



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO
CRISTALINO DE PROTEÍNAS: CRISTALIZACIÓN DE
FERRITINA BAJO LA INFLUENCIA DE UN CAMPO
ELÉCTRICO INTERNO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C A

P R E S E N T A

ANDREA E. GUTIÉRREZ QUEZADA



MÉXICO, D.F. 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Miguel Antonio Costas Basín
Vocal	Dr. José de Jesús García Valdés
Secretario	Dr. Abel Moreno Cárcamo
1° Suplente	Dr. Bernardo Frontana Uribe
2° Suplente	Dra. Ma. Guadalupe Lemus Barajas

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
Circuito Exterior, CU. 04510, México, D.F.

Asesor del tema: Dr. Abel Moreno Cárcamo

Sustentante: Andrea Elizabeth Gutiérrez Quezada

Parte de este trabajo se presentó en:

**12TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE CRYSTALLIZATION OF
BIOLOGICAL MACROMOLECULES, CANCÚN, MÉXICO, 6 - 9 de mayo de
2008.**

Fragmentos de un evangelio apócrifo

3. Desdichado el pobre en espíritu, porque bajo la tierra será lo que ahora es en la tierra.
4. Desdichado el que llora, porque ya tiene el hábito miserable del llanto.
5. Dichosos los que saben que el sufrimiento no es una corona de gloria.
6. No basta ser el último para ser alguna vez el primero
7. Feliz el que no insiste en tener razón, porque nadie la tiene o todos la tienen.
8. Feliz el que perdona a los otros y el que se perdona a sí mismo.
10. Bienaventurados los que no tienen hambre de justicia, porque saben que nuestra suerte, adversa o piadosa, es obra del azar, que es inescrutable.
14. Nadie es la sal de la tierra, nadie, en algún momento de su vida, no lo es.
16. No hay mandamiento que no pueda ser infringido, y también los que digo y los que los profetas dijeron.
18. Los actos de los hombres no merecen ni el fuego ni los cielos.
19. No odies a tu enemigo, porque si lo haces, eres de algún modo su esclavo. Tu odio nunca será mejor que tu paz.
20. Si te ofendiere tu mano derecha, perdónala; eres tu cuerpo y eres tu alma y es arduo, o imposible, fijar la frontera que los divide...
24. No exageres el culto de la verdad; no hay hombre que al cabo de un día, no haya mentido con razón muchas veces.
27. Yo no hablo de venganzas ni de perdones; el olvido es la única venganza y el único perdón. Hacer el bien a tu enemigo puede ser obra de justicia y no es arduo; amarlo, tarea de ángeles y no de hombres.
29. Hacer el bien a tu enemigo es el mejor modo de complacer tu vanidad.
34. Busca por el agrado de buscar, no por el de encontrar...
40. No juzgues al árbol por sus frutos ni al hombre por sus obras; pueden ser peores o mejores.
48. Felices los valientes, los que aceptan con ánimo parejo la derrota o las palmas.
49. Felices los que guardan en la memoria palabras de Virgilio o de Cristo, porque estas darán luz a sus días.
50. Felices los amados y los amantes y los que pueden prescindir del amor.
51. Felices los felices.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT, número de proyecto 82888 y al SNI por la beca otorgada.

A mi asesor, el Dr. Abel Moreno por permitirme laborar en su laboratorio y por compartirme su visión de la ciencia.

Al Dr. Miguel Costas por el tiempo que invirtió en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Jesús García Valdés por sus valiosas observaciones que contribuyeron a mejorar este escrito, así como por todo el tiempo que invirtió en ello. Te agradezco también tu apoyo y orientación como maestro.

Al Dr. Roberto Arreguín, a la Dra. Adela Rodríguez, al Dr. Bernardo Frontana, a la Dra. Patricia Cano, a la Dra. Alejandra Hernández y al Dr. Manuel Salmón por todas sus atenciones y la ayuda que recibí de alguna u otra forma por parte de ellos.

Agradezco muy especialmente a Federico del Río, por su amistad. Gracias por ser la excelentísima persona que eres y uno de los mejores maestros que he tenido. Pero sobre todo gracias por haber tenido siempre las palabras precisas cuando las necesité.

A mis compañeros del departamento de Bioquímica, Azucena, Francisco, Hugo, Yobana y Deyanira, por hacer más fácil mi estancia en el laboratorio y por no escatimar nunca su ayuda y conocimientos.

A mis compañeros de la facultad, porque han dado a mi vida personal y académica una gama de sabores y contrastes. Ha sido un placer recorrer junto a ustedes el surco por el cual han pasado tantos y tantos otros pasarán.

A mi queridísima Alicia, porque quizá seas la única que sabe todo lo que hay detrás de estas páginas. Porque has sido más que un Viernes cuentacuentos para mí. Gracias por compartirme a manos llenas tus colores, tus palabras y tu entusiasmo por la vida.

A Wolframio, por toda tu ternura, paciencia y gratitud. Tú no lo sabes, pero he aprendido mucho de ti.

A Pilar y a Jesús por haber colmado mi vida de un tipo de amor que solo con los años llega a madurar. Por abrirme tan cálidamente la puerta de su casa y por la dichosa infancia que al lado de ustedes pasé.

A Esteban porque me ha llenado de emoción y alegría pasar junto a ti estos trece años de tu vida. Yo no quiero ser un ejemplo para ti, yo quiero ser el soporte e impulso que una hermana mayor, pero sobre todo una amiga puede ser.

A Rafael, porque eres el principal forjador del camino que hasta hoy he recorrido. Por todo tu amor, apoyo y confianza. Gracias papá, este triunfo es más tuyo que mío.

A Rosa María en primera y última instancia. No sabes la emoción inmensa que siento al escribir tu nombre en esta página. Por el ilimitado amor que me das todos los días sin condiciones. Gracias mamá.

A mi bellísima Universidad porque caminando entre tus muros me he sentido plena y llena de felicidad.



Índice

	Página
Índice.....	1
I. Introducción.....	3
II. Objetivos.....	6
III. Antecedentes.....	7
III.1 Cristalización de proteínas.....	8
III.2 Nucleación.....	10
III.3 Cinética de crecimiento de cristales.....	12
III.4 Técnicas de cristalización.....	14
III.5 El empleo de campos eléctricos en la cristalización de proteínas.....	16
III.6 Ferritina: estructura y función.....	17
III.7 Conceptos básicos de electroquímica.....	20
III.8 Electrosíntesis de polipirrol.....	22
IV. Métodos.....	24
IV.1 Muestra.....	25
IV.2 Pruebas de cristalización en microbatch.....	25
IV.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	26
IV.4 Voltamperometría cíclica.....	29
IV.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	32
IV.6 Difracción de rayos X.....	34



V. Resultados y discusión.....	37
V.1 Estado de agregación inicial de la muestra.....	38
V.2 Pruebas de cristalización empleando la técnica batch.....	41
V.3 Cristalización electroasistida galvanostáticamente.....	48
V.4 Comparación de la calidad cristalina mediante difracción de rayos X	57
V.5 Cristalización electroasistida aplicando un intervalo de potencial.....	58
V.6 Caracterización de la superficie cristalina mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	65
V.7 Fijación de cristales de ferritina mediante electrosíntesis de polipirrol.....	68
VI. Conclusiones.....	71
VII. Logros y perspectivas.....	73
VIII. Referencias.....	74



I. INTRODUCCIÓN



La importancia de la cristalización de macromoléculas biológicas

El número de proteínas descubiertas aumenta considerablemente cada día, pero la obtención de su estructura terciaria y cuaternaria es un proceso que no avanza a la par con su descubrimiento. Este hecho se debe a las dificultades que presenta la obtención de un cristal con una calidad adecuada para su estudio estructural 3D, mediante difracción de rayos X, que actualmente es la técnica más empleada para resolver una estructura proteica. (Vekilov & Alexander, 2000; McPherson, 2003). La cristalografía de rayos X requiere de cristales de tamaño adecuado y de alta calidad para la colecta de datos de difracción, es por esto que la cristalización de macromoléculas biológicas, en este caso proteínas, es de gran interés en bioquímica. Desde el punto de vista de la biología estructural, la obtención de cristales, es por lo tanto el paso crucial hacia la determinación de la estructura tridimensional de las diferentes biomacromoléculas (García-Ruiz *et al.*, 1998; McPherson, 2003). El avance en ciertas investigaciones, basadas en la estructura, como ciencia de materiales, las ciencias biomédicas y diseño de fármacos, depende de la comprensión de la relación estructura-función de estas macromoléculas biológicas.

El hecho que no se obtengan fácilmente cristales de proteínas, se debe en gran medida al desconocimiento de la fisicoquímica de las interacciones a escala molecular. Es por esto que la cristalización de proteínas sigue siendo un largo proceso de prueba – error, que a pesar de que se han desarrollado nuevas teorías y tecnologías para encontrar las condiciones de cristalización (como el uso de robots), sigue arrojando cristales de baja calidad cristalina . Estudiar y hasta cierto punto controlar los fenómenos de nucleación y crecimiento de cristales de proteínas se ha vuelto por lo tanto un hecho deseable para los biocristalógrafos. Este estudio constituye una ciencia formal que en años recientes, se ha denominado cristalogénesis biológica. Por otro lado, la cristalización de proteínas ha traído un nuevo interés al descubrir la causa de ciertas enfermedades en la cristalización o agregación de ciertas



proteínas dentro de las células (Hirsch *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1989; Feeling-Taylor *et al.*, 1999).

En este trabajo tiene la finalidad de contribuir a la optimización de técnicas de cristalización, así como a la comprensión del proceso. Para esto, se estudia el fenómeno de nucleación y crecimiento cristalino bajo la influencia de un campo eléctrico interno, de una metaloproteína denominada ferritina proveniente de bazo de equino, partiendo de la siguiente hipótesis:

Si el fenómeno de cristalización de proteínas se rige por el transporte de moléculas cargadas en solución, y la fuerza motriz del proceso es la sobresaturación del sistema, entonces la presencia de un gradiente eléctrico contribuirá a mejorar el proceso de nucleación y en consecuencia, el crecimiento de cristales en una solución que contenga las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo dicho proceso.



II. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar los efectos de un campo eléctrico interno en la cristalización de la metaloproteína ferritina de bazo de equino.

Objetivos particulares:

- Mediante técnicas clásicas de cristalización de biomacromoléculas, se encontrarán las condiciones adecuadas para llevar a cabo los experimentos de electrocristalización de la proteína ferritina.
- Se evaluará cualitativamente la influencia de un campo eléctrico interno sobre la cristalización de ferritina en solución acuosa, dando seguimiento al proceso de electrocristalización a través de técnicas de dispersión dinámica de luz.
- Se comparará la calidad de empaquetamiento de cristales obtenidos en presencia de un campo eléctrico y sin influencia del mismo. Esto mediante técnicas de difracción de rayos X a través de un gráfico de intensidad sobre error estimado en función del límite de resolución.
- Se obtendrán cristales de ferritina por procesos electroasistidos, mediante el uso de voltamperometría cíclica para su caracterización *In situ* empleando técnicas de microscopia de fuerza atómica (AFM).
- Se evaluará la factibilidad de emplear la reacción de polimerización de pirrol para fijar cristales de ferritina en la superficie de un electrodo de grafito para estudios de AFM.



III. ANTECEDENTES



III.1 Cristalización de proteínas

Un cristal es un arreglo periódico tridimensional de moléculas en estado sólido, cuya distribución espacial muestra cierta simetría (Amorós, 1990). La cristalización de macromoléculas tenía a principios del siglo XX una importancia en bioquímica como medio de purificación, ya que la difracción de rayos X tenía entonces muy poco alcance como medio de elucidación estructural. La cristalización de moléculas biológicas data de mediados del siglo XIX, cuando si bien no se conocía la naturaleza de las proteínas, una gran cantidad de ellas fueron cristalizadas (McPherson, 1991). Fue hasta 1934 que Dorothy Crowfoot Hodgkin obtuvo el primer patrón de difracción de rayos X de un cristal de pepsina (Bernal & Crowfoot, 1934). A partir de entonces, y con el advenimiento de las nuevas técnicas de difracción de cristales, el obtener un cristal adecuado para su análisis mediante esta técnica se ha vuelto el llamado “cuello de botella” de la biología estructural.

