlas o materiales necesarios en la joyería, desarrollando así tanto el ámbito social como el económico.

El nácar es un material altamente estructurado compuesto por placas o tabletas poligonales de aragonita cuya forma puede ser hexagonal, redondeada o cuadrada. En la concha tienen un tamaño entre 5 y 15 μm de longitud con un espesor promedio de 0.5 μm , formando estructuras con marcadas diferencias entre bivalvos y gasterópodos; en los primeros las placas se ensamblan entre ellas de manera escalonada, construyendo un tipo de pared de ladrillos; mientras que, en los segundos, las tabletas se apilan una sobre otra formando columnas que asemejan monedas apiladas (Cartwright y Checa, 2007; Marin *et al.*, 2007; Nudelman, 2015). A partir de estas estructuras, se han propuesto dos modelos para explicar la formación del nácar, uno que sugiere un mecanismo heteroepitaxial, donde la nucleación se origina a partir de un sitio de nucleación orgánico y otro que propone el crecimiento continuo de las placas a través de un poro o un puente existente en

la matriz interlamelar que conecta una placa con la siguiente, permitiendo así el crecimiento de las placas de aragonita (Nudelman *et al.*, 2008). Sin embargo, lo más probable es que ocurra una combinación de ambos, donde las placas se encuentren comunicadas entre sí por medio de puentes minerales que a su vez estén flanqueados por sitios de nucleación (Cartwright y Checa, 2007; Marin *et al.*, 2007; Nudelman, 2015; Olson *et al.*, 2013) (Fig. 3).

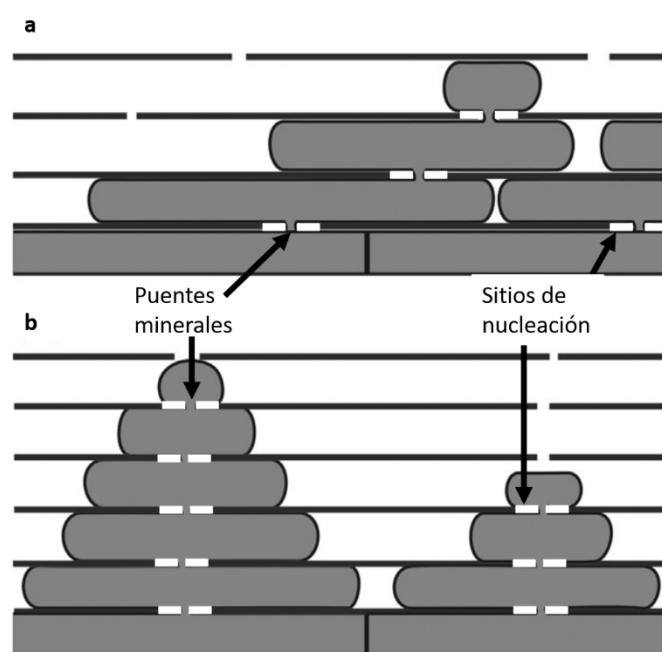


Figura 3. Modelo de nucleación y crecimiento del nácar en bivalvos (a) y gasterópodos (b). Las flechas indican los puentes minerales entre las placas de aragonita, los sitios de nucleación se muestran en blanco y las líneas negras gruesas representan la matriz interlamelar. Adaptado de Nudelman, 2015.

Además de los modelos propuestos para la nucleación y crecimiento del nácar, se describieron los pasos del mecanismo para que el nácar pueda depositarse. Este proceso se encuentra mediado por la matriz orgánica: 1) Ensamblaje de la matriz: la quitina se acomoda en capas planas (una sobre otra) y el espacio entre ellas es

rellenado con proteínas embebidas en un gel a partir del cual se desarrollarán las placas de nácar, también se dictará la orientación que tendrán. 2) Formación de la primera fase mineral: el CCA es transportado hasta el sitio de mineralización mediante vesículas y actúa como un precursor para la formación de aragonita. 3) Nucleación de tabletas de aragonita: los componentes de las placas se organizan a partir de su centro para formar las tabletas. 4) Crecimiento de las tabletas: cada placa crece verticalmente hasta llegar a la siguiente capa de quitina para continuar su crecimiento lateralmente, embebiendo algunos componentes de la matriz insoluble para formar el tejido maduro (nácar) (Addadi *et al.*, 2006).

1.3 Matriz extracelular

Como se mencionó anteriormente, además de carbonato de calcio, la concha también posee una matriz orgánica compuesta por proteínas, lípidos y carbohidratos principalmente. Esta matriz desempeña diversas funciones asociadas a la biomineralización (Marie *et al.*, 2007; Marie *et al.*, 2012; Marin *et al.*, 2012; Nudelman, 2015).

Los carbohidratos de la matriz son el segundo grupo de biomoléculas más abundantes en el nácar (después de las proteínas), y pueden clasificarse en dos conjuntos: quitina y polímeros solubles. La quitina ha sido ampliamente estudiada en moluscos debido a que posee una alta importancia en la formación de la concha, específicamente en la estructura y acomodo de las placas que conforman el nácar (Suzuki *et al.*, 2009, 2011). Por otro lado, los polímeros solubles al unirse a proteínas mediante un enlace covalente, forman glicoproteínas o peptidoglicanos como resultado de modificaciones postraduccionales (Marie *et al.*, 2010; Marin *et al.*, 2007). Los lípidos han sido reportados formando lipoproteínas o unidos a polisacáridos, por lo que podrían estar involucrados en señalización, sin embargo no han sido estudiados en amplitud y sus funciones en la biomineralización aún son desconocidas (Arivalagan *et al.*, 2017; Marie *et al.*, 2015, 2016).

Las proteínas son el grupo más abundante en la matriz orgánica de la concha y el más estudiado (Addadi *et al.*, 2006; Levi-Kalisman *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2016; Nudelman, 2015; Xu *et al.*, 2018). Sus características serán descritas más adelante en amplitud.

1.4 Proteínas de matriz

En general, las proteínas de la matriz (SMPs, del inglés Shell Matrix Proteins) comprenden una colección heterogénea de proteínas con puntos isoeléctricos (pI) variables (de muy ácido a muy básico). Su secuencia aminoacídica incluye principalmente residuos como Asp, Gly, Ser, Glu, Pro, Ala y Cys, que generalmente se encuentran en regiones conservadas repetitivas (dominios) cortas o largas de baja complejidad (Evans, 2008). Las SMPs pueden actuar como reguladores positivos o negativos en la biomineralización de la concha dependiendo los dominios que presenten (dominios con actividad enzimática, dominios involucrados en la señalización celular, dominios estructurales entre otros) (Marie *et al.*, 2010). La secuencia de aminoácidos de las SMPs relacionadas con la formación de la capa nacarada presentan regiones o dominios conservados con residuos como Asp, Gly, Asn, Ser, Pro y Cys, siendo Asp el aminoácido más importante en la capacidad de unión a Ca^{2+} (Evans, 2008; Marin, 2012; Marin *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2007). Los residuos Gly y Asn, generalmente son parte de secuencias repetidas que forman dominios específicos (Fig. 4), que han sido asociados con las funciones de nucleación (Du *et al.*, 2018) e inhibición (Montagnani *et al.*, 2011; Zhang y Zhang, 2006) en el proceso de biomineralización, mientras que los residuos Gly/Tyr o los motivos Gly-Tyr-Ser han sido asociados con la capacidad de unión a polisacáridos (Caiping *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2012; Montagnani *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2006; Zhang y Zhang, 2006).

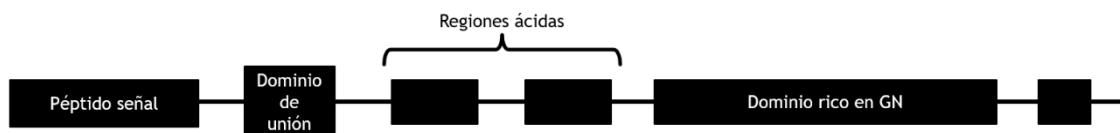


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de una proteína hipotética de la matriz ácida. Péptido señal, un dominio de unión que puede ser a otra proteína o a calcio, región ácida (como Leu, Asp y Ser) y con dominio repetitivo de Asn-Gly (GN).

Además de la presencia de dominios intrínsecos, algunas SMPs sufren modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, glicosilaciones y sulfataciones que determinan su estructura y las interacciones que tienen con otras moléculas (proteínas, iones, minerales, etc.), por lo que son de gran relevancia en el proceso de biomineralización del nácar (Matsushiro *et al.*, 2003; Zhang y Zhang, 2006). Por ejemplo, en algunas glicoproteínas, residuos estructurados de polisacáridos son importantes para controlar el crecimiento de los cristales de CaCO_3 *in vivo* (Xie *et al.*, 2011); en la perlina, grupos sulfato (cargados negativamente) asociados a ella presentan propiedades de unión a calcio (Albeck *et al.*, 1996; Miyashita *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018); mientras que los polisacáridos sulfatados presentes en las proteínas de la matriz atraen y acumulan iones Ca^{2+} alrededor de los sitios de nucleación (ricos en Asp) (Xie *et al.*, 2011). Es evidente que las modificaciones postraduccionales juegan un papel importante en la biomineralización del nácar, por eso su estudio es de vital importancia.

Se ha reportado que algunas SMPs carecen de una estructura secundaria definida, por lo que se les ha descrito como proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs), ya que al tener altas proporciones de aminoácidos no polares o cargados (Ser, Pro, Glu, Asp, Gly), en lugar de formar α -hélices u hojas- β , forman una espiral aleatoria completa o parcial. Además, si no poseen aminoácidos hidrofóbicos como Phe, Leu o Ile (núcleo hidrofóbico) las proteínas son más flexibles (Boskey *et al.*, 2016; Kalmar *et al.*, 2012).

La biomineralización del nácar se ha estudiado a través de la extracción y análisis funcional de las SMPs, sin embargo, dado que es un proceso complejo, su estudio es un reto metodológico y analítico (Du *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 2012; Marie *et al.*, 2012; Miyashita *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2011; Mouries *et al.*, 2002; Samata *et al.* 1999; Tsukamoto *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013). Para extraer las proteínas de la concha, éstas han sido tratadas con soluciones saturadas de ácidos débiles como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o con ácido acético glacial (AAG) al 10%, obteniendo 2 fracciones proteicas: 1) proteínas solubles, y 2) proteínas insolubles (Du *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 2012; Marie *et al.*, 2012; Miyashita *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2011; Mouries *et al.*, 2002; Samata *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013).

Las proteínas solubles e insolubles se distinguen entre sí principalmente por las características que les confieren los aminoácidos que las conforman, por ejemplo, las proteínas solubles suelen tener mayor porcentaje de residuos aminoacídicos ácidos (como el ácido aspártico) y suelen estar presentes entre los cristales de carbonato de calcio regulando la forma en que se depositan, mientras que las proteínas insolubles son abundantes en glicina y alanina, que le confieren hidrofobicidad, y tienden a estar relacionadas con la formación del nácar (Marin, 2012; Marin *et al.*, 2013).

1.5 SMPs insolubles y sus dominios

Como se muestra en la tabla I, en bivalvos, se han descrito diversas proteínas insolubles en EDTA o AAG al 10%, entre las que se encuentran la familia N14/N16/perlina, las proteínas Pif80, Pif97 y Pif177, las proteínas MSI (7, 31 y 60), Fam20c, N25, Nacreína, ente otras (Bahn *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2012; Marie *et al.*, 2016; Miyashita *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2011; Sudo *et al.*, 1997; Tsukamoto *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2019). Muchas de estas proteínas comparten dominios que han sido ligados a funciones específicas, demostrando

que existen proteínas homólogas entre moluscos, además de que los dominios se encuentran altamente conservados (Marie *et al.*, 2016).

Tabla I. Proteínas insolubles de la matriz de bivalvos.

Proteínas	Especie	Método de extracción	Capa de la concha	Referencias
Fam20C	<i>Pinctada fucata</i>	EDTA	Nácar	(Du <i>et al.</i> 2018)
N14/N16/ Perlina	<i>P. fucata</i> <i>P. maxima</i> <i>P. margaritifera</i>	EDTA/AAG	Nácar/ Perla	(Ma <i>et al.</i> 2016; Matsushiro <i>et al.</i> 2003; Miyashita <i>et al.</i> 2000; Montagnani <i>et al.</i> 2011)
N25	<i>P. fucata</i>	EDTA	Nácar/ Prismática	(Yang <i>et al.</i> 2019)
Pif 80/ Pif 97	<i>P. fucata</i>	AAG	Nácar	(Bahn <i>et al.</i> 2015, 2017)
MSI7 MSI21 MSI60	<i>P. fucata</i>	AAG	Nácar/ Prismática	(Sudo <i>et al.</i> 1997; Tsukamoto <i>et al.</i> 2004)
Pif 177 MSI60 Nacreína Shematrina Papilina	<i>Villosa leinosa</i> <i>Elliptio complanata</i>	AAG	Nácar	(Marie <i>et al.</i> 2016)

Entre los dominios más representativos de las proteínas insolubles, se encuentra el dominio de unión a quitina (CBD, del inglés Chitin Binding Domain), presente en la proteína del mejillón azul (BMSP, del inglés Blue Mussel Shell Protein), la familia perlina/N16, hichina, proteínas tipo-Pif, entre otras. El CBD juega un papel importante en la construcción de estructuras de andamiaje para que se depositen los cristales de carbonato de calcio (Gao *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2019; Montagnani *et al.*, 2011). Otro dominio muy representativo es el von Willebrand A (vWA), involucrado en la adhesión celular y, frecuentemente, asociado con dominios de

unión a quitina; se encuentra presente en proteínas como la BMSP y proteínas Pif (Feng *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2015). Un dominio asociado a la nucleación de carbonato de calcio es el de unión a calcio (CaBD, del inglés Calcium Binding Domain), con residuos de unión X, Y, Z, -Y, -X, -Z presentes en proteínas tipo calmodulina como CaM o CaLP (Li *et al.*, 2005). También se ha reportado actividad de unión a calcio por caracterización bioquímica en proteínas como la N16, N14, MSI60 y Aspeína, sin embargo, sus secuencias no presentan homología con dominios conocidos (Kono *et al.*, 2000; Samata *et al.*, 1999; Sudo *et al.*, 1997; Tsukamoto *et al.*, 2004). Además de los posibles dominios de unión a calcio aún no descritos, existen otras funciones que no han podido ser ligadas a dominios conocidos, lo que refuerza la existencia de dominios aún no descritos (Arroyo-Loranca *et al.*, 2020; Marie *et al.*, 2016; Montagnani *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el estudio de las proteínas de la matriz de *Pteria sterna* es de gran relevancia, dado que es una especie de interés económico y puede ser aprovechada para el desarrollo de nuevas tecnologías biomiméticas *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

México cuenta con dos especies nativas de ostras productoras de nácar, la concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851) y la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), que además de ser utilizadas para la producción de perlas de alto nivel competitivo (por sus características de coloración e iridiscencia), son recursos aprovechados en su totalidad ya que con el nácar se elaboran productos cosméticos, la carne es consumida y la concha utilizada para la elaboración de productos de ornato (Coan y Valentich-Scott, 2012; Monteforte y Cariño-Olvera, 2018).

