

Estudio descriptivo de la hemolinfa de *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby, 1833. (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). II Cuantificación de la hemoglobina celular y plasmática *

ESTHER URIA GALICIA **, HECTOR FERNANDEZ ARIAS **
Y TERESA MIRANDA AVILA

Departamento de Morfología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
Apartado Postal 42-186
11340 México, D. F.

URIA GALICIA, E., H. FERNÁNDEZ ARIAS y T. MIRANDA AVILA, 1988. Estudio descriptivo de la hemolinfa de *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby, 1833. (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). II Cuantificación de la hemoglobina celular y plasmática. *An. Esc. nac. Cienc. biol. Méx.*, 32: 75-81.

RESUMEN: Se investiga la naturaleza del pigmento respiratorio presente en *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby, 1833.

A través del estudio químico y morfológico de la hemolinfa se encuentra que tal pigmento es hemoglobina A, misma que se encuentra en su mayor proporción en el interior de las células cafés o eritrocitos.

En el plasma se determina la existencia de cantidades pequeñas de pigmentos hemotales.

Se discuten, finalmente, los resultados y perspectivas a futuro.

INTRODUCCIÓN

Existen dos mecanismos oxidativos a partir de los cuales los organismos obtienen la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas; uno de ellos —la fermentación— se efectúa en ausencia de oxígeno. El otro, por el contrario, necesita de este elemento y se conoce como respiración.

Para asegurar el aporte del oxígeno necesario en la respiración, han surgido

* Trabajo perteneciente al Proyecto "Estudio sobre diversos aspectos de la morfología microscópica de *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby, 1833" patrocinado por la Dirección de Graduados, IPN.

* Becario de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA) del IPN.

los llamados pigmentos respiratorios a lo largo del proceso evolutivo, a la par del desarrollo de aparatos circulatorios y de ventilación.

En los invertebrados se han descrito diversos pigmentos respiratorios (Wajcman, 1980) tales como: hemocianinas, hemoglobinas, eritrocruorinas, clorocruorinas y hemeritrinas. Estas moléculas existen dentro o fuera de las células especializadas, o bien, circulan libremente en líquidos como el hemocélico o la hemolinfa (Mill, 1972).

Particularmente en los moluscos gasterópodos, cefalópodos y anfineuros el pigmento más frecuente es la hemocianina cuya molécula contiene cobre (Eskeland, 1967; Manwell, 1963). Por otra parte, se informa que ciertas especies de planórbidos como *Biomphalaria glabrata* y *Planorbarius corneus*, contienen hemoglobina en la hemolinfa y en otros tejidos (Cheng, 1975; Sminia y col. 1972).

Parece ser que la mayoría de los lamelibranquios carece de pigmentos, otros tienen hemocianina y finalmente algunas especies de bivalvos contienen hemoglobina. Este es el caso de *Poromya granulata*, *Solen legumen*, *Tellina planta*, *Capsa fragilis*, *Arca perata*, *Anadara inflata*, *A. transversa*, *A. brasiliensis* y *A. lienosa floridensis*, entre otros (Cohen y Nemhauser, 1980; Read, 1962).

En cuanto a la localización de la hemoglobina, se informa que puede estar contenida en eritrocitos u otro tipo de célula especializada, en músculos y en otros tejidos, o estar en forma soluble en el plasma.

Tomando en consideración el antecedente de que varias especies del género *Anadara* contienen hemoglobina, y dado que la hemolinfa de *Anadara tuberculosa* es de un color café rojizo y pudiera también contenerla (Flores, 1982; Hernández, 1982), con el presente trabajo nos proponemos determinar si el pigmento presente es realmente hemoglobina; y por otra parte establecer si su localización es intra o extracelular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Previo identificación por los autores se trabajaron 24 ejemplares que provenían de Mazatlán, Sin.; Salina Cruz, Oax. y de Yucatán. Los animales se adquirieron en diferentes meses a lo largo de un año, por lo que variaron en peso (30-90 g) y tamaño (6.0 a 7.5 cm × 4.5 a 5.0 cm).