La cristalización de biomacromoléculas se puede abordar desde la teoría clásica del crecimiento cristalino hasta las más modernas tecnologías y modelos que han surgido en los últimos años.

Las distintas técnicas empleadas en la cristalización de cualquier molécula, lo que hacen es favorecer el surgimiento de un entramado periódico tridimensional que tiene su origen en la tendencia de las moléculas a alcanzar el estado con la menor energía libre posible. La naturaleza de dicho entramado y en general la termodinámica del proceso, es una función de la sobresaturación del sistema, que se define como $\beta = (\text{concentración}) * (\text{solubilidad})^{-1}$. Si $\beta > 1$ se espera que la proteína forme agregados.

Como varía la solubilidad de una proteína con respecto a uno de los muchos parámetros que influyen en su cristalización (pH, fuerza iónica, temperatura, concentración, etc.), se puede describir mediante un diagrama de Ostwald-Miers como el que se muestra en la figura 1. Aquí se muestra la concentración de proteína, es decir su solubilidad, en función del parámetro “p”, generalmente la concentración del agente precipitante, que es un compuesto (regularmente



una sal) que disminuye la solubilidad de la macromolécula (Gilliland, 1988). Las interacciones existentes en una solución de proteína son fuerzas de volumen, interacciones electrostáticas y atracciones de van der Waals. Cambiar alguno de los parámetros "p", modifica estas interacciones y puede conllevar a la alteración de la solubilidad de la macromolécula, variando las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente y conducir a la cristalización.

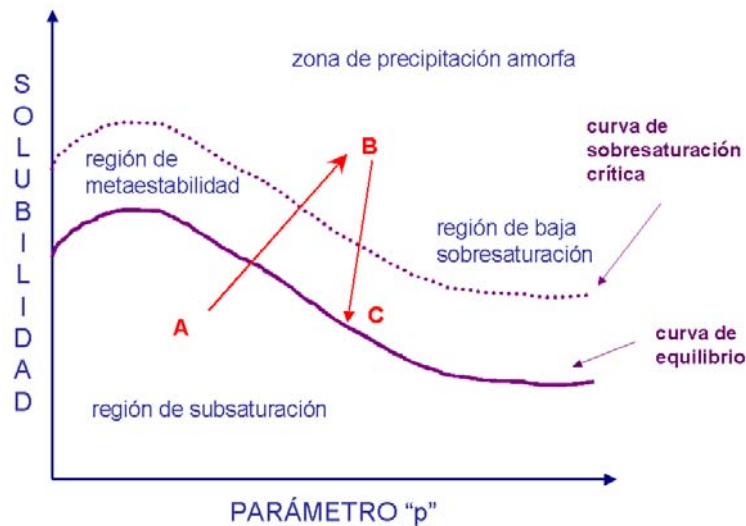


figura 1 Diagrama de Ostwald – Miers que muestra la solubilidad de la proteína en función de un parámetro "p". En rojo se muestra el camino que sigue una proteína durante el proceso de cristalización.

En la figura 1, la línea sólida representa la curva de equilibrio y la línea punteada representa la curva de sobresaturación crítica, también llamada de superequilibrio. La sobresaturación crítica es un umbral cinético asociado con el cambio de fase. El proceso de cristalización está dividido en tres partes: la nucleación, que es el paso crítico del proceso, el crecimiento cristalino y el cese del crecimiento. A diferencia de los compuestos inorgánicos, en las proteínas la nucleación se da a altas sobresaturaciones (que es cuando se supera la barrera de la tensión superficial) y el crecimiento de cristales se da a



bajas sobresaturaciones, en la región metaestable, (el espacio que forman ambas curvas).

Entender algunos de los parámetros termodinámicos de la solución de proteína-agente precipitante ha llevado a que eventualmente el trabajo de cristalizar una macromolécula se haya vuelto un trabajo más racional y cada vez menos fortuito para los cristalógrafos.

III.2 Nucleación

La nucleación es el paso limitante del proceso de cristalización, ya que representa una transición de fase en donde se debe superar una barrera energética. Como se mencionó, la nucleación en proteínas toma lugar en la región de sobresaturación. La nucleación es un proceso espontáneo porque en la región de sobresaturación, el sistema se encuentra en un estado de alta energía libre, para regresar a un estado de menor energía el sistema opta por dos opciones: precipitar o formar núcleos cristalinos. La precipitación ocurre a altas sobresaturaciones, mientras que la nucleación se da en bajas sobresaturaciones. La barrera de energía libre del proceso de nucleación es por lo tanto función del parámetro $\beta = C / C_e$ y del tamaño del agregado, según la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -[(4/3\pi r^3)/\Omega] kT \ln\beta + 4\pi r^2 \gamma$$

ΔG : energía libre del sistema

r : radio del agregado

Ω : volumen ocupado por una molécula en la red cristalina

k : constante de Boltzman

γ : energía superficial



Suponiendo que el agregado que se forma es una esfera, los términos $\frac{4}{3}\pi r^3$ y $4\pi r^2$ corresponden al volumen y al área de dicho agregado respectivamente. En la figura 2 se muestra el comportamiento teórico del proceso de nucleación donde las energías debidas al volumen y a la superficie del agregado en crecimiento se encuentran en competencia. La suma de ambas fuerzas da como resultado la variación de la energía libre en función del tamaño del agregado (r).

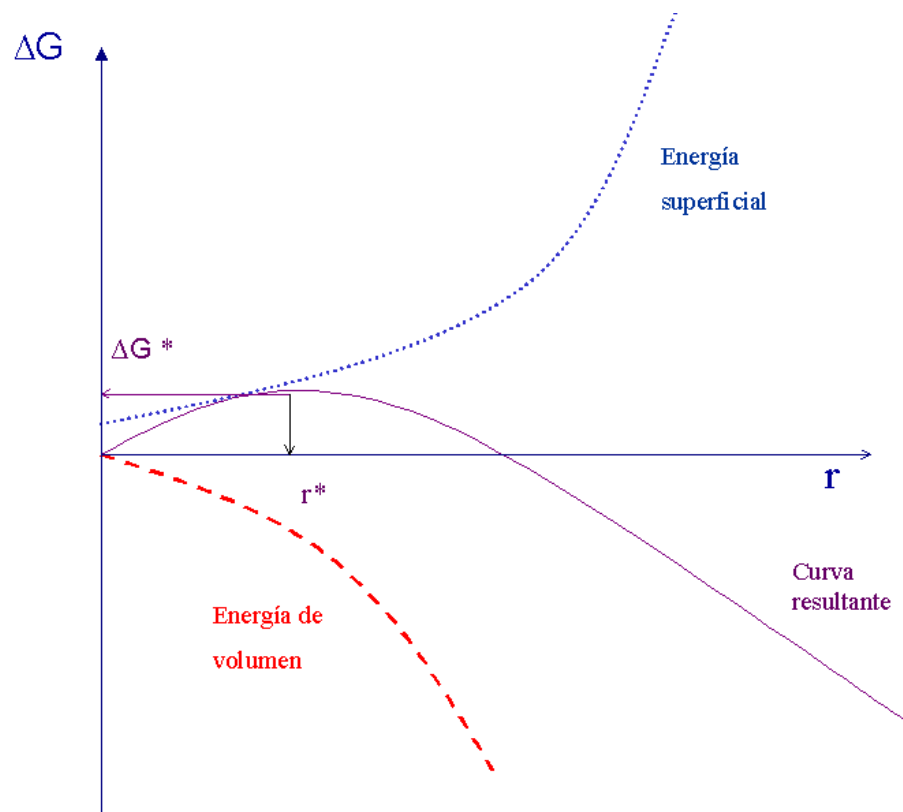


figura 2. Gráfico que muestra la energía libre del proceso de nucleación en función del tamaño del agregado. Las curvas punteadas muestran la contribución de la energía superficial y de volumen, según se indica. La suma de ambas da como resultado la curva continua. ΔG^* es el valor de la barrera energética de formación del núcleo crítico, con tamaño r^* .



El núcleo crítico (r^*) de la nueva fase, tiene las mismas probabilidades de crecer o disolverse dentro de la solución ya que está en un equilibrio lábil con la solución sobresaturada (Oxtoby, 1998). La relación entre el núcleo crítico y la barrera energética (ΔG^*) para la nucleación está dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta G^* (r^*) = r^* \Delta\mu / 2$$

Como es de esperarse, esta barrera determina a su vez, la rapidez de nucleación J:

$$J = A \exp (-B / \sigma^2)$$

Donde A es una constante de proporcionalidad, $\sigma = \ln\beta$ y B está dada por (Budevski *et al.*, 2000; Galkin *et al.*, 2000):

$$B = \Delta G^* \sigma^3 / \Delta\mu$$

III. 3 Cinética de crecimiento de cristales

Una vez superado el paso de nucleación, la cinética del proceso de crecimiento de un cristal se encontrará ligada a la llamada “dinámica de crecimiento de régimen mixto”. Ésta consta de dos partes: la primera de ellas es que tan rápido se desplaza una molécula desde el seno de la solución hasta la superficie del cristal en crecimiento y la segunda, una vez en contacto con la superficie, que tan rápido se incorpora a la red cristalina (figura 3). Las moléculas que llegan a la interfase difusiva del cristal en crecimiento, se incorporarán a la red cristalina con una rapidez determinada por la razón de cambio entre los procesos de adsorción y deadsorción. Esta última será más rápida, según la cantidad de ellas que se incorporen en los llamados sitios “kinks” del cristal en crecimiento (punto 3 de la figura 3) y esto a su vez



determinará la magnitud de las velocidades de crecimiento superficial (v) y perpendicular (R).

La cinética de crecimiento seguirá entonces los siguientes pasos:

- a) Transporte de moléculas a la interfase difusiva.
- b) Migración de las unidades adsorbidas en 1 (sitios terraza) hacia 2 (sitios "step") por difusión superficial.
- c) Migración de 2 a 3 (sitios "kink").
- d) Transporte de las moléculas de solvatación liberadas y del calor de cristalización.

La incorporación de una unidad en un sitio kink es mucho más estable, ya que en ese sitio la unidad de crecimiento pierde tres grados de libertad y gana tres veces una energía de enlace con las moléculas vecinas.

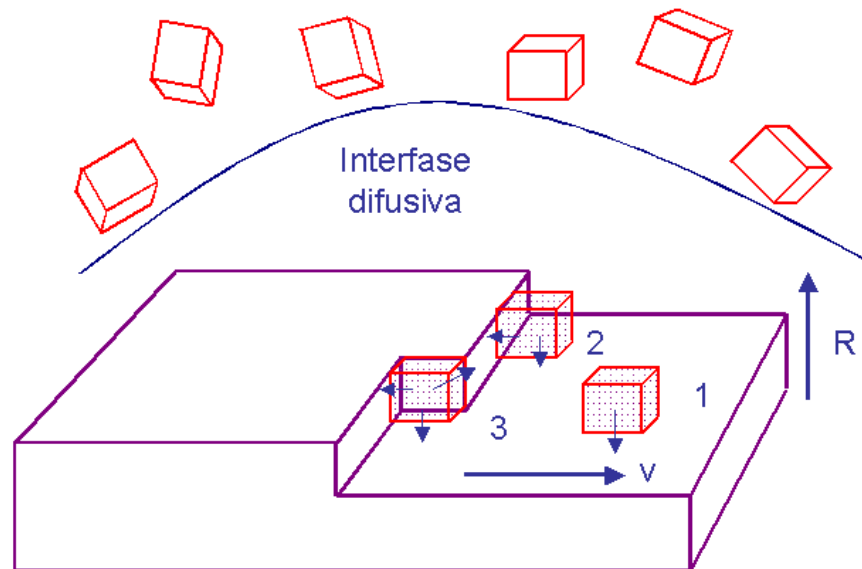


figura 3. Dinámica de un cristal en crecimiento. A medida que las unidades llegan a la interfase difusiva, su incorporación al cristal dependerá de los grados de libertad que pierdan al unirse a la superficie y esto a su vez determinará la cinética de crecimiento del cristal.



