



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“RECONOCIMIENTO QUÍMICO BIOELECTROSENSIBLE DE IONES CARBONATO POR
PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

HUGO JAVIER SERRANO POSADA



TUTOR: Dr. ABEL MORENO CÁRCAMO

AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Abel Moreno Cárcamo en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**) contando con el apoyo de:

DGAPA-UNAM

Proyecto IN214506

CONACyT

Proyecto 58515-Q

Y se presentó en el Simposio Interno del Instituto de Química.

Realizado el 4 de abril de 2008 en la UNAM, México D.F.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Josué y Lindelia, a mis hermanos, Néstor y Laura, y a Ginna, mi amor. Gracias por el apoyo y comprensión durante estos dos años. Gracias por la fortaleza que han tenido para poder soportar la distancia.

AGRADECIMIENTOS

A mi señor Jesucristo, hijo de mi Dios santo, señor todopoderoso, creador del cielo y también creador de la tierra.

A mi abuelo José Omar Serrano, mi tío Holmes Serrano y mi tía Norha Serrano porque sin su ayuda no hubiese sido posible viajar a México y cumplir con este objetivo. Muchas gracias por el interés que han tenido con mi educación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), porque a pesar de ser extranjero me dió educación gratuita y con recursos del pueblo mexicano. Gracias por la infinita nobleza de su política.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo, por dejarme realizar mi tesis de maestría en su grupo de investigación.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), por la beca PAPIIT otorgada durante los 12 meses del año 2007.

A Deyanira Fuentes, Juan Pablo Reyes-Grajeda y Azucena E. Jiménez Corona, por brindarme su amistad y por compartir conmigo toda su experiencia en el campo académico.

ÍNDICE	Pág.
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. ANTECEDENTES	3
IV. OBJETIVOS	6
V. JUSTIFICACIÓN	7
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Biomineralización	8
1.2. Biomineralización en cascarones de huevo	9
1.3. Proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves	12
1.4. Biomimética y aplicación al diseño de biomateriales	16
1.5. Caracterización bioquímica de los componentes proteicos	17
1.6. Estudios de dispersión dinámica de luz (DLS)	17
1.7. Voltamperometría cíclica	20
2. SECCIÓN EXPERIMENTAL	
Caracterización bioquímica	
Protocolo de aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1 y SCA-2	24
Estudios de dispersión dinámica de luz. Determinación de los estados de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 en función de la temperatura	25
Influencia de las proteínas SCA-1 y SCA-2 sobre la cristalización del carbonato de calcio	26

Interacción de las proteínas SCA-1 y SCA-2 con iones carbonato. Aplicaciones al diseño de un biosensor de iones carbonato	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Caracterización bioquímica	
3.1.1. Aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1 y SCA-2	31
Estudios de dispersión dinámica de luz. Determinación de los estados de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 en función de la temperatura	34
3.2. Influencia de las proteínas SCA-1 y SCA-2 sobre la cristalización del carbonato de calcio	46
3.3. Interacción de las proteínas SCA-1 y SCA-2 con iones carbonato. Aplicaciones al diseño de un biosensor de iones carbonato	48
4. CONCLUSIONES	56
5. PERSPECTIVAS	58
6. REFERENCIAS	59
APÉNDICE A. Índice de figuras	63
APÉNDICE B. <i>Crystal Growth & Design</i> , 2008 , 8, 1340-1345.	68

I. RESUMEN

La biomineralización investiga cómo los organismos forman minerales mediante un proceso frecuentemente asistido por biomacromoléculas (matriz orgánica). Se ha postulado que esta matriz orgánica y principalmente las proteínas podrían ser las responsables del proceso de nucleación y crecimiento de cristales. Los cascarones de huevo, por su rápida formación vía mineralización, son un excelente modelo para entender los fundamentos de la biomineralización. En este trabajo se reporta el aislamiento y purificación de las struthiocalcinas-1 y -2 (**SCA-1** y **SCA-2**), proteínas encontradas en la sección intramineral del cascarón de huevo de avestruz (*Struthio camelus*). La purificación se realizó mediante cromatografía de HPLC fase reversa (HPLC-RP). Estas dos proteínas fueron caracterizadas por técnicas electroforéticas, mientras que los estudios de dispersión dinámica de luz (DLS) determinaron los estados de agregación de las proteínas a diferentes temperaturas en agua y en solución amortiguadora. Con el objetivo de observar la interacción proteína-carbonato se construyó un prototipo de biosensor de iones carbonato usando un electrodo de pasta de carbono y proteínas adsorbidas en su superficie. Finalmente se investigó la influencia de estas dos proteínas en experimentos de cristalización *in vitro* de carbonato de calcio (calcita).

II. ABSTRACT

Knowing the mechanisms of the mineralization process at molecular recognition level is an essential step to understand the biomineralization process in living organisms. The purification of Struthiocalcins-1 and -2 (**SCA-1** and **SCA-2**) proteins, obtained from the intramineral part of the ostrich's eggshell (*Struthio camelus*), was performed by using Reverse Phase HPLC chromatography. To obtain a better insight about their solubility behavior at different temperatures in water and in buffer solution, dynamic light scattering experiments were carried out. We studied the influence of the intramineral proteins SCA-1 and SCA-2 on the crystal growth behavior of calcium carbonate (calcite). This study showed important changes in the crystal habit and the nucleation process of calcium carbonate. A prototype of carbonate biosensor was constructed using a carbon paste-based electrode and proteins adsorbed on the surface of this electrode.

III. ANTECEDENTES

Muchos biominerales conocidos en la naturaleza presentan propiedades sorprendentes, entre ellos, la capacidad innata de formarse a temperatura y presión ambiente. Este tipo de observaciones inspiraron décadas de investigaciones, enfocadas siempre en descubrir algunos de sus “secretos estructurales”, específicamente, el o los mecanismos utilizados por los organismos para formarlos. El primer trabajo formal de biomineralización fue realizado por Lowenstam en 1962 (Weiner & Addadi, 2002), en el que se describió la biomineralización de magnetita en dientes de quitones (moluscos). Desde entonces y hasta ahora se han descrito más de 70 tipos diferentes de minerales en seres vivos (Weiner & Addadi, 2002). Estos biominerales participan en una amplia variedad de procesos biológicos como la formación de huesos, dientes, conchas, cáscaras de huevos o en procesos patológicos como las calcificaciones cardiovasculares y los cálculos renales. El cascarón del huevo de las aves está compuesto de un 95 % de carbonato de calcio (CaCO_3). Se cree que las *proteínas asociadas a estos biominerales* podrían ser las responsables del proceso de nucleación y crecimiento de cristales. Reyes-Grajeda (2002, 2004) purificó, cristalizó y resolvió la estructura tridimensional de la proteína ovocleidina-17 (OC-17). La OC-17 es la principal proteína intramineral del cascarón de huevo de gallina común. Recientemente se cristalizó la proteína SCA-1 del cascarón de huevo de avestruz (Reyes-Grajeda, 2007) (**Figura 1**). Al parecer, estas proteínas intraminerales son las encargadas de formar los primeros núcleos cristalinos de carbonato de calcio, que son necesarios para que se forme posteriormente la estructura biomineralizada del cascarón de huevo (**Figura 2**). En vista de esto, Reyes-Grajeda (2004) intentó introducir iones calcio dentro de la estructura de la OC-17 por difusión de iones calcio a través de los cristales de proteína de OC-17 (*soaking*) para observar los sitios específicos de enlace, sin embargo, al comparar los mapas de densidad electrónica de los cristales de OC-17 no observó ninguna diferencia que correspondiera a la unión de iones calcio. En este trabajo también se demostró

por análisis de secuencia que la OC-17 no conserva los residuos responsables de coordinar iones calcio y por primera vez se plantea la posibilidad de que estas proteínas intraminerales **interactúen con iones carbonato** para formar los primeros núcleos cristalinos de carbonato de calcio.

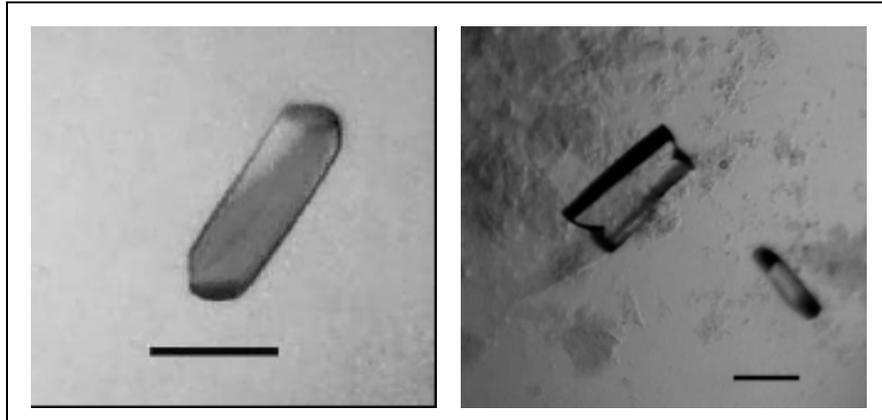


Figura 1. a) Cristal de la OC-17, b) Cristales de la SCA-1. Escala: 0.1 mm.

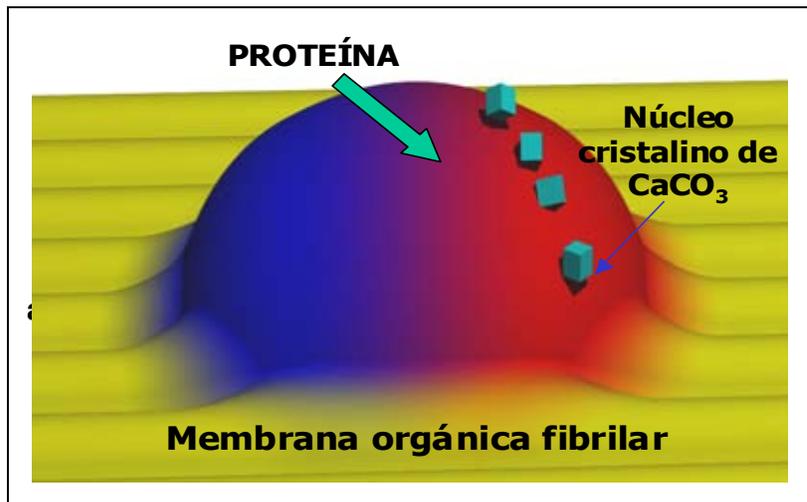


Figura 2. Representación esquemática de la nucleación del carbonato de calcio por parte de una proteína intramineral del cascarón de huevo de las aves.

In vivo, el proceso de biomineralización del cascarón de huevo de gallina se lleva a cabo a un pH de 7.5 y una concentración de ión calcio de 10 mM y de ión carbonato de 70 mM (Fernández et al., 2004). Este mismo autor demostró que los núcleos cristalinos de carbonato

de calcio se forman a un pH 7.4 sobre las mamilas (zonas ricas en proteínas intraminerales) de la membrana orgánica fibrilar del cascarón de huevo. A este valor de pH, la concentración del ión bicarbonato se ve favorecida ya que se observan dos equilibrios químicos entre el ácido carbónico-bicarbonato y bicarbonato-carbonato con valores de pK_1 6.31 y pK_2 10.33 respectivamente. Esto demuestra que las proteínas intraminerales tienen la capacidad de formar núcleos cristalinos de carbonato de calcio en un medio rico en iones bicarbonato (**Figura 3**).

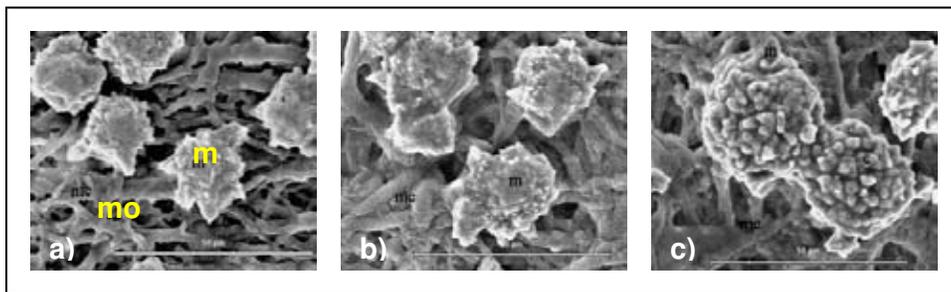


Figura 3. **a)** Vista frontal de las mamilas (m) depositadas sobre la membrana orgánica fibrilar (mo) del cascarón de huevo de gallina común, **b)** pequeños cristales de CaCO_3 depositados sobre las mamilas (24 horas), **c)** grandes cristales de CaCO_3 depositados sobre las mamilas (72 horas) (Fernández et al., 2004).

Lakshminarayanan (2005) utiliza la dispersión dinámica de luz (DLS) para demostrar el proceso de agregación de la proteína intramineral ansocalcina del cascarón de huevo de ganso (*Anser anser*) y de la proteína OC-17. De esta manera se plantea la posibilidad de que estas proteínas intraminerales formen una especie de “templado” como los que se observan en cada una de las mamilas de la figura 3. Es muy probable que este proceso de agregación esté asociado con la función biológica de estas proteínas, por lo que en este trabajo se aíslan, se purifican y se caracterizan por distintos métodos las proteínas intraminerales SCA-1 y SCA-2 del cascarón de huevo de avestruz. De esta manera se pretende entender el papel de estas proteínas en el proceso de biomineralización del cascarón de huevo.

IV. OBJETIVOS

General

Caracterización de algunos de los componentes macromoleculares involucrados en el proceso de biomineralización del cascarón de huevo de avestruz.

Particulares

- Aislar y purificar las proteínas SCA-1 y SCA-2 de la sección intramineral del cascarón de huevo de avestruz.
- Caracterizar bioquímicamente las proteínas SCA-1 y SCA-2.
- Realizar estudios de DLS para observar los estados de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 a diferentes temperaturas en agua y en solución amortiguadora.
- Estudiar la influencia de las proteínas SCA-1 y SCA-2 sobre la cristalización *in vitro* de carbonato de calcio (calcita).
- Realizar estudios electroquímicos de voltamperometría cíclica para observar la interacción proteína-carbonato.

V. JUSTIFICACIÓN

Una de las características que distingue a los materiales biológicos mineralizados de los materiales sintéticos es la presencia de un *complejo ensamble de macromoléculas*. Es sorprendente ver el control que tienen muchos organismos sobre la formación de materiales biológicos mineralizados. Orientación en la nucleación, control sobre la morfología cristalina, formación de mezclas complejas entre proteínas y arreglos cristalinos, son sólo algunos ejemplos que evidencian esta maravillosa capacidad biológica. Sin embargo, en la actualidad se conoce muy poco acerca de las estrategias utilizadas por los organismos para formar materiales superiores, ya que el nivel de organización estructural de los biominerales se jerarquiza a menudo en distintos órdenes estructurales para producir una estructura final muy compleja. Uno de los modelos de biomineralización más impresionantes es el cascarón de huevo de las aves, llegándose a formar en el caso de la gallina común, hasta 5 gramos de carbonato de calcio en menos de 24 horas (Lakshminarayanan et al., 2003). La caracterización de los componentes macromoleculares involucrados en este proceso es de vital importancia para llegar a entender el o los mecanismos utilizados por los organismos vivos para la formación de estos biominerales y en un futuro poder desarrollar “materiales a la medida” basándose en los de origen biogénico. Las proteínas intraminerales más abundantes del cascarón de huevo de avestruz son las struthiocalcinas-1 y -2 (SCA-1 y SCA-2). Se cree que estas proteínas SCA-1 y SCA-2 son las encargadas *de la fase de nucleación inicial* para que se forme posteriormente la estructura mineralizada. En este trabajo se aíslan y purifican las proteínas SCA-1 y SCA-2, se caracterizan bioquímicamente, se realizan estudios de DLS, experimentos de cristalización *in vitro* de carbonato de calcio y experimentos electroquímicos para poder entender el papel que tienen en el proceso de biomineralización del cascaron de huevo de avestruz y ampliar en un futuro este conocimiento a otros procesos de biomineralización más complejos.

1. INTRODUCCIÓN

Biom mineralización

Los organismos han estado usando minerales de una forma u otra desde hace aproximadamente 3500 millones de años. La evidencia de esta forma temprana de manipulación mineral está preservada en los fósiles estromatolíticos. Los estromatolitos son comunidades de organismos procarióticos que indirectamente inducen la formación de minerales para envolverse a si mismos, es decir, se agrupan en colonias formando rocas sedimentarias. Desde esta época, los organismos lentamente desarrollaron la habilidad de controlar la formación mineral. Hace aproximadamente 540 millones de años, en un periodo de unos pocos millones de años, una multitud de organismos multicelulares empezaron a producir estructuras esqueléticas mineralizadas. En este periodo crucial, las bases estructurales de la biom mineralización se establecieron (Addadi, 1992).

Hoy en día se conoce un gran número de biom minerales. Estos se encuentran en organismos unicelulares y multicelulares. La mayoría contienen cationes divalentes de metales alcalinotérreos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) unidos a aniones como los carbonatos, oxalatos, sulfatos, fosfatos, e hidróxidos / óxidos. Menos comunes son los metales como el Mn, Au, Ag, Pt, Cu, Zn, Cd, y Pb que se depositan en algunas bacterias, generalmente como sulfitos metálicos (Mann, 1989).

En la biom mineralización, las formas cristalinas o amorfas generalmente están asociadas con una función biológica específica, por ejemplo: fuerza mecánica (dientes), soporte estructural, protección de tejidos blandos y protección contra depredadores (huesos, conchas, cascarones de huevos). También se utilizan biom minerales para incrementar la densidad celular o como sensores magnéticos y de gravedad (Mann, 1989; Chasteen & Harrison, 1999; Wilt, 1999).

Dos procesos de biom mineralización han sido descritos: el primero se conoce como mineralización “**inducida biológicamente**”, en donde la formación de los biom minerales es

inducida por los organismos, como resultado de la interacción entre los metabolitos biológicos y los iones presentes en el medio ambiente. El segundo proceso se conoce como mineralización mediada por “**matriz orgánica**” y consiste en la formación de la fase mineral sobre un esqueleto estructural orgánico preformado, conocido como matriz orgánica. Esta matriz orgánica se compone principalmente de lípidos, polisacáridos y proteínas (Sarashina & Endo, 1998).

Las matrices orgánicas son producidas como armazones insolubles constituidos por macromoléculas principalmente hidrofóbicas (colágeno, quitina, celulosa), sobre las cuales se encuentran sujetas macromoléculas hidrofílicas. *Éstas últimas pueden presentar una superficie de nucleación activa hacia la solución externa* (Mann, 2001).

Biom mineralización en cascarones de huevo

Los cascarones de huevo son estructuras mineralizadas utilizadas para el desarrollo de los embriones de un gran número de especies. Éstos no sólo proveen protección al embrión, sino que también regulan el agua, el gas, el intercambio iónico y son una fuente de calcio esencial para la formación del esqueleto del embrión (Arias *et al.*, 1993). El componente mineralizado de todos los cascarones de huevos de las aves es la calcita, uno de los polimorfos del carbonato de calcio (CaCO_3). El carbonato de calcio existe en tres formas diferentes en la naturaleza: calcita, aragonita y vaterita. Bajo condiciones normales, la calcita es la fase termodinámica más estable y es la que se encuentra en cascarones de huevos de aves y muchos reptiles. En general, la porción mineralizada de los cascarones de huevo está dividida en cutícula, palizada mineral y botones mamilares internos (zona mamilar) (**Figura 4**). Estas zonas han sido identificadas en diferentes especies de aves mostrando básicamente la misma arquitectura (Hincke, 2000; Panheleux *et al.*, 1999) (**Figura 5**).