Después de lavarlos se obtuvo la hemolinfa por punción cardíaca, en cantidades de 0.5 a 1.0 ml. El plasma se separó por centrifugación a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos. Con la hemolinfa total, con el plasma, o con el paquete celular lisado, se realizaron diferentes pruebas como se indica a continuación. Como controles se usaron muestras de sangre humana de adulto o fetal según el caso.

1. Determinación de hemoglobina (Hb). La hemoglobina se cuantificó tanto en el plasma como en el paquete celular lisado, con los métodos de la Cianometahemoglobina y de la Bencidina (Cartwright, 1973).
2. Pruebas para hemoglobina fetal (HbF). Considerando que la hemoglobina buscada no fuera del tipo A sino fetal, se ensayaron las siguientes pruebas:
 - a) Método cualitativo (Raphael y col, 1976). En esta prueba se aprove-

- cha la resistencia de la HbF a la desnaturalización por los álcalis. Al centro de un papel filtro se colocan cuatro gotas de NaOH al 1 % y una gota de la muestra diluida 1:2 en solución isotónica. Después de 1-2 min. se lee la prueba: HbA — color pardo-verduzco y HbF — color rosado.
- b) Método de desnaturalización según Singer y Chernoff (Cartwright, *op. cit.*). El fundamento es semejante a la prueba anterior, pero el filtrado que se obtiene, puede leerse al espectrofotómetro y calcularse la concentración de HbF.
- c) Prueba microscópica de elución con ácido para HbF. Técnica de Kleihauer (Raphael y col. *op. cit.*). La HbA se eluye fácilmente al someter las células que la contienen a la acción de un amortiguador de fosfatos pH 3.2; mientras que las células con HbF resisten la elución. La prueba se aplica sobre frotis de una muestra diluida, por lo tanto, las células que tienen HbF aparecen oscuras sobre un fondo claro y las que contienen HbA se ven claras.

RESULTADOS

1. Los valores de hemoglobina que se obtuvieron al cuantificar el plasma y el paquete celular lisado se presentan en el cuadro 1.
2. Determinación de hemoglobina fetal.

Los resultados obtenidos con el método cualitativo, la desnaturalización con álcalis y la elución con ácido (Fig. 1), indican que el tipo de hemoglobina presente en la hemolinfa de *A. tuberculosa* es de tipo A.

DISCUSIÓN

Hay referencias que indican la existencia de hemoglobina en algunos moluscos y los autores señalan que se encuentra específicamente en células a las que se les denomina eritrocitos (Cohen y Nemhauser). Por su parte, *Anadara tuberculosa* contiene dos tipos celulares, las células con gránulos de color café que presumiblemente contienen el pigmento y las células espiculares con capacidad fagocítica (Flores, *op. cit.*; Hernández y col., *op. cit.*; Aguilar y col., 1982).

Los resultados del presente estudio muestran que en efecto la hemolinfa de *A. tuberculosa* presenta hemoglobina y se localiza en las células café; sin embargo, como ocurre en otros invertebrados, el pigmento también se encuentra en forma soluble en el plasma.

A este respecto, el cuadro 1 que presenta los resultados de la cuantificación de la hemoglobina, indica que los dos métodos utilizados detectan el pigmento bajo condiciones diferentes. La Cianometahemoglobina se emplea como método de rutina en la clínica humana y su sensibilidad permite medir cantidades que pueden expresarse en g/100 ml; mientras que el método de la bencidina, más sensible, cuantifica hasta 1.0 mg/ml de pigmentos hem totales (Cartwright, *op. cit.*).

Observando el cuadro mencionado notamos que las cantidades de Hb en la hemolinfa completa y en el paquete celular lisado son semejantes, tanto en las

muestras individuales como en su promedio; $\bar{x} = 3.2$ y 3.6 g % respectivamente.

Esto quiere decir que la hemoglobina está en el interior de las células en cantidades considerables. Por otra parte, las pruebas para diferenciar HbA de HbF, señalan que el pigmento es de tipo A y que se encuentra como se mencionaba, en las células granulares cafés.