A medida que las moléculas se incorporen a la red cristalina, la concentración de proteína disminuirá a los alrededores de la interfase difusiva hasta que el sistema alcance el equilibrio y el crecimiento cese. Cuando vemos la superficie de un cristal que ha terminado de crecer, vemos que es prácticamente plana, esto es porque una vez empezada una nueva capa, ésta crecerá hasta cubrir la superficie existente en un proceso cooperativo y de cinética mucho mayor.

El éxito de la cristalización está ligado a la velocidad relativa de los procesos de transporte de masa y a la cinética de superficie del cristal, a su vez que la calidad del cristal resultante es producto de la relación entre estos dos procesos. En general, cuando las moléculas llegan a la superficie del cristal con velocidad igual o menor a la de su reorganización en la superficie, la cristalización tiene mayor probabilidad de tener éxito y el cristal resultante ser de mayor calidad.

III.4 Técnicas de cristalización

Entre las técnicas más empleadas para la obtención de cristales de proteínas se encuentran las siguientes:

a) Cristalización batch

En esta técnica la proteína y el agente precipitante se mezclan de tal manera que la sobresaturación se alcanza desde el primer momento, dándose inmediatamente la nucleación. A medida que los núcleos crecen, la concentración de proteína decrece en la solución, transportándonos así a una zona de metaestabilidad donde se dará el crecimiento cristalino. (Chayen *et al.*, 1992; D'arcy *et al.*, 1996).

b) Difusión en fase vapor

Esta técnica comprende dos vertientes principalmente, el método de la gota colgante y el método de la gota sedente. En ambas se coloca una gota de una



mezcla 1:1 de proteína y agente precipitante (a.p.) en equilibrio de vapor con un volumen más grande de a.p. contenido en un recipiente. Dado que la concentración de a.p. en la gota es menor que en el recipiente, el disolvente se evaporará hasta igualar ambas concentraciones, dando además como resultado una gota con una concentración de proteína mayor. De esta manera se pasa de una zona de subsaturación a una zona de sobresaturación y a medida que se forman los núcleos, la concentración decrece hasta la zona metaestable, donde se puede llevar a cabo el crecimiento cristalino (Nakamura *et al.*, 2003).

c) Difusión en fase líquido-líquido

En esta técnica se ponen en contacto dentro de un capilar dos fases líquidas, la solución de agente precipitante y la solución de proteína, con la finalidad de que difundan. El uso de geles como agarosa ha incrementado la eficiencia de este método hacia la obtención de mejores cristales (Cang & Bi, 2001).

d) El empleo de geles en la cristalización de proteínas

Hemos visto ya la importancia de los fenómenos de transporte de masa, en el crecimiento de cristales. Éstos son: difusión, convección y migración. La migración es el movimiento de las partículas en disolución debida a la imposición de un gradiente externo. La difusión consiste en un flujo direccional que se produce debido al movimiento aleatorio de las moléculas del soluto, a escala microscópica, dentro de un gradiente de concentración. La convección por otro lado, es un movimiento de las partículas de soluto debido al movimiento del fluido o de las partículas del disolvente, por lo tanto, cuando el fluido permanece estático, se elimina la convección. Cuando se agrega un gel a una solución donde crece un cristal, se limita el transporte convectivo, rápido y caótico, y el transporte molecular se vuelve más homogéneo (Henisch, 1988). De esta manera se crea un ambiente de microgravedad favorable para el crecimiento tridimensional de los cristales, ya que se previene la sedimentación



de los mismos (García-Ruiz, 2001; Lorber & Giegé 2001; Sauter *et al.*, 2002). El uso de geles para inducir el crecimiento de cristales se remonta a 1926 con las investigaciones de Fisher y Simons y esta técnica se viene empleando desde hace dos décadas en la cristalización de macromoléculas biológicas (Robert, 1999). Ha demostrado ser útil para prevenir la formación de cristales gemelos (Sica *et al.*, 1994), para disminuir las impurezas incorporadas en el cristal (Chernov *et al.*, 2001), además de que proveen de protección a los cristales durante su transporte. Los geles más comúnmente empleados en esta técnica son agar, agarosa y sílica, acrilamida, sephadex. (Gavira & García-Ruiz, 2002).

Además de estas técnicas, en los años recientes se han desarrollado novedosos métodos para mejorar la calidad de los cristales de proteína. Entre éstas se encuentran: el uso de campos de ultrasonido (Nanev & Penkova, 2001), magnéticos (Sazaki *et al.*, 1997, Sazaki *et al.*, 2004), eléctricos internos (Mirkin *et al.*, 2003; Moreno & Sazaki, 2004; Nieto-Mendoza *et al.*, 2005) y externos (Taleb *et al.*, 1999; Taleb *et al.*, 2001; Nanev & Penkova, 2001; Penkova *et al.*, 2006; Al-Haq *et al.*, 2007a), la aplicación de altas presiones (Suzuki *et al.*, 2000, Kadri *et al.*, 2003) y el uso de radiación láser (Bancel *et al.*, 1999), como el método de FSLI (Femto-Second Laser Irradiation) (Mori *et al.*, 2006). La innovación en el campo de la biocristalogénesis ha llegado incluso al crecimiento de cristales en vuelos parabólicos, en cohetes sondas, en lanzaderas espaciales y en estaciones orbitales, en condiciones de microgravedad (DeLucas *et al.*, 1987; Bugg, 1986; DeLucas). Dichos proyectos, a pesar de los excelentes resultados que arrojan, se han visto disminuidos en los últimos años debido al costo y a otras desventajas como baja reproducibilidad y confiabilidad.



III.5 El empleo de campos eléctricos en la cristalización de proteínas

Un campo eléctrico (sería más propicio decir, la intensidad de un campo eléctrico) se define como aquella fuerza ejercida en una carga “q” en una región del espacio alrededor de una distribución de cargas (Scott, 1960). El empleo de campos eléctricos en la cristalización de proteínas surgió en 1976 cuando se logró cristalizar la proteína Estradiol 17 β - Deshidrogenasa mediante una técnica que los autores nombraron difusión electroforética (Chin *et al.*, 1976). La cristalización inducida mediante un campo eléctrico se divide en dos tipos de experimentos principalmente: el uso de un campo eléctrico interno (Mirkin *et al.*, 2003; Moreno & Sazaki, 2004; Sazaki *et al.*, 2004; Nieto-Mendoza *et al.*, 2005), en donde los electrodos se encuentran en contacto directo con la muestra y el uso de un campo eléctrico externo (Taleb *et al.*, 1999; Taleb *et al.*, 2001; Naney & Penkova, 2001; Penkova *et al.*, 2006, Al-Haq *et al.*, 2007a), en donde los electrodos se encuentran fuera de la solución. Recientemente se ha preferido utilizar la expresión de cristalización electroasistida para englobar ambos tipos de experimentos (Frontana-Urbe & Moreno, 2008). En general las diferentes versiones de esta técnica han demostrado ser eficaces en la disminución, tanto en la cantidad como el tiempo de la nucleación, así como en el aumento del tamaño de los cristales resultantes.

III. 6 Ferritina: estructura y función

El hierro es un nutriente esencial, requerido para la síntesis de diversas proteínas como hemoglobina, mioglobina y los citocromos. Por otro lado, un exceso de hierro es dañino para la célula ya que en una atmósfera oxidante puede llevar a la formación de radicales libres. Las proteínas que regulan la presencia de hierro en las células son la transferrina que se encarga de transportarlo en el torrente sanguíneo, el receptor de transferrina que es una proteína de membrana que permite la entrada de transferrina a la célula, la



hemosiderina que se deriva la degradación lisosomal de la ferritina (Harrison & Arosio, 1996) y esta última, una proteína de almacenaje de hierro.

Esta proteína fue aislada por primera vez en 1937 por Laufberger. Se trata de una proteína cuya principal función es la de almacenamiento de hierro en las células de casi todos los seres vivos, en donde sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, si bien no la primaria, se conservan en los reinos animal, vegetal y microbiano (Andrews *et al.*, 1992). Está presente en todos los tejidos de los organismos altamente diferenciados pero principalmente en el hígado, el bazo y los riñones de los mamíferos. Es soluble, lo que le permite transportarse sin dificultades por el torrente sanguíneo. Sus tareas son adquirir o atrapar el ion Fe II, catalizar su oxidación e inducir su mineralización, y controlar el acceso que tienen a él los demás componentes celulares. En realidad dichas funciones se pueden resumir en una: regular los niveles de iones hierro en la célula. Recientemente también se piensa que está involucrada en proteger a la célula del estrés oxidativo, secuestrando especies reactivas del oxígeno (Tatur *et al.*, 2007).

Para la síntesis de proteínas que contienen hierro, éste se emplea de la forma Fe (II); sin embargo, la forma más estable es la de Fe (III), por lo que la ferritina lo almacena en este último estado de oxidación. Esto lo realiza en forma de un mineral llamado fosfato ácido de óxido de hierro, con fórmula molecular $[\text{FeO}(\text{OH})]_8[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$, muy parecido a la ferrihidrita con la diferencia de que cada átomo de hierro está rodeado por 5 átomos de oxígeno y uno de fósforo, en vez de 6 átomos de oxígeno. Este átomo de fósforo es el punto donde el mineral se une a los aminoácidos de la pared interior de la proteína. Este mineral se deposita dentro de la cavidad que forma la unidad biológica. Puede almacenar hasta 4500 átomos de hierro y de esta manera lo mantiene disponible para su uso posterior en su forma activa y evita que se convierta en una especie inerte como HFeO (óxido ácido de hierro) (Chasteen & Harrison, 1999).



La subunidad de esta proteína está formada por dos pares de hélices antiparalelas AB y CD unidas mediante un asa y por una hélice más corta perpendicular a las anteriores E, situada en el extremo C terminal de la subunidad, como se muestra en la figura 4a. En los mamíferos existen dos subunidades distintas, H y L (heavy y light en inglés) con una identidad secuencial del 55% y cuya relación depende del tejido de origen (Arosio *et al.*, 1978). Estas subunidades tienen funciones complementarias en cuanto a adquirir el hierro del medio. La subunidad H contiene un sitio ferroxidasa dinuclear localizado en el sitio intermedio de las cuatro hélices alfa principales, que cataliza la oxidación de ion ferroso (Fe^{2+}) por el O_2 , produciendo H_2O_2 . La subunidad L carece de este sitio pero contiene un exceso de glutamatos en la superficie interior de la esfera que propicia el microambiente adecuado para el proceso de biomineralización (Chasteen & Harrison, 1999). De hecho se han sintetizado exitosamente otros minerales dentro de esta proteína, tales como sulfuro férrico, oxihidróxido de uranilo y de manganeso, etc. (Douglas *et al.*, 1995).

La unidad biológica consta de 24 subunidades empacadas con simetría 432 que forman una esfera hueca de diámetro externo de 12 nm e interno de 8 nm (figura 4b) (Harrison & Arosio, 1996). En dicha unidad cada subunidad se encuentra rodeada por otras seis subunidades. Su peso molecular es aproximadamente 440 kDa.

Cuenta con 8 canales hidrofílicos sobre los ejes de simetría C3, por donde se piensa que el hierro entra y sale de la molécula (Levi *et al.*, 1996). También cuenta con 6 canales hidrofóbicos sobre los ejes de simetría C4 que se piensa están relacionados con algún intercambio electrónico.

La ferritina cristaliza en tres diferentes grupos espaciales a saber, cúbico (F432) empleando 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 80 mM CdSO_4 como agente precipitante; tetragonal (P4₂1₂) obtenidos con 0.66 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 80 mM CdSO_4 (Granier *et al.*, 1997) y ortorrómbico (P2₁2₁2) con 0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 80 mM CdSO_4 (Langlois *et al.*, 1996). Las diferentes estructuras se han resuelto partiendo de



cristales obtenidos mediante la técnica de difusión en vapor. La primera estructura de ferritina descrita fue la bazo de equino mediante difracción de rayos X, con una resolución de 2.8 Å (Hoare *et al.*, 1975; Banyard *et al.*, 1978). En el caso de la estructura cúbica se sabe que hay interacciones intermoleculares mediadas por puentes salinos debido a los iones Cd^{2+} unidos a los ejes C3 (Granier *et al.*, 1997).