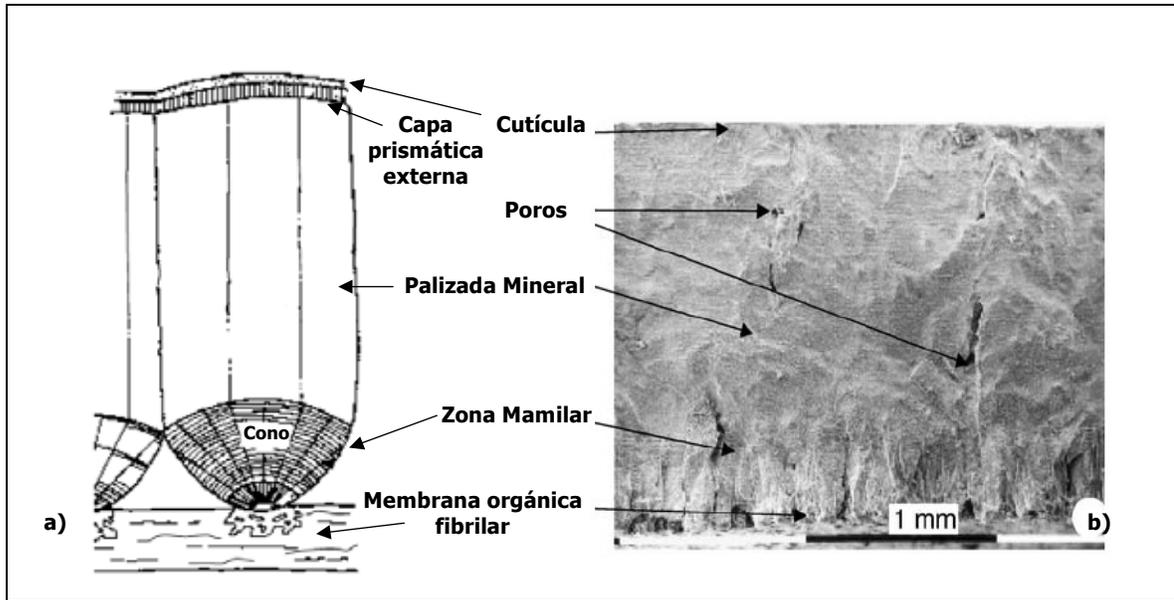


Figura 4. a) Esquema general del cascarón de huevo de las aves, **b)** Vista transversal del cascarón de huevo de avestruz (Dauphin, 2006).

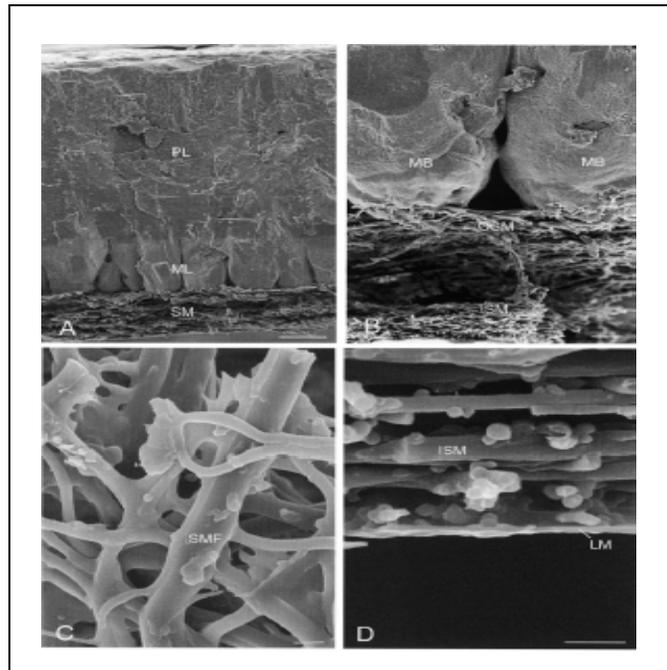


Figura 5. a) Vista transversal del cascarón de huevo de gallina común, **b)** Vista transversal de la interfase entre la membrana orgánica fibrilar y la zona mamilar, **c)** Vista frontal de la membrana orgánica fibrilar, **d)** Vista lateral de la membrana orgánica fibrilar (Hincke, 2000).

El cascarón de huevo de avestruz está compuesto aproximadamente de un 96 % de calcita y un 4 % de fase orgánica (Heredia, 2005). Es de color blanco y mide 15 cm de largo x 13 cm de ancho aproximadamente. La palizada mineral está formada principalmente de carbonato de calcio, aunque se han encontrado pequeñas cantidades de Mg, S, P, Fe, Ba, Mn y Sr (Dauphin, 2006). La fracción orgánica del cascarón, es decir, aquella encontrada en la zona mamilar y la palizada mineral, está compuesta de proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos (sulfato de queratán y sulfato de dermatán) (Solomon, 1999; Fernández et al., 1997).

Estas biomacromoléculas podrían ser las responsables del proceso de nucleación, depositación y control de la morfología cristalina del cascarón de huevo. Sin embargo, en la zona mamilar se encuentran una serie de proteínas específicas del cascarón de huevo, las cuales podrían ser las responsables del control de la nucleación del carbonato de calcio (Fernández et al., 1997).

Después del proceso de extracción (ácido acético al 10 %) de esta fase orgánica (matriz orgánica), aproximadamente la mitad de ella permanece como matriz insoluble. De la matriz soluble se han aislado y caracterizado diversas proteínas (ovocleidinas, ovocalixinas, osteopontina, ovoalbúmina, lisozima, ovotransferrina, etc). Sin embargo, las matrices solubles de los cascarones de los huevos de aves, contienen principalmente una o dos proteínas con un **dominio similar al de lectina tipo-C (CTLTD)**. Lectinas tipo-C y proteínas con un CTLD son muy comunes en los animales (Drickamer, 1999). Las verdaderas lectinas de esta superfamilia contienen una secuencia de aminoácidos característica altamente conservada, responsable del enlace calcio-dependiente de carbohidratos. En los miembros no-lectínicos estos aminoácidos usualmente no están conservados. La función que se le atribuye a las proteínas con un CTLD es el enlace proteína-proteína (Mann, 2006).

Proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves

La matriz soluble del cascarón de huevo de gallina y ganso contiene una sola proteína con un CTLD, la ovocleidina-17 (OC-17) (Hincke et al., 1995) y la ansocalcina (ANCA) (Lakshminarayanan et al., 2002, 2003), respectivamente. Por su parte, la matriz soluble del cascarón de huevo de avestruz contiene dos proteínas con un CTLD, las struthiocalcinas-1 y -2 (SCA-1 y SCA-2) (Mann, 2004).

La proteína SCA-1 (**PM: 15,343.2 ± 4 Da**) es claramente ortóloga (misma función, distintos organismos) a la ansocalcina, su secuencia de aminoácidos tiene la misma longitud que la ansocalcina (**132 aa**) y muestra una identidad en la secuencia de aminoácidos del 65 %,

comparada con un 41 % con la OC-17. La SCA-1 y la ansocalcina tienen siete cisteínas y carecen de modificaciones postraduccionales. La proteína SCA-2 (**PM: 16,834.1 ± 2 Da**) muestra características de ambas, su secuencia es 46 % idéntica a la ansocalcina y 36 % idéntica a la OC-17. Sin embargo, la longitud de la secuencia de aminoácidos de la SCA-2 es idéntica a la de la OC-17 (**142 aa**) y contiene seis cisteínas, las cuales están conservadas en la mayoría de las proteínas con un CTLD. Además de esto, la SCA-2 presenta tres serinas fosforiladas localizadas exactamente en la misma región de la secuencia en la cual se encuentran las dos fosfoserinas de la OC-17. Estas características hacen más similares estructuralmente a la SCA-2 y la OC-17 (Mann, 2004).

El avestruz es un miembro de la familia de las ratites (corredoras) y su origen es africano. Otras especies emparentadas con ella son el emú de Australia, el ñandú (rhea americana) de Sudamérica, el kiwi, el casuario y dos aves extintas: el ave elefante y el moa (Dauphin, 2006). Las ratites son un grupo de aves que se caracterizan por ser buenas corredoras, que han perdido la capacidad de volar y que anidan en el suelo. Recientemente se aislaron cuatro proteínas con un CTLD, las dromaiocalcinas-1 y -2 (DCA-1 y DCA-2) de la matriz soluble del cascarón de huevo de emú (*Dromaius novaehollandiae*) y las rheacalcinas-1 y -2 (RCA-1 y RCA-2) de la matriz soluble del cascarón de huevo de rhea (*Rhea americana*) (Mann, 2006). Con base en lo anterior se pueden dividir las proteínas de las ratites en dos grupos (**Figura 6**).

Grupo 1: SCA-1, DCA-1 y RCA-1, las cuales muestran entre 70-77 % de identidad en su secuencia de aminoácidos, carecen de fosforilaciones y tienen un número variable de cisteínas (entre 7-9). **Grupo 2:** SCA-2, DCA-2 y RCA-2, las cuales muestran entre 78-85 % de identidad en su secuencia de aminoácidos, 2-3 serinas fosforiladas (localizadas exactamente en el mismo sitio de sus secuencias) y tienen seis cisteínas conservadas. Mientras que la ansocalcina se puede incluir perfectamente en el grupo 1, con una identidad de secuencia entre el 63-70 % con los otros miembros, no presenta fosforilaciones y tiene siete cisteínas; la

OC-17 puede incluirse en el grupo 2, con una identidad de secuencia entre 42-47 % (37-39 % con el grupo 1), dos serinas fosforiladas y seis cisteínas. Es desconcertante y desconocido por qué las ratites necesitan dos proteínas con un CTLD para construir su cascarón, mientras que la gallina y el ganso necesitan sólo una (Mann, 2006). En la **figura 7** se puede ver con más detalle la relación estructural entre estas proteínas.

Figura 6. Porcentajes en la identidad de secuencia de aminoácidos entre proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves (Mann, 2006).

	RCA-1	DCA-1	SCA-1	ANCA	RCA-2	DCA-2	SCA-2	OC-17
DCA-1	77.0							
SCA-1	73.5	69.7						
ANCA	69.7	63.6	62.9					
RCA-2	45.2	45.8	45.4	47.0				
DCA-2	43.0	43.7	43.2	44.7	78.2			
SCA-2	43.7	44.4	43.9	44.7	84.5	82.4		
OC-17	37.8	37.3	38.6	35.6	46.5	42.3	43.7	

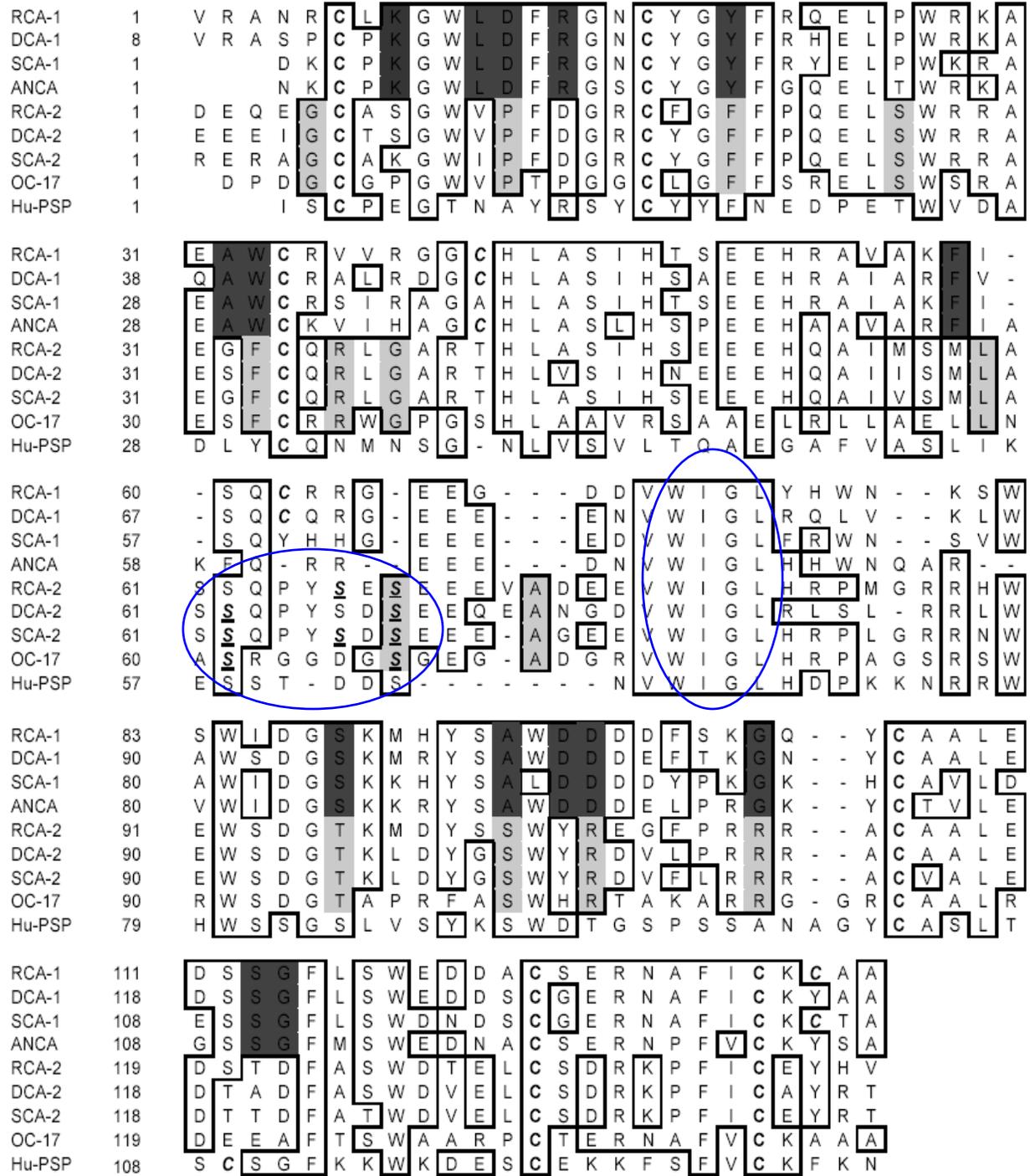


Figura 7. Alineamiento de secuencias entre proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves. Las serinas fosforiladas están subrayadas (S). Las cisteínas preservadas en todas las proteínas están en negrita (**C**) y las cisteínas extras están en negrita y cursiva (***C***). Hu-PSP: proteína litostatina de cálculos pancreáticos humanos (Mann, 2006).

Los datos estructurales disponibles hasta el momento demuestran una arquitectura común en el patrón de plegamiento de las proteínas intraminerales con un CTLD (**Figura 8**).

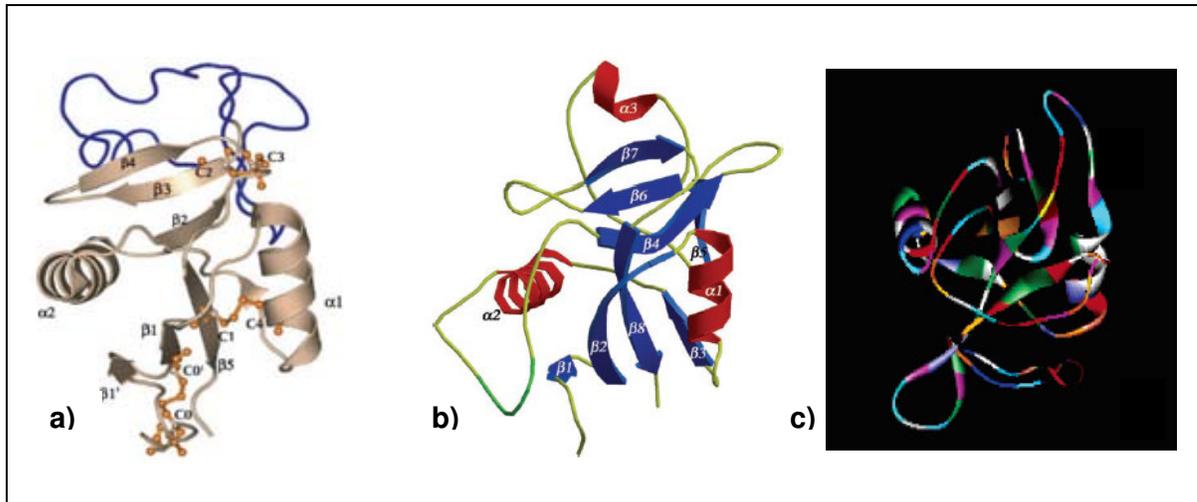


Figura 8. **a)** Representación ideal de una proteína con un CTLD. En “azul” se observa la región responsable de la unión de iones calcio (Zelensky, 2005), **b)** Estructura cristalina de la OC-17 (Reyes-Grajeda, 2004), **c)** Modelo molecular de la ansocalcina (Lakshminarayanan, 2005).

En su topología general, las proteínas intraminerales con un CTLD presentan estructuras α y β . Tienen dos hélices α que se encuentran perpendicularmente orientadas una con relación a la otra y rodeando a dos láminas β antiparalelas. Dentro de la secuencia se puede observar el motivo “WIGL” altamente conservado en las proteínas con un CTLD (**Figuras 7 y 9**) y el cual sirve como marcador en el análisis de secuencia (Zelensky, 2005).

En la proteína de unión a manosa de rata (rat mannose binding protein = RMBP), se pueden observar los motivos “EPN” y “WND” responsables de la coordinación del ion calcio (Zelensky, 2005). Las proteínas SCA-1, SCA-2 y OC-17 no conservan estos residuos responsables de coordinar al ion calcio (**Figura 9**).

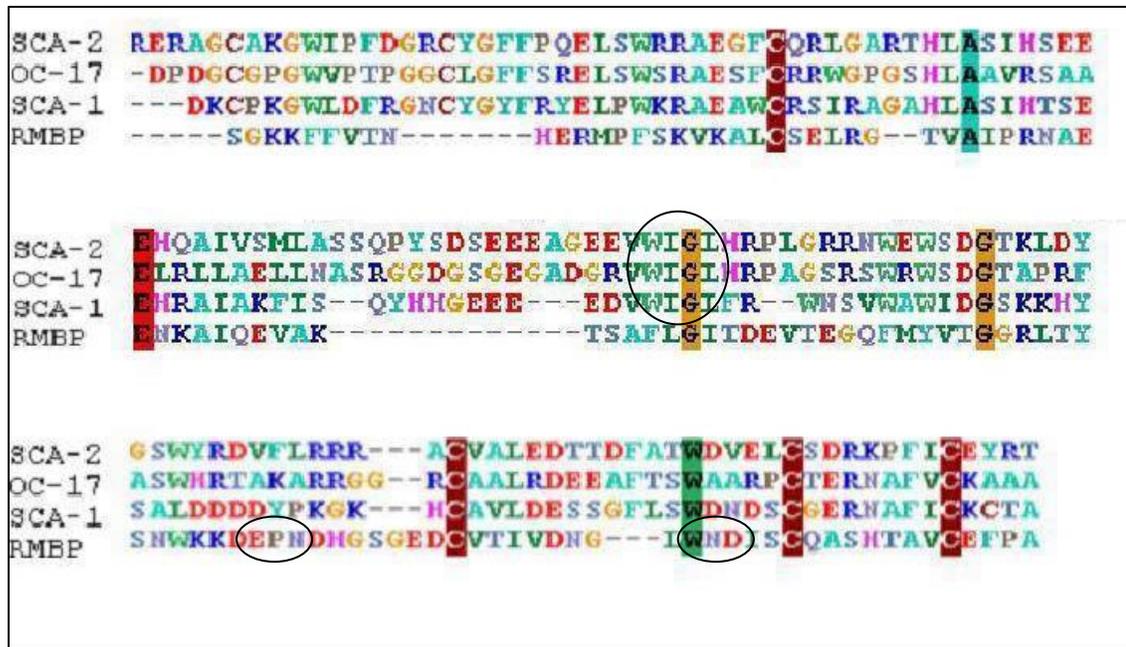


Figura 9. Alineamiento de secuencias entre las proteínas SCA-1, SCA-2, OC-17 y la RMBP.¹

Biomimética y aplicación al diseño de biomateriales

Son inmensas las aplicaciones que tiene la biomineralización hacia la biomimética (diseño de biomateriales). La biomimética es un campo interdisciplinario nuevo, en el que participa la ingeniería, la biología y la ciencia de materiales, en donde esta última aporta las bases para el desarrollo de nuevas tecnologías. Esta ciencia involucra investigaciones de estructura-función de compuestos biológicos, para diseñar y sintetizar nuevos y mejores materiales.