P. sterna pertenece a la familia Pteriidae (Coan y Valentich-Scott, 2012). Posee valvas color marrón oscuro por fuera y por dentro una apariencia nacarada, que se ha reportado como la más iridiscente exhibiendo un gran abanico de colores metálicos. Esta especie alcanza longitudes de hasta 16 cm y su concha, que es más cóncava que la de *P. mazatlanica* o *Pinctada margaritifera*, presenta una ala (*Pterion* en griego) en la charnela, siendo más larga en la parte anterior con respecto a la posterior (Kiefert *et al.*, 2004; Meza, 2016). Presenta una distribución costera, tropical a templada, pasando por subtropical, yendo desde el alto Golfo de California en México hasta la costa de Perú (Serna-Gallo *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el estudio del nácar tiene importancia económica, científica y social, por lo que conocer el mecanismo mediante el cual se forma ha sido ampliamente estudiado en diversos moluscos a través de la caracterización e identificación de las proteínas y moléculas involucradas en el proceso. Sin embargo, el género *Pteria* no ha sido ampliamente estudiado a diferencia del género *Pinctada*, en el que se han descrito más de 50 proteínas involucradas en la biomineralización de la concha, de las cuales, al menos 20 participan en la formación del nácar (Song *et al.*, 2019).

La **nacreína** fue la primera SMP reportada, posee un dominio con actividad de anhidrasa carbónica (CA, del inglés Carbonic Anhydrase) con secuencias repetidas

de Gly-X-Asn o Gly-Asn y tiene funciones tanto en la capa nacarada como en la prismática (Miyamoto *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2019).

Una proteína más reciente descrita, **PfY2**, participa en el proceso de nucleación de cristales y es capaz de mediar la transición de CCA a calcita o aragonita; además, cuando la concha sufre algún daño se ha encontrado en ambas capas de la concha (nacarada y prismática), por lo que se la he relacionado con procesos de regeneración y reparación (Xie *et al.*, 2011).

La familia de proteínas **Shematrina**, son proteínas ricas en Gly, con un pl básico (9-10.3), se ha observado que están involucradas en la formación de estructuras de andamiaje para la deposición de carbonato de calcio (Marie *et al.*, 2016).

Otras proteínas estructurales son la familia de proteínas **MSI** (nombradas de acuerdo con su peso molecular). Estas proteínas son ricas en residuos de Ala y Gly y algunas de ellas están involucradas en la nucleación, como la MSI17 (Zhang *et al.*, 2003).

Las proteínas **Pif**, las cuales son nombradas de acuerdo con sus pesos moleculares, Pif80 y Pif97, poseen secuencias ricas en Asp, Gly, Arg, Cys y Lys, así como puentes disulfuro que le brindan una estructura estable. Se ha reportado que interactúan entre ellas y con otras proteínas como N16 para construir la estructura sobre la que se formará el cristal de CaCO₃. Además, funcionan como estabilizadores del CCA, reforzando su importancia y papel en la mineralización del nácar (Bahn *et al.*, 2015, 2017).

La familia de proteínas **N14/N16/perlina** está conformada por proteínas de bajo peso molecular, y funcionan como nucleadoras de aragonita, así como estructurales, pues además de encontrarse dentro de los cristales se encuentran en la fase intercrystalina formando estructuras de andamiaje. Debido a que estas proteínas poseen dominios repetidos ricos en Gly y Asp, dominios de unión a quitina, sitios de interacciones de proteínas y de captura de iones (Ca²⁺) (Miyashita *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2011; Samata *et al.*, 1999), se hipotetiza que tiene

función de anclaje entre las proteínas ácidas y las proteínas solubles (Bahn *et al.*, 2017).

Las proteínas anteriormente mencionadas, presentan homología entre especies de bivalvos, y algunas incluso entre moluscos, por lo que proteínas presentes en la concha de *Pteria sterna*, un bivalvo de alto valor económico en México, podrían presentar similitudes con otras proteínas previamente descritas.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado un gran número de proteínas de la matriz de la concha involucradas en la formación del nácar (Jiao *et al.*, 2015; Miyashita *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2011), sin embargo, existen proteínas que no han sido completamente caracterizadas y otras que aún no han sido descritas, lo que limita el entendimiento del proceso de biomineralización de la concha de moluscos. Por esto, se vuelve complicado desarrollar tecnologías biomiméticas que ayuden a la sociedad ya que el proceso no ha sido completamente entendido. Dado lo anterior, el estudio de proteínas de la concha de moluscos permitirá no sólo entender el proceso de biomineralización de bivalvos moluscos, sino que contribuirá a sentar las bases para la producción de polimorfos de carbonato de calcio *in vitro* que puedan ser usados en el desarrollo de tecnologías biomiméticas.

4. HIPÓTESIS.

Si las proteínas insolubles de la matriz presentan dominios asociados con la unión de calcio y quitina, y además han sido relacionadas con la formación de aragonita *in vitro*, entonces las proteínas insolubles de la concha de *Pteria sterna* presentarán características bioquímicas e intrínsecas de su secuencia que les confieran la capacidad de formar aragonita *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente la proteína más abundante de la fracción insoluble de la concha de *Pteria sterna*.

5.2 Objetivos particulares

- 1) Aislar y caracterizar la proteína más abundante de la fracción insoluble de la concha de la ostra perlera conocida como concha nácar (*P. sterna*).
- 2) Analizar la capacidad de cristalización de carbonato de calcio de la proteína en presencia de diferentes sales, molaridades y cantidad de proteína.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracción de proteínas de la matriz

Se obtuvieron las fracciones solubles e insolubles de la concha de *P. sterna* por el método de ácido acético (Montagnani *et al.*, 2011). Brevemente, se realizó una decalcificación de la concha molida de *P. sterna* (20 g) con 200 mL de una solución de AAG al 10% (v/v) en agitación constante a 4 °C durante 24 h. La matriz soluble en ácido y la matriz insoluble en ácido (ASM y AIM respectivamente, del inglés Acid-Soluble Matrix y Acid-Insoluble Matrix) fueron separadas por centrifugación a 4,500 g, 30 min a 4 °C y, posteriormente, por decantación. El AAG presente en la ASM fue eliminado por diálisis utilizando membranas con un corte de 12-14 kDa Spectra/Pro® previamente hidratadas en agua destilada por 30 min. La diálisis fue llevada a cabo empleando agua destilada, con agitación constante a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se hizo un recambio de agua destilada y se mantuvo bajo las mismas condiciones por 8 h. Después, la ASM dializada se concentró por per-evaporación en frío (4 °C, 36 h) y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La proteína precipitada, *pellet*, correspondiente a la AIM, fue lavada con agua destilada para retirar el exceso de AAG y almacenada a -20 °C hasta su uso.

6.2 Electroforesis SDS en gel de poliacrilamida

Las proteínas ASM y AIM de la concha de *P. sterna* se analizaron en un gel discontinuo de poliacrilamida al 4% (gel concentrador; amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH, 6.8) y 16% (gel separador; amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) en un mini-SDS-PAGE (Bio-Rad Protean II) (Laemmli, 1970). Brevemente, se tomaron 64 µg de AIM y 30 µg de ASM (peso húmedo), se mezclaron respectivamente con 5 y 20 µL de amortiguador de carga Laemmli 4X (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol 20%, SDS 10%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05% [p/v]), se hirvieron 10 min para desnaturalizar las proteínas, las muestras se centrifugaron 1 min a 7,500 g. El sobrenadante resultante fue cargado en el gel. Los geles se corrieron a 90 V constantes hasta que el frente de corrida quedó a medio centímetro del borde

inferior del gel. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos o tratados según el análisis a realizar, y los resultados fueron documentados utilizando un fotodocumentador (Chemi Doc XRS, Bio Rad). Para obtener la movilidad relativa de las proteínas (pesos moleculares), se utilizó como referencia un estándar de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad 1610317).

6.3 Purificación de Ps19

Se procedió a purificar la proteína más abundante de la AIM de la concha, la cual fue nombrada Ps19 por su peso molecular calculado de ~19 kDa, mediante electroforesis preparativa utilizando los mismos amortiguadores descritos en la sección anterior. Brevemente, se ensambló el dispositivo como se indica en el manual de Mini Prep Cell (Cat. N. 170-2908). La muestra de proteínas se preparó mezclando 25 mg de *pellet* (peso húmedo) en 250 μ L de amortiguador de carga Laemmli 4X (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glicerol 20%, SDS 10%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05%), se hirvió 10 min y se cargó en un gel cilíndrico de poliacrilamida al 12% de 7 cm de altura. La electroforesis se corrió a 200 V constantes a temperatura ambiente. Cuando el frente de corrida alcanzó el final del gel, se colectaron 100 fracciones de 200 μ L. Posteriormente, para identificar la proteína de interés, se cargaron fracciones aleatorias en un gel SDS-PAGE al 16% de poliacrilamida (30%/0.8%). Las fracciones con la proteína con peso de ~19 kDa fueron concentradas por centrifugación mediante un filtro con un corte de 10,000 Daltones (Amicon Ultra-4, EMD Millipore) a 7,500 g, 10 min a 4 °C; el amortiguador de corrida fue eliminado y sustituido por Tris-HCl 30 mM pH 8.8. La proteína obtenida fue separada en alícuotas de 10 μ L en tubos de 600 μ L y almacenada a -20 °C.

6.4 Cuantificación de proteína

La cuantificación de Ps19 fue realizada mediante densitometría de píxeles (Vincent *et al.* 1997) separando primero la muestra de proteínas en un gel discontinuo de poliacrilamida al 16% en un mini-SDS-PAGE (Bio-Rad Protean II), teñido con azul de Coomassie (R250). Primero se elaboró una curva estándar con ovoalbúmina ($0.5\text{-}8.0\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), la cual fue separada en un gel 16% SDS-PAGE, posteriormente, el gel fue teñido con azul de Coomassie y la imagen fue escaneada con un Chemi Doc XRS (Bio-Rad). La densidad de píxeles de cada banda del estándar (ovoalbúmina) fue calculada usando el software Image Lab 5.1 y se obtuvo la ecuación lineal. La cantidad de Ps19 presente en el extracto de AIM de la concha de *P. sterna* y la proteína purificada, fue calculada mediante la ecuación obtenida de la curva estándar de ovoalbúmina:

$$y = 5 \times 10^{-6}x - 0.94 \quad (1)$$

6.5 Análisis de espectrofotometría de masas

La proteína Ps19 (10 μg) fue separada en un gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%, fue teñido con azul de Coomassie (R250), y la banda de interés fue cortada manualmente del gel. La muestra fue procesada en el Laboratorio Universitario de Proteómica, UNAM, donde fue hidrolizada con tripsina (Promega Grado de secuenciación, Madison, WI, EUA) y analizada por espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC-MS del inglés, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Los péptidos obtenidos fueron comparados con la base de datos de proteínas no redundantes del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.6 Caracterización de proteínas por tinciones

Las proteínas presentes en AIM (64 μg) y ASM (30 μg) fueron caracterizadas mediante tinciones específicas en geles de electroforesis al 16 %, al igual que la proteína Ps19 aislada del extracto de AIM.

6.6.1 Azul de Coomassie

Para la tinción de proteínas, los geles fueron sumergidos en una solución de azul de Coomassie (0.25% Coomassie R250, 45% metanol, 10% AAG), también conocida como tinción CBB (del inglés Coomassie Brilliant Blue) durante una hora y se destiñeron en una solución de desteñido (10% AAG, 40% metanol) hasta revelar los patrones de bandeo. Las bandas fueron visualizadas y foto-documentadas en un Chemi Doc XRS (Bio-Rad).

6.6.2 Nitrato de plata

Esta tinción fue utilizada para visualizar proteínas poco abundantes, dado que detecta hasta 1 ng de proteína, y en casos como CBB o Stains-All, incrementa la señal de los reactivos (Rabilloud *et al.*, 1994). Brevemente, una vez que se separaron las proteínas en el gel, se incubó 5 min en solución de fijación (10% etanol, 0.5% AAG), posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con agua destilada, seguidos de la impregnación con nitrato de plata (20 mL con 15 μL de formaldehído) durante 10 min en oscuridad. Se lavó durante 10 segundos con agua destilada y se procedió al revelado, añadiendo 20 mL de solución de desarrollo (NaOH, formaldehído 37%) hasta ver las bandas de proteína. La reacción se detuvo con la solución de fijación y se visualizó el resultado. Todos los pasos se realizaron en agitación constante. Los geles fueron visualizados y foto-documentados en un Chemi Doc XRS (Bio-Rad).