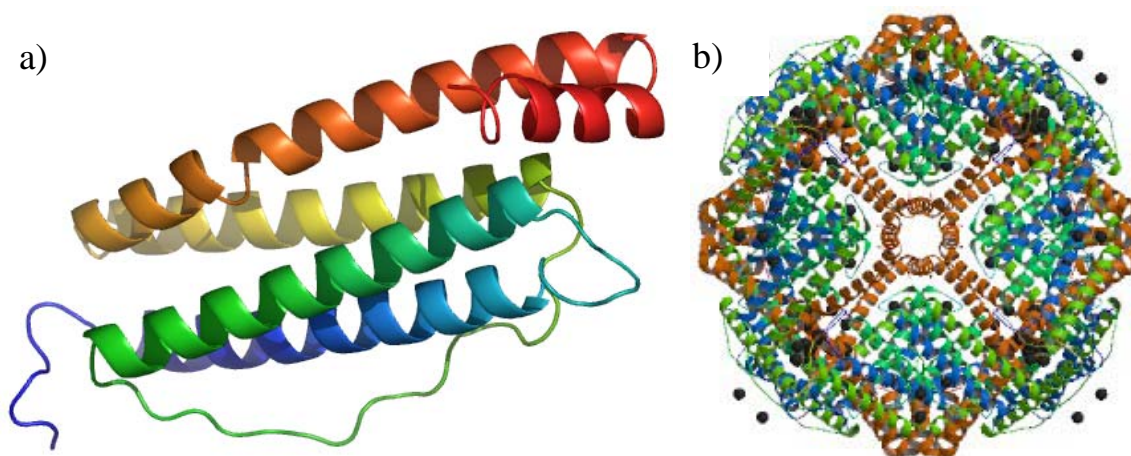


figura 4. a) Subunidad de ferritina de bazo de equino. b) Unidad biológica de dicha proteína, conformada por 24 subunidades. PDB código: 1aew

III. 7 Conceptos básicos de electroquímica

Los fenómenos electroquímicos que se llevan a cabo en disolución acuosa son los más ampliamente estudiados. Estos fenómenos requieren la presencia de elementos portadores de carga (iones o moléculas polares) para que exista un flujo de cargas dentro de la solución. Los iones en disolución y las moléculas polares se orientan por atracción electrostática como consecuencia del potencial adquirido en los electrodos en la presencia de un campo eléctrico. Una vez orientados fluyen hacia éstos a una velocidad particular y con una dinámica característica de las circunstancias. Este proceso corresponde



claramente a un fenómeno de migración, descrito en la sección III.4 como un fenómeno de transporte de masa.

Las técnicas galvanostáticas se caracterizan por la imposición de una corriente eléctrica en un sistema y el registro del cambio en el potencial dentro del mismo. Se conoce como corriente eléctrica (I) a la cantidad de carga eléctrica que circula por unidad de tiempo en un circuito y se mide en amperios (A).

Cuando existe una diferencia de potencial entre dos puntos, se habla de una medida del trabajo que se debe realizar para que una carga eléctrica se mueva de un punto al otro; esta diferencia se mide en voltios (V).

Al imponer un campo eléctrico en una solución, ya sea interno o externo, la carga que pasa por un punto en el circuito está dada por la corriente y el tiempo $Q = It$.

Siempre que pasa una corriente por un circuito hay tres factores que hacen aumentar el valor del voltaje que se necesita aplicar para mantener el valor de la corriente: el potencial óhmico, la polarización de la concentración y el sobrevoltaje.

El potencial óhmico está relacionado con la ley de Ohm y es el voltaje necesario para que pase corriente a través de una celda que tiene cierto valor de resistencia y se lleve a cabo la migración de los iones y/o la reacción electroquímica. Recordando brevemente, la ley de Ohm afirma que el potencial es directamente proporcional a la intensidad de corriente y a la resistencia del sistema.

La polarización de la concentración aparece cuando la concentración de las especies cargadas no son las mismas en la superficie del electrodo y en el seno de la solución. Esto a su vez aumenta el potencial necesario para que se lleve a cabo el fenómeno de migración.

Por otro lado, el sobrevoltaje se atribuye a la energía de activación necesaria para llevar a cabo una reacción redox (en caso de que la haya); se define como el voltaje necesario para mantener una determinada velocidad de transferencia electrónica.



Cuando las especies cargadas son atraídas al electrodo de signo contrario se forma la llamada doble capa eléctrica. La primera capa de moléculas formada en la superficie del electrodo está específicamente adsorbida por fuerzas de van der Waals y por fuerzas electrostáticas. A continuación se forma otra capa de moléculas de signo opuesto al del electrodo y a medida que nos alejamos de éste, dichas moléculas disminuyen formando así la llamada parte difusa de la doble capa.

III. 8 Electrosíntesis de polipirrol

Con la finalidad de adherir cristales de ferritina sobre la superficie de un electrodo de grafito (sección V.7), se utilizó polipirrol obtenido mediante técnicas electroquímicas, como una especie de pegamento.

El pirrol es un compuesto orgánico heterociclo aromático, de fórmula molecular C_4H_5N cuya estructura se muestra en la figura 5a. En 1968 Dall'Olio y colaboradores, obtuvieron por oxidación electroquímica del pirrol en medio sulfúrico, lo que entonces llamaron "pirrol negro", un precipitado de este color, insoluble, con naturaleza catiónica, que tenía propiedades conductoras. Este compuesto resultó ser polipirrol (figura 5b).

Posteriormente se descubrió que este tipo de polímeros, llamados intrínsecos, son aquellos que a lo largo de la cadena poseen lo que se conoce como conjugación π debido a la presencia de dobles enlaces conjugados (Díaz *et al.*, 2005). La incorporación de algunos iones en la composición de los polímeros, aumenta considerablemente la conductividad del mismo, esto dio lugar a que a dichos iones se le llamaran dopantes (Chiang *et al.*, 1977). Su estructura de bandas es semejante a la de los semiconductores y aislantes; el dopado altera la estructura de bandas, tomando electrones de la banda de valencia (dopado p) o cediendo electrones a la banda de conducción (dopado n), dejando alguna de las dos bandas parcialmente llena (Epstein *et al.*, 1989).



Entre los principales métodos utilizados para la síntesis de estos polímeros se encuentran: por síntesis directa, por oxidación química del polímero y por oxidación electroquímica (Fernández, 2003).

La síntesis electroquímica tiene la ventaja de que permite obtener el polímero en un solo paso, en estado conductor, sin necesidad de doparlo después (Otero *et al.*, 1987; Beck, 1988). Permite además obtener muestras en forma de película con un grosor controlado. Durante este proceso, se inicia una oxidación anódica mediante la aplicación de un potencial eléctrico y el polímero se deposita sobre la superficie de un electrodo (el ánodo). Este paso es un proceso progresivo y reversible que da lugar a la formación de un compuesto polímero-contraión de estequiometría variable. Es un proceso rápido, unos pocos segundos después del inicio del flujo de corriente anódico, el electrodo se recubre con una película negra (Fernández, 2003).

Durante la formación del polímero tiene lugar un proceso simultáneo de oxidación polimérica ya que el potencial de oxidación del polímero es menor que el potencial de polimerización. El polímero reducido es un semiconductor mientras que el oxidado es un conductor (Fernández, 2003).

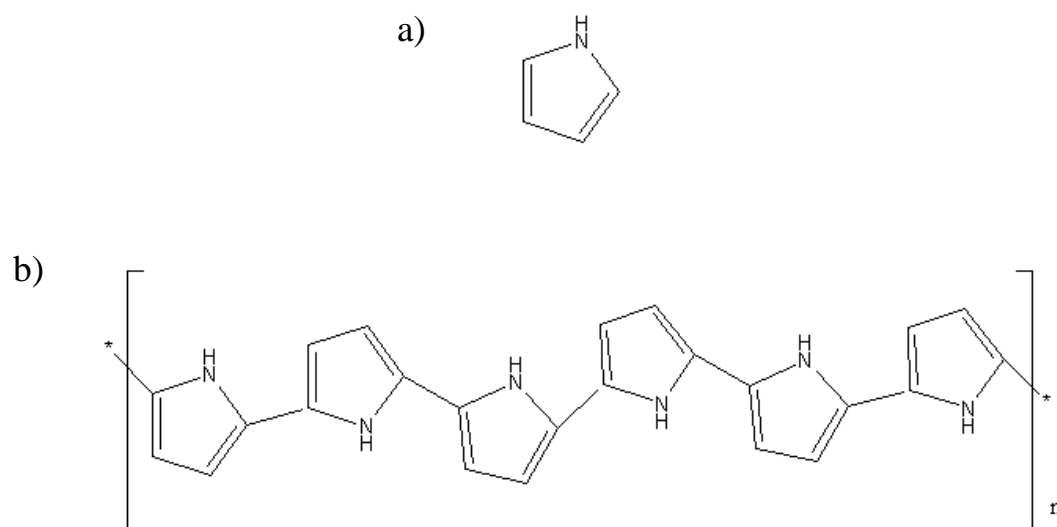


figura 5. a) pirrol, b) polipirrol



De entre todos los monómeros heterocíclicos, el pirrol tiene la ventaja de que puede ser fácilmente electropolimerizado en solución acuosa en un amplio intervalo de valores de pH (3 – 9), tiene una alta solubilidad en agua y un potencial de oxidación relativamente bajo (Fernández, 2003).



IV. MÉTODOS



IV. 1 Muestra

Para la realización experimental de esta tesis, se utilizó una muestra comercial de ferritina de bazo de equino obtenida de Sigma (código, F4503) en forma de solución acuosa con 76 mg/mL de proteína y 0.1 M NaCl.

IV. 2 Pruebas de cristalización en microbatch

Para las pruebas de cristalización en microbatch se utilizaron placas de poliestireno con 72 pozos (Hampton Research), como los que se muestran en la figura 6. En cada uno de los pozos con capacidad para 11 μ L se coloca una mezcla 1:1 de proteína y agente precipitante, después se recubre con una gota de aceite mineral ligero con una densidad de 0.84 g/mL, para evitar la evaporación del disolvente.

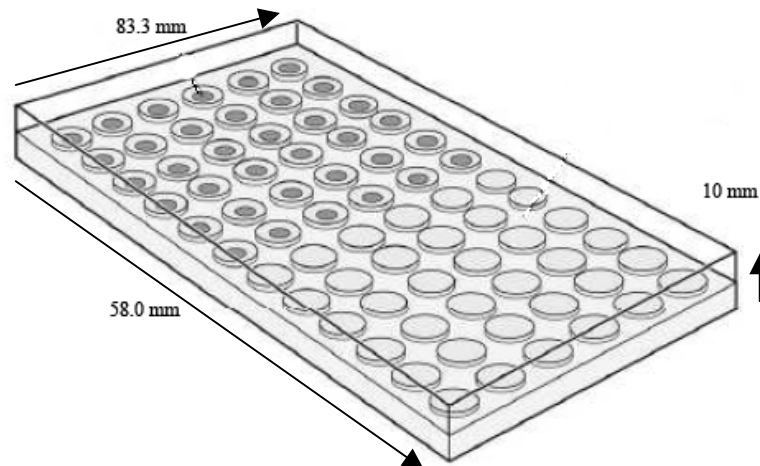


figura 6. Placa de cristalización microbatch con 72 pozos



IV. 3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

También llamada dispersión de luz cuasi-elástica (QELS) o espectroscopia de correlación fotónica (PCS). Es una técnica empleada en el crecimiento de cristales de biomoléculas, para estudiar las condiciones de pre-nucleación y nucleación, así como la solubilidad y la agregación de la proteína, es decir, las interacciones proteína – proteína y solvente – proteína en diferentes condiciones (Wilson, 2003). Esta técnica se basa en la medición de las fluctuaciones del promedio de la intensidad de luz dispersada por la muestra a un ángulo determinado, durante un corto periodo de tiempo τ (Harding, 1998). Estas fluctuaciones se deben principalmente al movimiento aleatorio difusivo de las moléculas de proteína dentro y fuera de un punto en un rayo láser que se incide sobre la muestra. En la figura 7 se muestra una esquema simplificado del principio de operación de esta técnica.