El mismo método de la cianometahemoglobina, aplicado al plasma da valores de cero, pero el de la bencidina proporciona un valor promedio de 2.6 mg %. De manera que si la mayor proporción de Hb es intracelular, hay una parte pequeña en forma soluble.

Por conocimientos en el humano, se sabe que el catabolismo de la Hb es diferente cuando los eritrocitos se destruyen en el sistema retículo endotelial (SRE) y cuando ocurre una hemólisis intravascular (Orten y Neuhaus, 1984; Williams, 1972). En el primer caso, la degradación de la Hb se lleva a cabo en células del SRE fundamentalmente en el bazo y el producto de transformación es bilirrubina; ésta es transportada por la albúmina plasmática hasta el hígado, transformada y excretada.

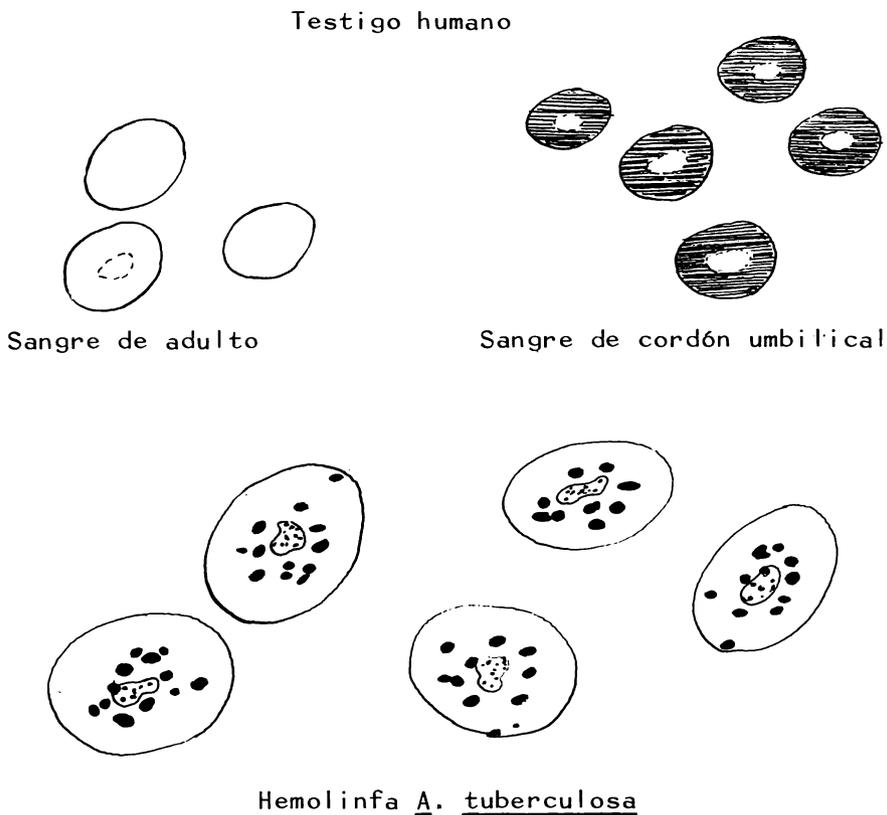


Figura 1.

CUADRO 1. Valores de hemoglobina

No. de determinación	Hemolinfa total Cianometa hemoglobina g %	Hemoglobina Plasma		Paquete celular lisado Cianometa hemoglobina g %
		Cianometa hemoglobina g %	Bencidina mg %	
1	3.3	Cero	2.3	2.9
2	2.8	Cero	2.4	3.1
3	3.1	Cero	2.4	2.9
4	3.1	Cero	2.7	3.0
5	1.6	Cero	2.2	2.7
6	2.3	Cero	2.3	2.8
7	2.0	Cero	2.3	3.2
8	3.6	Cero	2.3	5.0
9	3.5	Cero	2.6	3.9
10	1.7	Cero	2.5	3.9
11	5.6	Cero	2.4	2.5
12	4.3	Cero	2.6	2.2
13	4.3	Cero	2.7	5.9
14	3.9	Cero	3.0	4.7
15	3.0	Cero	2.6	4.9
16	3.4	Cero	3.0	3.7
17	5.6	Cero	2.8	4.0
18	5.1	Cero	3.8	5.2
19	2.5	Cero	3.6	3.4
20	2.4	Cero		
21	2.6	Cero		
22	2.7	Cero		
23	2.9	Cero		
24	2.9	Cero		
Valor mínimo	1.6		2.2	2.2
Valor máximo	5.6		3.8	5.9
Media \bar{x}	3.2		2.6	3.6
D. S.	± 1.1		± 0.4	± 1.0