6.6.3 Ácido periódico-Schiff

La tinción con ácido periódico-Schiff (Zacharius *et al.*, 1969), fue utilizada para identificar la presencia de glicoproteínas, si la proteína se tiñe de rosa es indicativo de potenciales glicosilaciones. Una vez realizada la electroforesis, se incubó el gel

5 min en solución A (ácido tricloroacético 5%), se retiró y posteriormente se incubó 5 min en la solución B (ácido periódico 0.8% en acetato de sodio 0.3%), se removió, posteriormente se añadió el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich S5133) y se dejó actuar por 10 min en obscuridad. Se retiró el reactivo y se realizaron 3 lavados de 3 min cada uno con la solución C (ácido nítrico 3%), se retiró la solución C y se incubó un minuto o menos con la solución D hasta visualizar bandas (ácido clorhídrico 0.01 N), se retiró y se lavó con agua destilada. Finalmente, el gel fue foto-documentado en un Chemi Doc XRS (Bio-Rad) y mediante fotografía directa (iPhone 6S) para documentar el color de la tinción. Se utilizó ovoalbúmina, una glicoproteína, como control positivo.

6.6.4 Stains-All

Se utilizó la tinción de Stains-All (Dahlberg *et al.*, 1969) para identificar proteínas con posibles uniones a calcio, aquellas proteínas con dicha propiedad se tiñen de color azul. Brevemente, tras la electroforesis, se lavó tres veces el gel con isopropanol 25% durante 10 min en agitación constante, se retiró la solución de lavado y se agregó la solución de Stains-All (Tris-HCl 30 mM, pH 8.8, formamida 7.5%, isopropanol 25% y 0.025% Stains-All). Se incubó por un periodo mínimo de 2 h o toda la noche en obscuridad, posteriormente, se realizó un lavado de 20 min con isopropanol 25% y finalmente, un lavado rápido con agua destilada (todos los lavados se realizaron en obscuridad). Una vez reveladas las bandas, el gel fue foto-documentado en un Chemi Doc XRS (Bio-Rad) y también mediante fotografía directa (iPhone 6S) para documentar el color de la tinción. Se utilizó ovoalbúmina como control negativo, pues esta proteína no presenta uniones a calcio.

6.7 Ensayo de unión a quitina

El ensayo fue realizado como describe Montagnani *et al.*, (2011). Brevemente, 13.6 µg de Ps19 purificada (o BSA, como control negativo) fueron mezclados con 100 µL de agua destilada e incubados en agitación constante durante 2 h a 25 °C con 1

mg de quitina de camarón en solución (Sigma, C9752). Las muestras fueron centrifugadas 5 min a 13,000 g a temperatura ambiente y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a 4 °C. El *pellet* se enjuagó tres veces con agua destilada (200 µL) antes de lavarlo con NaCl 0.2 M (100 µL), la muestra se centrifugó 5 min a 13,000 g, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C. De los sobrenadantes se tomaron 15 µL y se mezclaron con 5 µL de amortiguador Laemmli 4X, el *pellet* obtenido fue mezclado con 20 µL del mismo amortiguador, las tres muestras se hirvieron durante 10 min y se cargaron en un gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. El patrón electroforético se reveló con la tinción con nitrato de plata (Rabilloud *et al.*, 1994) y fue visualizado en un Chemi Doc XRS (Bio-Rad). Las proteínas con unión a quitina se visualizan en la fracción con amortiguador de carga y no en los sobrenadantes de los lavados.

6.8 Estructura del nácar de la concha

La estructura del nácar de la concha de *P. sterna* de tres organismos se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy) para determinar su tipo: columnar o laminada. La concha se cortó transversalmente y fue observada directamente con el microscopio en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR.

6.9 Cristalización *in vitro* de CaCO₃ en presencia de Ps19 purificada

6.9.1 Efecto de las sales sobre la cristalización in vitro de CaCO₃

Para evaluar la capacidad de Ps19 de participar en la cristalización de carbonato de calcio, se incubó la proteína purificada con tres diferentes soluciones saturadas: solución A (CaCl₂ 40 mM pH 8.2, NaHCO₃ 100 mM), solución B (MgCl₂ 40 mM pH 8.2, NaHCO₃ 100 mM) y solución C (CaCO₃ 100 mM) (Hillner *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 2000). Como controles se utilizaron las soluciones sin proteína y la Ps19 sin sales (en agua destilada). Cada mezcla, que se elaboró por triplicado, fue incubada

sobre cubreobjetos de la siguiente manera: en cada cubreobjetos se colocaron 10 μL de proteína ($0.68 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 50 μL de agua destilada, 10 μL agua destilada y 50 μL de solución saturada, o 10 μL de proteína ($0.68 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 50 μL de solución saturada; los cubreobjetos se colocaron dentro de placas de Petri selladas con Parafilm y fueron incubadas a 4 °C por 30 días. La morfología de los cristales fue examinada por SEM (por triplicado) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR.

6.9.2 Efecto de la concentración de proteína y de la concentración del cofactor divalente sobre la capacidad de cristalización de CaCO_3 de Ps19.

Se realizó un ensayo de cristalización *in vitro* para ver el efecto de Ps19 en la modulación de la cristalización del CaCO_3 . Se hizo un diseño experimental en matrices y cada experimento fue realizado por triplicado. Se probaron cuatro sales: 1) MgCl_2 , NaHCO_3 ; 2) CaCl_2 , Na_2CO_3 ; 3) $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$, NaHCO_3 y 4) MgSO_4 , Na_2CO_3 , donde los cofactores Ca^{2+} y Mg^{2+} , fueron ajustados a dos molaridades (40 y 100 mM) ensayándose tres concentraciones de proteína (0.2, 0.7 y $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Los controles incluyeron las sales sin presencia de proteína y la proteína sin la presencia de sales (Tabla II). El ensayo consistió en la siguiente mezcla de reacción: 50 μL de la solución salina y 10 μL de agua destilada para el control o 10 μL de la proteína en un cubreobjetos estéril dentro de una caja Petri sellada con Parafilm incubada a 4 °C por 30 días. Todos los reactivos utilizados fueron Sigma-Aldrich con una pureza grado biología molecular. La morfología de los cristales fue examinada por SEM por triplicado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR.

Tabla II. Condiciones de cristalización *in vitro* para Ps19.

Sal	Molaridad del cofactor (Mm)	pH	Polimorfo de CaCO ₃ esperado	Concentración de Ps19 (µg·µL ⁻¹)
MgCl ₂ , 100 mM NaHCO ₃	40 ó	8.2	Aragonita	0.2
	100			0.7
				1.2
CaCl ₂ , 100 mM Na ₂ CO ₃	40 ó	8.2	Calcita	0.2
	100			0.7
				1.2
CaCl ₂ , MgCl ₂ 100 mM NaHCO ₃	40 ó	8.2	Calcita/aragonita	0.2
	100			0.7
	(1:1)			1.2
MgSO ₄ , 100 mM Na ₂ CO ₃	40 ó	8.2	Aragonita	0.2
	100			0.7
				1.2

6.10 Raman

Se realizaron análisis de espectroscopía tipo Raman de los cristales obtenidos *in vitro* de la Ps19 del primer experimento de cristalización, utilizando un espectrómetro InVia micro Raman (Renishaw RM2000, Nuevo León México) con una longitud de onda de excitación de 532 nm dada por un láser YAG de 100 mW con un tamaño de muestra de 2 µm × 2 µm. Los cristales fueron escaneados por 90 segundos de 100 a 1900 cm⁻¹ por triplicado para tener una identificación específica. Para todas las mediciones, las muestras fueron colocadas a 200 µm y a 100x del objetivo fueron usados. El análisis fue realizado en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (LINAN-IPICYT).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de proteínas de la matriz de la concha de *P. sterna*.

Las proteínas (AIM y ASM) de la matriz de la concha de *P. sterna* fueron extraídas con AAG al 10% (Fig. 5). De los 20 g de concha de *P. sterna* que se procesaron se obtuvieron aproximadamente 15 g de AIM y 8 mL de ASM (Fig. 6).



Figura 5. Extracción de proteínas de la concha con AAG 10% a 4 °C de *P. sterna*.

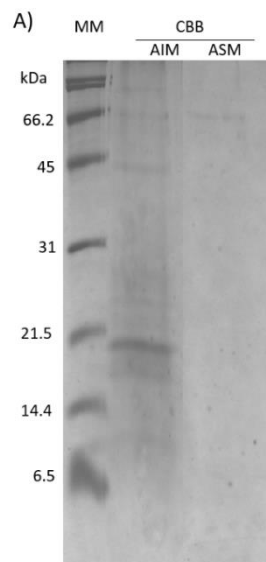


Figura 6 Perfil electroforético de proteínas de *P. sterna* de las fracciones soluble e insoluble (AAG 10%). SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. MM: marcador molecular, CBB: Coomassie Brilliant Blue, AIM: proteínas insolubles de la matriz; ASM: proteínas solubles de la matriz.

7.2 Caracterización bioquímica de proteínas de la matriz

Las proteínas de las fracciones AIM y ASM se separaron mediante electroforesis y los geles se tiñeron usando varias técnicas específicas (Fig. 7).

En la fracción AIM se identificó una abundante banda de proteína alrededor de los 19 kDa, mientras que la fracción ASM presentó menor abundancia y diversidad de proteínas (Fig. 7, CBB y SN).

Una vez identificada la banda de proteína de mayor abundancia en la fracción AIM, se procedió a evidenciar algunas de las características que están involucradas en la formación de la concha, tales como glicosilaciones y uniones a calcio. La tinción de PAS tiñó de rosa la proteína de 19 kDa, indicando que se encuentra glicosilada, mientras que la tinción Stains-All (tiñó de azul a esta misma proteína) indicó que la proteína, además, presenta uniones a calcio. La tinción adicional con nitrato de plata ayudó a mejorar la sensibilidad de la tinción con Stains-All y la de CBB (Fig. 7). A la

luz de estos resultados se purificó la proteína de 19 kDa de la fracción AIM, al ser la más abundante y presentar características de mayor interés.

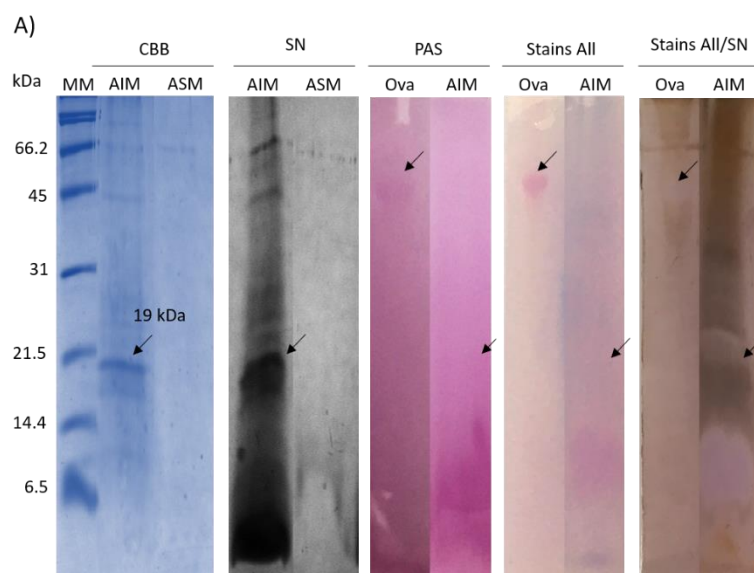


Figura 7. Caracterización mediante tinción-específica de las fracciones ASM y AIM de proteína de *P. sterna*. SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. MM: marcador molecular; CBB: Coomassie Brilliant Blue; SN: Nitrato de Plata; PAS: Ácido periódico-Schiff; Stains-All: tinción para proteínas cargadas; Stains-All/nitrato de plata: tinción para incrementar la sensibilidad del reactivo Stains-All, Ova: ovoalbúmina (control positivo en PAS y control negativo en Stains-All); AIM: proteínas insolubles de la matriz; ASM: proteínas solubles de la matriz. Las flechas indican el control positivo, control negativo o la detección de la proteína de interés en cada tinción.