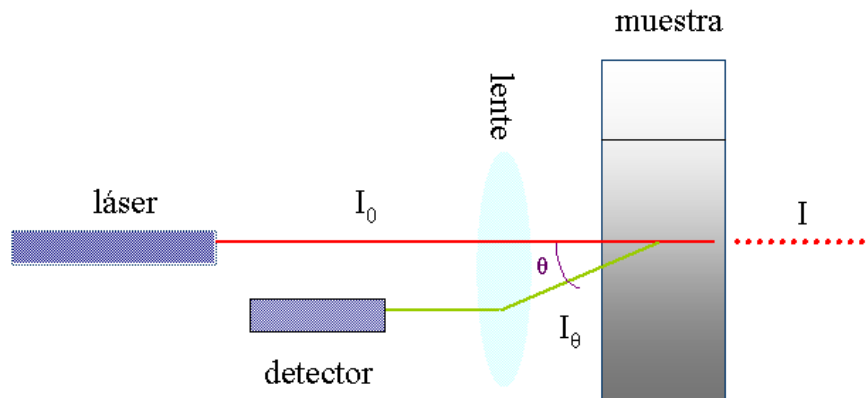


figura 7. Principio de operación de la técnica DLS. Parte de la intensidad del rayo incidente sobre la muestra es dispersado por las partículas en solución y es detectado en el ángulo θ .



Comúnmente el ángulo de detección θ es de 90° , pero en el equipo empleado durante la realización de esta tesis el ángulo es de 173° , lo que se conoce como detección retrodispersa. Este ángulo tiene la ventaja de evitar la multidispersión, fenómeno que conlleva errores de precisión y exactitud en la determinación del tamaño de partícula, sobre todo si la muestra se encuentra muy concentrada.

Matemáticamente este comportamiento puede presentarse como una función de correlación que tiene la siguiente forma:

$$C(\tau) = B [1 + a (C'(\tau))^2]$$

B: línea base

a: constante que depende de la coherencia espacial de la luz dispersada detectada

$C'(\tau)$: función de correlación normalizada del campo eléctrico dispersado

Se trata de una función de decaimiento, que es la expresión matemática que indica una tendencia en una relación a decrecer y finalmente desaparecer así como la velocidad en que este fenómeno ocurre.

Dependiendo de si el tamaño de la muestra es homogéneo, si presenta algunos oligómeros o si es heterogéneo con la presencia de grandes agregados, la función de correlación puede adoptar formas distintas. Para el primer caso, la función de correlación normalizada del campo eléctrico dispersado se puede escribir como sigue:

$$C'(\tau) = e^{-\Gamma\tau}$$

En los otros dos casos, esta función se puede expresar como:



$$C'(\tau) = \int_0^{\infty} f(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma$$

En cualquiera de los casos, Γ es la constante de decaimiento que se relaciona con el coeficiente de difusión de la proteína:

$$\Gamma = Dq^2$$

D es el coeficiente de difusión translacional, dependiente de la concentración y q es el vector de dispersión que a su vez está dado por:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

n: índice de refracción del medio

λ : longitud de onda del rayo incidente verticalmente polarizado en vacío.

θ : ángulo de detección de la dispersión

Un análisis de la función de correlación provee una forma de estimar el tamaño aparente de las moléculas en solución; si se considera que la proteína es globular, se puede emplear la relación de Stokes-Einstein para estimar el valor del radio hidrodinámico R_h de la proteína:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D(c)}$$

k: constante de Boltzmann

T: temperatura absoluta

η : viscosidad de la solución

Mientras más grande sea el valor de D, la partícula es más pequeña lo que provoca que la función de correlación decaiga rápidamente. Por el contrario, pequeños valores de D corresponden a partículas más grandes y a un decaimiento más lento en la función (Wilson, 2003).



Por otro lado se debe de tener precaución a la hora de interpretar los datos, ya que tomar la distribución de tamaño de partícula obtenida mediante esta técnica como estados absolutos de agregación de la proteína es erróneo, sobre todo si la muestra presenta un alto grado de polidispersidad. Para obtener datos confiables, la diferencia en tamaños entre dos especies debe ser mayor a un factor de 5. A veces lo que se puede saber de este análisis es la simple presencia de agregados y no su tamaño real.

También es bueno saber si el disolvente está afectando de alguna manera la función de correlación ya que los agentes precipitantes presentan por sí mismos variaciones en el coeficiente de difusión y se puede obtener una función de decaimiento con respecto a la luz que dispersan.

Los datos de tamaño de partícula fueron obtenidos *in situ* durante la electrocristalización con el software DTS (nano) (Malvern, Ltd.), acoplado al equipo de la serie Zetasizer nano, modelo nano S de Malvern, con un láser de 633 nm de longitud de onda.

IV. 4 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría es un conjunto de técnicas analíticas basadas en la relación existente entre el potencial y la corriente en un proceso electroquímico.

La velocidad de reacción en dicho proceso, está controlada por la velocidad de difusión de la especie hacia el electrodo y es proporcional al gradiente de concentración entre ambas zonas.

La voltamperometría cíclica usa una forma de onda triangular (figura 9) aplicada al electrodo de trabajo. Se aplica una rampa lineal de voltaje entre los tiempos t_0 y t_1 y después se invierte la rampa para llevar de nuevo el potencial a su valor inicial en el tiempo t_2 .

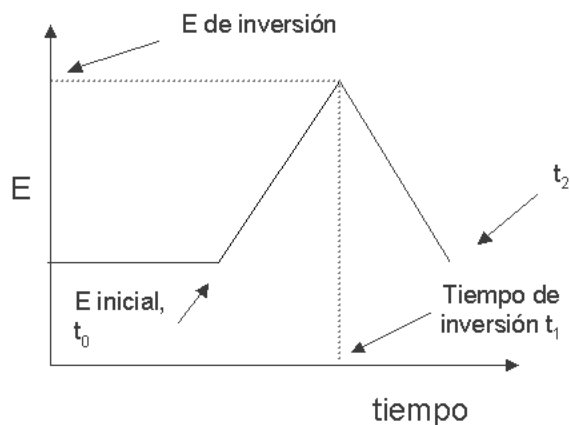


figura 9. Intervalo de potencial en función del tiempo durante un experimento de voltamperometría cíclica.

En la figura 10 se muestra como ejemplo un voltamperograma típico, aplicando un intervalo de potencial de este tipo. Según la convención francesa, las corrientes positivas corresponden a una oxidación, es decir que el electrodo de trabajo actúa como ánodo y las corrientes negativas corresponden a una reducción y el electrodo de trabajo actúa como cátodo. Al valor de potencial donde se alcanza la corriente límite de reducción se le conoce como potencial de pico catódico (E_{pc}) y para el proceso de reducción se le llama potencial de pico anódico (E_{pa}). El potencial de media onda, $E_{1/2}$, corresponde a la semisuma de estos potenciales.

Que la corriente no se estabilice antes de invertir el potencial se debe a que se termina el analito en las proximidades del electrodo de trabajo y la difusión es muy lenta para restituirlo. Cuando el potencial se invierte la corriente sigue siendo catódica ya que el potencial es lo suficientemente negativo para que se de lugar la reducción; cuando el potencial se hace bastante menos negativo es cuando aparece la corriente anódica.

Cuando se aplica un potencial constante, el potencial del cátodo se va haciendo cada vez más negativo y cualquier soluto puede reducirse y entonces es necesario agregar un despolarizador catódico como nitrato que se reduce más fácilmente que H^+ . Por eso se agrega un tercer electrodo, para



mantener un potencial catódico constante. De esta forma: a) el electrodo de trabajo es aquel donde se lleva a cabo la reacción de interés, b) el electrodo de referencia es aquel respecto al cual se mide el potencial del electrodo de trabajo por donde no pasa prácticamente corriente y no se ve afectado por los fenómenos de sobrevoltaje y c) el electrodo auxiliar o contraelectrodo forma un par con el electrodo de trabajo para que pase una cantidad significativa de corriente.

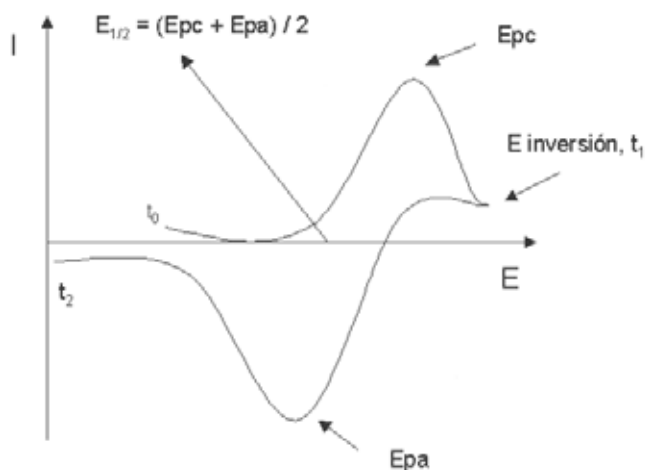


figura 10. Diagrama típico de un voltamperograma

Para fines de la realización de esta tesis se utilizó una celda de fluidos (50 μ L) acoplada a un modulo electroquímico (EC-AFM) de Digital Instruments Multimode SPM, NanoScope IIIa de Veeco. Como electrodo de trabajo se empleó una placa de platino, como electrodo de cuasireferencia un alambre de plata y como contraelectrodo un alambre de platino, para los experimentos de electrocristalización. Para la electrosíntesis de pirrol se utilizó como electrodo de trabajo grafito pirolítico altamente orientado (HOPG), ya que ha demostrado ser un electrodo especialmente útil para esta reacción (Acosta *et al.*, 2007; Hernández-Pérez *et al.*, 2002). El O_2 origina un par de ondas electroquímicas, por lo que fue removido en cada solución burbujeando N_2 .



IV. 5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Esta técnica fue inventada en 1986 (Binnig & Quate) y desde entonces ha tenido un gran impacto en ciencias de materiales, ciencias biológicas y en industrias como la electrónica, de telecomunicaciones, automotriz, etc. La microscopía de fuerza atómica ha sido empleada para estudiar cristales de proteína, ácidos nucleicos y virus en solución mientras crecen, ya que tiene la singular capacidad de que es posible caracterizar superficies inmersas en solución acuosa. Esto nos permite obtener imágenes más precisas de las muestras a estudiar, cuando estas se encuentran comúnmente en un ambiente acuoso, lo que evita la deshidratación de la muestra.

Una punta unida a un soporte llamado cantilever, barre la superficie en cuestión. La interacción de la punta con la muestra provoca ciertas perturbaciones en el cantilever (con una fuerza que va de pN a nN), lo cual es detectado por medio de la deflexión de un láser que incide sobre él. Un circuito fotoeléctrico convierte estas desviaciones en información sobre la superficie de la muestra. Un cerámico piezoeléctrico se usa para mover la muestra en las direcciones x , y y z (figura 11).

Los cristales de macromoléculas son especialmente sensibles a la presión ya que son superficies suaves. Entre más pequeña sea la constante de fuerza de resorte del cantilever, menor será la fuerza con la que interactúe la punta con la muestra. Por otro lado, mientras más grande sea la fuerza aplicada, la punta será más sensible a las variaciones superficiales, lo que conllevará a una mejor caracterización topográfica.

Las fuerzas que interactúan entre la muestra y la punta son: fuerzas electrostáticas a grandes distancias (20 nm), fuerzas de van der Waals a distancias medias (varios Å) y fuerzas de repulsión de Pauli (~ 1 Å) (Goldsbury 2002).

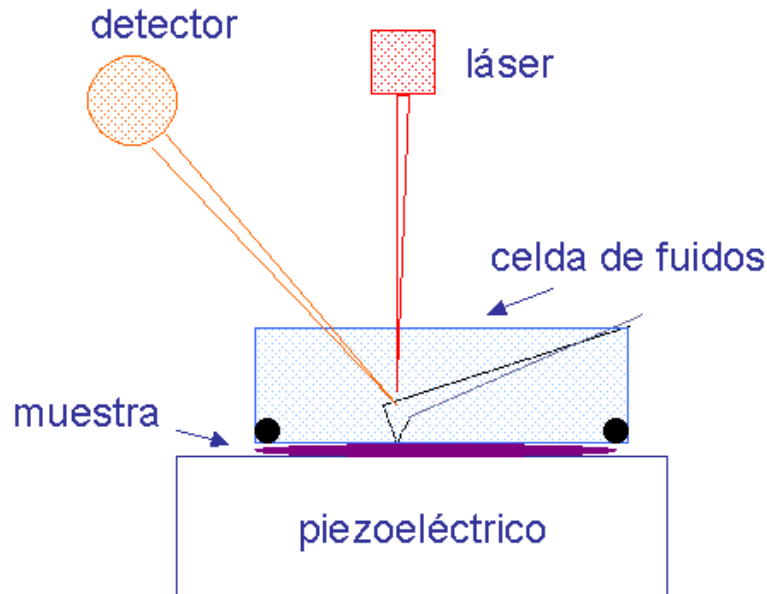


figura 11. Esquema que ilustra el principio de operación de un microscopio de fuerza atómica. Las desviaciones de un láser que incide sobre el cantilever, se traduce en información topográfica sobre la muestra.