Cuando los eritrocitos se destruyen en el interior de los vasos sanguíneos, la hemoglobina liberada se conoce como Hb-libre, que es transportada como complejo haptoglobina-hemoglobina (HpHb2) hasta células del SRE en donde se degrada a bilirrubina. Sin embargo, cuando se satura la capacidad de transporte, se puede determinar Hb-libre en el plasma, aunque ésta se oxida rápidamente a metahemoglobina y metahemalbúmina. La Hb-libre y la metahemoglobina se eliminan por la orina y la metahemalbúmina se cataboliza en el SRE.

El proceso de hemólisis intravascular en el humano se presenta bajo algún trauma o en síndromes como la esferocitosis hereditaria o la hemoglobinuria paroxística nocturna. Por el contrario, en *A. tuberculosa* la destrucción de células con Hb parece ser lo normal. La ultraestructura de las células cafés sugie-

re, por sus resultados preliminares, que las células circulantes no son totalmente jóvenes y que algunas presentan francos signos de degeneración (Fernández y col., no publicado); por lo tanto resulta posible que liberen parte de su contenido. Sin embargo, la destrucción de la población celular, en general, debe ocurrir en otro sitio pues la cantidad de Hb en el plasma y la frecuencia de las imágenes degenerativas así lo sugieren. Queda por lo tanto investigar cuál o cuáles serían esos sitios.

También resulta interesante determinar en el futuro las formas bajo las cuales se encuentra la Hb plasmática, pues la técnica de la bencidina no hace diferencias a ese nivel entre los pigmentos hem totales (Hb-libre metahemoglobina y metahemalbúmina).

Igualmente se desconocen otros datos importantes sobre la Hb de *A. tuberculosa* y que se han estudiado principalmente en *A. inflata* (Ui, 1957; Sasakawa y Walter, 1971 a, b; Sasakawa y Satake, 1967; Yagui y col. 1957 a, b), por ejemplo: peso molecular, estructura molecular de la hemoglobina o hemoglobinas presentes y su efectividad en el sistema de transporte de oxígeno.

CONCLUSIONES

El pigmento que se encuentra en la hemolinfa de *Anadara tuberculosa* es hemoglobina.

La hemoglobina es de tipo A y se localiza en su mayor proporción en el interior de las células cafés o eritrocitos. No se ha establecido hasta el presente su localización intracelular precisa.

En menor cantidad, la hemoglobina circula en forma soluble en el plasma. La(s) forma(s) circulante(s) deben ser investigadas, pues hasta el momento solamente se han determinado como pigmentos hem totales.

Se abren varias perspectivas de investigación para complementar el conocimiento sobre aspectos biológicos, morfológicos y químicos del pigmento respiratorio de *A. tuberculosa*.

SUMMARY

The identity of the respiratory pigment present in the Hemolymph of *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby, 1833. As Hemoglobin-A. was supported by chemical and morphological studies.

Results indicate that the great majority of respiratory pigment occurs in Brown cells (erythrocytes). In addition an small quantity of plasm total Hem groups was also demonstrated.

Results and futures perspectives are discussed.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, M. B., A. M. HERNÁNDEZ, E. URÍA y H. FERNÁNDEZ, 1982. Estudio preliminar sobre las propiedades fagocíticas de *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby, 1833. Memorias VI Congreso Nacional de Zoología, Mazatlán, Sin., pp. 1-12.