7.3 Purificación de la proteína de *P. sterna* más abundante en la concha

Una vez que se observó que la proteína de 19 kDa de la AIM presentaba características bioquímicas relacionadas con la biomineralización de la concha, ésta se purificó mediante electroforesis preparativa SDS-PAGE. De las fracciones colectadas, se identificaron 25 fracciones (58-83) que contenían la proteína de 19 kDa, de acuerdo con su movilidad relativa calculada (Figs. 8 y 9). De los 890 µg de proteína sin purificar contenida en el extracto crudo de la AIM de la concha, se obtuvieron 68 µg de proteína pura, con un rendimiento del 18% y una pureza del

85% (Tabla III). Se obtuvieron 100 μL de proteína pura de los que se hicieron alícuotas de 10 μL que se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La concentración de proteína calculada por densitometría de píxeles (ver sección 6.4) de esta preparación fue de $6.8\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

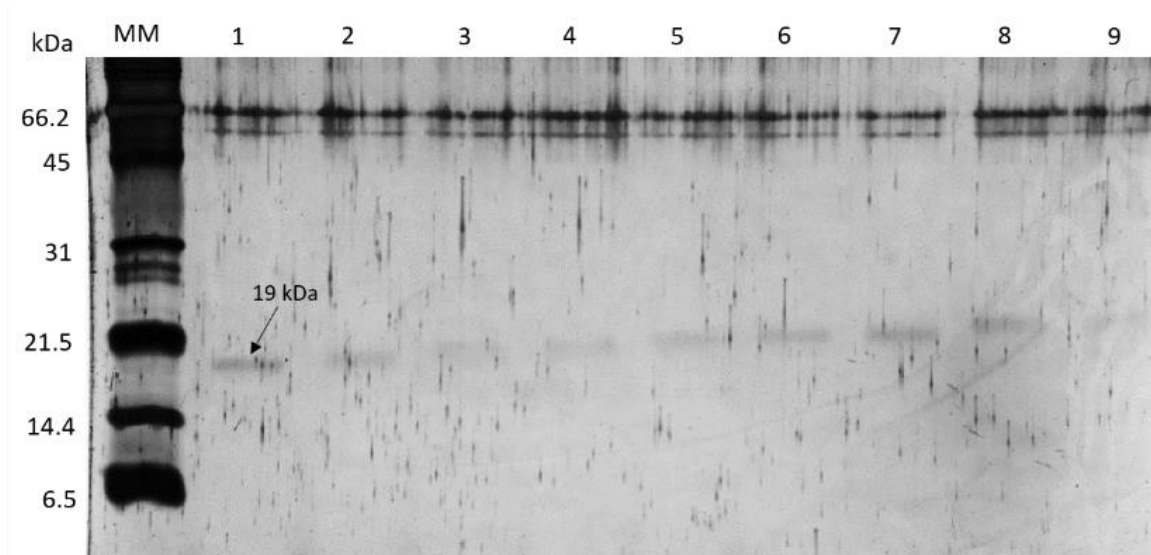


Figura 8. Perfil electroforético en SDS-PAGE de poliacrilamida al 16% de las fracciones obtenidas de la electroforesis preparativa de la fracción AIM de la concha de *P. sterna* (tinción: nitrato de plata). MM: marcador de peso molecular; 1-9: muestras aleatorias entre las fracciones 76-100. La flecha indica una de las fracciones que contienen la proteína de interés.

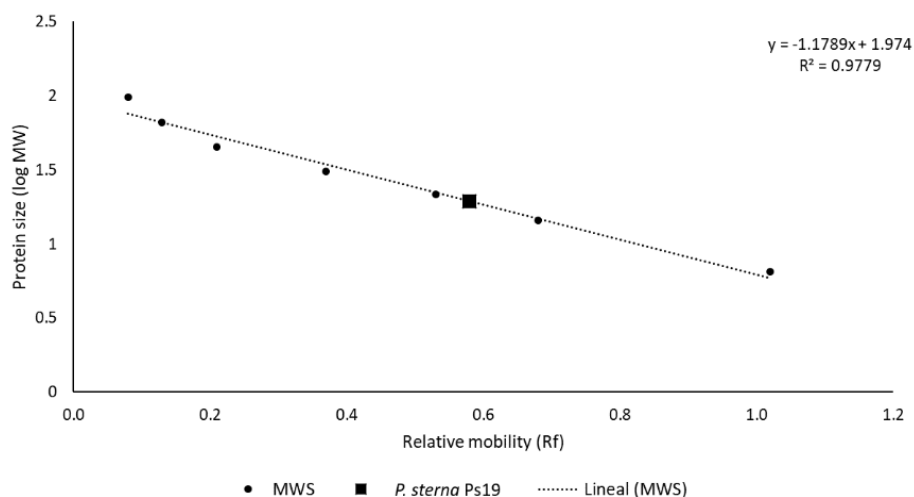


Figura 9. Cálculo del peso molecular de Ps19 de la matriz insoluble en AAG (AIM) de *P. sterna*. Estándares de proteína y Ps19 fueron separados en un gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. Los ejes representan movilidad relativa (Rf) de las proteínas y el logaritmo del peso molecular (log MW). MWS: estándar de peso molecular (Bio-Rad 1610317).

Tabla III. Purificación de Ps19 de la concha de *P. sterna*.

Especie	Paso	Proteína (mg) ^b	Proteína objetivo (mg) ^b	Rendimiento (%)	Pureza (%)
<i>P. sterna</i>	Extracto crudo ^a	0.890	0.369	100	41
	Electroforesis preparativa	0.369	0.075	20	85
	Lavado-concentración con Amicon	0.068	0.068	18	85

^a A partir de la extracción con AAG frío de 20 g de concha pulverizada de *P. sterna*.

^b Concentración de proteína determinada por densitometría de imagen utilizando Ovoalbúmina como proteína estándar.

7.4 Secuenciación proteica de Ps19

Se obtuvo la secuencia *de novo* de la proteína de 19 kDa mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. La composición aminoacídica de la proteína purificada indicó una alta proporción de Leu (17%), Asp (11%), Ser (8%) y Ala (8%), lo que corresponde potencialmente a una proteína ácida (coincide con los resultados reportados con Stains-All), con un 17% de residuos ácidos (Asp/Glu). De la digestión con tripsina y secuenciación de aminoácidos, se obtuvieron las secuencias de los once péptidos que se muestran en la tabla IV.

Utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (del inglés BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) se compararon las secuencias de los péptidos obtenidos para la proteína de 19 kDa en la secuenciación contra la base de datos de proteínas no redundantes de Mollusca del NCBI, con un corte de 0.1 para el valor de E y no se encontró ninguna homología con alguna proteína de la base de datos. Sin embargo, cuando el corte del valor de E se amplió a 3.0, la proteína de 19 kDa tuvo similitud con una proteína tipo serino beta-lactamasa de *Biomphalaria glabrata* (valor de E de 0.4), con un dominio BTB/POZ de *Aplysia californica* (100% similitud) y una proteína no caracterizada de *Mizuhopecten yessoensis* (78% similar), ambas con un valor de E de 0.5. También presentó similitud del 67% con una proteína hipotética de *Lottia gigantea* (valor de E de 1.0), una similitud del 78% con una proteína no caracterizada de *Crassostrea virginica* (valor de E de 1.0) y presentó 89% de similitud con otra proteína no caracterizada de la misma especie (valor de E de 2.1). Con una proteína hipotética de *Elysia chlorotica* presentó el 64% de similitud con un valor de E de 2.5 y con un valor de E de 3.0 presentó una similitud del 89% con una proteína no caracterizada de *Mizuhopecten yessoensis* (Tabla IV). Los resultados sugieren que la proteína no tiene homología con otras proteínas de la concha previamente descritas, por lo que se considera como una nueva proteína, a la cual se le ha nombrado Ps19 (Arroyo *et al.*, 2020).

Tabla IV. Péptidos obtenidos por secuenciación *de novo* y análisis de homología contra las proteínas no redundantes de Mollusca empleando BLAST.

No.	Secuencia	Precursor (Da)	MW	BLAST hits	Valor de E	Identidad (%)	Número de acceso (ID)
1	DLCDAGAVR	488.7	975.4	-	-	-	-
2	MDALGLANR	481.2	960.5	-	-	-	-
3	YACVQCR	478.7	955.4	-	-	-	-
4	DVTAVTWVADD LFP	798.9	1595.8	Proteína no caracterizada (<i>Crassostrea virginica</i>)	2.1	89	XP_02229 3857.1
				Proteína no caracterizada (<i>Mizuhopecten yessoensis</i>)	3.0	89	XP_02137 1593.1
5	PFVDDQYCYVLK	852.9	1703.8	Proteína no caracterizada (<i>Crassostrea virginica</i>)	1.0	78	XP_00905 7105.1
				Proteína hipotética (<i>Lottia gigantea</i>)	1.0	67	XP_00905 7105.1
6	DLSTDSTFLWAL K	840.9	1679.9	-	-	-	-
7	LWTQYNSNLCS AQLR	903.7	1805.4	-	-	-	-
8	GELNDEFSTCNS PR	979.9	1957.8	-	-	-	-
9	DGDVLMWALR	656.8	1311.6	Dominio BTB/POZ, repetición anquirina (<i>Aplysia californica</i>)	0.5	100	XP_00510 0573.1
				Proteína no caracterizada (<i>Mizuhopecten yessoensis</i>)	0.5	78	XP_02137 7093.1
10	YSLDPLSCS	924.1	1846.8	-	-	-	-
11	FPGSPYVELYKW R	967.4	1932.9	Proteína tipo serino beta-lactamasa (<i>Biomphalaria glabrata</i>)	0.4	80	XP_01308 6113.1
				Proteína hipotética (<i>Elysia chlorotica</i>)	2.5	64	RUS87181 .1

7.5 Características de proteína Ps19

Una vez purificada, se realizó la caracterización bioquímica de la Ps19 para identificar-corroborar la presencia de características de otras proteínas involucradas en la biomineralización, tales como uniones a calcio y glicosilaciones. Como se muestra en la figura 10, la proteína tiene un peso molecular de 19 kDa (calculado de acuerdo con su movilidad relativa, Figs. 9 y 10 CBB), de acuerdo con la tinción de PAS, Ps19 es una glicoproteína (rosa-PAS, Fig. 10) y potencialmente tiene uniones a calcio (azul-Stains-All, Fig. 10). La tinción con nitrato de plata intensifica la visualización de la proteína después de la tinción con Coomassie R250 y de Stains-All, e indica que no existe otra proteína en la muestra (amarillo-Satins-All/SN, Fig. 10).

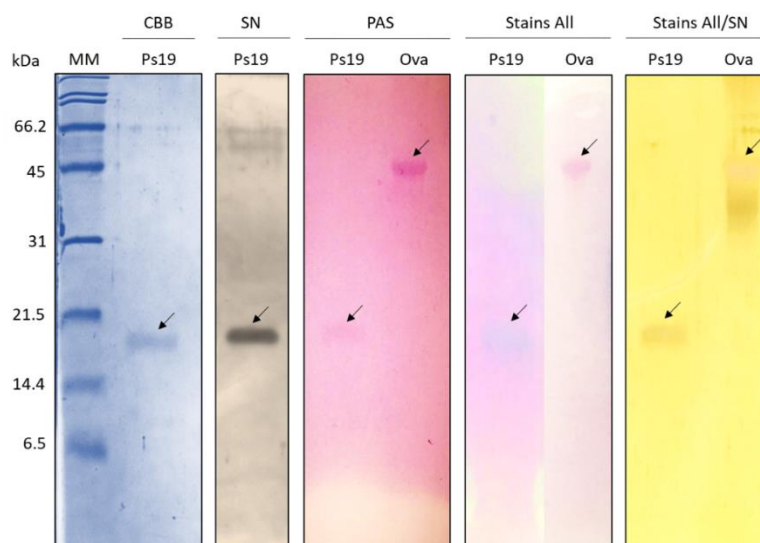


Figura 10. Caracterización bioquímica, mediante tinción-específica, de la proteína Ps19 de *P. sterna* en geles SDS-PAGE de poliacrilamida al 16%. MM: marcador de peso molecular, CBB: tinción Coomassie Brilliant Blue; SN: tinción con Nitrato de Plata; PAS: tinción Ácido Periódico-Schiff; Stains-All: tinción para proteínas cargadas; Stains-All/Nitrato de Plata: tinción para incrementar la sensibilidad del reactivo Stains-All, Ova: ovoalbúmina (como control positivo en PAS y control negativo en Stains-All). Las flechas indican el control positivo o la detección de la proteína de interés en cada tinción.

7.6 Ensayo de unión a quitina

Se analizó la capacidad de unión a quitina de Ps19 incubando la proteína purificada con quitina y realizando posteriores lavados como se describe en la metodología. Como se muestra en la figura 11, se encontró a Ps19 en el pellet tratado con el amortiguador de carga (Fig. 11, LB-Ps19, flecha), lo que indica que es capaz de unirse a la quitina a diferencia de la BSA (control negativo) que se encontró en los sobrenadantes de la reacción correspondientes a los lavados realizados (Fig. 11, LB-BSA, H₂O y NaCl 0.2 M).

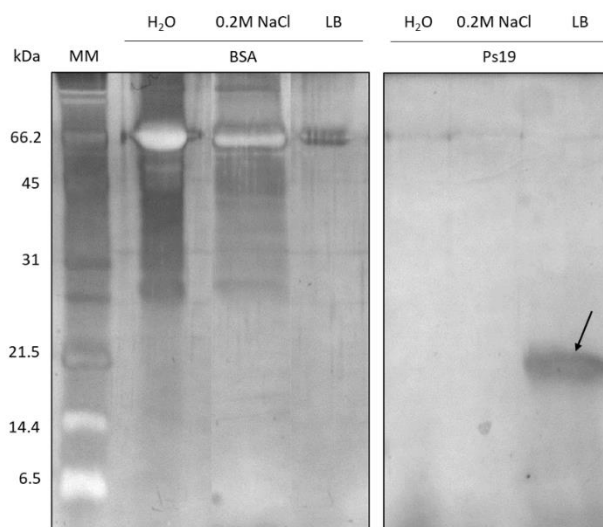


Figura 11. Ensayo de unión a quitina de Ps19 de *P. sterna*. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 16% teñido con nitrato de plata. MM: marcador de peso molecular; BSA: Albúmina sérica bovina; Ps19: proteína de 19 kDa de *P. sterna*. La flecha indica a Ps19 unida a quitina.

7.7 Estructura microscópica del nácar

Las observaciones del nácar de la concha mediante SEM revelaron una estructura laminar del tipo “pared de ladrillos” en vista transversal, y en corte longitudinal, puede apreciarse la forma geométrica de las placas de aragonita (Fig. 12).