En los sistemas biológicos, los organismos producen materiales suaves y duros que tienen extraordinarias propiedades. Estos compuestos son complejos en términos de composición y microestructura pero son altamente ordenados, conteniendo componentes orgánicos e inorgánicos en estrecha asociación. Por estas razones se han comenzado a estudiar para desarrollar materiales híbridos orgánico-inorgánico (Mark & Lee, 1995) y por sus diferentes aplicaciones en nanotecnología (Hull, 1981; Chow & Gonsalves, 1996), debido a que presentan interesantes propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas, piezoeléctricas y

¹ Alignment Online: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>

mecánicas. Es importante enfatizar que muchos biomateriales son sintetizados a temperatura y presión ambiente (Sarıkaya, 1994). Así, aunque los mecanismos utilizados por los organismos para producir estos biomateriales no son bien conocidos, estos pueden ser una inspiración para el desarrollo de futuros materiales, emulando a los de origen biológico.

Caracterización bioquímica de los componentes proteicos

En general, las técnicas electroforéticas son muy utilizadas en la caracterización bioquímica de las proteínas, existiendo diferentes variantes de ella, como la electroforesis nativa, la desnaturizante, el enfoque isoelectrico, las técnicas bidimensionales, etc. De éstas, la electroforesis desnaturizante o SDS-PAGE aporta información importante sobre el grado de pureza química y peso molecular aproximado de las diferentes subunidades.

Estudios de dispersión dinámica de luz (DLS)

En esta técnica, un equipo de DLS irradia una solución de moléculas de proteína con un haz monocromático de luz y analiza las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por las proteínas en solución (analito) en función del tiempo (**Figura 10**). El equipo también permite analizar la estabilidad del analito en función de la temperatura.

De esta manera el DLS proporciona información acerca del diámetro hidrodinámico de la proteína, pudiéndose observar la monodispersidad de la muestra (esto es, que existan en solución partículas de tamaño uniforme) o la formación de agregados de proteína (Wilson, 1990).

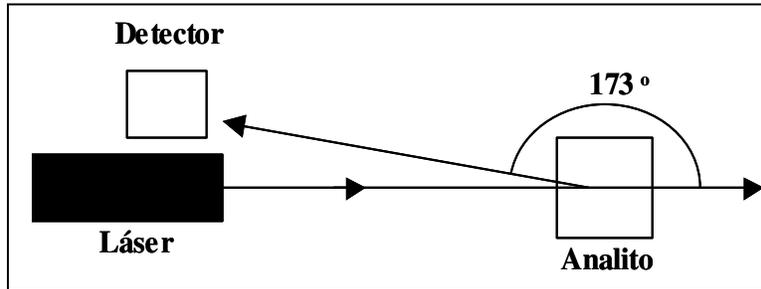


Figura 10. Representación esquemática de los componentes básicos de un equipo de DLS.

Las variaciones en el campo eléctrico total de dispersión se deben al movimiento browniano y la difusión traslacional de las proteínas dispersantes en solución. De esta manera se correlacionan los distintos campos eléctricos dispersados por las proteínas en solución en una escala de tiempo y se construye una función de correlación.

En términos generales, en el equipo de DLS se encuentra un componente llamado *correlator*, el cual mide el grado de similitud entre dos señales en un periodo de tiempo. Si se compara la intensidad de la señal para una proteína en solución en un tiempo (t) con otra señal para la misma proteína en un periodo de tiempo posterior muy pequeño ($t + \delta t$) se puede observar que las dos señales son muy similares. En un tiempo posterior ($t + 2\delta t$) la señal no será tan similar como la señal en el tiempo ($t + \delta t$) porque la molécula de proteína se movió un poco. De esta manera, la correlación entre las distintas señales para la misma proteína (o agregados) se reducirá con el tiempo y finalmente llegará a cero.

Debido al movimiento Browniano, la velocidad de decaimiento de la función de correlación está relacionada con el tamaño de la partícula, así, la velocidad de decaimiento es mucho mayor para partículas pequeñas que para partículas grandes porque las partículas pequeñas se mueven más rápido que las grandes (**Figura 11**).

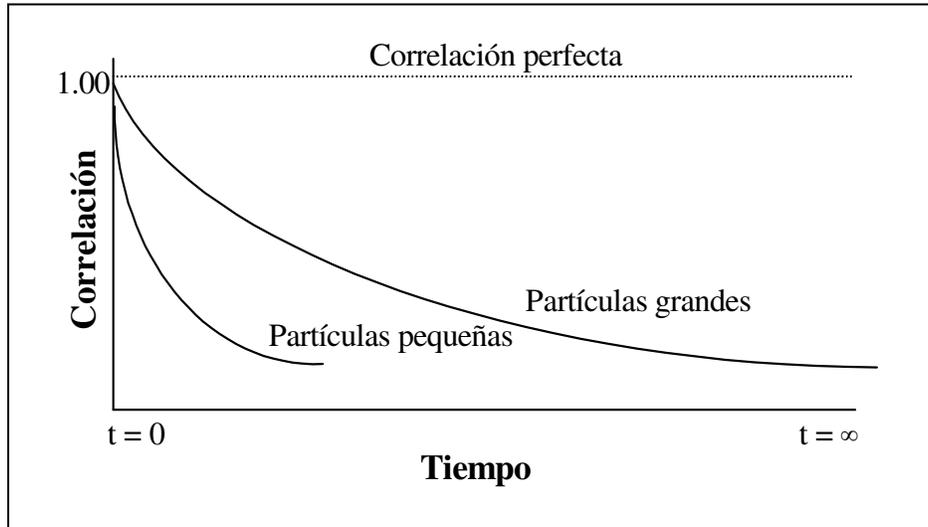


Figura 11. Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en una medición de DLS.

Después de que la función de correlación se mide, los algoritmos del software calculan el coeficiente de difusión traslacional (**D**) de la proteína (o agregados de proteína). De esta manera, el diámetro hidrodinámico (**d_H**) de la proteína puede ser calculado por medio de la ecuación de Stokes-Einstein (**Ec. 1**):

$$\mathbf{d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}} \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde:

- d_H** : Diámetro hidrodinámico
- k** : Constante de Boltzmann
- η** : Viscosidad del solvente
- T** : Temperatura absoluta

Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es una técnica muy utilizada en todos los campos de la química como método de estudio de los estados redox, ya que permite barrer rápidamente un amplio intervalo de potenciales tanto para especies oxidables como reducibles. La *información sobre el analito* se deduce a partir de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado. En estos estudios voltamperométricos se utiliza una *celda electroquímica de tres electrodos*, sumergidos en una disolución que contiene el analito y también un exceso de electrolito no reactivo llamado *electrolito soporte*. Uno de los electrodos es el *electrodo de trabajo*, **ET**, cuyo potencial está variando con el tiempo y tiene una respuesta idealmente rápida y reproducible a los cambios de actividad del analito, en este caso, debido a la posible interacción entre las proteínas intraminerales en estudio (adsorbidas sobre un electrodo de trabajo de pasta de carbono) y los iones carbonato en solución (**Figura 12**). El segundo electrodo es un *electrodo de referencia* (**ER**, normalmente de calomelanos saturado) cuyo potencial permanece constante durante el experimento. El tercer electrodo es un *electrodo auxiliar*, **EA**, que se utiliza para cerrar el circuito eléctrico externo.

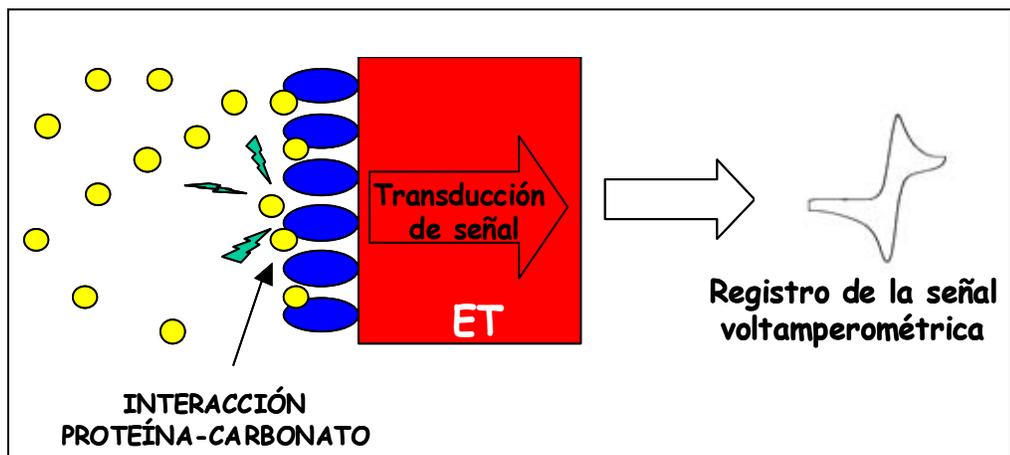


Figura 12. Interacción proteína-carbonato. **ET**: pasta de carbono (transductor de señal).

La voltamperometría cíclica usa una señal de potencial de forma triangular (**Figura 13a**) aplicada al electrodo de trabajo. Después de aplicar una rampa lineal de voltaje entre los

tiempos t_0 y t_1 , se invierte la rampa para llevar de nuevo el potencial a su valor inicial en el tiempo t_2 . El ciclo se puede repetir muchas veces, se mide la intensidad de la corriente generada en función del potencial aplicado y finalmente se obtiene el voltamperograma cíclico, que en el caso más simple es parecido al mostrado en la **figura 13b**.

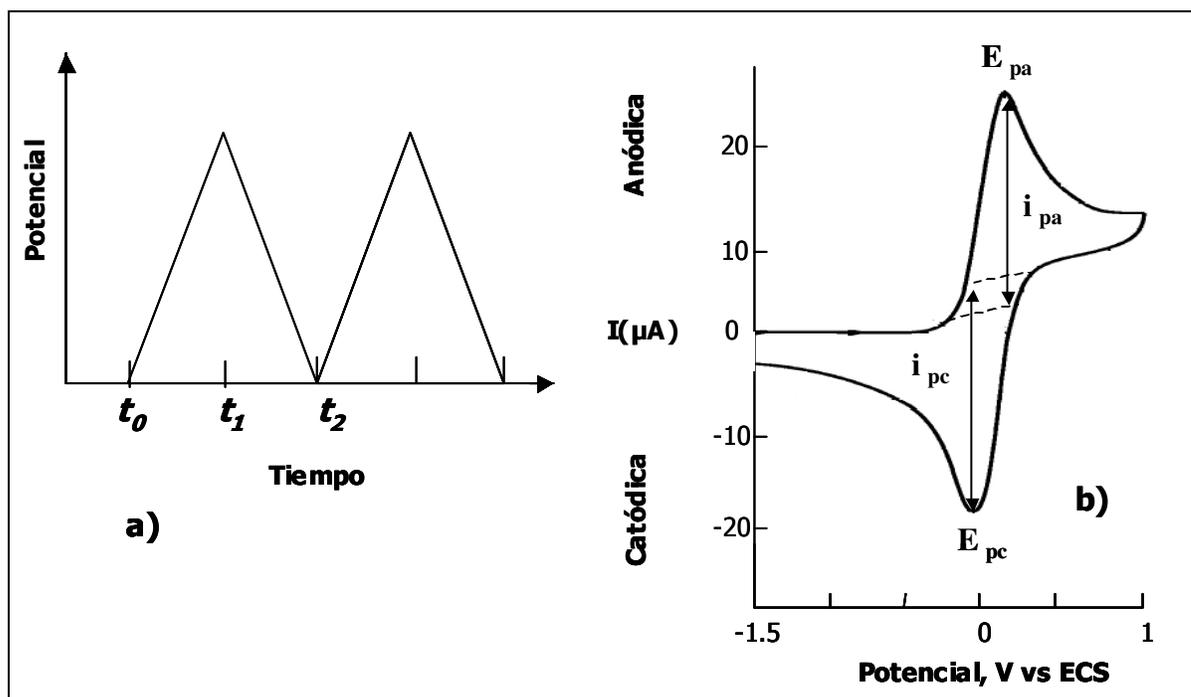


Figura 13. a) Señal de excitación en voltamperometría cíclica. b) Voltamperograma cíclico, arriba: pico anódico (oxidación), abajo: pico catódico (reducción).

Los parámetros de interés en voltamperometría cíclica son las magnitudes de las *corrientes de pico*, i_{pa} e i_{pc} , su relación, i_{pa}/i_{pc} , y la separación entre los *potenciales de pico*, $E_{pa} - E_{pc}$. Para un sistema reversible, la corriente de pico está definida por la ecuación de Randles-Sevcik (**Ec. 2**):

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C^*, \text{ cuando } T = 25 \text{ }^\circ\text{C} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde i_p es la corriente de pico, n es el número de electrones transferidos, A es el área del electrodo de trabajo, D es el coeficiente de difusión de la especie que se oxida o se reduce, v

es la velocidad de barrido de potencial y C^* es la concentración de dicha especie en el seno de la disolución. Por lo tanto, para un sistema reversible i_p es proporcional a C^* .

Se puede identificar un sistema reversible a 25 °C midiendo la diferencia entre E_{pa} y E_{pc} (**Ec. 3**):

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx 59/n \text{ mV} \quad (\text{Ec. 3})$$

Por lo tanto, para los sistemas reversibles esta diferencia entre los potenciales de pico debe ser aproximadamente de $59/n$ mV, donde n es el número de electrones transferidos. Análogamente, los valores de i_{pa} e i_{pc} son aproximadamente iguales para un sistema reversible, es decir, la relación $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$. Para los sistemas irreversibles y casi-reversibles existen ciertas variaciones en las ecuaciones anteriores.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1. Caracterización bioquímica

2.1.1. Protocolo de aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1 y SCA-2

Se utilizó un huevo de avestruz para aislar y purificar las proteínas intraminerales SCA-1 y SCA-2. El contenido del huevo de avestruz se desechó y las membranas se separaron manualmente después de un tratamiento con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Aldrich) al 5 % por un periodo de 1 hora a 4 °C. El cascarón se lavó con agua corriente y finalmente con agua destilada.

El cascarón se secó a temperatura ambiente sobre papel absorbente y posteriormente se molió en un mortero de porcelana hasta que el tamaño de las partículas fue el más pequeño posible. Después de este tratamiento se obtuvieron 150 g de polvo de cascarón, a partir de los cuales se comenzó la extracción de las proteínas SCA-1 y SCA-2.

La extracción se realizó utilizando ácido acético (Sigma) al 10 % (20 mL por gramo de polvo de cascarón) con agitación constante por un periodo de 36-48 horas a 4 °C. La disolución resultante (aproximadamente 3 L) se filtró para eliminar trozos de cascarón y el extracto se concentró por ultrafiltración (Amicon de 50 mL) con una membrana de corte molecular de 3 KDa (YM3) hasta obtener un volumen final de 100 mL.

Estos 100 mL de extracto fueron dializados contra 5x10 vol. de ácido acético al 5 %. Para precipitar la fase proteica, la solución dializada se llevó a saturación con sulfato de amonio (sigma). Después de 24 horas, esta solución se centrifugó a 64,500 x g durante 90 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el botón fue resuspendido en ácido acético al 5 % (v/v). Esta solución se dializó contra ácido acético al 5 % (v/v) para remover el sulfato de amonio y posteriormente se eluyó a través de filtros de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con abertura de malla de 0.2 µm.

La solución que contenía la porción soluble intramineral del cascarón de huevo de avestruz (extracto intramineral) se inyectó en una columna Júpiter C18 de HPLC fase

reversa (250 x 10.0 mm; 5 μ m), usando como fase móvil (**B**) 100 % de acetonitrilo (Fluka) con 0.1 % de TFA (ácido trifluoroacético, Fluka) y utilizando un gradiente lineal de 0-100 % de **B** en 58 minutos a un flujo de 1 mL / min.

Con la finalidad de observar las proteínas presentes en el extracto intramineral se realizó una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), utilizando un gel tipo homogéneo 12,5 % en un sistema Amersham Pharmacia Biotech.

Después de la cromatografía de fase reversa se realizaron electroforesis desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12,5 % para detectar los picos que correspondían a las proteínas SCA-1 y SCA-2. En todos los casos los geles fueron teñidos con azul de coomasie (Sigma).

2.2. Estudios de dispersión dinámica de luz. Determinación de los estados de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 en función de la temperatura

Se realizaron experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) para conocer el estado de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2, utilizando un equipo **Malvern Nano S** con tecnología láser NIBS, el cual cuenta con controlador de temperatura. Se filtró una solución de SCA-1 a una concentración de 1 mg/mL a través de un filtro con apertura de malla de 0.02 μ m para remover cualquier partícula extraña. Esta solución se introdujo inmediatamente al equipo de DLS, el cual cuenta con un diodo láser de longitud de onda de 633 nm. Una vez introducida la muestra se realizó un barrido de temperaturas entre 4-27 °C. La concentración de todas las soluciones amortiguadoras utilizadas fue de 0.1 M. Se utilizó el mismo procedimiento para determinar los estados de agregación de la SCA-2.

2.3. Influencia de las proteínas SCA-1 y SCA-2 sobre la cristalización del carbonato de calcio

Con la finalidad de determinar el efecto de las proteínas intraminerales SCA-1 y SCA-2 sobre la morfología macroscópica de cristales de carbonato de calcio se realizó la síntesis *in vitro* de CaCO_3 evaluando el efecto de la concentración de las dos proteínas. Se usaron dos proteínas control: lisozima de albúmina de huevo comercialmente disponible y la proteína OC-17.

Los cristales de calcita crecieron mediante la técnica de difusión en fase vapor, utilizando un sistema diseñado *ad hoc* para que la síntesis de los cristales se diera con una presión de vapor homogénea, producto de la descomposición del carbonato de amonio (sigma; 0.1 mol L^{-1}). Esta solución de carbonato de amonio se colocó dentro de una caja petri en la que se introdujo otra caja de menor tamaño invertida y sobre la cual se colocaron cubreobjetos siliconizados. Cada uno de estos cubreobjetos siliconizados contenía solución de cloruro de calcio (sigma; 0.1 mol L^{-1}) mezclada con cada una de las proteínas (SCA-1, SCA-2, OC-17 y lisozima). Las cantidades adicionadas de proteína estuvieron entre 50-200 μg . En el mismo sistema se montaron pruebas control (sin influencia de las proteínas).

El sistema se *selló perfectamente* para evitar fugas. El volumen total de las gotas fue de 50 μL y todos los experimentos se realizaron a 18 $^\circ\text{C}$. En la **figura 14** se muestra el diseño del sistema experimental.

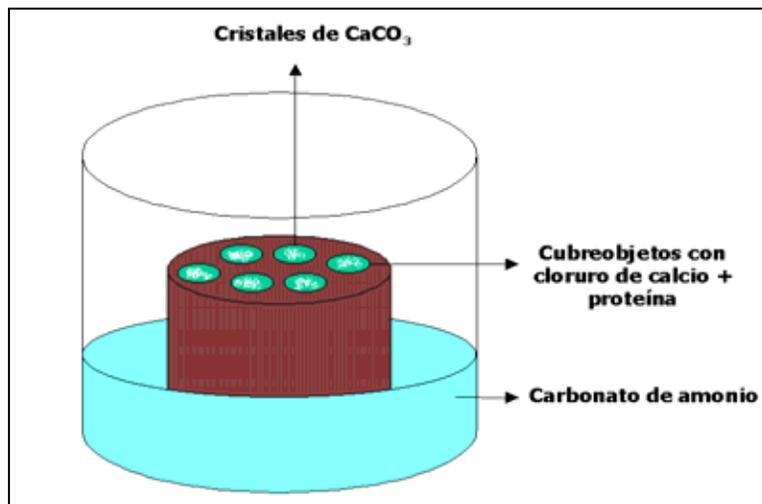


Figura 14. Diseño experimental utilizado para la síntesis *in vitro* de cristales de CaCO_3 (calcita).