- CARTWRIGHT, G. E., 1973. *El laboratorio en el diagnóstico hematológico*, Ed. Científico-Médica, España, pp. 84-96; 350-353.
- CHENG, T. C., 1975. Does cooper cause anemia in *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.*, **26** (3): 421-422.
- COHEN, W. D. AND I. NEMHAUSER, 1980. Association of Centrioles with the marginal band of a Molluscan Erythrocyte. *J. Cell. Biol.*, **86** (1): 286-291.
- ESKELAND, T., 1967. Ultrastructure of hemocyanin components from the Gastropod *Buccinum undatum*. *J. Ultrastr. Res.*, **17**: 544-564.
- FLORES, E. I., 1982. Estudio de los elementos formes presentes en la hemolinfa de *Anadara (Anadara) tuberculosa* Sowerby 1833. Tesis profesional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- HERNÁNDEZ, S. A. M., H. FERNÁNDEZ y E. URÍA, 1982. Algunos aspectos generales de los hemocitos de *Anadara (Anadara) tuberculosa*. Sowerby 1833. Memorias del VI Congreso Nacional de Zoología, Mazatlán, Sin., pp. 17-29.
- MANWELL, C., 1963. The chemistry and Biology of Hemoglobin in some marine clams I. Distribution of the pigment and properties of the oxygen equilibrium. *Comp. Biochem. Physiol.*, **8**: 209-218.
- MILL, P. J., 1972. *Respiration in the Invertebrates*. The Macmillan Press Limited, London, 212 pp.
- ORTEN, J. M. y O. W. NEUHAUS, 1984. *Bioquímica humana*, 10a. Ed., Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1016 pp.
- RAPHAEL, S. S., CH. F. A. CULLING, T. A. HYDE, M. J. INWOOD, L. D. MELLOR, F. SERGOVICH, F. SPENCER AND S. THOMPSON, 1976. *Lynch's Medical Laboratory Technology*, Vol. II, Third Edition, LUB. Saunders Co. Philadelphia, pp. 1125-1126.
- READ, K. R. H., 1962. The Hemoglobin of the bivalved mollusc, *Phacoides pectinatus* Gmelin. *Biol. Bull.*, **123**: 605-617.
- SASAKAWA, S. AND K. SATAKE, 1967. On the molecular weight of Hemoglobin from *Anadara inflata* at various pH. *J. Biochem.*, **62**: 139.
- SASAKAWA, S. AND H. WALTER, 1971a. Blood clam (*Anadara inflata*) red cells partition in aqueous two-polymer phase systems. *Biochim. Biophys. Acta.*, **244**: 452-460.
- 1971b. Blood clam (*Anadara inflata*) Hemoglobins. Partition in aqueous two-polymer phase systems and alkali denaturation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **244**: 461-465.
- SMINIA, T., H. H. BOER AND A. NIEMANTSVERDIET, 1972. Hemoglobin producing cells in freshwater snails. *Z. Zellforsch.*, **135**: 563-568.
- UI, J., 1957. On the molecular weight of Hemoglobin of *Anadara inflata* (Reeve), *J. Biochem.*, **44** (1): 9-10.
- WAJCMAN, H., 1980. L'Hémoglobine. Serie "Le Biologiste", Press Universitaire, France, Paris, 165 pp.
- WILLIAMS, W. J., E. BEUTLER, A. J. ERSLEV AND R. W. RUNDLES, 1972. *Hematology*, Second Edition, McGraw-Hill Book Co., U. S. A., 1755 pp.
- YAGUI, Y., T. MISHIMA, T. TSUJIMURA, K. SATO AND F. EGAMI, 1957. Studies on the Hemoglobin of *Anadara inflata* (Reeve), I. Purification and properties of the crystalline Hemoglobin. *J. Biochem.*, **44** (1): 1-7.
- YAGUI, Y., T. TSUJIMURA AND K. SATO, 1957. Studies on the Hemoglobin of *Anadara inflata* (Reeve), II. Terminal aminoacid residues, *J. Biochem.*, **44** (1): 11-23.