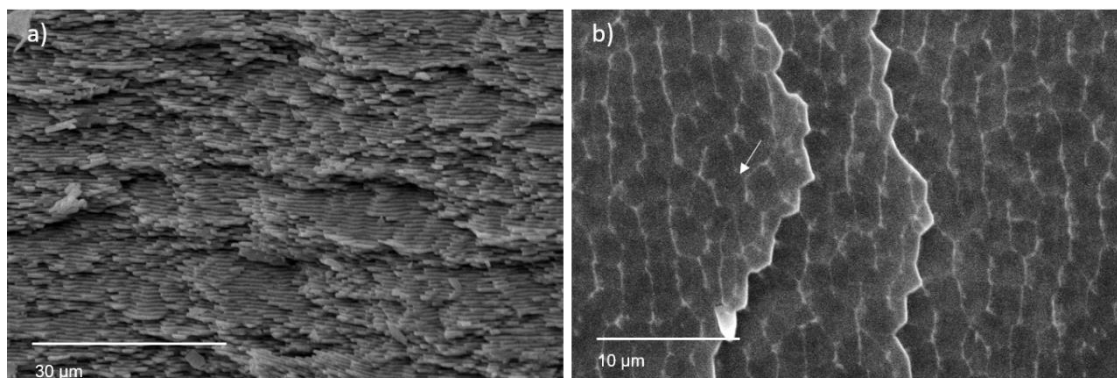


Figura 12. Estructura de la concha (capa nacarada) de *P. sterna* visualizada por SEM. a) Estructura tipo “pared de ladrillos”, b) Vista superior de placas de aragonita; la flecha indica las placas de aragonita.

7.8 Ensayos de cristalización *in vitro* de CaCO_3 en presencia de Ps19

7.8.1 Efecto de las sales sobre la cristalización *in vitro* de CaCO_3 .

La formación cristalina de CaCO_3 fue evaluada mediante SEM (sección 6.9.1 de materiales y métodos). Como se muestra en la figura 13, las observaciones SEM revelaron que cuando no se agregó proteína a la solución A (CaCl_2 40 mM pH 8.2, NaHCO_3 100 mM) y solución C (CaCO_3 100 mM), se observaron cristales de calcita, con un tamaño de 25 μm para la solución A y de 20 μm para la solución C. Estos cristales presentaron la forma geométrica típica de la calcita, con ángulos de 90° y caras lisas (Fig. 13a, c). La solución B (MgCl_2 40 mM pH 8.2, NaHCO_3 100 mM), mostró cristales de aragonita, con una morfología tipo aguja con una variación en tamaños (Fig. 13b). Cuando se añadió Ps19 a las soluciones A y B, se pudo observar la formación de placas octagonales de aragonita (Fig. 13d, e), la solución que contenía CaCl_2 (solución A), formó placas de 30 μm (Fig. 13d), mientras que la solución B (conteniendo MgCl_2) presentó placas con un tamaño de 100 μm (Fig. 13e). Sin embargo, no se observó formación de cristales al incubar la solución C (CaCO_3 100 mM) con la proteína (Fig. 13f).

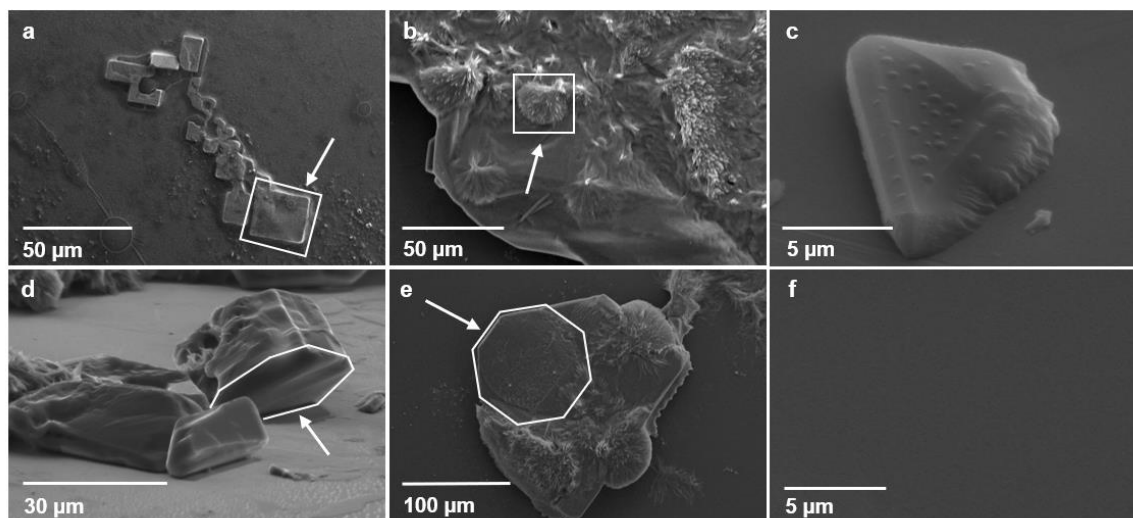


Figura 13. Efecto de Ps19 en el crecimiento de cristales de CaCO_3 en la presencia de diferentes soluciones salinas. **a:** 40 mM CaCl_2 pH 8.2, 100 mM NaHCO_3 (solución A); **b:** 40 mM MgCl_2 pH 8.2, 100 mM NaHCO_3 (solución B); **c:** 100 mM CaCO_3 (solución C). **d, e,** and **f:** Ps19 con soluciones A, B y C, respectivamente. Las flechas indican cristales de calcita en **a**, cristales de aragonita en **b**, y placas de aragonita en **d** y **e**. Las estructuras geométricas de cada caso fueron delimitadas en blanco.

7.8.2 Efecto de la concentración de proteína y de la concentración del cofactor divalente sobre la capacidad de cristalización de CaCO_3 de Ps19.

Se evaluó la formación de carbonato de calcio por medio de SEM al incubar cuatro soluciones salinas a dos molaridades diferentes (40 y 100 Mm) con tres concentraciones de Ps19 (sección 6.9.2 de materiales y métodos, Tabla II). Cuando se incubó la proteína a $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ sin la presencia de solución salina, se formaron cristales irregulares de 100 μm de longitud; los cristales se hicieron más pequeños (50 μm) y más estructurados conforme la concentración de proteína aumentó ($1.2 \mu\text{m}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) (Figs.14 y 15). Cuando MgCl_2 y MgSO_4 se encontraban a 40 mM en la solución 1 (MgCl_2 , 100 mM NaHCO_3) y solución 3 (MgSO_4 , 100mM Na_2CO_3) respectivamente, sin la presencia de proteína, se formaron cristales de aragonita en forma de espiga (Fig.14d, 4I), en la solución 3 además, se precipitó carbonato de calcio amorfo (CCA) (Fig. 4I). Las soluciones 2 (CaCl_2 , 100mM Na_2CO_3) y 4

(CaCl₂/MgCl₂, 100mM NaHCO₃) a 40 mM de cofactor, cristalizaron calcita con su típica geometría cuadrada con bordes suaves, la solución 2 formó los cristales más grandes (120 μm de largo), mientras que los cristales formados en la solución 3 eran 10 veces más pequeños.

Cuando el cofactor se encontraba a 100 mM sin la presencia de Ps19, únicamente la solución 1 formó cristales de aragonita (Fig. 15d), que fueron más abundantes que aquellos formados a 40 mM del cofactor. La solución 2 formó cristales geométricos definidos de calcita de 100-500 μm de largo (Fig. 15h), mientras que las soluciones 3 y 4 precipitaron CCA (Figs. 15 l, p). La solución 3 además precipitó CaCO₃ en su forma menos estable: vaterita (esferas en la Fig. 15l).

Ps19 fue capaz de inducir la formación de placas de aragonita a ambas concentraciones de cofactor (40 y 100 mM) cuando fue incubada con la solución 1 (Figs. 14 y 15), pero no presentaron formas definidas o regulares. En la solución 2 a 40 mM de cofactor, Ps19 fue capaz de formar tabletas hexagonales de aragonita de 100 μm con Ps19 a 0.2 y 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Fig. 14i) y tabletas incompletas de 600 μm de longitud con 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 (Fig. 14j), mientras que la misma solución (10 mM) formó placas de 500 μm cuando fue incubada con Ps19 a 0.2 y 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, con forma hexagonal (Fig. 15i) y cuadrada (Fig. 15k) respectivamente. La solución 2 a 40 mM de cofactor y con la concentración media de Ps19, cristalizaron placas incompletas con forma de diamante (4j), mientras que la misma combinación, pero a 100 mM de cofactor resultó en la formación de placas de aragonita de entre 100 a más de 500 μm de longitud apiladas una sobre otra (Fig. 15j).

La solución 3 con el cofactor a 40 mM precipitó CCA con la concentración más baja de proteína (Fig. 14m), a la concentración media de Ps19 empezaron a formarse algunas estructuras de aragonita (sin forma definida) (Fig. 14n), y a la concentración más alta de proteína se visualizaron placas de 200 μm de longitud (Fig. 14o). La solución 3 con el cofactor a 100 mM precipitó CCA a cualquier concentración de Ps19, formando películas gruesas a 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 (Figs. 15q-s).

Finalmente, la solución 4 por sí sola a 40 mM de cofactor formó cristales de calcita de menos de 10 μm de longitud, mientras que incubada con 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19, formó una película de ACC, con 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de proteína, formó placas aragoníticas de 200 μm y a 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19, precipitó espículas de aragonita de 50 μm de largo.

La solución 4 con 100 mM de cofactor formó CCA sin la presencia de Ps19 (Fig. 15p). Cuando se incubó con la menor cantidad de proteína, se siguió formando CCA, aunque la superficie se volvió más lisa (Fig. 15q). Cuando se incubó con la concentración intermedia de Ps19 se apreciaron algunas placas hexagonales de aragonita bajo lo que parece ser una película de CCA de aproximadamente 200 μm de radio (Fig. 15r) y finalmente, con la concentración más alta de proteína, además del CCA, se formaron espículas de aragonita de 50 μm de largo(15s).

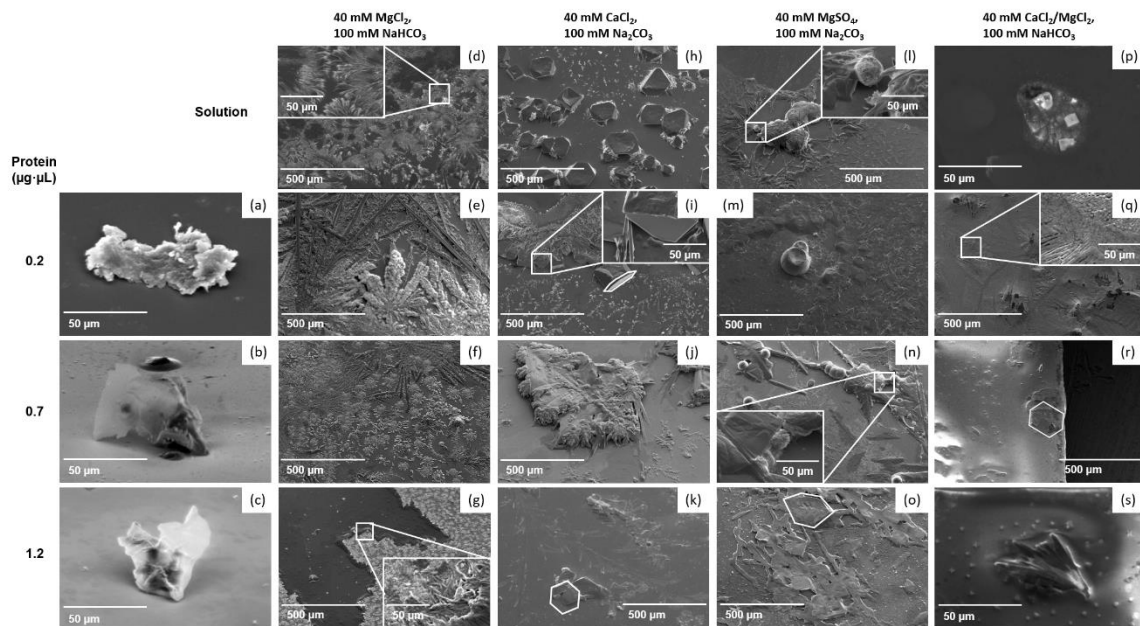


Figura 14. Efecto de Ps19 sobre la cristalización de CaCO_3 cuando se combinan cuatro soluciones salinas a 40 mM de cofactor. Proteína Ps19 incubada sola a (a) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (b) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (c) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (d) Solución 1 (40 mM MgCl_2 , 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (e-g) solución 1 con (e) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (f) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (g) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (h) Solución 2 (40 mM CaCl_2 , 100 mM Na_2CO_3) sin presencia de Ps19, (i-k) solución 2 con (i) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (j) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (k) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (l) Solución 3 (40 mM MgSO_4 , 100 mM Na_2CO_3) sin presencia de Ps19, (m-o) solución 3 con (m) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (n) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (o) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (p) Solución 4 (40 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$, 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (q-s) solución 4 con (q) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (r) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (s) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. Las estructuras fueron delimitadas con líneas blancas.