Después de 72 horas de realizado el experimento se pudo ver mediante un microscopio óptico, el efecto de la concentración de cada una de las proteínas adicionadas sobre la cristalización *in vitro* de CaCO_3 .

2.4. Interacción de las proteínas SCA-1 y SCA-2 con iones carbonato

Las determinaciones electroanalíticas de respuesta a iones carbonato fueron realizadas por voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} en un potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30. Se usó un sistema de tres electrodos (**Figura 15**), electrodo de referencia: calomel saturado, $E = 0.241 \text{ V}$ *versus* NHE, electrodo auxiliar: alambre de platino y el electrodo de trabajo se construyó usando como base principal **una microestructura interdigital de platino**, donde un O-ring (0.3 cm de diámetro interno) fue pegado con silicona (**Figura 16a**). Dentro del O-ring se adicionó pasta de carbono (mezcla de 0.8 g de polvo de grafito, con un tamaño de partícula entre $1\text{-}2 \mu\text{m}$ y una pureza del 99.99 % y 0.2 mL de aceite de silicona) y esmalte de uñas en la

parte superior de la microestructura interdigital para evitar interferencias en las mediciones por parte del platino (**Figura 16b**).

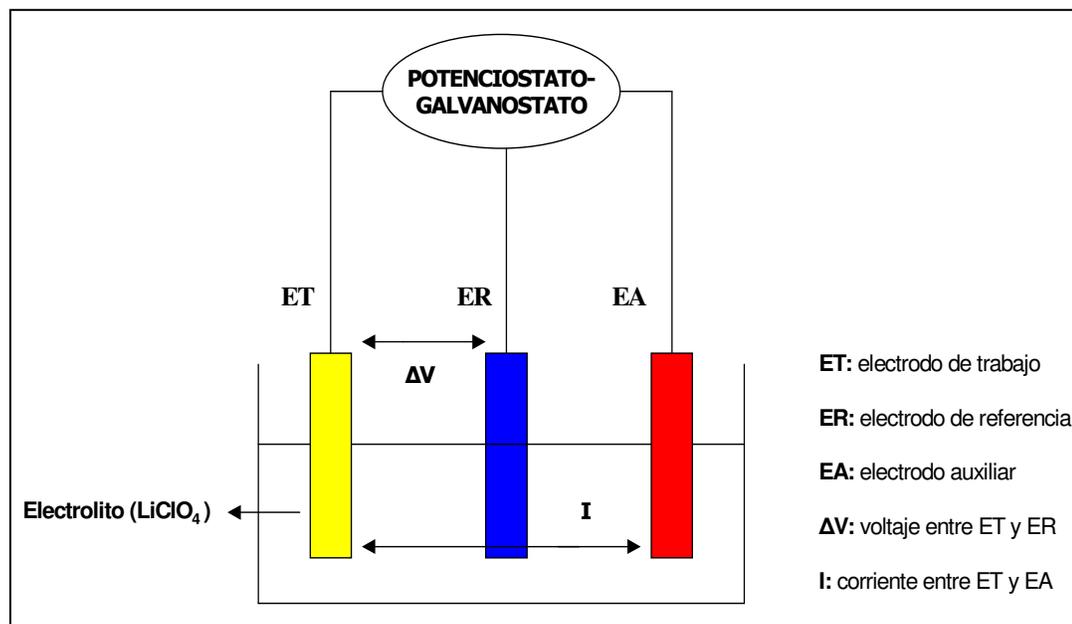


Figura 15. Representación esquemática de una celda electroquímica de tres electrodos.

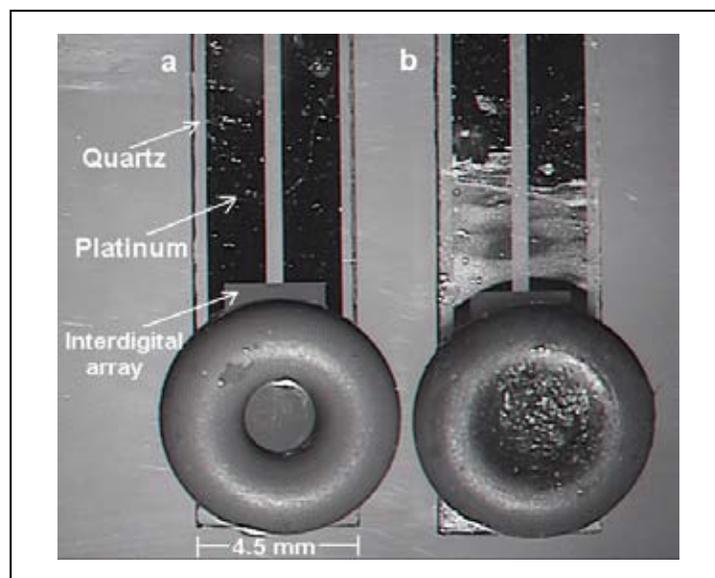


Figura 16. Microestructura interdigital de platino utilizada para sensar las interacciones proteína-carbonato. **a)** dispositivo vacío, **b)** electrodo de pasta de carbono con la proteína adsorbida en su superficie.

La solución de proteína a estudiar (SCA-1, SCA-2, OC-17 o lisozima; $10 \mu\text{L}$, 1 g L^{-1}) se adicionó a la superficie del electrodo de pasta de carbono y se esperó a que se evaporara la totalidad del agua (30 minutos aproximadamente) hasta que se obtuvo una *capa sólida de proteína* (**Figura 17**).

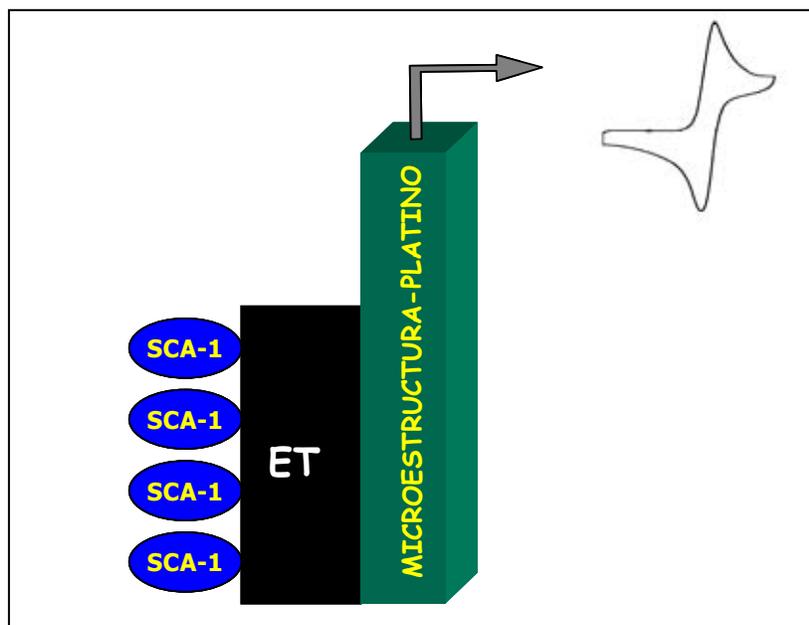


Figura 17. Capa sólida de proteína SCA-1 adsorbida sobre un electrodo de trabajo de pasta de carbono.

Se utilizó como electrolito soporte LiClO_4 (0.1 mol L^{-1}), el cual fue desoxigenado por burbujeo de N_2 (g) (INFRA, de ultra alta pureza, 99.999 %) durante 15 minutos. Las adiciones estándar de iones carbonato fueron realizadas por medio de una micropipeta y se tomaron de una solución stock ($0.1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$, Sigma, pureza 99.9 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización bioquímica

3.1.1. Aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1 y SCA-2

La metodología que se utilizó para el aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 consistió en algunas modificaciones del protocolo descrito por Mann (2004) con el propósito de obtener un mayor rendimiento. Mann (2004) aisló, purificó y determinó la secuencia de aminoácidos de las proteínas SCA-1 y SCA-2. En el primer análisis electroforético (**Figura 18**) del extracto intramineral del cascarón de huevo de avestruz se pueden observar claramente dos bandas que pertenecen únicamente a las proteínas SCA-1 y SCA-2 previamente caracterizadas por Mann (2004).

Estas dos proteínas son las más abundantes del cascarón de huevo de avestruz, de acuerdo a nuestro método de extracción.

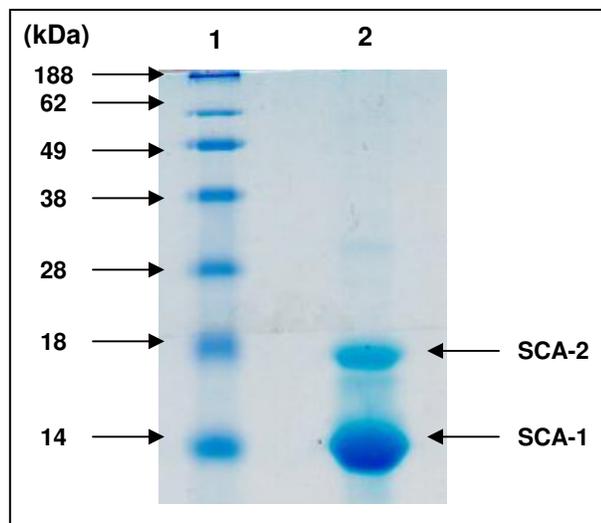


Figura 18. 12.5 % SDS-PAGE. Carril 1: marcadores de peso molecular (SeeBlue). Carril 2: extracto intramineral del cascarón de huevo de avestruz.

Las modificaciones realizadas en el protocolo de purificación resultaron ser óptimas para la purificación de estas dos proteínas, ya que se obtuvieron con mayor rendimiento y alta pureza. A partir de los 150 g de polvo de cascarón con los que se comenzó la purificación, fue posible obtener 7 mg de SCA-1 y 3 mg de SCA-2. La purificación se realizó por cromatografía de HPLC fase reversa (**Figura 19**). En el cromatograma de la figura 19a se observan dos picos con tiempos de retención t_R 52.29 y t_R 53.88 min. Se colectaron las fracciones correspondientes a los dos picos y por análisis electroforético se determinó que el pico con t_R 53.88 min corresponde a la proteína SCA-1 y el pico con t_R 52.29 min corresponde a la proteína SCA-2 (**Figura 20a**). La proteína SCA-1 se obtuvo con un alto grado de pureza, mientras que la proteína SCA-2 se “repurificó” para incrementar la pureza y esto trajo como consecuencia una disminución del rendimiento (**Figuras 19b y 20b**).

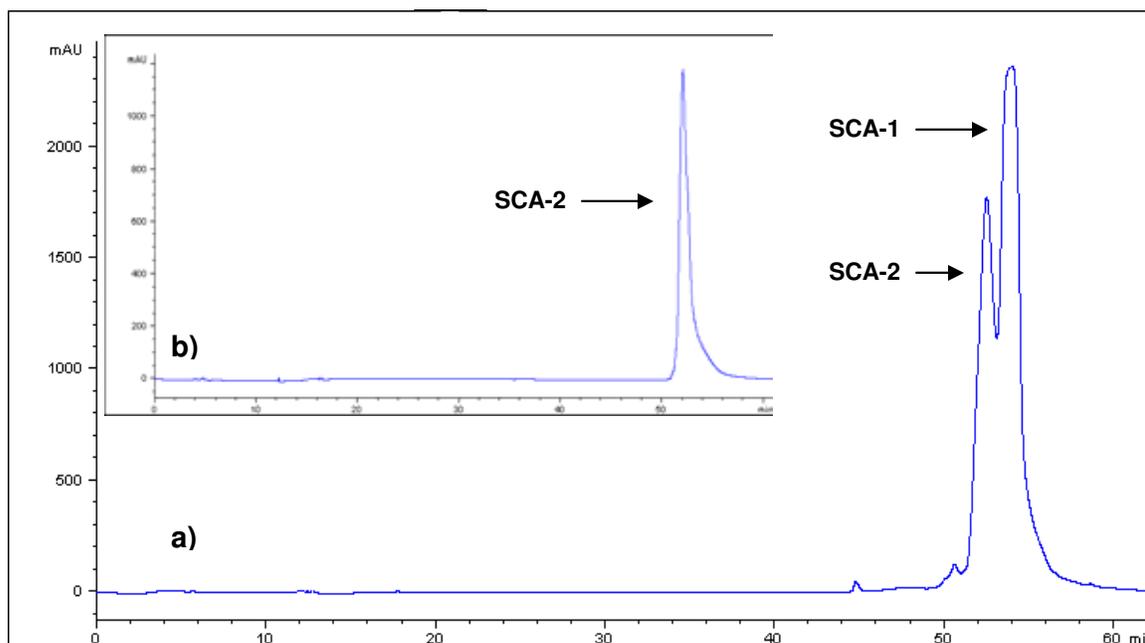


Figura 19. a) Cromatograma del extracto intramineral usando una columna Júpiter C-18 de HPLC fase reversa (gradiente lineal de 0-100 % de **B** en 58 minutos a un flujo de 1 mL / min), **b)** SCA-2 repurificada por HPLC fase reversa.

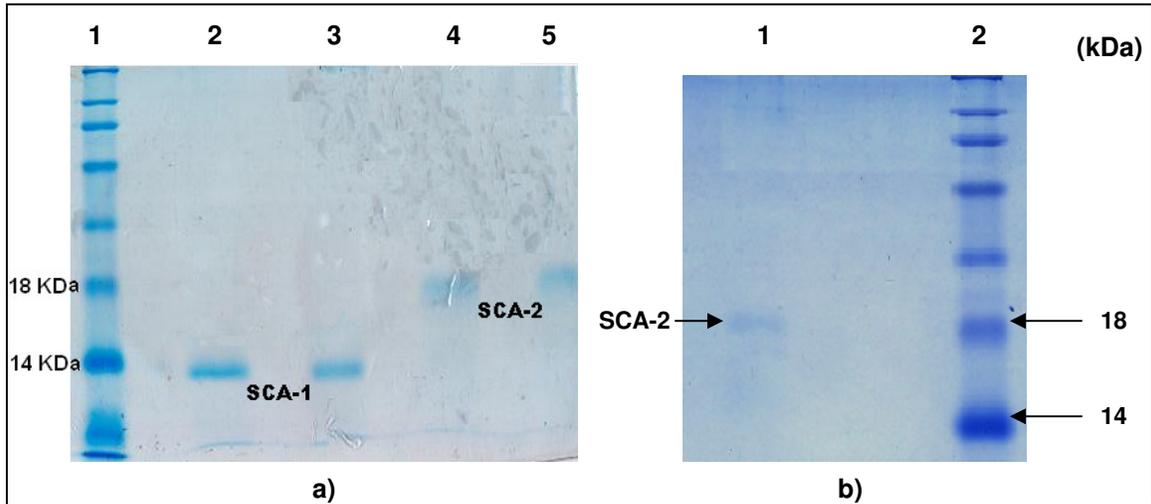


Figura 20. a) 12.5 %SDS-PAGE. Carril 1: marcadores de peso molecular (SeeBlue). Carril 2 y 3: SCA-1. Carril 4 y 5: SCA-2. **b)** 12.5 %SDS-PAGE. Carril 1: SCA-2 después de repurificarla en una columna Júpiter C-18 de HPLC fase reversa. Carril 2: marcadores de peso molecular (SeeBlue).

3.2. Estudios de dispersión dinámica de Luz. Determinación de los estados de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 en función de la temperatura

Se empleó el método de dispersión dinámica de luz (DLS) para caracterizar la homogeneidad, estabilidad conformacional y propiedades térmicas de las proteínas SCA-1 y SCA-2. En el intervalo de temperaturas analizado inicialmente (4-37 °C), las proteínas SCA-1 y SCA-2 mostraron un comportamiento de agregación en agua completamente al azar, con enormes agregados de hasta 1000 nm de diámetro hidrodinámico cuando sus soluciones respectivas no se eluyeron a través de un filtro con apertura de malla de 0.02 μm (**Figura 21**).

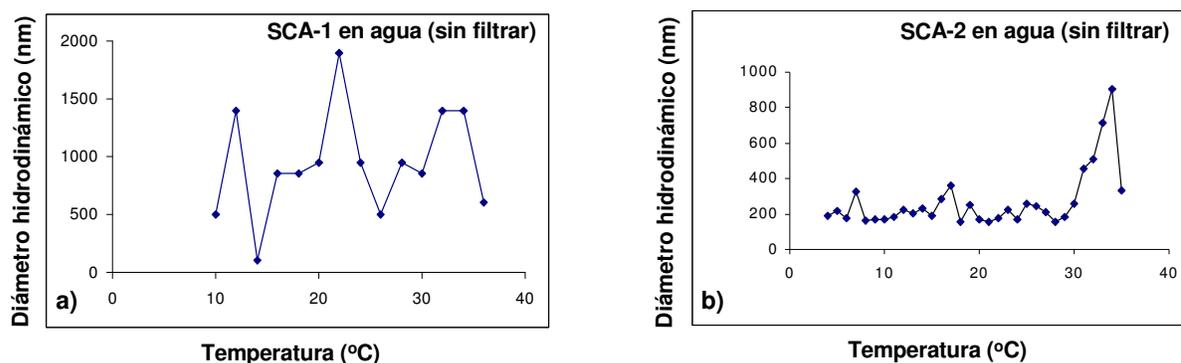


Figura 21. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación en agua de las proteínas: a) SCA-1, b) SCA-2.

A pesar de que la proteína SCA-1 tiene un CTLD que podría estar implicado en la interacción proteína-proteína, esta proteína no presenta ninguna modificación postraduccional que potencie su tendencia a la formación de agregados u oligómeros. Cuando se filtra la solución de SCA-1 por 0.02 μm se observan agregados mucho menores que los observados en la figura 21a. Se observó también el fenómeno de agregación en solución amortiguadora en un intervalo de temperaturas entre 4-27 °C. La agregación de la proteína SCA-1 es menor en agua que en cada una de las soluciones amortiguadoras utilizadas (**Figura 22**).