En el llamado modo contacto, como su nombre lo indica, la punta se encuentra permanentemente en contacto con la muestra. Por contacto entendemos aquella distancia de la zona repulsiva en una curva de fuerza (figura 12), es decir en la zona donde predominan las fuerzas de repulsión de Pauli.

Entre las limitaciones de esta técnica se encuentra que las muestras deben estar firmemente fijadas en un soporte sólido. A menos que los cristales crezcan *in situ* en la superficie donde se analizarán.

Se utilizó un equipo Multimodal Nanoscope IIIa de Veeco (Digital Instruments, Santa Barbara USA), con un módulo electroquímico (EC-AFM). Se utilizaron cantilevers de nitruro de silicio Si_3N_4 , con una constante de fuerza de resorte de 0.3 N/m, de 200 μm de largo, con puntas integradas (NP-20, SPM Digital Instruments, Co.). Las imágenes de AFM fueron analizadas con el software Nanoscope IIIa v. 5.22.r4.

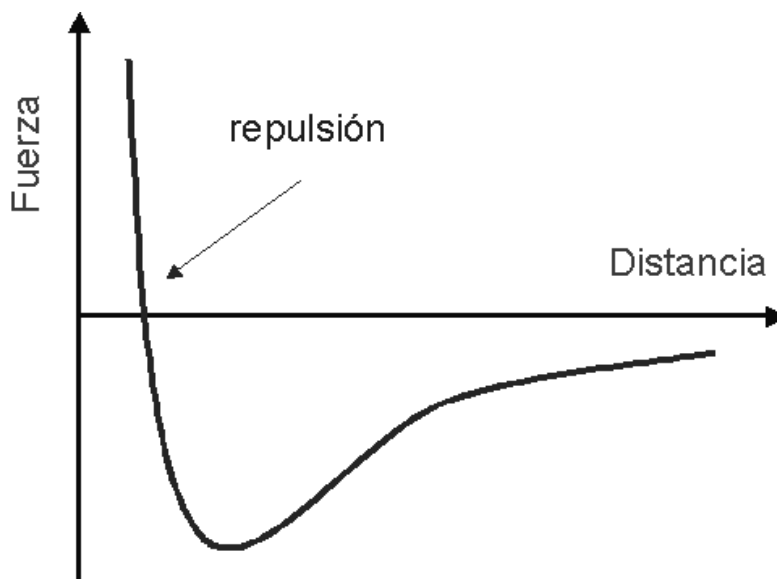


figura 12. Curva de fuerza que representa la interacción entre la punta y la muestra. En modo contacto, la distancia entre éstas se encuentra en la zona repulsiva, es decir que la interacción es regida por las fuerzas de repulsión de Pauli.

IV. 6 Difracción de rayos X

Hasta el momento, la resolución estructural de macromoléculas biológicas se realiza principalmente a través de difracción de rayos X, si bien tiene el inconveniente de que se requiere la presencia de cristales. Técnicas que no presentan esta desventaja, como Resonancia Magnética Nuclear (Wüthrich 2001) ó EM-Crio (Frank 2006), se ven limitadas hasta el momento por el peso molecular de la muestra. Los rayos X fueron descubiertos por Röntgen en 1895 y son radiación electromagnética con un intervalo de longitud de onda de 10^{-7} – 10^{-11} m (1000 – 0.1 Å).

Incidir un haz de rayos X sobre un cristal, producirá miles de puntos de difracción con un entramado específico. De la posición de estos puntos se puede dilucidar la distancia interplanar que se repite dentro del cristal y la



intensidad. De esta difracción se puede conocer la estructura tridimensional de la molécula que forma el cristal, empleando un software especializado.

Dado que el número y tamaño de las moléculas que componen un cristal de proteína son muy grandes, la difracción es de mucho menor intensidad que para cristales de una molécula pequeña, ya que la difracción es un efecto cooperativo entre las moléculas de un cristal. Además que los elementos C, N y O, que son los principales componentes de las proteínas, difractan mucha menor radiación que los elementos más pesados de la tabla periódica.

Para llevar a cabo una colecta de datos de un monocristal, se necesita principalmente una fuente de rayos X y un detector de los mismos. En la actualidad, los aceleradores de partículas como el sincrotrón son las fuentes más poderosas de rayos X. La longitud de onda de la radiación de sincrotrón es mucho más corta que la empleada en cualquier equipo convencional, lo que mejora la transmisión y acelera la colecta de datos. Entre las ventajas de usar una longitud de onda menor es que se favorece el tiempo de vida del cristal ya que se ve menos dañado por la radiación al exponerse menor tiempo a los rayos X. Éstos suelen formar radicales libres que a la larga desestabilizan y destruyen el cristal. Bajar la temperatura durante la colecta de datos de difracción producida por el cristal, disminuye a su vez los efectos de este daño. Un sincrotrón es un equipamiento enorme, en el que se hacen circular partículas eléctricamente cargadas a una velocidad cercana a la de la luz. Estas partículas son inyectadas en un anillo de almacenaje y cuando el rayo de partículas cambia de dirección, debido a la presencia de campos magnéticos, las partículas son aceleradas hacia el centro del anillo. Esto provoca la emisión de energía en forma de radiación electromagnética, cuya longitud de onda dependerá de la energía de las partículas cargadas y de la intensidad del campo magnético. Esta energía es compensada por pulsos de radiofrecuencia en cada ciclo. El anillo tiene comúnmente un diámetro de entre 10 y algunos cientos de metros.



La principal ventaja del uso del sincrotrón como fuente de rayos X es la intensidad, ya que ésta es algunos órdenes de magnitud mayor que cualquier equipo convencional de tubos sellados o ánodo rotatorio. Otra de sus ventajas es que presenta poca divergencia de la onda electromagnética, generando puntos más intensos y definidos.

Con el fin de comparar el efecto de un campo eléctrico interno sobre la cristalización de ferritina, se obtuvieron datos cristalográficos de los cristales obtenidos en solución con y sin presencia de campo eléctrico. En todos los casos, la resolución fue de 2.0 Å utilizando radiación de sincrotrón en la beamline X6A ubicado en el Brookhaven National Laboratory, Upton, NY (USA). Se colectó un data set de 180 imágenes de oscilación con un ADSC Quantum Detector 210.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



V. 1 Estado de agregación inicial de la muestra

Se sabe que la ferritina forma *In vitro* oligómeros que afectan la cristalización (Thomas 1998). Con el propósito de estudiar el estado de agregación de la muestra comercial de ferritina, se llevaron a cabo estudios de la misma, midiendo el tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Se preparó una solución a 20 mg/mL de ferritina, sin agente precipitante, a pH 5, en acetato de sodio 0.05 M. El resultado se muestra en la figura 13, donde se observa una tendencia bimodal de tamaño de partícula en un intervalo de temperatura de 4 a 30 °C.

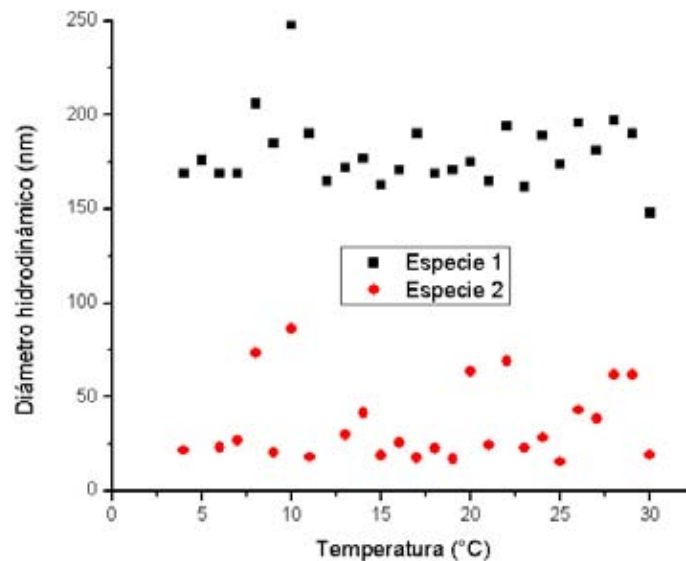


figura 13. a) Diámetro hidrodinámico de agregados de ferritina nativa sin agente precipitante en función de la temperatura, determinado mediante DLS. Intervalo de temperatura: 4 – 30 °C

En la figura 14 se muestra el porcentaje de intensidad de la luz dispersada en función del tamaño de partícula para cinco valores de temperatura: 4, 10, 20, 25 y 30°C.

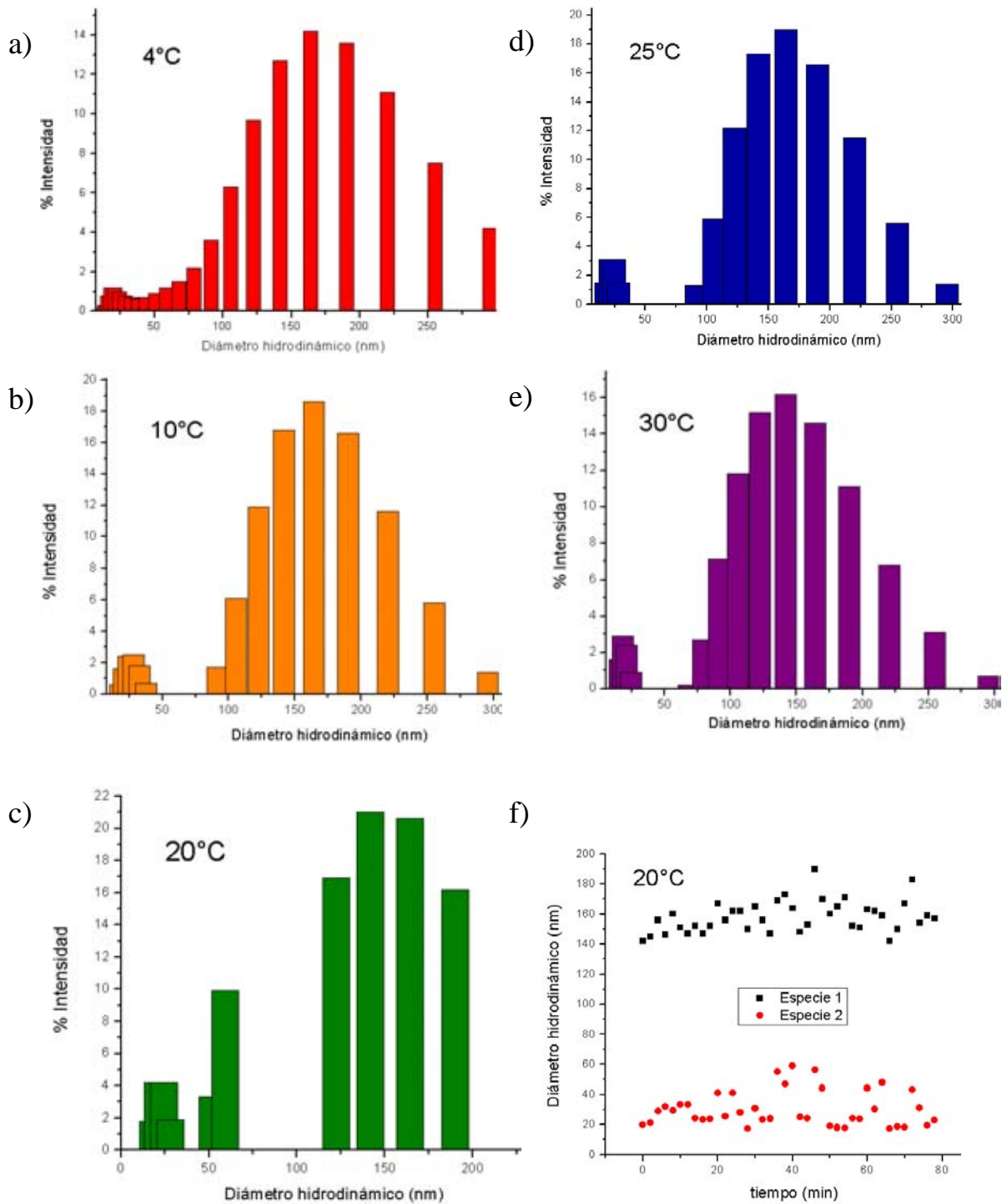


figura 14. a)-e) Porcentaje de intensidad de la luz dispersada en función del tamaño de agregados de ferritina a cinco valores de temperatura. Concentración de ferritina: 5 mg/mL, pH 5. f) Diámetro hidrodinámico de agregados de ferritina nativa sin agente precipitante en función del tiempo a 20 °C.