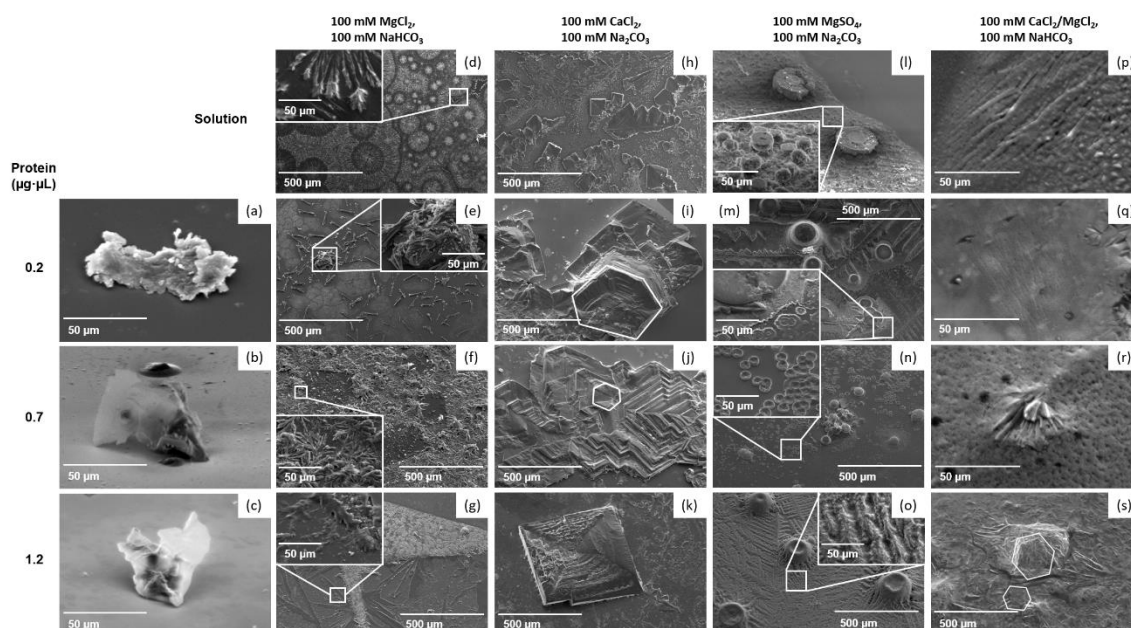


Figura 15. Efecto de Ps19 sobre la cristalización de CaCO_3 cuando se combinan cuatro soluciones salinas a 100 mM de cofactor. Proteína Ps19 incubada sola a (a) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (b) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (c) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (d) Solución 1 (100 mM MgCl_2 , 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (e-g) solución 1 con (e) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (f) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (g) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (h) Solución 2 (100 mM CaCl_2 , 100 mM Na_2CO_3) sin presencia de Ps19, (i-k) solución 2 con (i) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (j) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (k) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (l) Solución 3 (100 mM MgSO_4 , 100 mM Na_2CO_3) sin presencia de Ps19, (m-o) solución 3 con (m) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (n) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (o) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. (p) Solución 4 (100 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$, 100 mM NaHCO_3) sin presencia de Ps19, (q-s) solución 4 con (q) $0.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (r) $0.7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y (s) $1.2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Ps19 respectivamente. Las estructuras fueron delimitadas con líneas blancas.

7.9 Análisis de Raman

Se utilizó espectrometría de Raman para confirmar la identidad de la calcita y aragonita de las estructuras cristalinas obtenidas en presencia de Ps19 (Fig. 16). El espectro correspondiente de la muestra correspondiente a la figura 13 (a y e), se muestran en la figura 16. Los cristales de calcita contienen dos unidades de CaCO_3 , con un total de diez átomos; su nucleación y crecimiento del cristal, han sido ampliamente estudiados por espectrometría de Raman y por cálculos teóricos (De

La Pierre *et al.*, 2014). La presencia de modos vibracionales activos para frecuencias Raman de 282.47 cm^{-1} (oscilaciones traductoras de los grupos CO_3), 712.48 cm^{-1} (ν_4 , flexión asimétrica), y 1087.27 cm^{-1} (ν_1 , estiramiento simétrico de los grupos CO_3), confirman la formación de celdas romboédricas primitivas de calcita con un grupo espacial $D_{3d}^6(R\bar{3}C)$ y parámetros de $a= 5.03$ y $c= 17.325\text{ \AA}$, respectivamente (Rutt y Nicola 1974). Por otro lado, el espectro Raman de la aragonita muestra modos vibracionales similares a los de la calcita, pero con unos ligeros cambios hacia energías más bajas en todos sus modos, de acuerdo con su celda ortorrómbica primitiva. El cristal contiene cuatro unidades de CaCO_3 , con un total de veinte átomos; la presencia de los modos activos de Raman a 206.1 cm^{-1} , 702.595 cm^{-1} , and 1085.16 cm^{-1} , han sido reportados para cristales de aragonita en polvo y confirma la formación adecuada de la red ortorrómbica con un grupo espacial $D_{2h}^{16}(Pnma)$ y unos parámetros de celda de 5.008 , 8.029 , and 5.861 \AA para los ejes a , b , y c , respectivamente (Urmos *et al.*, 1991).

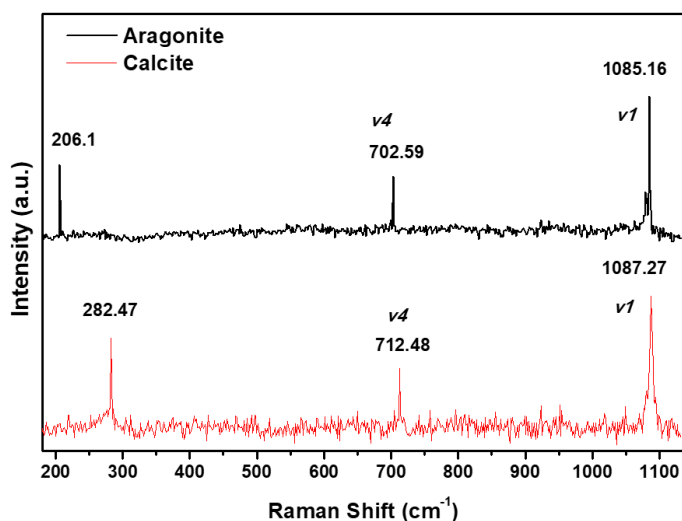


Figura 16. Espectro Raman de los cristales de calcita de los controles (línea roja) y cristales de aragonita (línea negra) inducidos por la proteína Ps19 asilada de la matriz insoluble en AAG de la concha de *P. sterna*. En rojo se muestra el espectro emitido por la calcita y en negro el emitido por la aragonita.

8. DISCUSIÓN

Se aisló y caracterizó una nueva proteína de la matriz insoluble en AAG de la concha de *P. sterna*. Estudios anteriores han reportado que las proteínas insolubles de la matriz de la concha de otros moluscos tienen una alta proporción de residuos Asp y Glu, convirtiéndolas en proteínas ácidas, lo que comúnmente presenta un reto en su purificación. La proteína Ps19 mostró una alta proporción de estos residuos (17%); por lo que puede considerarse una proteína ácida, lo que coincide con que su purificación presentó un reto, teniendo un bajo rendimiento (18%), aunque la pureza de la proteína extraída fue alta (85%). Se han extraído proteínas insolubles en AAG de otras especies y se ha hecho un gran esfuerzo por tratar de describir y caracterizarlas todas, y a pesar de que muchas han sido descritas, muchas quedan aún sin caracterizar y su papel en la biomineralización de la concha permanece sin conocerse (Liao *et al.*, 2019; Marie *et al.*, 2010, 2015).

Las pruebas bioquímicas de Ps19 muestran que es una proteína con capacidad de unión a quitina, característica esencial para las interacciones entre proteínas de la matriz y biomoléculas orgánicas para crear un marco para la mineralización del carbonato de calcio (Baqueiro y Aldana, 1995; Marie *et al.*, 2008; Marin, 2012; Nudelman, 2015). Uno de los principales componentes orgánicos interlamelares de las placas de nácar es la β -quitina, también considerada como un sitio de nucleación para las hojas de aragonita debido a su interacción con otras proteínas de la matriz (Addadi *et al.*, 2006; Bahn *et al.* 2015; Keene *et al.*, 2010). De acuerdo con esta evidencia, Ps19 puede estar involucrada no sólo en la mineralización de placas de aragonita sino también en su nucleación. Proteínas como las tipo Pif o a hichina (proteínas de la AIM) son conocidas por tener dominios conservados ricos en residuos de Gly y Cys (Feng *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2015), sin embargo, de acuerdo con el análisis de BLAST, ninguno de estos dominios fue encontrado en las secuencias de péptidos obtenidas para Ps19; pero presentó esta capacidad *in vitro*, lo que sugiere la existencia de otros dominios de unión a quitina que todavía no se conocen. Un caso similar es el de la familia Perlina/N16, que no posee un dominio

específico de unión a quitina y presenta dicha capacidad de acuerdo con análisis bioquímicos de la proteína (Montagnani *et al.*, 2011; Samata *et al.*, 1999), lo que coincide con los resultados aquí mostrados para Ps19 de *P. sterna*.

Investigaciones anteriores han reportado que proteínas como N14, N16 y MSI60 poseen dominios específicos GXN (Kono *et al.*, 2000; Samata *et al.*, 1999; Sudo *et al.*, 1997) o dominios ricos en Asp como la Aspeína (Tsukamoto *et al.*, 2004), que están involucrados con la unión a calcio en *Pinctada fucata* (Sato *et al.*, 2013). La proteína Ps19 mostró capacidad de unirse a calcio, pero la secuencia aminoacídica obtenida hasta el momento no presenta ninguno de los dominios conservados asociados a esta característica, por lo que podría tratarse de un nuevo dominio aún no descrito, o este dominio podría encontrarse en la secuencia que todavía no ha sido obtenida.

De acuerdo con el análisis de BLAST con un valor de E de 0.1, no se encontró ninguna similitud con ninguna proteína, pero al ampliar este valor a 3.0, se mostraron similitudes con un valor de E de 0.5 para el péptido 9, una con un 100% de similitud con un dominio BTB/POZ de *Aplysia californica*, que es un dominio presente en diferentes proteínas relacionadas al arreglo del citoesqueleto, regulación de la transcripción y otras funciones que involucran interacciones proteína-proteína (Aravind y Koonin, 1999). Se mostró una segunda similitud para este péptido del 78% con una proteína no caracterizada de *Mizuhopecten yessoensis*. La similitud con el dominio BTB/POZ podría indicar que Ps19 es una proteína involucrada en interacciones proteína-proteína, probablemente en la formación de las placas de aragonita, sin embargo, en qué tipo de interacción proteína-proteína está involucrada, no ha sido estudiada.

Otra similitud presente, fue la del péptido 11 con un valor de E de 0.4, con un 80% de similitud con una proteína tipo serino-beta-lactamasa de *Biomphalaria glabrata*. La beta-lactamasa es una proteína mitocondrial relacionada con la resistencia a antibióticos con actividad enzimática (Fróes *et al.*, 2016; Keckesova *et al.*, 2017),

por lo que estudios posteriores de Ps19 deben ser realizados para probar si esta proteína posee actividad enzimática o comparte alguna característica con esta familia de proteínas. Las otras similitudes encontradas fueron con proteínas no caracterizadas o con proteínas hipotéticas, por lo que sus funciones no están descritas y es necesaria más información para llegar a una conclusión.

La glicosilación es una característica de vital importancia para las SMPs, porque aporta un pH ácido a la proteína (Samata y Samata, 1990). Se ha propuesto que los azúcares ácidos, especialmente los sulfatados, pueden concentrar iones de calcio alrededor de proteínas ácidas, induciendo así la nucleación del cristal (Marie *et al.*, 2007); también pueden tener un papel importante en el reconocimiento de la superficie del mineral y en la selección del polimorfo a formar (Levi *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 2007; Samata y Samata, 1990). Ps19 mostró que es una glicoproteína, y dada su composición de aminoácidos puede ser una proteína ácida, por lo que dicha glicosilación podría ser la responsable de su capacidad de cristalizar placas de aragonita *in vitro* sin importar la sal con la que se incube.

Las soluciones saturadas que contienen HCO_3^- , Na^{2+} o Ca^{2+} cristalizan calcita, mientras que las que contienen Mg^{2+} forman cristales de aragonita. Sin embargo, cuando la calcita se encuentra en soluciones saturadas que contienen Mg^{2+} con una composición similar al agua de mar (radio molar Mg:Ca mayor a 4), sólo se observa la formación de aragonita, y si la solución se encuentra muy saturada en magnesio, puede observarse la formación de vaterita dado que ésta se estabiliza y precipita (Fricke y Volkmer, 2007).

En este trabajo, Ps19 fue capaz de unirse tanto a quitina como a iones de calcio, a pesar de que la secuencia parcial de la proteína no mostró ninguno de los dominios conservados asociados a estas características, tales como la repetición GN- o los motivos GYS, que han sido ampliamente observados en muchas de las proteínas de la matriz de la concha (Feng *et al.*, 2017; Kono *et al.*, 2000; Matsushiro *et al.*, 2003; Montagnani *et al.*, 2011; Samata *et al.*, 1999).

Ps19, como otras SMPs, es capaz de unir polisacáridos y iones de calcio, moléculas que son necesarias para la mineralización del carbonato de calcio, por lo que puede que Ps19 actúe como un intermediario entre los cristales de carbonato de calcio y la matriz orgánica. Sin embargo, podría funcionar también como una plantilla para la nucleación de aragonita, de acuerdo con los ensayos de cristalización *in vitro*. Adicionalmente a estas evidencias, es necesario realizar más análisis para corroborar el papel de Ps19 en la mineralización de la concha de *P. sterna*, así como su importancia.

Cuando las soluciones salinas saturadas se incuban con proteínas de la matriz pueden inducir la formación de cristales de calcita o aragonita, independientemente de la sal con la que se incuben (Hillner *et al.*, 1992). En esta investigación, las soluciones que formaron aragonita o calcita fueron consistentes con lo reportado en la literatura, no obstante, una vez que se añadió la proteína, la Ps19 fue capaz de inducir cristales de aragonita sin importar la sal con la que fuera incubada, indicando que es capaz de inducir selectivamente la formación de placas de aragonita *in vitro* similares al nácar. No se observó formación de cristales cuando fue incubada con la solución C (100 mM CaCO₃), lo que podría estar asociado a la concentración de proteína como han reportado otros autores, quienes han trabajado con concentraciones que oscilan entre 0.6 a 40 µg·µL⁻¹(Chen *et al.*, 2018; Weiss *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2018). Este resultado sugiere que una alta concentración de proteína podría inhibir la formación de cristales de carbonato de calcio, actuando como un regulador de la nucleación, sin embargo, se necesitan experimentos posteriores con dicha sal.