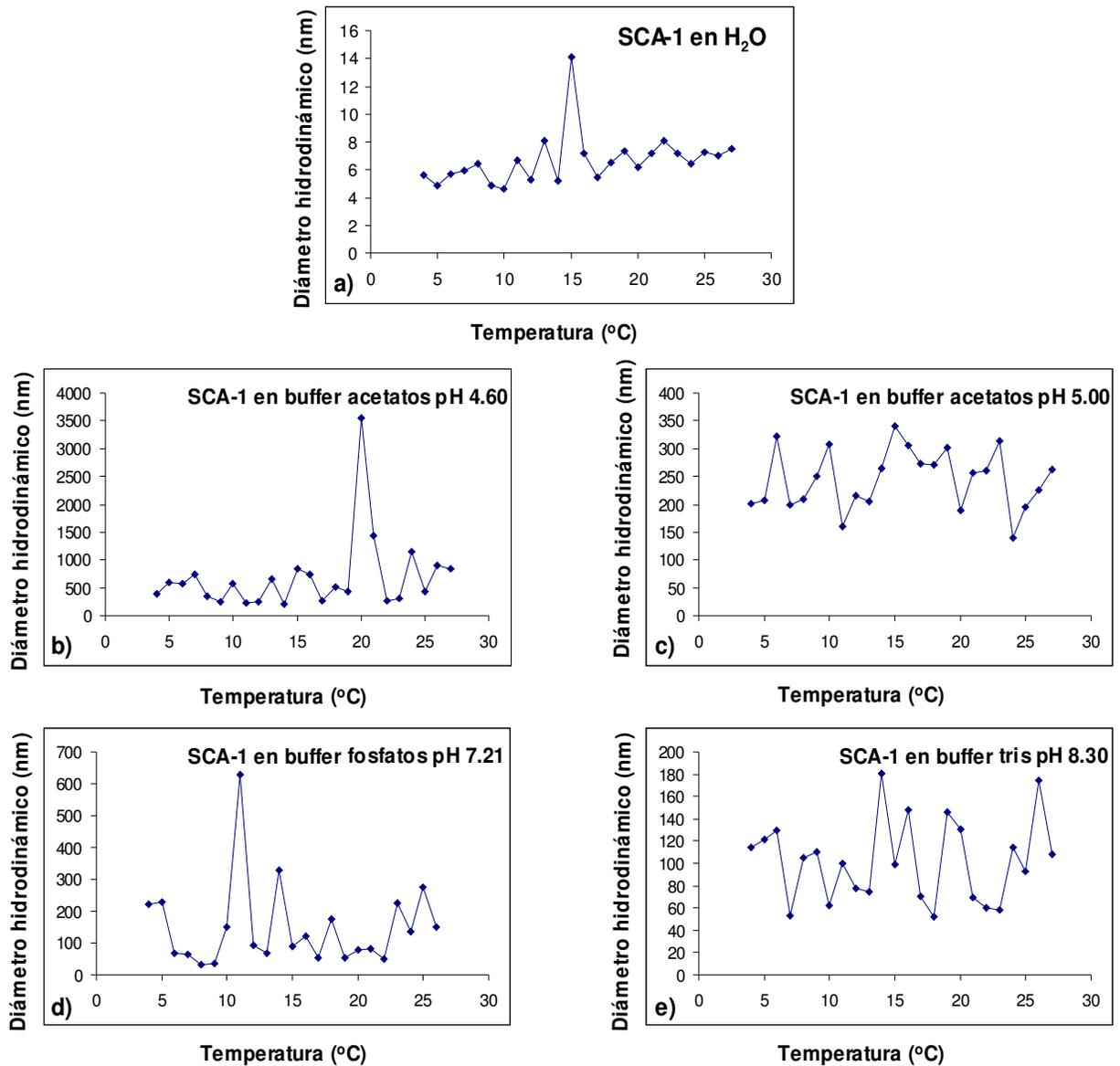


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-e)** en diferente solución amortiguadora.

Por otro lado, la proteína SCA-1 muestra un comportamiento estable y una distribución de partículas relativamente homogéneas cuando está disuelta en amortiguador de citrato de sodio, pH 5.6 (amortiguador requerido para obtener las mejores condiciones de cristalización (Reyes-Grajeda, 2007)). Incluso, cuando se disminuye el pH pero se mantiene la misma

solución amortiguadora de citratos, la proteína sigue estando en forma principalmente monomérica (**Figura 23**).

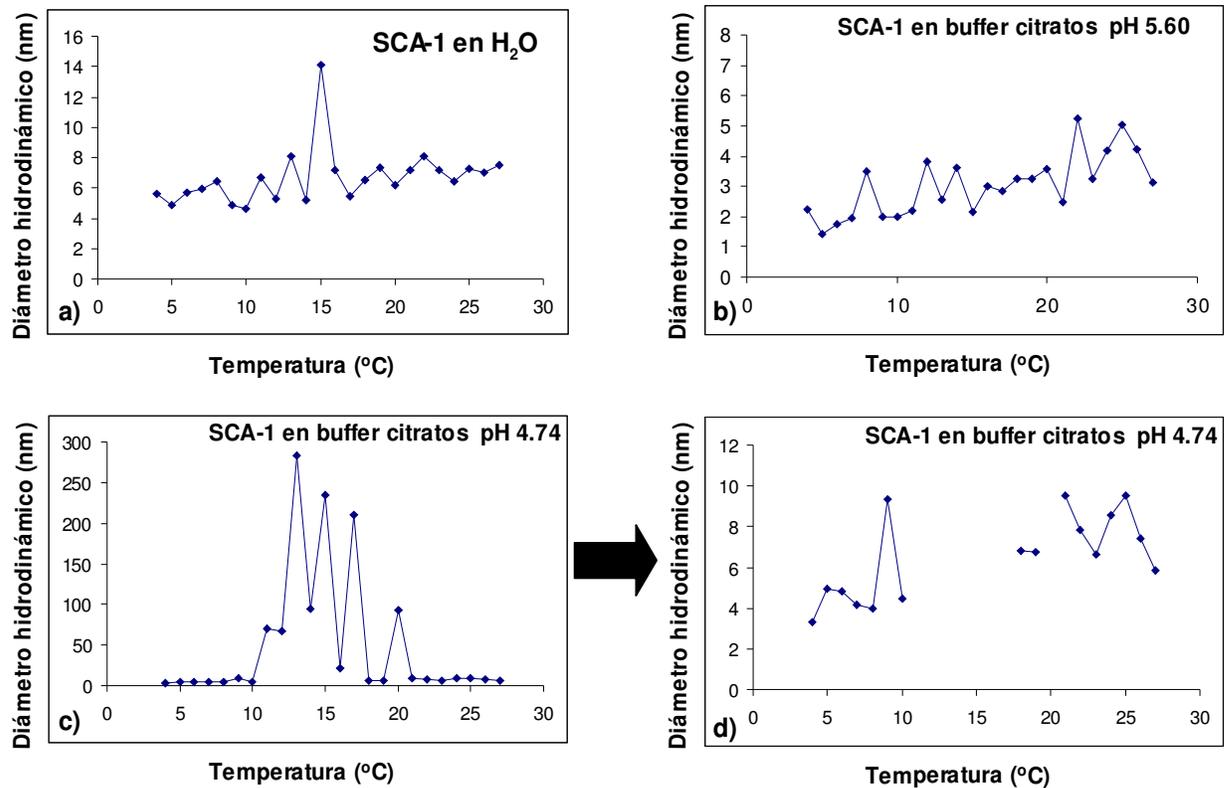


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-c)** en solución amortiguadora de citratos, **d)** solución amortiguadora de citratos a pH 4.74 sin tomar los puntos de mayor agregación.

La proteína SCA-2 presentó el mismo comportamiento de agregación al azar en agua (sin filtrar), pero a diferencia de la SCA-1 tuvo un comportamiento de agregación relativamente homogéneo entre 5-30 °C y de alta agregación entre 31-37 °C (**Figura 21b**). Cuando se filtra la solución acuosa de SCA-2 por 0.02 μm se observan agregados mucho menores que los observados en la figura 21b. Los estudios de DLS para la proteína SCA-2 en diferentes soluciones amortiguadoras se pueden observar en la **figura 24**. La proteína SCA-2 tiene un CTLD y también tiene tres modificaciones postraduccionales (fosforilaciones) que pueden

potenciar su fenómeno de agregación en solución, es por eso que a pesar de estar filtrada, la proteína SCA-2 presenta agregados más grandes en agua que los que se observan en la proteína SCA-1.

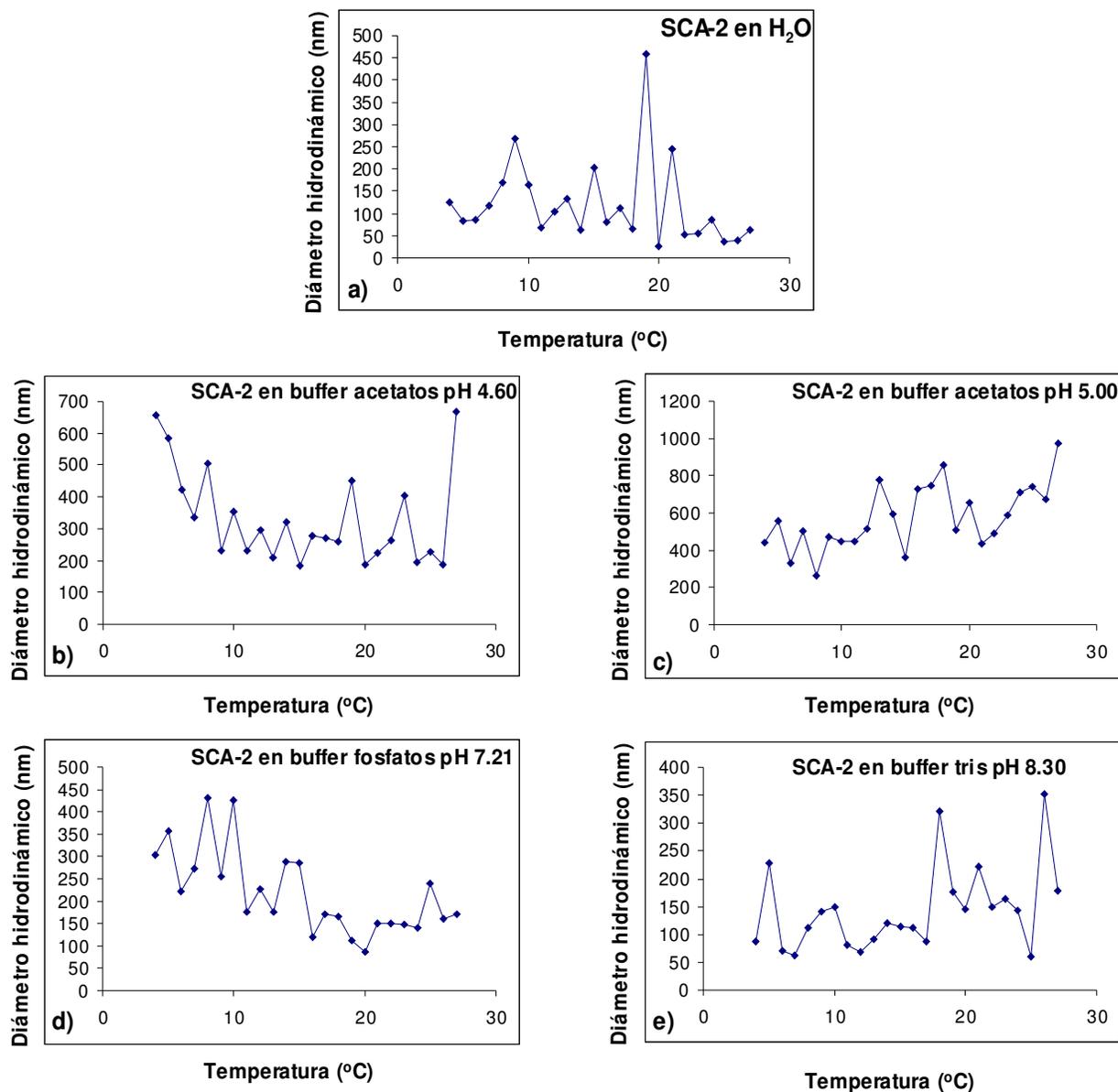


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-e)** en diferente solución amortiguadora.

Inicialmente no se pudo encontrar una solución amortiguadora que favoreciera la formación del monómero de SCA-2 en solución. Sin embargo, cuando se hace el estudio de DLS en solución

amortiguadora de citratos se observa la formación inmediata del monómero de SCA-2 en un amplio intervalo de temperaturas (**Figura 25**). Quizás algunas características que pueden favorecer la formación del monómero de SCA-1 y SCA-2 en la misma solución amortiguadora es que son proteínas con alta homología en su secuencia de aminoácidos, son intraminerales, provienen de la misma fuente natural y tienen puntos isoeléctricos cercanos, **pI (SCA-1)** 5.96 y **pI (SCA-2)** 5.41. En cuanto a las propiedades físicas de la SCA-2 se observa una menor solubilidad en agua (con agregados mayores) si se compara con la solubilidad y los agregados de la SCA-1.

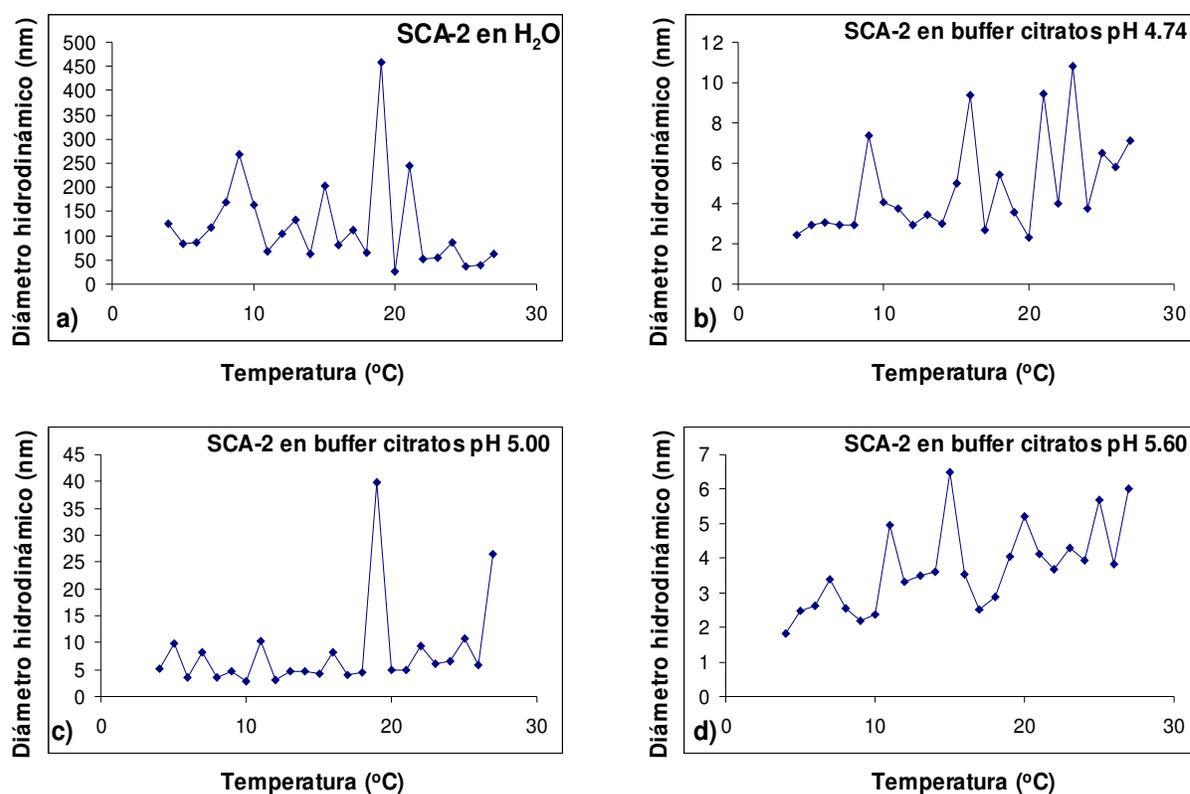


Figura 25. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-d)** en solución amortiguadora de citratos.

Estos resultados son interesantes en términos de la estabilidad conformacional y la función de estas dos proteínas intraminerales. La proteína SCA-2 aún no ha sido cristalizada y el amortiguador de citratos podría ser adecuado para este fin porque favorece la formación del

monómero de proteína. Específicamente, el amortiguador de citratos pH 5.0, favorece la monodispersidad de la proteína en un intervalo más amplio de temperaturas. Es probable que el comportamiento de agregación en agua esté relacionado con los procesos de biomineralización del carbonato de calcio durante la formación del cascarón de huevo. Se cree que el fenómeno de agregación *in vivo* es necesario para que estas proteínas intraminerales puedan formar una especie de “templado” sobre el cual se depositen los núcleos cristalinos de carbonato de calcio y así se dé la formación del cascarón. Se ha reportado con anterioridad en diferentes trabajos (Hincke et al., 1995; Mann, 1999) el fenómeno de agregación en agua para la OC-17 de *Gallus gallus*. Lakshminarayanan et al., (2005) también reporta el fenómeno de agregación para la ansocalcina de Ganso. Como se dijo anteriormente, existe una relación tanto en longitud de secuencia de aminoácidos como en homología, para las parejas de proteínas: (Ansocalcina-SCA-1) y (OC-17-SCA-2). Los resultados experimentales de DLS para las proteínas SCA-1 y SCA-2 muestran la tendencia de agregación en agua, así como lo mostraron las proteínas intraminerales ansocalcina y OC-17.

La nucleación de cristales de carbonato de calcio por parte de estas proteínas intraminerales se realiza *in vivo* a una concentración aproximada de 10 mM de ión calcio y 70 mM de ión carbonato (Fernández, 2004). En vista de esto, se realizaron estudios de DLS para las proteínas SCA-1 y SCA-2 en presencia de este tipo de iones y a concentraciones cercanas a las que se observan en el fluido uterino de la gallina común (**Figuras 26, 27, 28 y 29**).

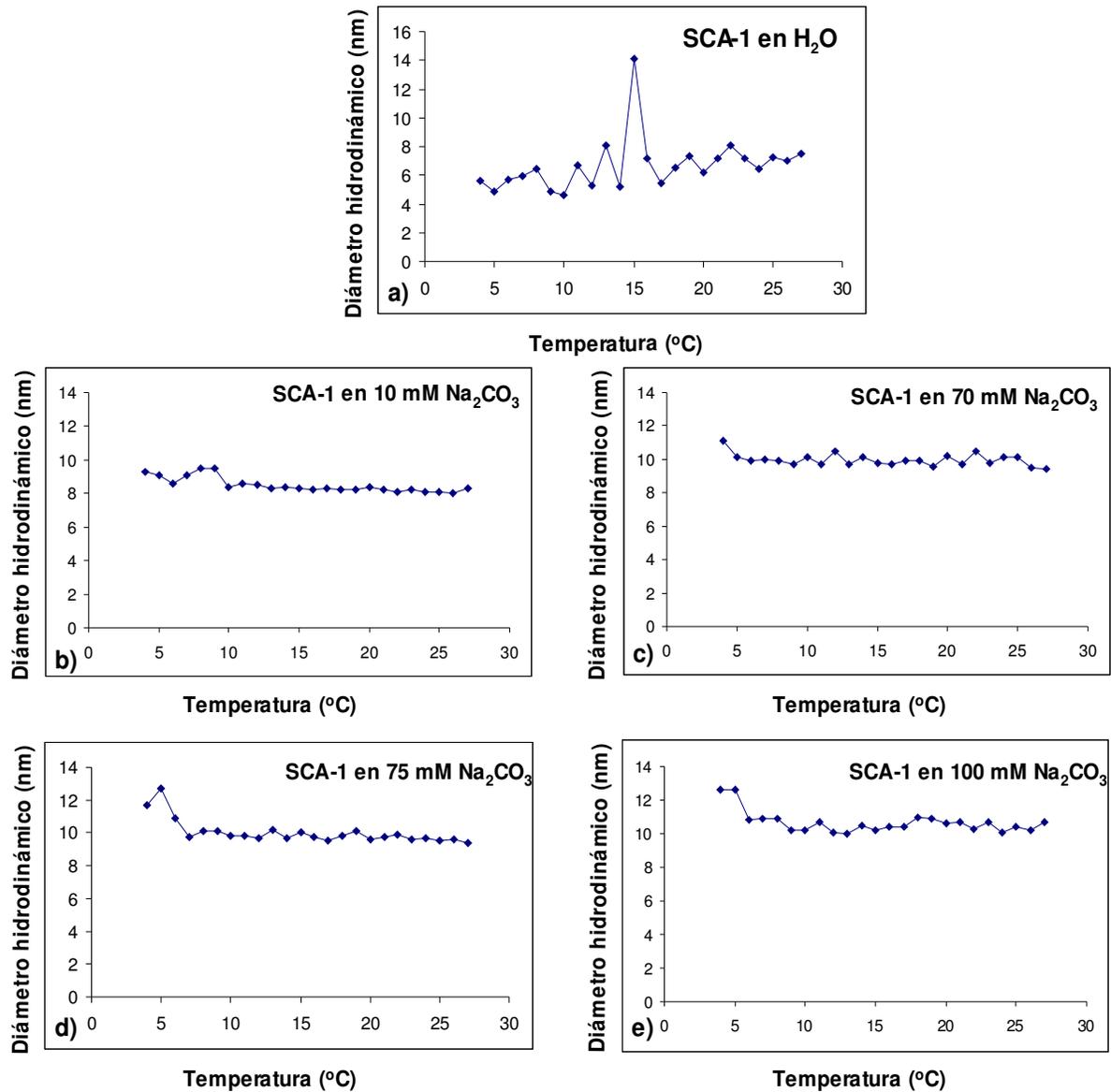


Figura 26. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-e)** en solución de carbonato de sodio.