La formación de agregados no parece guardar ninguna relación con la temperatura, como podemos observar en estos resultados. La figura 14c, correspondiente a las especies presentes a 20°C es la que demuestra tener menor polidispersidad, ya que los valores del tamaño de los agregados se sitúan en un intervalo menor, comparado con las demás especies. En la figura 14f podemos ver que las especies se mantienen estables a través del tiempo. La primera de ellas corresponde al monómero (Harrison & Arosio, 1996) y a oligómeros pequeños. La segunda, con un diámetro mayor (entre 100 y 200 nm) corresponde a grandes agregados, los que en realidad se encuentran en una proporción mayor, según la intensidad de luz dispersada, como se muestra en la figura 14c.

La presencia de estos oligómeros es ampliamente conocida (Niitsu & Listowsky, 1973), sin embargo hasta ahora no se ha podido explicar satisfactoriamente su naturaleza y la causa de su presencia en soluciones acuosas de ferritina (Thomas *et al.*, 1998). Recientemente se ha encontrado evidencia de que estos oligómeros se unen mediante interacciones electrostáticas, a la superficie de los microtúbulos (Hasan *et al.*, 2005), que son estructuras formadas por tubulinas, que forman parte del citoesqueleto (Amos, 2005) y que ayudarían a regular los niveles de ferritina en el citoplasma (Hasan *et al.*, 2006). Lo que se sabe, es que su formación es espontánea y que la naturaleza de la atracción entre moléculas que forman un agregado difiere de aquella atracción responsable de la nucleación y posterior cristalización de la proteína (Petsev *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta estos resultados se decidió trabajar a 20°C, lo que nos permitirá llevar a cabo experimentos con una menor polidispersidad, sin separar el monómero de los oligómeros.

Una vez conocida la polidispersidad de la muestra, se llevaron a cabo pruebas de cristalización para encontrar las concentraciones adecuadas a usar del agente precipitante y de la proteína durante la electrocristalización a 20 °C.



V. 2 Pruebas de cristalización empleando la técnica batch

Tradicionalmente se ha utilizado CdSO_4 al 5% p/v (0.2 M) como agente precipitante en la cristalización de ferritina (Arosio *et al.*, 1983; Hemstead *et al.*, 1997). Pero según Granier y colaboradores (1997), la mezcla de agentes precipitantes CdSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes concentraciones, da como resultado la formación de cristales de diferentes grupos espaciales: cúbicos, tetragonales y ortorrómbicos (como se ha mencionado en la página 21), previa purificación de la muestra de ferritina a cristalizar mediante cromatografía de exclusión molecular (separación de los monómeros y los oligómeros).

Utilizando esta mezcla de sales se llevaron a cabo dos estudios selectivos del comportamiento de cristalización de la proteína en función de su concentración y de la concentración de la mezcla de agentes precipitantes. Estos estudios se realizaron mediante la técnica batch. En el primero de ellos se varía la concentración de CdSO_4 en un intervalo de 0 a 0.25 M, con incrementos de 0.05 unidades. En el segundo se varía la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un intervalo de 0 a 1.0 M, con incrementos de 0.2 unidades y en ambos la concentración de ferritina se varía en un intervalo de 1 a 23 mg/mL, con incrementos de 2 unidades, tal y como se muestra en la figura 15.

Después de tres días se observaron únicamente cristales pertenecientes al sistema cúbico, como se comprobó fácilmente mediante un filtro polarizador de luz, ya que éstos, al ser sistemas isotrópicos, no presentan birrefringencia.

En a) se observó que al disminuir la concentración de CdSO_4 los cristales se vuelven más grandes hasta una concentración de 0.1 M por debajo de la cual no se forman cristales. En b) se aprecia que los cristales se vuelven más definidos a medida que la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ decrece hasta 0.5 M y a menores concentraciones de dicha sal se forman lo que se conoce como estructuras dendríticas. En ambos casos al aumentar la concentración de proteína los cristales se vuelven más abundantes aunque su tamaño permanece prácticamente constante en todo el intervalo, es decir que la nucleación es prolífica, pero ésta no afecta el tamaño de los cristales (figura 16).

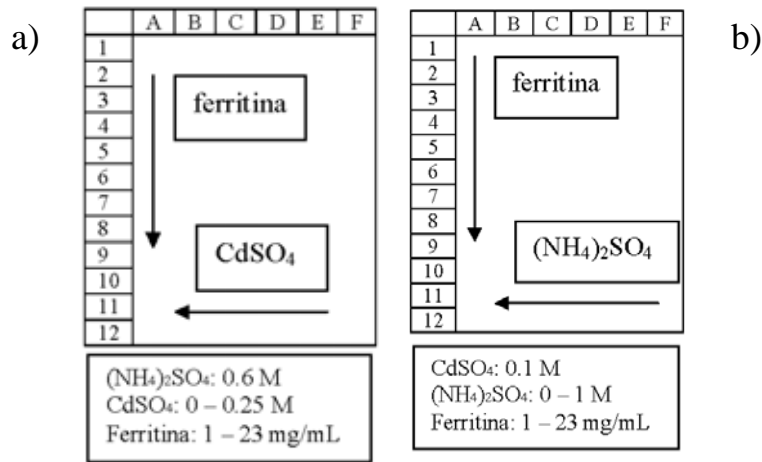


figura 15. Aquí se muestran los intervalos de variación de concentraciones tanto de ferritina como de agente precipitante en dos pruebas. En a) se mantiene constante la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mientras se aumenta la concentración de CdSO_4 desde la columna F hasta la A, en incrementos de 0.05 unidades. En b) se mantiene constante la concentración de CdSO_4 y se aumenta la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ desde la columna F hasta A, en incrementos de 0.2 unidades. En ambas pruebas la concentración de ferritina aumenta de la fila 1 a la 12, con incrementos de dos unidades.

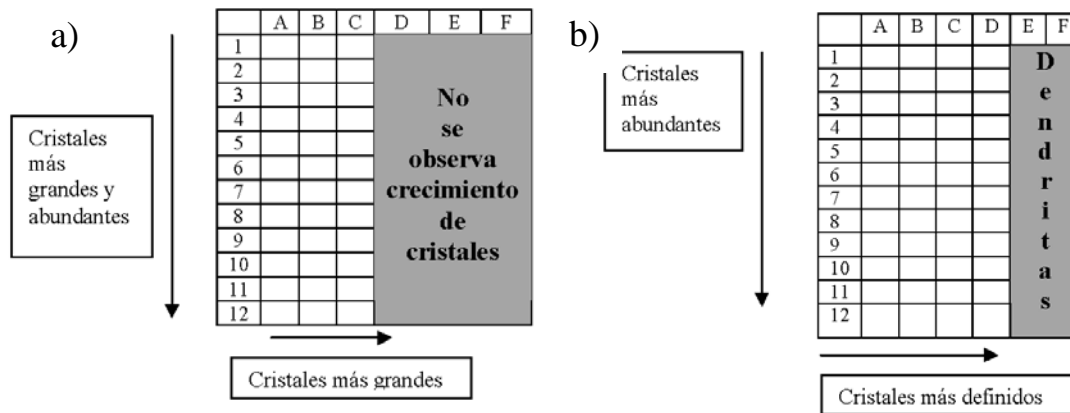


Figura 16. Representación esquemática de los resultados obtenidos en las pruebas de cristalización con las condiciones descritas en la figura 15.



En las figuras 17 y 18 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas a y b respectivamente, a tres diferentes concentraciones de proteína y de agente precipitante.

Una idea ampliamente aceptada es que para obtener cristales de ferritina se deben separar los monómeros de los oligómeros, de lo contrario los experimentos de cristalización llevarán únicamente a la formación de dendritas (Hegenauer *et al.*, 1979; Arosio *et al.*, 1983; Langlois *et al.*, 1996; Granier *et al.*, 1997; Hemstead *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2000; Tsekova *et al.*, 2002; Moreno & Rivera, 2005; Bartling *et al.*, 2007; Tatur *et al.*, 2007). Los agregados conocidos como dendritas se forman cuando después de la nucleación en condiciones de sobresaturación, el sistema no llega a la zona de metaestabilidad y por lo tanto no alcanza el equilibrio, en donde procede el crecimiento. Es decir que el crecimiento se da en la misma región de sobresaturación, es decir, lejos del equilibrio (Amorós, 1990). Los resultados mostrados aquí contradicen esta idea ya que la muestra no se purificó, sino que se usó en las mismas condiciones en que fue obtenida. Es decir que al acoplar los efectos de dos agentes precipitantes en ciertas concentraciones, es posible modificar el grado de saturación de esta proteína. El hecho de que en la presencia únicamente de monómeros, no se formen dendritas, a pesar de estar ausente el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, es un hecho explicable analizando los respectivos diagramas de fase teóricos (figura 19). En la figura 19a se esquematiza el proceso de crecimiento cristalino cuando hay únicamente monómeros presentes, utilizando CdSO_4 como agente precipitante. A una concentración de ferritina constante, pasamos de una región de subsaturación a una región de sobresaturación, agregando CdSO_4 a cierta concentración. Una vez que aparecen los primeros núcleos, la concentración de ferritina disminuye hasta la región de metaestabilidad donde alcanza el equilibrio y crecen los cristales. Cuando hay presentes grandes agregados (figura 19b), la concentración de ferritina no logra disminuir lo suficiente para llegar a la zona de metaestabilidad y por lo tanto los núcleos formados desarrollan dendritas.



Según la dinámica de crecimiento de régimen mixto que controla el crecimiento cristalino, el transporte de masa hasta la superficie del cristal en crecimiento es el primer paso durante la cristalización. El hecho de que los agregados tengan una mayor masa que el monómero, limita su transporte de masa, así como su incorporación a la red cristalina. Esto se debe a que una vez en la superficie del cristal no se colocan con facilidad en un sitio kink (sección III.2), debido al amplio volumen que ocupan en comparación con el monómero. Esto explica porque la concentración de ferritina no disminuya lo suficiente antes de formarse dendritas.

Al agregar un co-agente precipitante, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el transporte difusivo dentro la solución, así como la incorporación de unidades a la red, siguen siendo lentos en presencia de oligómeros. Sin embargo se observa la formación de cristales bien definidos, lo que nos indica que la solución sí se sitúa en la región de metaestabilidad y alcanza el equilibrio, lo que conlleva a la formación de cristales (figura 19c).

Este hecho sugiere que el sistema se sitúa en un menor nivel de sobresaturación en donde se forman los núcleos y enseguida alcanza el equilibrio, debido a un cambio en la solubilidad de la proteína al aumentar la fuerza iónica.

Durante las pruebas de cristalización, al disminuir la relación entre las concentraciones de los agentes precipitantes, se va haciendo más fácil llegar desde la zona de sobresaturación hacia la curva de equilibrio, hasta que se llega a una relación de concentraciones donde nunca se toca la zona de sobresaturación y por lo tanto no hay aparición de cristales (figura 20). Esto explica porque al disminuir la relación de las concentraciones, los cristales se vuelven más grandes y definidos, hasta una relación de $\text{CdSO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0.1 \text{ M} / 0.5 \text{ M} = 0.2$, por debajo de la cual no hay crecimiento cristalino.