En los ensayos donde se incubaron diferentes concentraciones de Ps19 con soluciones saturadas a dos molaridades diferentes, se observó la formación de calcita, aragonita y vaterita, así como CAA, lo que puede deberse a las concentraciones de las sales y de la proteína, pues se ha reportado que algunas SMPs son capaces de estabilizar el CCA a partir del cual se forman los polimorfos

de carbonato de calcio, coincidiendo con los modelos propuestos de formación del nácar (Addadi *et al.*, 2006; Bahn *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2017).

También se ha reportado que si una solución contiene altas concentraciones de Mg^{2+} , se tiende a formar aragonita, sin embargo, esto puede variar de acuerdo al radio Mg:Ca que exista en la solución. A un radio de 4:1 entre estos elementos, la probabilidad de que se forme aragonita es mayor, mientras que a radios mayores o menores, se favorece la formación de calcita de magnesio, CAA (Declerck *et al.*, 2016; Loste *et al.*, 2003).

La selección de polimorfos de carbonato de calcio no depende únicamente de la composición de la solución salina con la que se incubó; bajo condiciones experimentales, es más sencillo que los cristales de aragonita se formen en espacios confinados (en tubos de >25 nm de diámetro), sin embargo, estas condiciones no se presentan en la naturaleza. Por ejemplo, en moluscos, las placas de nácar tienen un tamaño mayor a 25 nm debido a la presencia de las proteínas de la matriz, cuyas interacciones con los minerales y otras proteínas forman una estructura de andamiaje que permiten la existencia de dicho tamaño (Zeng *et al.*, 2018).

9. CONCLUSIONES

Este estudio describe las características bioquímicas de Ps19, una proteína de la matriz insoluble en AAG de la concha de *P. sterna*. Ps19 es una glicoproteína con capacidad de unión a calcio y a quitina, características importantes para la nucleación de aragonita. Además, Ps19 es capaz de cristalizar carbonato de calcio *in vitro* formando placas geométricas de aragonita que son necesarias en la estructuración del nácar. Sin embargo, no pudo establecerse una relación directa entre la modulación que podría ejercer Ps19 y la mineralización de CaCO_3 *in vitro*, por lo que se requieren realizar posteriores investigaciones para determinar la relación entre la concentración de proteína y sales, sobre la formación de polimorfos de CaCO_3 .

10. LITERATURA CITADA

- Addadi, L., D. Joester, F. Nudelman y Steve Weiner. 2006. Mollusk Shell Formation: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization Processes. *Chemistry - A European Journal*. 12(4):980–87.
- Albeck, S., S. Weiner y Lia Addadi. 1996. Polysaccharides of Intracrystalline Glycoproteins Modulate Calcite Crystal Growth in Vitro. *Chemistry - A European Journal*. 2(3):278–84.
- Aravind, L. y E. V. Koonin. 1999. Fold Prediction and Evolutionary Analysis of the POZ Domain: Structural and Evolutionary Relationship with the Potassium Channel Tetramerization Domain. *Journal of Molecular Biology*. 285(4):1353–61.
- Arivalagan, J., T. Yarra, B. Marie, V. A. Sleight, E. Duvernois-Berthet, M. S. Clark, A. Marie y Sophie Berland. 2017. Insights from the Shell Proteome: Biomineralization to Adaptation. *Molecular Biology and Evolution*. 34(1):66–77.
- Arroyo-Loranca, R. G., N. Y. Hernandez-Saavedra, L. Hernandez-Adame y C. Rivera-Perez. 2020. Ps19, a Novel Chitin Binding Protein from *Pteria Sterna* Capable to Mineralize Aragonite Plates in Vitro. *PLoS ONE*. 15(3):1–15.
- Bahn, S. Y., B. H. Jo, Y. S. Choi y H. J. Cha. 2017. Control of Nacre Biomineralization by Pif80 in Pearl Oyster. *Science Advances*. 3(8): 1-9.
- Bahn, S. Y., B. H. Jo, B. H. Hwang, Y. S. Choi y Hyung Joon Cha. 2015. Role of Pif97 in Nacre Biomineralization: In Vitro Characterization of Recombinant Pif97 as a Framework Protein for the Association of Organic – Inorganic Layers in Nacre. *Crystal Growth & Design*. 15(8):3666–73.
- Baqueiro, E. y D. Aldana. 1995. Mecanismo de Formacion de Conchas de Moluscos. *Avance y Perspectiva*. 14:231–36.
- Barthelat, F. 2010. Nacre from Mollusk Shells: A Model for High-Performance Structural Materials. *IOP Publishing*. 5:1–8.

- Belcher, A. M., X. H. Wu, R. J. Christensen, P. K. Hansma, G. D. Stucky y D. E. Morse. 1996. Control of Crystal Phase Switching and Orientation by Soluble Mollusc-Shell Proteins. *Nature*. 381(6577):56–58.
- Boskey, A. L. y E. Villarreal-Ramirez. 2016. Intrinsically Disordered Proteins and Biomineralization. *Matrix Biology*. 52–54:43–59.
- Caiping, M., Z. Cen, N. Yancheng, X. Liping y R. Zhang. 2005. Extraction and Purification of Matrix Protein from the Nacre of Pearl Oyster *Pinctada Fucata*. *Tsinghua Science and Technology*. 10(4):499–503.
- Cartwright, J. H. E. y A. G. Checa. 2007. The Dynamics of Nacre Self-Assembly. *Journal of the Royal Society Interface*. 4(14):491–504.
- Checa, A. G., C. Jiménez-López, A. Rodríguez-Navarro y J. P. Machado. 2007. Precipitation of Aragonite by Calcitic Bivalves in Mg-Enriched Marine Waters. *Marine Biology*. 150(5):819–27.
- Chen, Y., J. Gao, J. Xie, J. Liang, G. Zheng, L. Xie y R. Zhang. 2018. Transcriptional Regulation of the Matrix Protein Shematin-2 during Shell Formation in Pearl Oyster. *Journal of Biological Chemistry*. 293(46):17803–16.
- Coan, E. V. y P. Valentich-Scott. 2012. *Bivalve Seashells of Tropical West America: Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Peru*. Santa Barbara: 1ra ed. Santa Barbara Museum of Natural History. 1223 p.
- Dahlberg, A. E., C. W. Dingman y A. C. Peacock. 1969. Electrophoretic Characterization of Bacterial Polyribosomes in Agarose-Acrylamide Composite Gels. *Journal of Molecular Biology*. 41:139–47.
- Dauphin, Y., G. Luquet, M. Salome, L. Bellot-Gurlet y J. P. Cuif. 2018. Structure and Composition of *Unio Pictorum* Shell: Arguments for the Diversity of the Nacropismatic Arrangement in Molluscs. *Journal of Microscopy*. 270(2):156–69.

- Dauphin, Y. y J. P. Cuif. 2018. Mollusk Shells: Does the Nacro-Prismatic 'Model Exist? En: K. Endo, T. Kogure y H. Nagasawa (eds). *Biom mineralization*. Springer Singapore. Singapore. pp. 341–48.
- Declat, A., E. Reyes y O. M. Suárez. 2016. Calcium carbonate precipitation : a review of the carbonate crystallization process and applications in bioinspired composites. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 44:87–107.
- Du, J., C. Liu, G. Xu, J. Xie, L. Xie y R. Zhang. 2018. Fam20C Participates in the Shell Formation in the Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *Scientific Reports*. 8(3563):1-9.
- Duplat, D., M. Gallet, S. Berland, A. Marie, L. Dubost, M. Rousseau, S. Kamel, C. Milet, M. Brazier, E. Lopez y Laurent Bédouet. 2007. The Effect of Molecules in Mother-of-Pearl on the Decrease in Bone Resorption through the Inhibition of Osteoclast Cathepsin K. *Biomaterials*. 28(32):4769–78.
- Evans, John S.. 2008. Tuning in to Mollusk Shell Nacre- and Prismatic-Associated Protein Terminal Sequences: Implications for Biom mineralization and the Construction of High Performance Inorganic-Organic Composites. *Chemical Reviews*. 108(11):4455–62.
- Feng, D., Q. Li, H. Yu, L. Kong y S. Du. 2017. Identification of Conserved Proteins from Diverse Shell Matrix Proteome in *Crassostrea gigas*: Characterization of Genetic Bases Regulating Shell Formation. *Scientific Reports*. 7:1–12.
- Fricke, M. y D. Volkmer. 2007. Crystallization of Calcium Carbonate Beneath Insoluble Monolayers: Suitable Models of Mineral–Matrix Interactions in Biom mineralization? *Top Curr Chem*. 270:1–41.
- Fróes, A. M., F. F. da Mota, R. R. C. Cuadrat y A. M. R. Dávila. 2016. Distribution and Classification of Serine β -Lactamases in Brazilian Hospital Sewage and Other Environmental Metagenomes Deposited in Public Databases. *Frontiers in*

Microbiology. 7:1–15.

Gao, P., Z. Liao, X. X. Wang, L. F. Bao, M. H. Fan, X. M. Li, C. W. Wu y S. W. Xia. 2015. Layer-by-Layer Proteomic Analysis of *Mytilus galloprovincialis* Shell. PLoS ONE. 10(7):1–19.

Gower, L. B. 2008. Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. Chemical Reviews. 108(11):4551–4627.

Hillner, P. E., A. J. Gratz, S. Manne y P. K. Hansma. 1992. Atomic-Scale Imaging of Calcite Growth and Dissolution in Real-Time. Geology. 20(4):359–62.

Huang, G., X. Bi, B. Zhang, T. Qu, B. Liu, S. Fan y D. Yu. 2017. Expression , Purification, and Functional Activity of Shell Matrix Protein Pearlins from the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. Journal of Shellfisheries Association. 36(2):373–77.

Jiao, Y., Z. Zheng, R. Tian, X. Du y Q. Wang. 2015. MicroRNA, Pm-MiR-2305, Participates in Nacre Formation by Targeting Pearlins in Pearl Oyster *Pinctada martensii*. International Journal of Molecular Sciences. 16:21442–53.

Jin, C., J. Zhao, J. Pu, X. Liu y Jiale Li. 2019. Hichin, a Chitin Binding Protein Is Essential for the Self-Assembly of Organic Frameworks and Calcium Carbonate during Shell Formation. International Journal of Biological Macromolecules. 135:745–51.

Kalmar, L., D. Homola, G. Varga y P. Tompa. 2012. Structural Disorder in Proteins Brings Order to Crystal Growth in Biomineralization. Bone. 51(3):528–34.

Keckesova, Z., J. L. Donaher, J. De Cock, E. Freinkman, S. Lingrell, D. A. Bachovchin, B. Bieri, V. Tischler, M. C. Okondo, F. Reinhardt, P. Thiru, T. R. Golub, E. Jean y R. A. Weinberg. 2017. LACTB Is a Tumor Suppressor That Modulates Lipid Metabolism and Cell State. Nature. 543(7647):681–86.

Keene, E. C., J. S. Evans y L. A. Estroff. 2010. Silk Fibroin Hydrogels Coupled with the N16N- β -Chitin Complex: An in Vitro Organic Matrix for Controlling Calcium Carbonate Mineralization. *Crystal Growth & Design*. 10(12):5169–75.

Kiefert, L., D. McLaurin-Moreno, E. Arizmedi, H. A. Hänni y S. Elen. 2004. Cultured Pearls from the Gulf of California, Mexico. En: A. S. Keller (ed.). *Gems & Gemology*. Gemological Institute of America. pp. 26–38.

Kocot, K. M., F. Aguilera, C. McDougall, D. J. Jackson y B. M. Degnan. 2016. Sea Shell Diversity and Rapidly Evolving Secretomes: Insights into the Evolution of Biomineralization. *Frontiers in Zoology*. 13(1):1–10.

Kono, M., N. Hayashi y T. Samata. 2000. Molecular Mechanism of the Nacreous Layer Formation in *Pinctada maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 269(1):213–18.

De La Pierre, M., C. Carteret, L. Maschio, E. André, R. Orlando y R. Dovesi. 2014. The Raman Spectrum of CaCO₃ polymorphs Calcite and Aragonite: A Combined Experimental and Computational Study. *Journal of Chemical Physics*. 140(16):164509-1-164509–12.

Levi-Kalisman, Y-, G. Falini, L. Addadi y Steve Weiner. 2001. Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM. *Journal of Structural Biology*. 135(1):8–17.

Levi, Y., S. Albeck, A. Brack, S. Weiner y L. Addadi. 1998. Control over Aragonite Crystal Nucleation and Growth: An in Vitro Study of Biomineralization. *Chemistry - A European Journal*. 4(3):389–96.

Li, S., L. Xie, Z. Ma y R. Zhang. 2005. cDNA Cloning and Characterization of a Novel Calmodulin-like Protein from Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *The FEBS Journal*. 272:4899–4910.

Liao, Z., Y. T. Jiang, Q. Sun, M. H. Fan, J. X. Wang y H. Y. Liang. 2019.

Microstructure and In-Depth Proteomic Analysis of *Perna viridis* Shell. PLoS ONE. 14:1-37.

Loste, E., R. M. Wilson, R. Seshadri y F. C. Meldrum. 2003. The Role of Magnesium in Stabilising Amorphous Calcium Carbonate and Controlling Calcite Morphologies. Journal of Crystal Growth. 254(1–2):206–18.

Ma, J., K. Wong, Z. Xu, K. Au, N. Lee, C. Su, W. Su, P. Li y P. Shaw. 2016. N16, a Nacreous Protein, Inhibits Osteoclast Differentiation and Enhances Osteogenesis. Journal of Natural Products. 79(1):204–12.