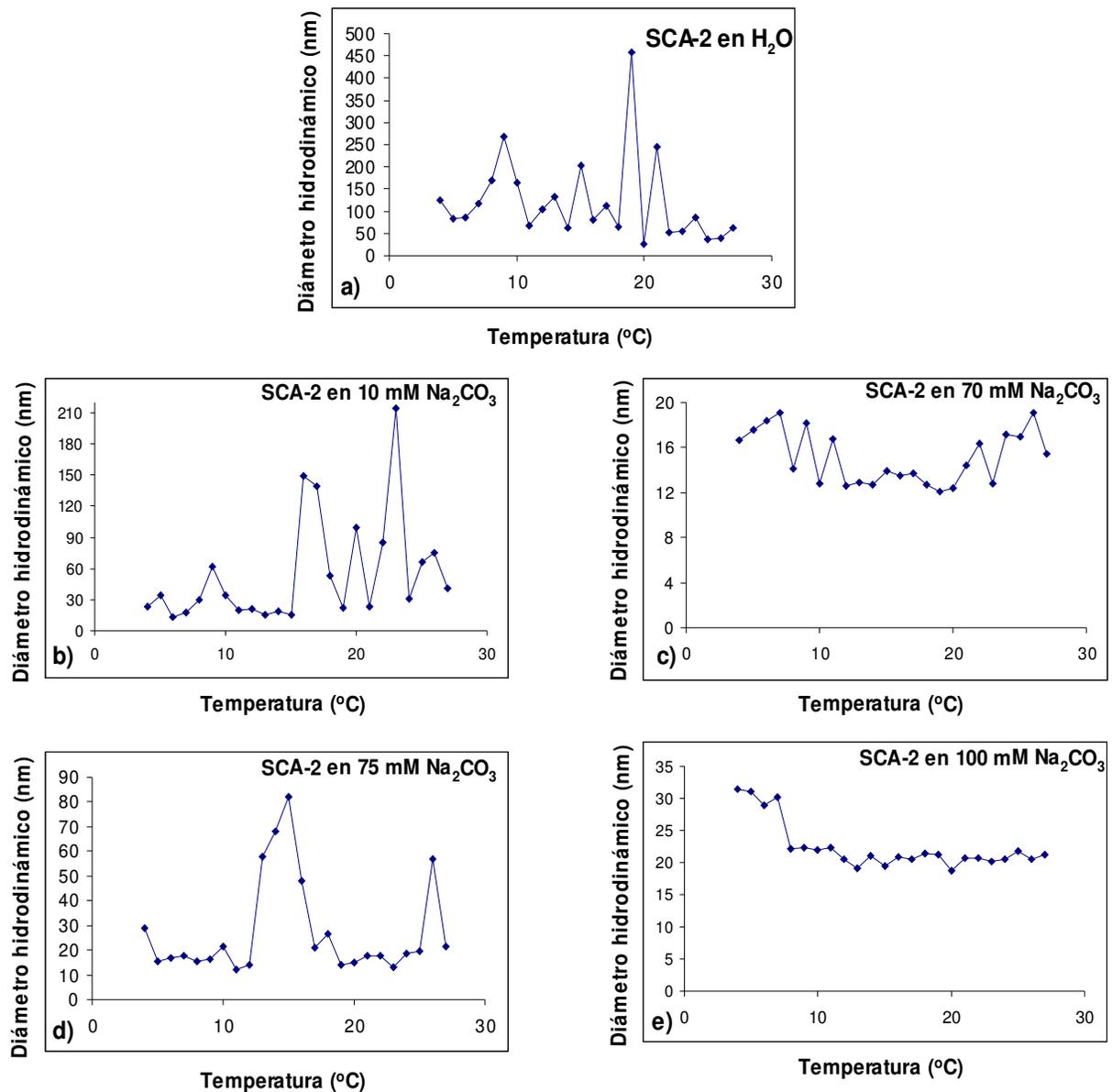


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-e)** en solución de carbonato de sodio.

Se observa un patrón de agregación muy interesante cuando las proteínas se encuentran en solución de carbonato de sodio. En primer lugar, la proteína SCA-2 presenta agregados menores y relativamente homogéneos en algunos intervalos de temperatura comparados con

los agregados en agua, mientras que la proteína SCA-1 presenta agregados uniformes de aproximadamente 8-10 nm de diámetro hidrodinámico en casi todo el intervalo de temperaturas. Estos estudios de DLS demuestran que la proteína SCA-1 presenta una mayor interacción con iones carbonato que la proteína SCA-2. También se demuestra que la proteína SCA-1 forma “templados” de diámetro uniforme, lo que está de acuerdo con algunas hipótesis planteadas en la literatura. Sobre este “templado” se pueden depositar los primeros núcleos cristalinos de carbonato de calcio en el momento de formación del cascarón de huevo de avestruz (**Figura 28**). A altas concentraciones de ion carbonato (100 mM), la proteína SCA-2 presenta una agregación uniforme de aproximadamente 20 nm de diámetro hidrodinámico. Es muy interesante observar esta monodispersidad de la SCA-2 ya que solo se obtiene a altas concentraciones del ion carbonato y además no se observa cuando la proteína esta disuelta en agua.

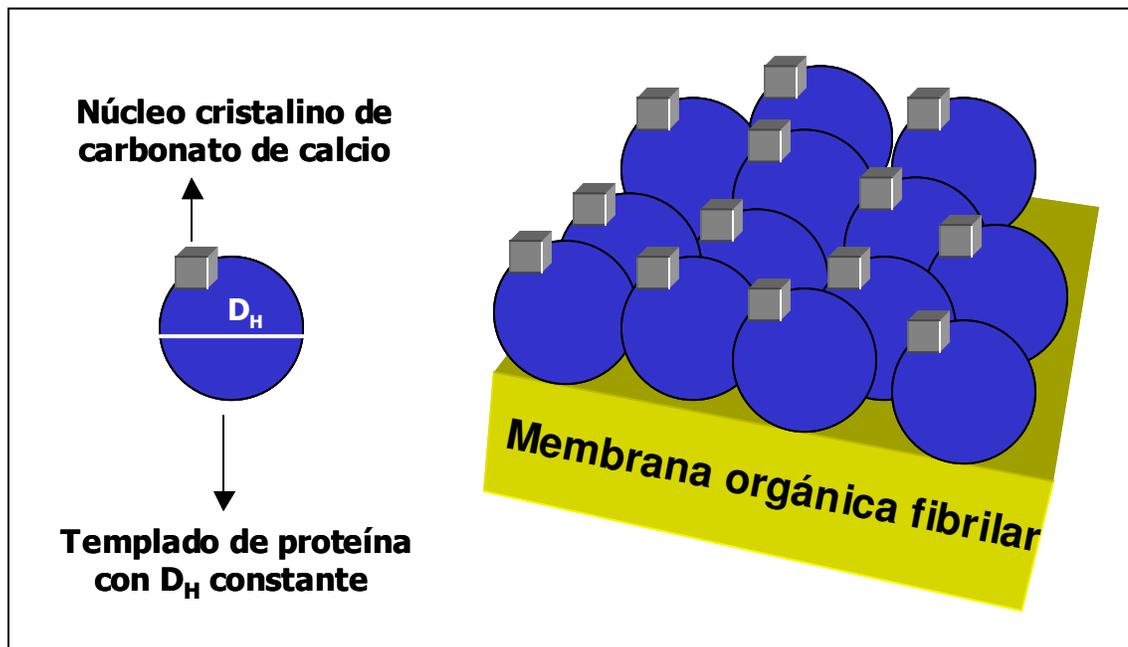


Figura 28. Modelo del “templado de proteínas” actuando como centros de nucleación del carbonato de calcio (calcita).

También se hicieron mediciones de DLS en presencia de CaCl_2 y NaCl para descartar la interacción entre las proteínas SCA-1 y SCA-2 con estos iones (**Figuras 29 y 30**).

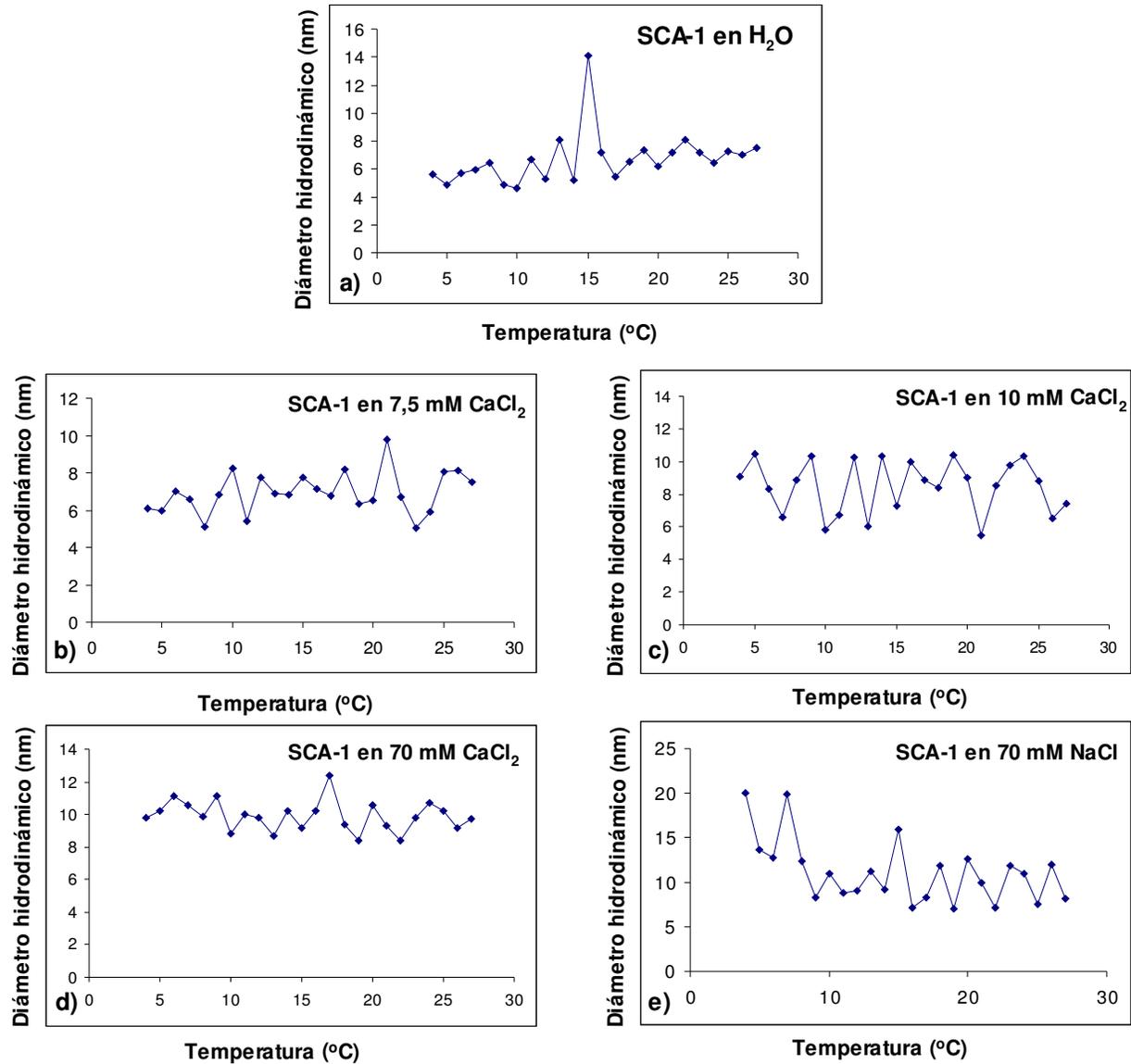


Figura 29. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-d)** en solución de CaCl_2 , **e)** en solución de NaCl .

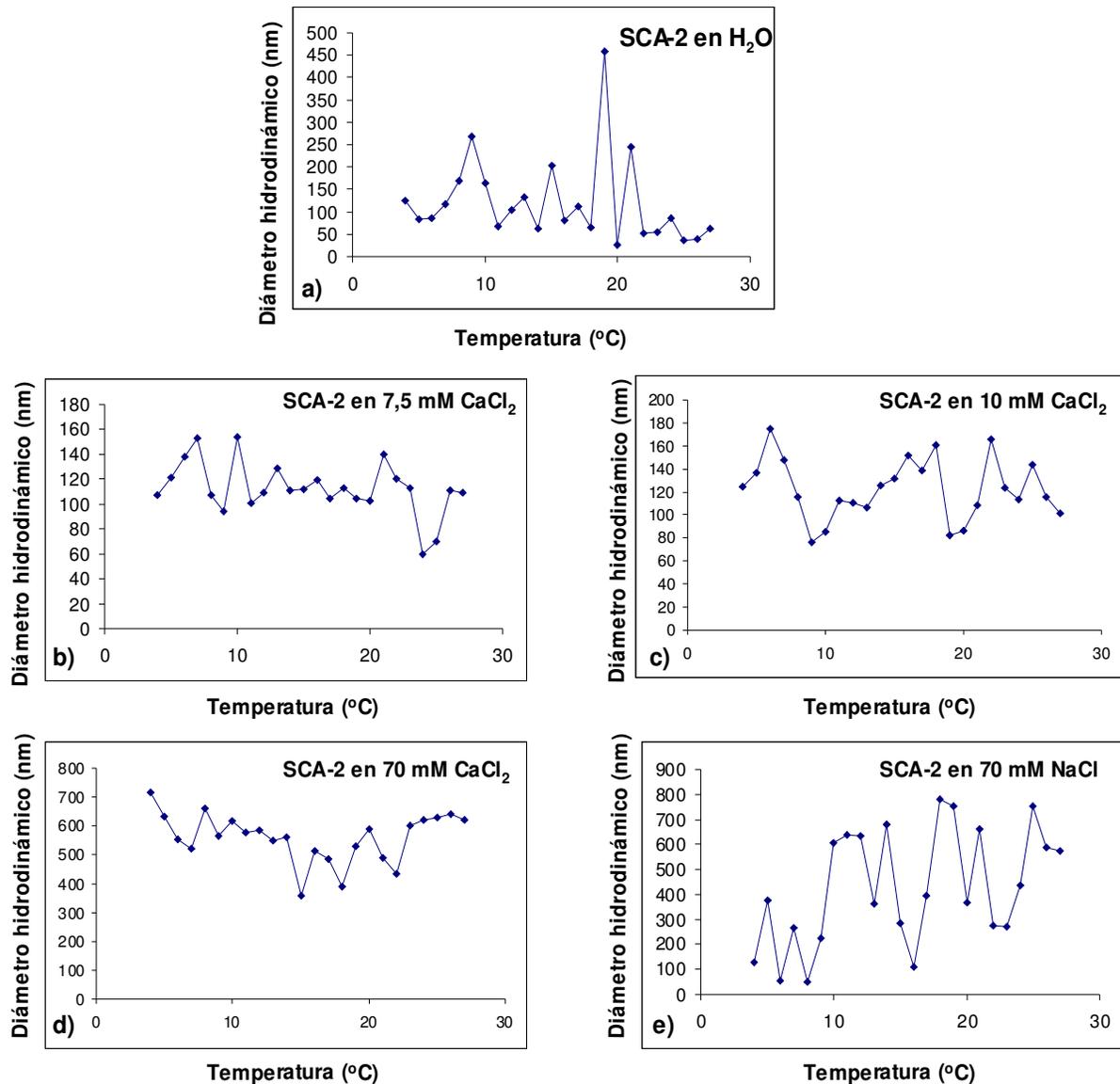


Figura 30. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-d)** en solución de CaCl₂, **e)** en solución de NaCl.

El patrón de agregación de las dos proteínas en solución de CaCl₂ (10 mM) a diferentes temperaturas es muy similar al patrón de agregación en agua. Es interesante observar que no

hay una interacción apreciable entre cada una de las proteínas intraminerales y los iones calcio. Esto mismo se pudo determinar para la proteína OC-17 por medio de estudios cristalográficos (Reyes-Grajeda, 2004). Por análisis de secuencia también se observa que estas proteínas intraminerales carecen de los residuos responsables de coordinar iones calcio (**Figura 9**). Se observa un patrón de polidispersidad de las proteínas SCA-1 y SCA-2 cuando están disueltas en solución de NaCl. En ambas proteínas se observan agregados mayores que cuando están disueltas en agua, quizás por algún fenómeno de *salting out*.

La relevancia de estos experimentos de DLS en presencia de iones calcio e iones carbonato es intentar simular *in vitro* el comportamiento de las proteínas intraminerales dentro del fluido uterino del ave. Con base en estos resultados puede ser probable que estas dos proteínas intraminerales tengan funciones relativamente distintas dentro del proceso de biomineralización del cascarón de huevo.

3.3. Influencia de las proteínas SCA-1 y SCA-2 sobre la cristalización del carbonato de calcio

La cristalización *in vitro* del carbonato de calcio (calcita) fue realizada en presencia de tres proteínas intraminerales (SCA-1, SCA-2 y OC-17) y una proteína aislada de la parte interna del huevo, la lisozima. Como se esperaba, en ausencia de proteínas se observaron cristales romboédricos perfectos de calcita (**Figura 32a**). A altas concentraciones de proteína intramineral se observa una gran modificación del hábito cristalino (**Figura 32 b-d**). Según estos resultados se puede decir que la lisozima además de controlar el número de núcleos cristalinos, permite conservar el hábito cristalino. Ahora bien, no es claro el papel de la lisozima en la formación del cascarón de huevo.

Por otro lado, las proteínas SCA-1, SCA-2 y OC-17 presentan una interacción **proteína-cristal** ya que cambian el hábito cristalino y producen agregados de CaCO_3 muy similares a los encontrados en la zona mamilar del cascarón de huevo de avestruz (**Figura 31**).

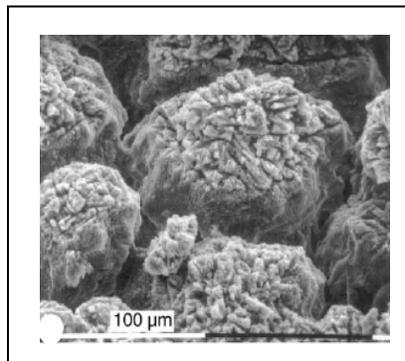


Figura 31. Vista frontal de los conos mamilares del cascarón de huevo de avestruz (Dauphin, 2006). Escala: 100 μm .

Estas observaciones soportan la hipótesis de que estas proteínas intraminerales tienen cierta influencia en el control del crecimiento de los cristales de calcita y como consecuencia juegan un papel importante en la organización estructural y las propiedades mecánicas del cascarón de huevo.

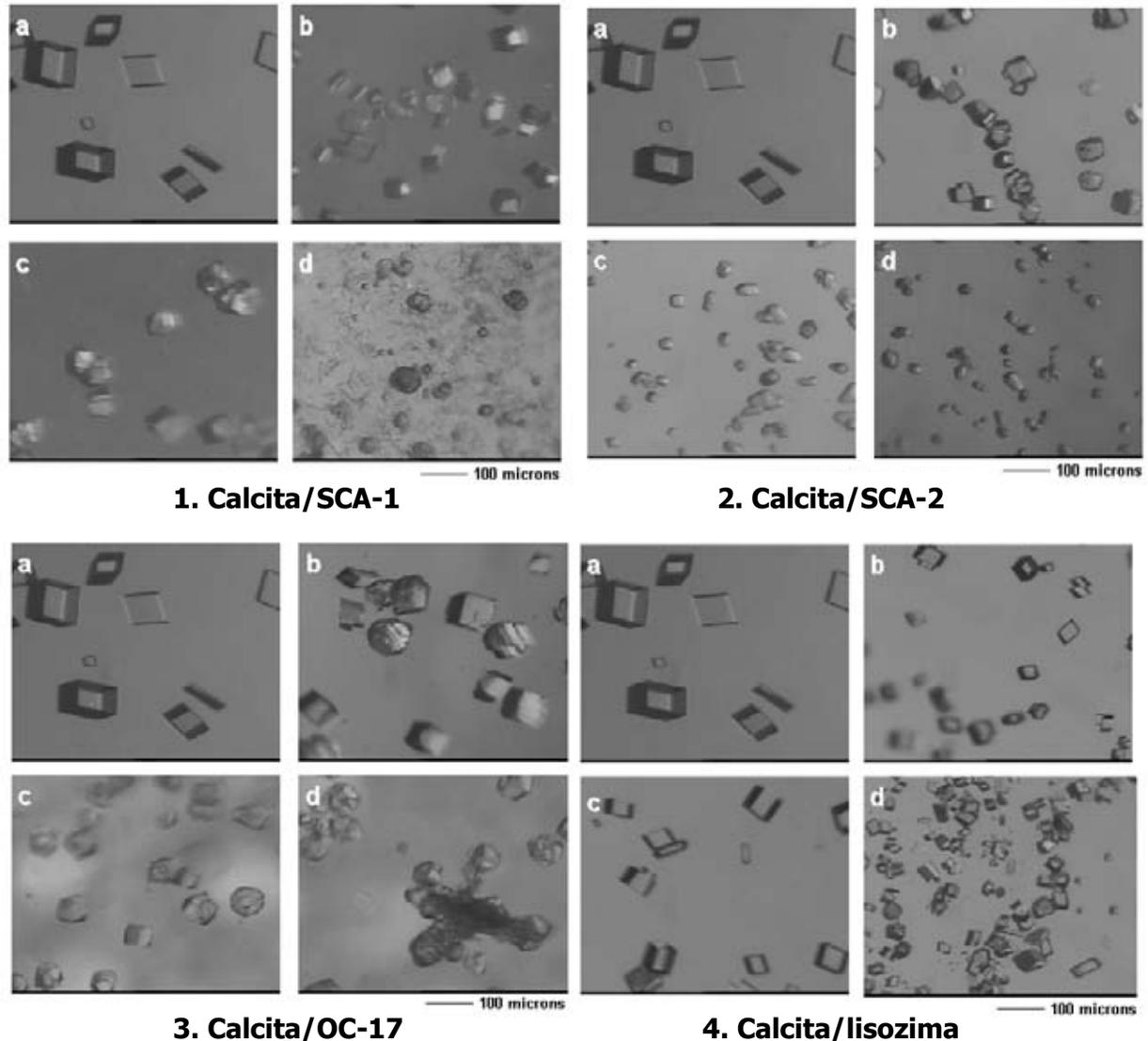


Figura 32. Cristalización de calcita en presencia de algunas proteínas intraminerales presentes en los cascarones de huevos de algunas aves. **a)** Imagen del control (concentración de proteína = 0.0 µg), se pueden observar los cristales romboédricos perfectos de calcita. **b-d)** cristales de calcita crecidos bajo la presencia de 50, 100 y 200 µg de las proteínas respectivamente. Escala: 100 µm.

3.4. Interacción de las proteínas SCA-1 y SCA-2 con iones carbonato. Aplicaciones al diseño de un biosensor de iones carbonato

Se decidió investigar la interacción entre estas proteínas y el anión más abundante involucrado en la formación del cascarón de huevo, el anión carbonato (CO_3^-). Se decidió usar este anión para los estudios electroquímicos porque es un ión electroactivo y quizás se observe el mismo comportamiento en los procesos de biomineralización de la calcita.

Se realizaron experimentos electroquímicos en un potencióstato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30. Inicialmente se adsorbieron las proteínas SCA-1 y SCA-2 sobre un electrodo de pasta de carbono y se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica en una celda electroquímica de tres electrodos con el sistema $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{LiClO}_4$ (Figuras 12 y 15). Es necesario remarcar que la afinidad de estas proteínas por el electrodo de pasta de carbono está relacionada con la capacidad de adsorción de la proteína. Es conocido que los electrodos de pasta de carbono muestran una fuerte interacción con moléculas orgánicas (Kuwana, 1964).

La barrera anódica del LiClO_4 incrementa su valor con cada adición de aniones CO_3^- a la solución. La proteína SCA-1 muestra una interacción apreciable con los iones carbonato. El incremento de su barrera anódica es mucho mayor que el incremento del blanco (interacción carbonato-ET, sin proteína adsorbida). Por otro lado se observa una muy leve interacción entre la proteína SCA-2 y los aniones carbonato (**Figura 33**). Esto se puede relacionar con los estudios de DLS, en los que se observa una mayor interacción y una formación de agregados uniformes de la proteína SCA-1 en presencia de iones carbonato.

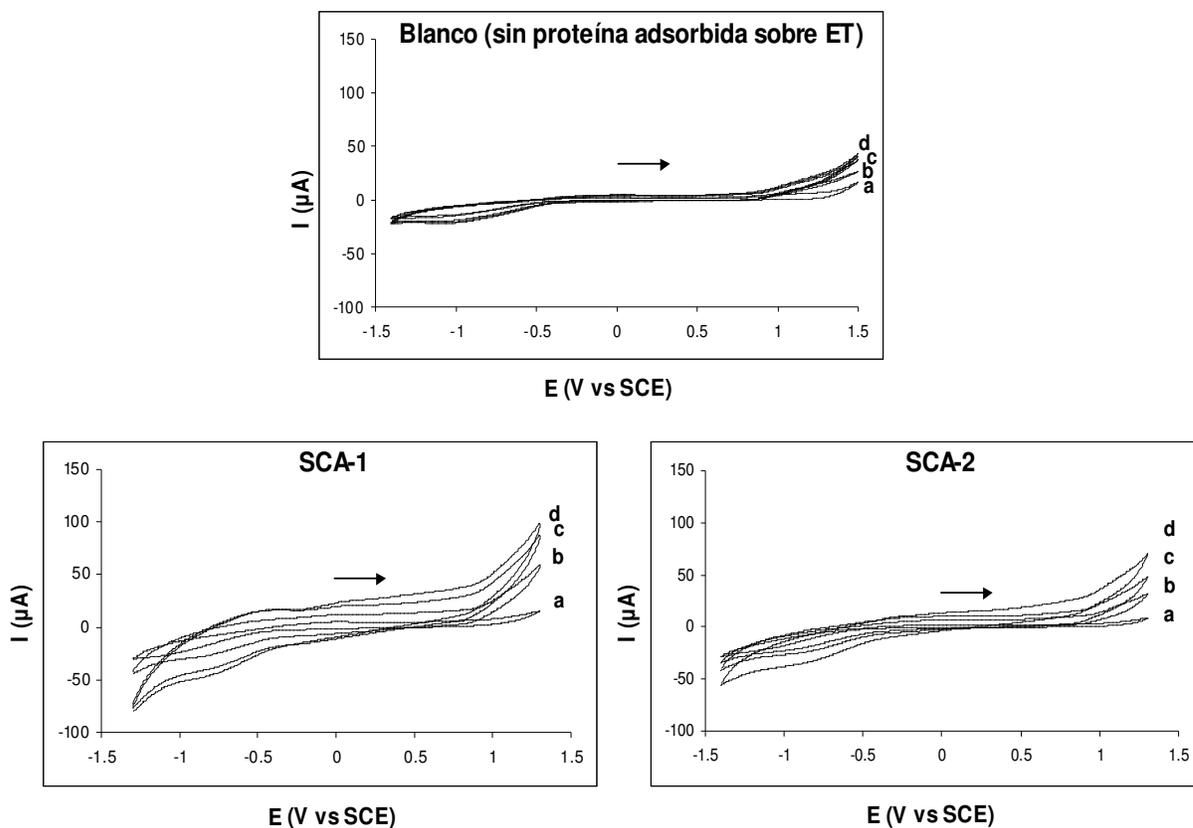


Figura 33. Voltamperogramas cíclicos (5 ciclos) de las proteínas SCA-1 y SCA-2 usando una celda electroquímica. Disolvente: agua desionizada. Velocidad de barrido: 100 mVs^{-1} . **ET**: electrodo de pasta de carbono ($10 \mu\text{g}$ de proteína adsorbida en su superficie); **ER**: electrodo de calomel saturado; **EA**: alambre de Pt. **a**) LiClO_4 0.1 M (sin adición de iones carbonato), **b-d**) adiciones sucesivas de Na_2CO_3 a la celda electroquímica para observar la interacción proteína-carbonato (ver los valores numéricos en la **figura 34**).

El incremento en los valores de la barrera anódica cuando las proteínas intraminerales están presentes, está de acuerdo con la hipótesis de la interacción entre la proteína adsorbida en el electrodo de trabajo y los aniones carbonato. Se puede visualizar mejor la interacción proteína-carbonato, graficando la respuesta electroquímica normalizada (I/I^0) de cada uno de los voltamperogramas cíclicos obtenidos para cada una de las proteínas *versus* concentración de iones carbonato (mM) adicionados a la celda electroquímica (**Figura 34**).

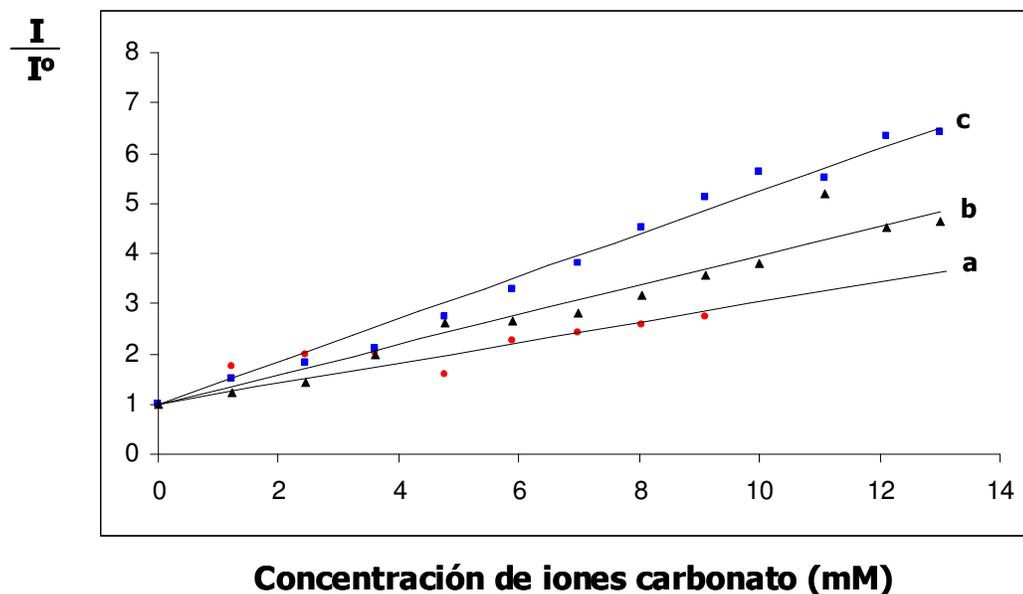
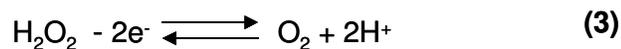
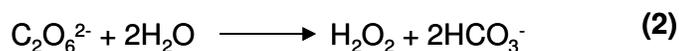
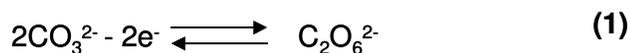
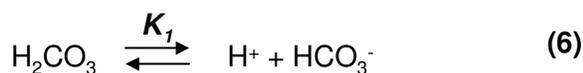
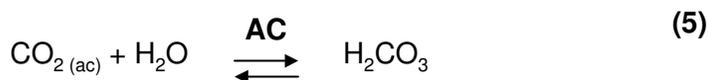
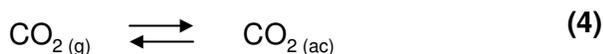


Figura 34. Respuesta electroquímica normalizada tomada a 1.3 V *versus* concentración de iones carbonato usando un electrodo de pasta de carbono. **a)** Blanco, **b)** SCA-2, **c)** SCA-1.

Estas observaciones de interacción proteína-carbonato para cada una de estas proteínas intraminerales podrían ser útiles en la construcción de un *biosensor de iones carbonato*. Por otro lado, estas observaciones también son útiles para responder algunas preguntas relacionadas con los *procesos de biomineralización*. El blanco en la figura 34a hace referencia a la interacción entre los iones carbonato y el electrodo de trabajo de pasta de carbono. El anión carbonato por sí sólo presenta un proceso redox característico. Zhang (2005) reporta la oxidación electroquímica del carbonato en solución acuosa a pH 10.75 a percarbonato o peroxidicarbonato (reacción 1). Se ha demostrado por estudios químicos y electroquímicos que el ion percarbonato se hidroliza a peróxido de hidrógeno (reacción 2) y este peróxido de hidrógeno puede producir oxígeno molecular por oxidación en el electrodo (reacción 3).



El intervalo de pH en el que se hicieron los experimentos electroquímicos de voltamperometría cíclica estuvo entre 7.2 – 7.6 (sin tamponar). Si se observan los pasos que involucra el proceso de biomineralización del carbonato de calcio en seres vivos, se puede deducir que en este intervalo de pH en el que se trabajó, el equilibrio favorece al ion bicarbonato (Mann, 1989):

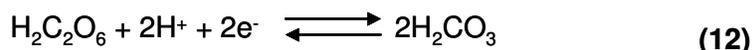
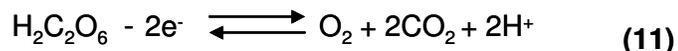
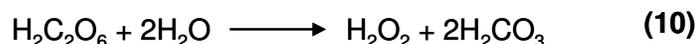
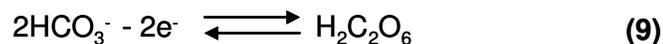


La anhidrasa carbónica convierte el $\text{CO}_{2(ac)}$ en H_2CO_3 (reacción 5). Antes de que se dé la formación del carbonato de calcio, el ácido carbónico debe transformarse a bicarbonato (pK_1

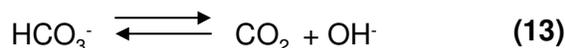
6.31) (reacción 6) y el bicarbonato en carbonato (pK_2 10.33) (reacción 7). Fernández (2004) reporta la formación *in vitro* de núcleos cristalinos de carbonato de calcio a pH 7.4 (Figura 3). Esto quiere decir que el pH en el que se forman los núcleos cristalinos de carbonato de calcio no favorece a la concentración del ion carbonato. Sin embargo, se dice que estas proteínas tienen afinidad por iones carbonato porque la fase mineral del cascarón de huevo de las aves es el *carbonato de calcio*. Sí las proteínas están encargadas de formar núcleos cristalinos, necesariamente serán núcleos de carbonato de calcio, sin importar si la concentración de carbonatos está favorecida o no. *Ahora bien, el mecanismo utilizado por las proteínas intraminerales para realizar este proceso es aún desconocido.* Para poder entender este fenómeno, es necesario tener en cuenta que en los procesos de biomineralización existen dos rutas distintas por medio de las cuales se puede formar un núcleo cristalino (Mann, 1989):

1. Incremento en la supersaturación del sistema, ya sea por un flujo activo de iones hacia el medio de cristalización o por un aumento en el pH.
2. Disminución de la energía de activación para el proceso de nucleación, por medio de la presencia de una superficie orgánica (matriz orgánica) que facilite la formación del núcleo.

El proceso de nucleación del ave involucra necesariamente la segunda ruta, porque proporciona una superficie orgánica (proteínas) (Figura 2) que puede interactuar con los iones del medio (iones bicarbonato) y favorecer la formación del núcleo cristalino de *carbonato de calcio*. La concentración del ion bicarbonato es mayor en el pH en que se realizaron los experimentos electroquímicos. Castelfranco (2007) reporta la oxidación del ion bicarbonato (reacción 9) a ácido peroxidicarbónico:



El ácido peroxidicarbónico se puede hidrolizar a peróxido de hidrógeno y ácido carbónico (reacción 10). También se puede oxidar a oxígeno molecular y CO_2 (reacción 11) o reducir a ácido carbónico (reacción 12). Hori (1983) también reporta la reducción del ion bicarbonato a formiato por medio de la disociación inicial del bicarbonato a CO_2 (reacciones 13 y 14):



A diferencia del cascarón de huevo de gallina y del cascarón de huevo de ganso, el cascarón de huevo de avestruz tiene dos proteínas intraminerales con un dominio similar al de lectina tipo-C, la SCA-1 y la SCA-2. Hoy en día es desconocido el motivo por el cual la gallina y el ganso tienen una sola proteína intramineral en sus cascarones, mientras que el avestruz tiene dos. Se cree que la aparición de dos proteínas con un dominio similar al de lectina tipo-C en el avestruz pudo ser fruto de la duplicación de un gen después de la divergencia evolutiva entre estas aves o que uno de los dos genes provenientes de un posible ancestro común fue perdido en el linaje de gansos y gallinas (Mann, 2006).

Es evidente que existen diferencias entre los cascarones de huevo de gallina, ganso y avestruz. Mientras que el cascarón de huevo de gallina tiene entre 0.3 - 0.4 mm de grueso, el cascarón de huevo de avestruz tiene aproximadamente 2.5 mm de grueso. Debido a sus extraordinarias propiedades mecánicas, el cascarón de huevo de avestruz se ha utilizado en experimentos de cirugía facial reconstructiva en animales, usándolo como sustituto de hueso (Mann, 2004). No se sabe si esta diferencia en las propiedades mecánicas entre los cascarones de los huevos de estas tres aves sean el motivo por el cual las avestruces conserven dos proteínas intraminerales en su cascarón, mientras que la gallina y el ganso sólo conserven una.

La proteína SCA-1 mostró una gran interacción con iones carbonato, mientras que la proteína SCA-2 mostró una interacción menor. Quizás la SCA-2 mostró una interacción menor con iones carbonato porque dentro del mismo cascarón se encuentra la SCA-1 (de gran interacción) por lo que podría asumirse que las proteínas SCA-1 y SCA-2 pudieran trabajar en conjunto. Con base en las reacciones redox del carbonato, se puede *proponer* un mecanismo de interacción proteína-carbonato (**Figura 35**). En un primer paso, la proteína puede fijar dos iones carbonato de la disolución (**I**) para luego oxidar estas dos moléculas de carbonato, liberar $2e^-$ y formar un complejo proteína-percarbonato (**II**). Esto estaría de acuerdo con la reacción de oxidación del carbonato a percarbonato (reacción 1). Finalmente se libera el complejo proteína-percarbonato (**II**) por oxidación del percarbonato a O_2 , CO_2 , $2e^-$ (reacción 11) y proteína libre (**III**). Este mecanismo propuesto puede explicar el aumento de la barrera anódica cuando la proteína está adsorbida sobre el electrodo de trabajo de pasta de carbono y se adicionan iones carbonato a la celda electroquímica.