Ma, Y., S. Berland, J. Andrieu, Q. Feng y L. Bédouet. 2013. What Is the Difference in Organic Matrix of Aragonite vs Vaterite Polymorph in Natural Shell and Pearl?: Study of the Pearl-Forming Freshwater Bivalve Mollusc *Hyriopsis cumingii*. Materials Science and Engineering C. 33:1521–29.

Mann, K., E. Edsinger-Gonzales y M. Mann. 2012. In-Depth Proteomic Analysis of a Mollusc Shell: Acid-Soluble and Acid-Insoluble Matrix of the Limpet *Lottia gigantea*. Proteome Science. 10(28):1–18.

Marie, B., J. Arivalagan, S. Berland, A. Marie, G. Bolbach, S. Berland y A. Marie. 2016. Deep Conservation of Bivalve Nacre Proteins Highlighted by Shell Matrix Proteomics of the Unionoida *Elliptio complanata* and *Villosa lienosa*. J. R. Soc. Interface. 14:1–11.

Marie, B., J. Arivalagan, L. Dubost, S. Berland, A. Marie y F. Marin. 2015. Unveiling the Evolution of Bivalve Nacre Proteins by Shell Proteomics of Unionoidae. Key Engineering Materials. 672:158–67.

Marie, B., C. Joubert, C. Belliard, A. Tayale, I. Zanella-Cle, Y. Gueguen y Caroline Montagnani. 2012. Characterization of MRNP34 , a Novel Methionine-Rich Nacre Protein from the Pearl Oysters. Amino Acids. 42:2009–17.

Marie, B., C. Joubert, A. Tayalé, I. Zanella-Cleón, C. Belliard, D. Piquemal, N.

Cochennec-Laureau, F. Marin, Y. Gueguen y Caroline Montagnani. 2012. Different Secretary Repertoires Control the Biomineralization Processes of Prism and Nacre Deposition of the Pearl Oyster Shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(51):20986–91.

Marie, B., G. Luquet, J. Pais De Barros, N. Guichard y S. Morel. 2007. The Shell Matrix of the Freshwater Mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida): Involvement of Acidic Polysaccharides from Glycoproteins in Nacre Mineralization. *The FEBS Journal*. 274:2933–45.

Marie, B., G. Luquet, L. Bédouet, C. Milet, N. Guichard, D. Medakovic y F. Marin. 2008. Nacre Calcification in the Freshwater Mussel *Unio pictorum*: Carbonic Anhydrase Activity and Purification of a 95 KDa Calcium-Binding Glycoprotein. *ChemBioChem*. 9(15):2515–23.

Marie, B., I. Zanella-Cléon, N. Le-Roy, M. Becchi, G. Luquet y F. Marin. 2010. Proteomic Analysis of the Acid-Soluble Nacre Matrix of the Bivalve *Unio pictorum*: Detection of Novel Carbonic Anhydrase and Putative Protease Inhibitor Proteins. *ChemBioChem*. 11(15):2138–47.

Marin, F. 2012. The Formation and Mineralization of Mollusk Shell. *Frontiers in Bioscience*. S4(1):1099–1125.

Marin, F. y G. Luquet. 2004. Molluscan Shell Proteins. *Comptes Rendus Palevol*. 3(6–7):469–92.

Marin, F., G. Luquet, B. Marie y D. Medakovic. 2007. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. *Current Topics in Developmental Biology*. 80:209–76.

Marin, F., B. Marie, S. B. Hamada, P. Silva, N. Le-Roy, S. E. Wolf, C. Montagnani, C. Joubert, D. Piquemal y Benjamin Marie. 2013. "Shellome": Proteins Involved in Mollusc Shell Biomineralization Diversity, Functions. *Recent Advances in Pearl*

Research. (33):149–66.

Marin, F., B. Pokroy, G. Luquet, P. Layrolle y K. De Groot. 2007. Protein Mapping of Calcium Carbonate Biominerals by Immunogold. *Biomaterials*. 28(14):2368–77.

Marin, F., N. Le-Roy y B. Marie. 2012. The Formation and Mineralization of Mollusk Shell. *Frontiers in Bioscience*. (S4):1099–1125.

Matsushiro, A., T. Miyashita, H. Miyamoto, K. Morimoto, B. Tonomura, A. Tanaka, y K. Sato. 2003. Presence of Protein Complex Is Prerequisite for Aragonite Crystallization in the Nacreous Layer. *Marine Biotechnology*. 5:37–44.

Meza Buendía, A. K. 2016. Respuesta fisiológica de *Pteria sterna* (gould , 1851) en relación a la concentración de alimento y temperatura (Maestría). La Paz, México. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 75 p.

Miyamoto, H., M. Yano y T. Miyashita. 2003. Similarities in the Structure of Nacrein, the Shell-Matrix Protein, in a Bivalve and a Gastropod. *Journal of Molluscan Studies*. 69(1):87–89.

Miyashita, T., R. Takagi, M. Okushima, S. Nakano, H. Miyamoto, E. Nishikawa y A. Matsushiro. 2000. Complementary DNA Cloning and Characterization of Pearlin, a New Class of Matrix Protein in the Nacreous Layer of Oyster Pearls. *Marine Biotechnology*. 2(5):409–18.

Montagnani, C., B. Marie, F. Marin, C. Belliard, F. Riquet, A. Tayalé, I. Zanella-Cléon, E. Fleury, Y. Gueguen, D. Piquemal y N. Cochenec-Laureau. 2011. Pmarg-Pearlin Is a Matrix Protein Involved in Nacre Framework Formation in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *ChemBioChem*. 12(13):2033–43.

Monteforte, M. y M. Cariño-Olvera. 2018. A History of Nacre and Pearls in the Gulf of California. En: L. Price y N. Narchi (eds.). *Coastal Heritage and Cultural Resilience*. Springer. pp. 79–112.

- Mouries, L., M. Almeida, C. Milet, S. Berland y E. Lopez. 2002. Bioactivity of Nacre Water-Soluble Organic Matrix from the Bivalve Mollusk *Pinctada maxima* in Three Mammalian Cell Types : Fibroblasts , Bone Marrow Stromal Cells and Osteoblasts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 132:217–29.
- Neff, J. M. 1972. Ultrastructure of the Outer Epithelium of the Mantle in the Clam *Mercenaria mercenaria* in Relation to Calcification of the Shell. *Tissue and Cell*. 4(4):591–600.
- Nudelman, F.. 2015. Nacre Biomineralisation: A Review on the Mechanisms of Crystal Nucleation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 46:2–10.
- Nudelman, F., E. Shimoni, E. Klein, M. Rousseau, X. Bourrat, E. Lopez, L. Addadi, y Steve Weiner. 2008. Forming Nacreous Layer of the Shells of the Bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera* : An Environmental- and Cryo-Scanning Electron Microscopy Study. *Journal of Structural Biology*. 162:290–300.
- Olson, I. C., A. Z. Blonsky, N. Tamura, M. Kunz, B. Pokroy, C. P. Romao, M. Anne White y P. Gilbert. 2013. Crystal Nucleation and Near-Epitaxial Growth in Nacre. *Journal of Structural Biology*. 184(3):454–63.
- Rabilloud, T., L. Vuillard, C. Gilly y J. J. Lawrence. 1994. Silver-Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels: A General Overview. *Cellular and Molecular Biology*. 40(1):57–75.
- Rousseau, M., A. Meibom, M. Gèze, X. Bourrat, M. Angellier y Evelyne Lopez. 2009. Dynamics of Sheet Nacre Formation in Bivalves. *Journal of Structural Biology*. 165(3):190–95.
- Rutt, H. N. y J. H. Nicola. 1974. Raman Spectra of Carbonates of Calcite Structure. *Journal of Physics C: Solid State Physics*. 7(24):4522–28.
- Samata, T. y T. Samata. 1990. Ca-Binding Glycoproteins in Molluscan Shells with

Different Types of Ultrastructure. *The Veliger*. 33:190–201.

Samata, T., N. Hayashi, M. Kono, K. Hasegawa, C. Horita y S. Akera. 1999. A New Matrix Protein Family Related to the Nacreous Layer Formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Letters*. 462(1–2):225–29.

Sato, Y., N. Inoue, T. Ishikawa, R. Ishibashi, M. Obata, H. Aoki, T. Atsumi y A. Komaru. 2013. Pearl Microstructure and Expression of Shell Matrix Protein Genes MSI31 and MSI60 in the Pearl Sac Epithelium of *Pinctada fucata* by *in situ* Hybridization. *PLoS ONE*. 8(1):1-9.

Serna-Gallo, I., J. M. J. Ruíz-Velazco, H. Acosta-Salmón, E. Peña-Messina, G. Torres-Zepeda y P. E. Suecedo. 2014. Growth and Reproduction Patterns of the Winged Pearl Oyster, *Pteria sterna*, Cultivated in Tropical Environments of Mexico: Implications for Pearl Farming. *Ciencias Marinas*. 40(2):75–88.

Song, X., Z. Liu, L. Wang y L. Song. 2019. Recent Advances of Shell Matrix Proteins and Cellular Orchestration in Marine Molluscan Shell Biomineralization. *Frontiers in Marine Science*. 6 (41):1-16.

Sudo, S., T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, y T. Takahashi. 1997. Structures of Mollusc Shell Framework Proteins. *Nature*. 387(6633):563–64.

Suzuki, M., A. Iwashima, N. Tsutsui, T. Ohira, T. Kogure y H. Nagasawa. 2011. Identification and Characterisation of a Calcium Carbonate-Binding Protein, Blue Mussel Shell Protein (BMSP), from the Nacreous Layer. *ChemBioChem*. 12(16):2478–87.

Suzuki, M., K. Saruwatari, T. Kogure, Y. Yamamoto, T. Nishimura, T. Kato y H. Nagasawa. 2009. An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science*. 325(5946):1388–90.

Towe, K. M. y G. H. Hamilton. 1967. Ultrastructure and Inferred Calcification of the

Mature and Developing Nacre in Bivalve Mollusks. *Calcified Tissue Research*. 1(1):306–18.

Tsukamoto, D., I. Sarashina y K. Endo. 2004. Structure and Expression of an Unusually Acidic Matrix Protein of Pearl Oyster Shells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 320:1175–80.

Tushtev, K., M. Murck y G. Grathwohl. 2008. On the Nature of the Stiffness of Nacre. *Materials Science and Engineering C*. 28(7):1164–72.

Urmos, J., F. Sharma y F. T. Mackenzie. 1991. Characterization of Some Biogenic Carbonates with Raman Spectroscopy. *American Mineralogist*. 76:641–46.

Vincent, S. G., P. R. Cunningham, N. L. Sgstephens, A. J. Halayko, J. T. Fisher. 1997. Quantitative densitometry of proteins stained with Coomassie Blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software. *Electrophoresis*. 18:67-71.

Walker, J. M., B. Marzec y Fabio Nudelman. 2017. Solid-State Transformation of Amorphous Calcium Carbonate to Aragonite Captured by CryoTEM. *Angewandte Chemie - International Edition*. 56(39):11740–43.

Wang, S. N., X. H. Yan, R. Wang, D. H. Yu y X. X. Wang. 2013. A Microstructural Study of Individual Nacre Tablet of *Pinctada maxima*. *Journal of Structural Biology*. 183(3):404–11.

Weiner, S., Y. Levi-Kalishman, S. Raz y L. Addadi. 2003. Biologically Formed Amorphous Calcium Carbonate. *Connective Tissue Research*. 44(1):214–18.

Weiss, I. M., S. Kaufmann, K. Mann y M. Fritz. 2000. Purification and Characterization of Perlucin and Perlustrin, Two New Proteins from the Shell of the Mollusc *Haliothis laevigata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267(1):17–21.

Wilt, F. H. 2005. *Developmental Biology Meets Materials Science: Morphogenesis*

of Biomineralized Structures. *Developmental Biology*. 280(1):15–25.

Xie, L., F. Zhu, Y. Zhou, C. Yang y R. Zhang. 2011. Molecular Approaches to Undertand Biomineralization of Shell Nacreous Layer. En: Müller, W. E. G.P (ed.). *Molecular Biomineralization, Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer-Verlag. Berlin. pp. 331–52.

Xu, Z., Y. Liu, J. Lin, K. Cheng, Y. Wang, H. Yao, W. Peng, H. Wu, W. Su, P. C. Shaw y P. Li. 2018. Preparative Expression and Purification of a Nacreous Protein N16 and Testing Its Effect on Osteoporosis Rat Model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 111:440–45.

Yang, D., Y. Yan, X. Yang, J. Liu, G. Zheng, L. Xie y R. Zhang. 2019. A Basic Protein, N25, from a Mollusk Modifies Calcium Carbonate Morphology and Shell Biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*. 294(21):8371–83.

Zacharius, R. M., T. E. Zell, J. H. Morrison y J. J. Woodlock. 1969. Glycoprotein Staining Following Electrophoresis on Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*. 30(1):148–52.

Zeng, M., Y. Kim, C. Anduix-Canto, C. Frontera, D. Laundry, N. Kapur, H. K. Christenson y F. C. Meldrum. 2018. Confinement Generates Single-Crystal Aragonite Rods at Room Temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 201718926.

Zhang, C., L. Xie, J. Huang, X. Liu y R. Zhang. 2006. A Novel Matrix Protein Family Participating in the Prismatic Layer Framework Formation of Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 344(3):735–40.

Zhang, C. y R. Zhang. 2006. Matrix Proteins in the Outer Shells of Molluscs. *Marine Biotechnology*. 8(6):572–86.

Zhang, R., L. Xie y Z. Yan. 2018. Biomineralization Mechanism of the Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. Springer. Singapore. 737p.

Zhang, Y., L. Xie, Q. Meng, T. Jiang, R. Pu, L. Chen y R. Zhang. 2003. A Novel Matrix Protein Participating in the Nacre Framework Formation of Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 135(3):565–73.