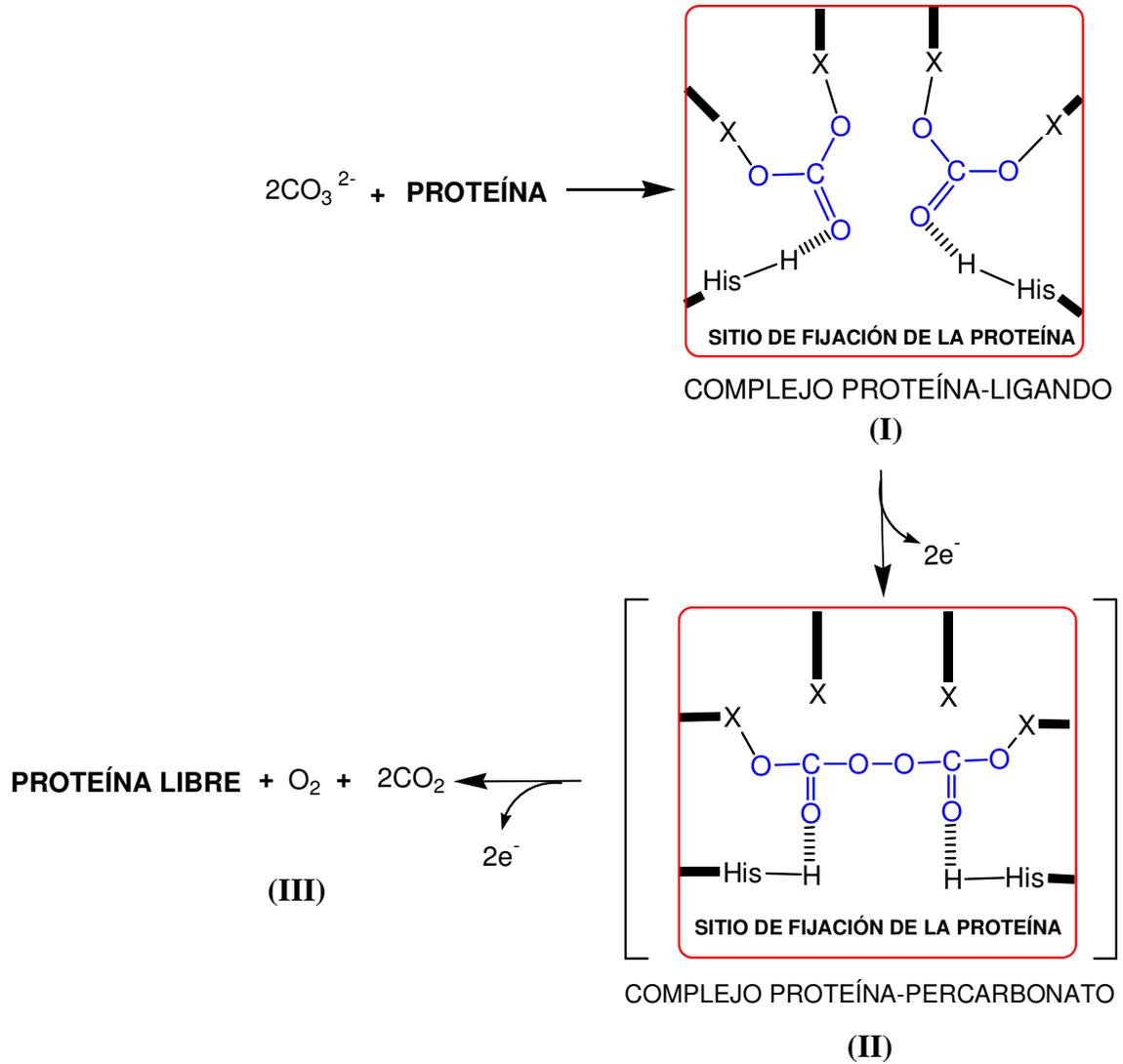


Figura 35. Mecanismo propuesto para la interacción proteína-carbonato y para la oxidación de éste en el electrodo de trabajo de pasta de carbono.

4. CONCLUSIONES

- En los experimentos de dispersión dinámica de luz se observó un comportamiento de agregación en agua completamente al azar de las proteínas SCA-1 y SCA-2, así como se observaron en reportes anteriores, fenómenos de agregación en la ansocalcina y la OC-17. Estos resultados podrían ser un indicio del estado funcional *in vivo* de estas proteínas intraminerales del cascarón de huevo de avestruz, en donde se cree que el fenómeno de agregación es necesario para que estas proteínas puedan formar una especie de “templado” sobre el cual se depositen los núcleos cristalinos de carbonato de calcio y así se forme el cascarón. En presencia de iones carbonato, las proteínas SCA-1 y SCA-2 mostraron un comportamiento diferente. La proteína SCA-1 presentó una interacción mayor con iones carbonato, formando agregados de diámetro uniforme en casi todo el intervalo de temperaturas analizado, mientras que la proteína SCA-2 se agregó en partículas de menor tamaño que cuando estaba disuelta en agua y se observó una monodispersidad de la muestra sólo en algunos valores de temperatura. En presencia de solución amortiguadora de citratos se logró estabilizar el monómero de SCA-1 y SCA-2. Este amortiguador podría ser usado para cristalizar la proteína SCA-2.
- Se observó la influencia de las proteínas SCA-1, SCA-2 y OC-17 sobre la morfología macroscópica de la calcita mediante experimentos de cristalización *in vitro* de carbonato de calcio. Según estos resultados, las proteínas SCA-1, SCA-2 y OC-17 cambian el hábito cristalino, produciendo agregados de CaCO_3 muy similares a los encontrados en la zona mamilar del cascarón de huevo. Estas observaciones soportan la hipótesis de que estas proteínas intraminerales tienen cierta influencia en el control del crecimiento de cristales de calcita y como consecuencia, juegan un papel importante en la organización estructural y

propiedades mecánicas del cascarón de huevo. Por otro lado, se observó un efecto distinto de la lisozima sobre la morfología macroscópica de los cristales de carbonato de calcio. A diferencia de las proteínas SCA-1, SCA-2 y OC-17, la lisozima además de controlar el número de núcleos cristalinos, permite que se conserve el hábito cristalino. Es probable que la lisozima tenga cierta influencia en los procesos de biomineralización del cascarón de huevo, aunque en la actualidad no se sabe con certeza cuál es ese papel.

- Se demostró por medio de estudios electroquímicos de voltamperometría cíclica, que las proteínas SCA-1 y SCA-2 tienen afinidad por iones carbonato. Según esto, es probable que en la fase inicial de formación del cascarón de huevo de las aves, estas proteínas tengan una afinidad preferida por iones carbonato para formar los núcleos cristalinos de carbonato de calcio. Se observó una marcada respuesta electroquímica de la proteína SCA-1 por iones carbonato, mientras que la proteínas SCA-2 mostró una menor afinidad por iones carbonato. Es probable que la SCA-2 tenga una respuesta menor a iones carbonato porque dentro del mismo cascarón se encuentra la SCA-1 (de gran interacción con iones carbonato). También se propuso un mecanismo para la interacción proteína-carbonato en un electrodo de trabajo de pasta de carbono.

5. PERSPECTIVAS

- Cristalizar las proteínas SCA-2 y ansocalcina
- Difundir iones carbonato en la estructura cristalina de la OC-17, SCA-1, SCA-2 y ansocalcina para reconocer el sitio de unión a carbonato.
- Proponer un modelo de biomineralización con base en estos estudios cristalográficos.

6. REFERENCIAS

- Addadi, L.; Weiner, S. **1992**. Control and Design Principles in Biological Mineralization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 153-169.
- Addadi, L.; Weiner, S. **1997**. A pavement of pearl. *Nature*. 389, 912-915.
- Arias, J. L.; Fink, D. J.; Xiao, S. P.; Heuer, A. H. & Caplan, A. I. **1993**. Biomineralization and eggshell: cell mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *International Review of Cytology*. 145, 217-250.
- Castelfranco, P. A.; Lu, Y. K.; Stemler, A. J. **2007**. Hypothesis: the peroxydicarbonic acid cycle in photosynthetic oxygen evolution. *Photosynthesis Research*. 94, 235-246.
- Chasteen, N. D. & Harrison, P. M. **1999**. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology*. 126, 182-194.
- Chow, G-M. & Gonsalves, K. (ed). **1996**. Nanotechnology. Molecularly designed materials. *ACS Symposium series 622. American Chemical Society. USA*. 413 pp.
- Dauphin, Y.; Cuif, Jean-Pierre.; Salome, M.; Susini, J.; Williams, C. T. **2006**. Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386, 1761-1771.
- Drickamer, K. **1999**. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 585-590.
- Dupuy, V.; Blesbois, E. **1996**. The effects of age on the composition of uterine fluid of broiler breeder hens and on maintenance of quality of fowl spermatozoa when stored in uterine fluid or in a synthetic medium. *Theriogenology*. 45, 1221-34.
- Fernández, M. S.; Araya, M. & Arias, J. L. **1997**. Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biology*. 16, 13-20.
- Fernández, M. S.; Passalacqua, K.; Arias, J. I.; Arias, J. L. **2004**. Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation. *Journal of Structural Biology*. 148, 1-10

- Heredia, A.; Rodríguez-Hernández, A. G.; Lozano, L. F.; Peña-Rico, M. A.; Velázquez, R.; Basiuk, V. A.; Bucio, L. **2005**. Microstructure and thermal change of texture of calcite crystals in ostrich eggshell *Struthio camelus*. *Materials Science & Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems*. C25, 1-9.
- Hincke, M. T.; Gautron, J.; Panheleux, M.; Garcia-Ruiz, J.; McKee, M. D.; Nys, Y. **2000**. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology*, 19, 443-453.
- Hincke, M. T.; Tsang, C. P.; Courtney, M.; Hill, V. & Narbaitz, R. **1995**. Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin-17). *Calcif. Tiss. Int.* 56, 578-583.
- Hori, Y.; Suzuki, S. **1983**. Electrolytic reduction of bicarbonate ion at a mercury electrode. *Journal of the Electrochemical Society*. 130, 2387-90
- Hull, D. **1981**. An introduction to composite materials. *Cambridge University Press. USA*. p. 246.
- Kuwana, T.; French, W. **1964**. Electrooxidation or reduction of organic compounds in aqueous solutions by using carbon paste electrode. *Anal. Chem.*36, 241-2.
- Lakshminarayanan, R.; Joseph, J. S.; Kini, R. M.; and Valiyaveetil, S. **2005**. Structure-Function Relationship of Avian Eggshell Matrix. Proteins: A Comparative Study of Two Major Eggshell Matrix Proteins, Ansocalcin and OC-17. *Biomacromolecules*. 6, 741-751.
- Lakshminarayanan, R.; Kini, R. M.; Valiyaveetil, S. **2002**. Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 5155-5159.
- Lakshminarayanan, R.; Valiyaveetil, S.; Rao, V. S.; Kini, R. M. **2003**. Purification, Characterization, and in Vitro Mineralization Studies of a Novel Goose Eggshell Matrix Protein, Ansocalcin. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 2928-2936.

- Mann, K.; Siedler, F. **1999**. The amino acid sequence of ovocleidin-17, a major protein of the avian eggshell calcified layer. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 47, 997-1007.
- Mann, K.; Siedler, F. **2004**. Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence and posttranslational modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1696, 41-50.
- Mann, K.; Siedler, F. **2006**. Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 143B, 160-170.
- Mann, S. **2001**. Biomineralization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. *Oxford University Press*. p. 198.
- Mann, S.; Webb, J & Williams, J. P. (ed). **1989**. Biomineralization. Chemical and biochemical perspectives. *VCH. N. Y. USA*. 541 pp.
- Mark, J. E. & Y-C, Lee. (ed). **1995**. Hybrid organic-inorganic composites. ACS Symposium series 585. *American Chemical Society. USA*. p. 378.
- Panheleux, M.; Bain, M.; Fernández, M. S.; Morales, I.; Gautron, J.; Arias, J. L.; Solomon, S. E.; Hincke, M. & Nys, Y. **1999**. Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study. *British Poultry Science*. 40, 240-252
- Reyes-Grajeda, J. P.; Jauregui-Zúñiga, D.; Rodríguez-Romero, A.; Hernández-Santoyo, A.; Bolaños-García, V.; Moreno, A. **2002**. Crystallization and preliminary X-ray analysis of ovocleidin-17 a major protein of the *Gallus gallus* eggshell calcified layer. *Protein and Peptide Letters*. 9, 253-257.
- Reyes-Grajeda, J. P.; Moreno, A.; Romero, A. **2004**. Crystal Structure of Ovocleidin-17, a Major Protein of the Calcified *Gallus gallus* Eggshell. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 40876-40881.

- Reyes-Grajeda, J. P.; Marín-García, L.; Stojanoff, V.; Moreno, A. **2007**. Purification, crystallization and preliminary x-ray analysis of struthiocalcin-1 from ostrich (*Struthio camelus*) eggshell. *Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. F63, 987-989.
- Sarashina, I. & Endo, K. **1998**. Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implications for calcium carbonate biomineralization. *American Mineralogist*. 83, 1510-1515
- Sarikaya, M. **1994**. An introduction to biomimetics: a structural viewpoint. *Microscopy Research and Technique*. 27, 360-375.
- Solomon, S. E. **1999**. An egg ist ein ei, es un huevo, est un oeuf. *British Poultry Science*. 40, 5-11.
- Weiner, S. & Addadi, L. **2002**. At the cutting edge. *Science*. 298, 375-376.
- Wilson, W. **1990**. Monitoring crystallization experiments using dynamic light scattering: assaying and monitoring protein crystallization in solution. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. 1, 110-117.
- Wilt, F. **1999**. Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton. *Journal of Structural Biology*. 126, 216-226.
- Zelensky, A. N.; Gready, J. E. **2005**. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*. 272, 6179-6217.
- Zhang, J.; Oloman, C. W. **2005**. Electro-Oxidation of Carbonate in Aqueous Solution on a Platinum Rotating Ring Disk Electrode. *Journal of Applied Electrochemistry*. 35, 945-953.

APÉNDICE A

(ÍNDICE DE FIGURAS)

Figura 1. a) Cristal de la OC-17, **b)** Cristales de la SCA-1.

Figura 2. Representación esquemática de la nucleación del carbonato de calcio por parte de una proteína intramineral del cascarón de huevo de las aves.

Figura 3. a) Vista frontal de las mamilas (m) depositadas sobre la membrana orgánica fibrilar (mo) del cascarón de huevo de gallina común, **b)** pequeños cristales de CaCO_3 depositados sobre las mamilas (24 horas), **c)** grandes cristales de CaCO_3 depositados sobre las mamilas (72 horas).

Figura 4. a) Esquema general del cascarón de huevo de las aves, **b)** Vista transversal del cascarón de huevo de avestruz.

Figura 5. a) Vista transversal del cascarón de huevo de gallina común, **b)** Vista transversal de la interfase entre la membrana orgánica fibrilar y la zona mamilar, **c)** Vista frontal de la membrana orgánica fibrilar, **d)** Vista lateral de la membrana orgánica fibrilar.

Figura 6. Porcentajes en la identidad de secuencia de aminoácidos entre proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves.

Figura 7. Alineamiento de secuencias entre proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves. Las serinas fosforiladas están subrayadas (**S**). Las cisteínas preservadas en todas las proteínas están en negrita (**C**) y las cisteínas extras están en negrita y cursiva (**C**). Hu-PSP: proteína litostatina de cálculos pancreáticos humanos.

Figura 8. a) Representación ideal de una proteína con un CTLD. En "azul" se observa la región responsable de la unión de iones calcio, **b)** Estructura cristalina de la OC-17, **c)** Modelo molecular de la ansocalcina.

Figura 9. Alineamiento de secuencias entre las proteínas SCA-1, SCA-2, OC-17 y la RMBP.

Figura 10. Representación esquemática de los componentes básicos de un equipo de DLS

Figura 11. Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en un DLS.

Figura 12. Interacción proteína-carbonato. **ET:** pasta de carbono (transductor de señal).

Figura 13. a) Señal de excitación en voltamperometría cíclica. **b)** Voltamperograma cíclico, arriba: pico anódico (oxidación), abajo: pico catódico (reducción).

Figura 14. Diseño experimental utilizado para la síntesis *in vitro* de cristales de CaCO₃ (calcita).

Figura 15. Representación esquemática de una celda electroquímica de tres electrodos.

Figura 16. Microestructura interdigital de platino utilizada para biosensar las interacciones proteína-carbonato. **a)** dispositivo vacío, **b)** electrodo de pasta de carbono con la solución de proteína adsorbida en la superficie.

Figura 17. Capa sólida de proteína SCA-1 adsorbida sobre un electrodo de trabajo de pasta de carbono.

Figura 18. 12.5 % SDS-PAGE. Carril 1: marcadores de peso molecular (SeeBlue). Carril 2: extracto intramineral del cascarón de huevo de avestruz.

Figura 19. a) Cromatograma del extracto intramineral usando una columna Júpiter C-18 de HPLC fase reversa (gradiente lineal de 0-100 % de **B** en 58 minutos a un flujo de 1 mL / min), **b)** SCA-2 repurificada por HPLC fase reversa.

Figura 20. a) 12.5 %SDS-PAGE. Carril 1: marcadores de peso molecular (SeeBlue). Carril 2 y 3: SCA-1. Carril 4 y 5: SCA-2. **b)** 12.5 %SDS-PAGE. Carril 1: SCA-2 después de repurificarla en una columna Júpiter C-18 de HPLC fase reversa. Carril 2: marcadores de peso molecular (SeeBlue).

Figura 21. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación en agua de las proteínas: **a)** SCA-1, **b)** SCA-2.

Figura 22. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-e)** en diferente solución amortiguadora.

Figura 23. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-c)** en solución amortiguadora de citratos, **d)** solución amortiguadora de citratos a pH 4.74 sin tomar los puntos de mayor agregación.

Figura 24. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-e)** en diferente solución amortiguadora.

Figura 25. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-d)** en solución amortiguadora de citratos.

Figura 26. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-e)** en solución de carbonato de sodio.

Figura 27. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-e)** en solución de carbonato de sodio.

Figura 28. Modelo del “templado de proteínas” actuando como centros de nucleación del carbonato de calcio (calcita).

Figura 29. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-1. **a)** en agua, **b-d)** en solución de CaCl_2 , **e)** en solución de NaCl .

Figura 30. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína SCA-2. **a)** en agua, **b-d)** en solución de CaCl_2 , **e)** en solución de NaCl .

Figura 31. Vista frontal de los conos mamilares del cascarón de huevo de avestruz.

Figura 32. Cristalización de calcita en presencia de algunas proteínas intraminerales presentes en los cascarones de huevos de algunas aves. **a)** Imagen del control (concentración de proteína = $0.0 \mu\text{g}$), se pueden observar los cristales romboédricos perfectos de calcita. **b-d)** cristales de calcita crecidos bajo la presencia de 50, 100 y $200 \mu\text{g}$ de las proteínas respectivamente. Escala: $100 \mu\text{m}$.

Figura 33. Voltamperogramas cíclicos (5 ciclos) de las proteínas SCA-1 y SCA-2 usando una celda electroquímica. Disolvente: agua desionizada. Velocidad de barrido: 100 mVs^{-1} . **ET**: electrodo de pasta de carbono ($10 \mu\text{g}$ de proteína adsorbida en su superficie); **ER**: electrodo de calomel saturado; **EA**: alambre de Pt. **a)** LiClO_4 0.1 M (sin adición de iones carbonato), **b-d)** adiciones sucesivas de Na_2CO_3 a la celda electroquímica para observar la interacción proteína-carbonato (ver los valores numéricos en la **figura 34**).

Figura 34. Respuesta electroquímica normalizada tomada a 1.3 V *versus* concentración de iones carbonato usando un electrodo de pasta de carbono. **a)** Blanco, **b)** SCA-2, **c)** SCA-1.

Figura 35. Mecanismo propuesto para la interacción proteína-carbonato y para la oxidación de éste en el electrodo de trabajo de pasta de carbono.

APÉNDICE B

(Crystal Growth & Design, 2008, 8, 1340-1345.)