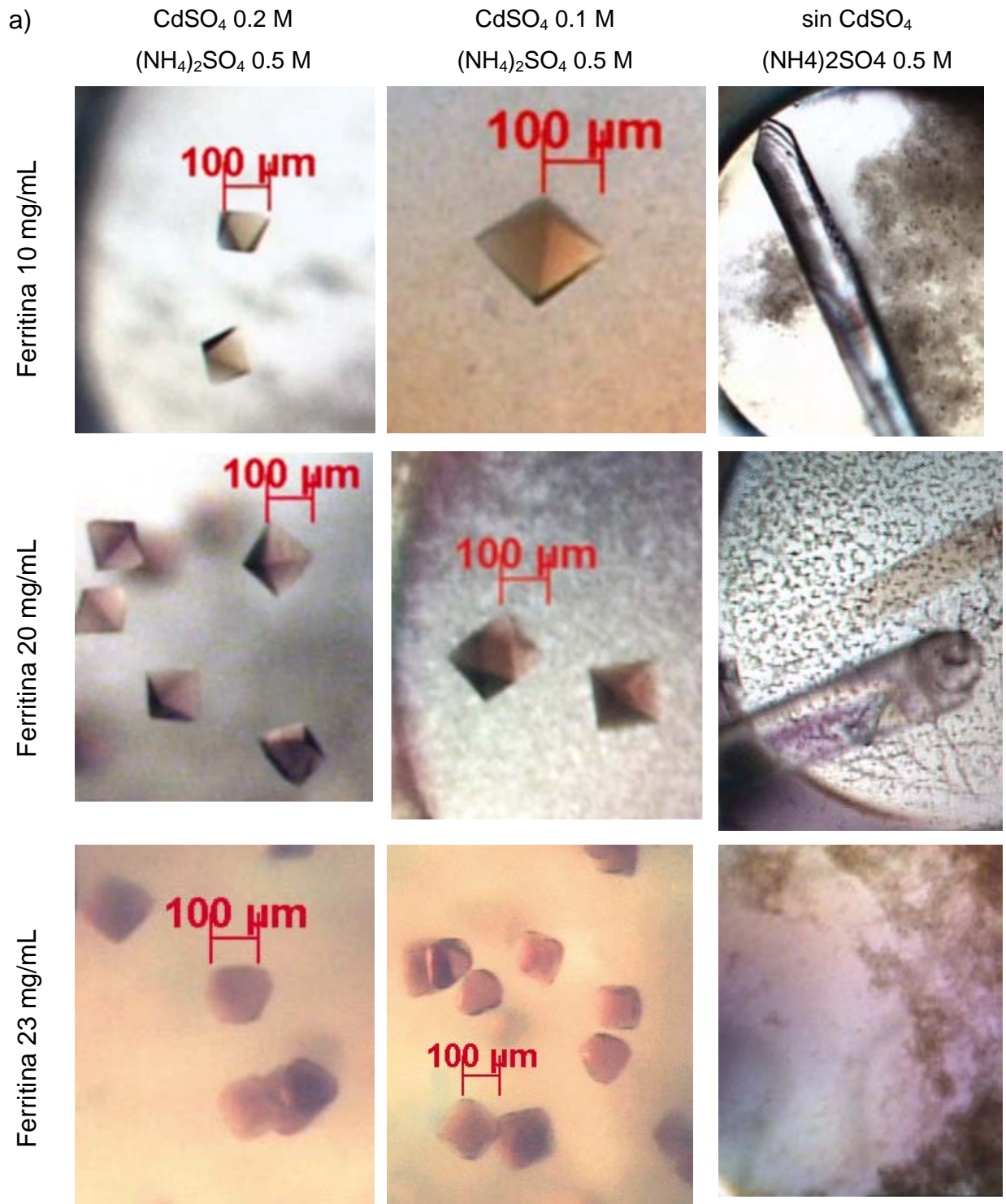


figura 17. Fotografías que muestran los resultados obtenidos para la prueba a, con tres condiciones distintas de proteína y agente precipitante. Por debajo de una concentración 0.1 M de CdSO_4 no se forman cristales.

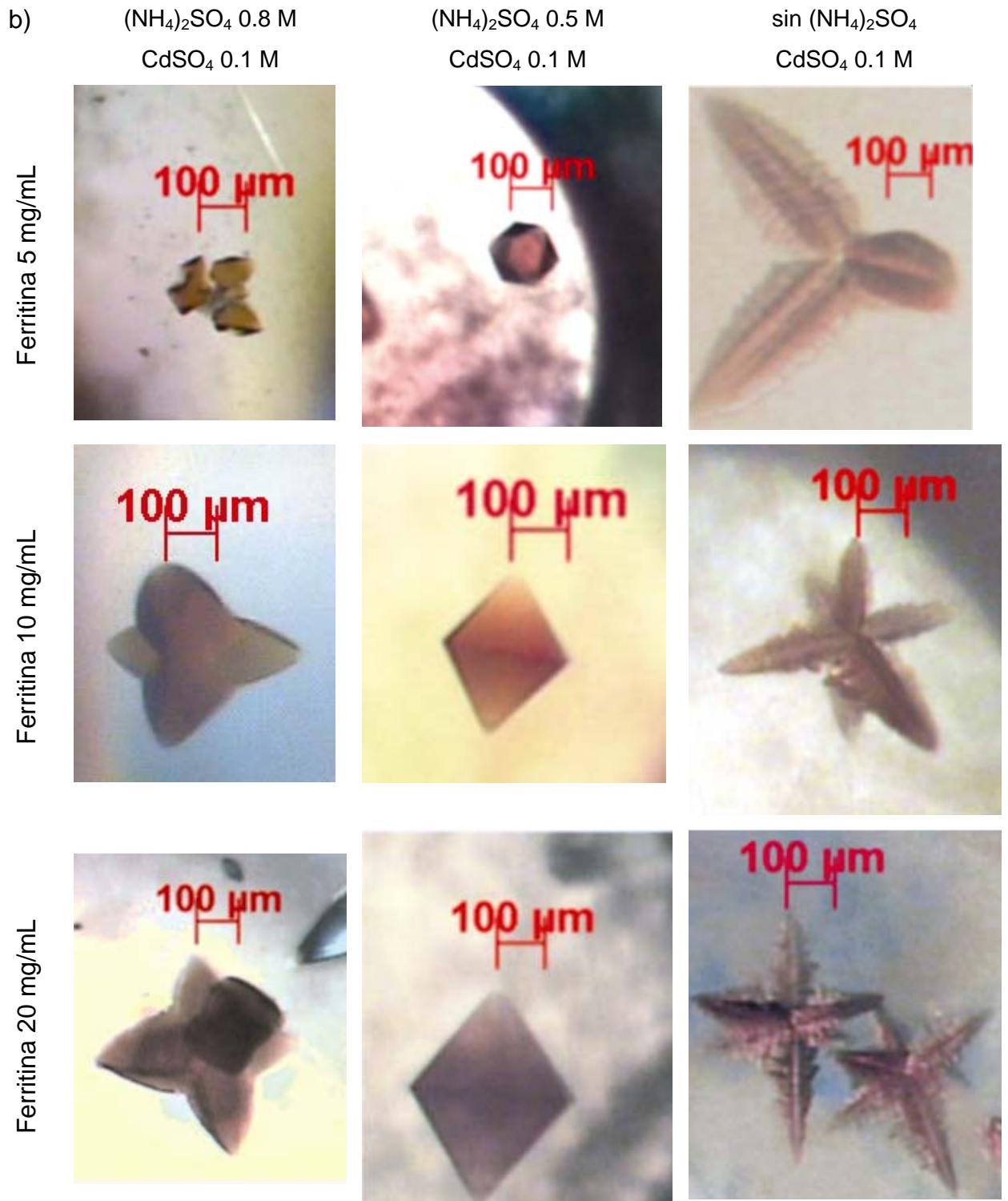


figura 18. Fotografías que muestran los resultados obtenidos para la prueba b, con tres condiciones distintas de proteína y agente precipitante. Por debajo de una concentración 0.5 M de (NH₄)₂SO₄ se forman dendritas.

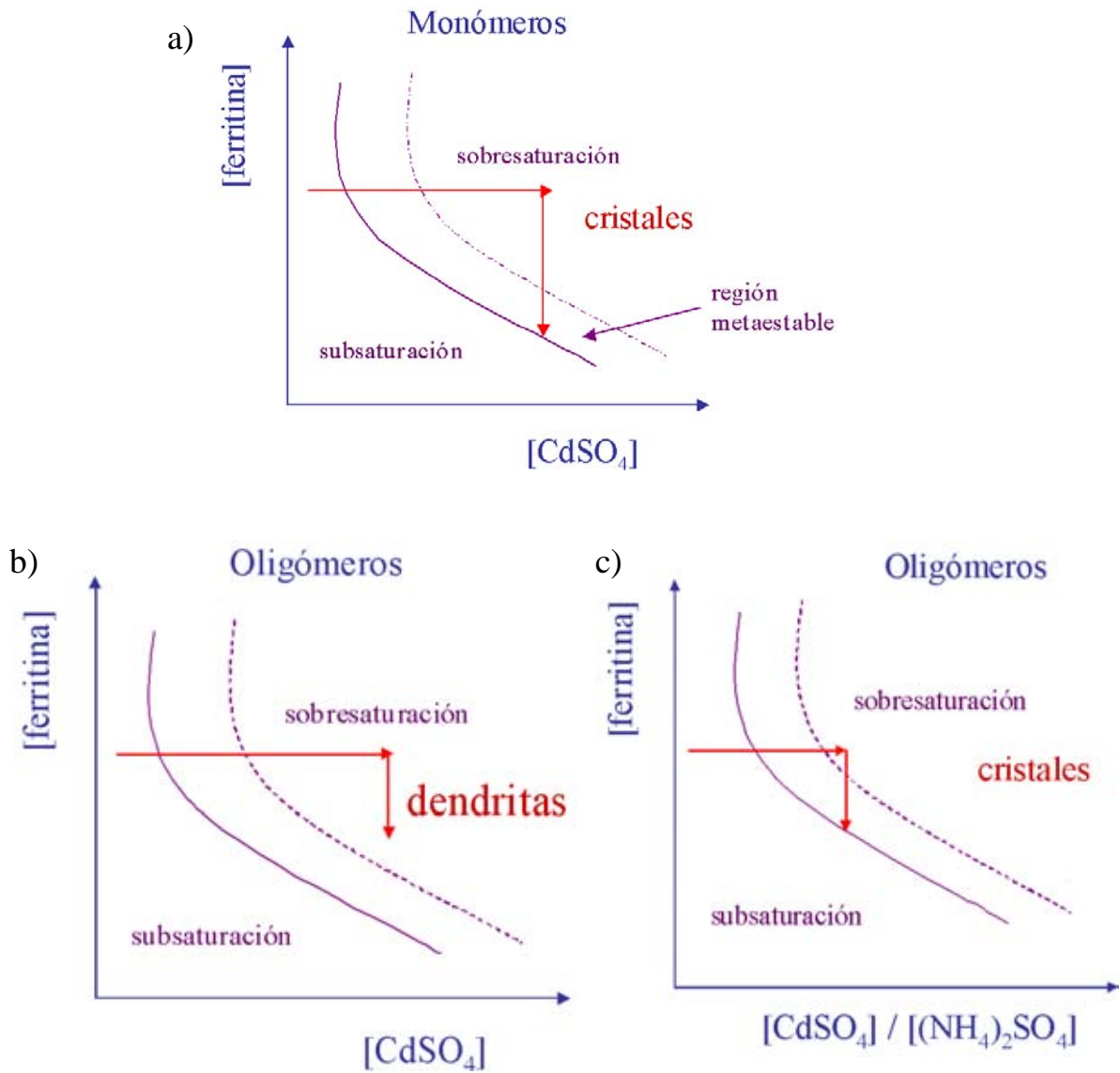


figura 19. a) Diagrama teórico del sistema monomérico en presencia de CdSO₄ como agente precipitante. b) Diagrama teórico del sistema oligomérico en presencia de CdSO₄ como agente precipitante. c) Diagrama teórico del sistema oligomérico empleando CdSO₄/(NH₄)₂SO₄ como agente precipitante.



Para comenzar con la electrocristalización, las condiciones que se eligieron, según estas pruebas fueron:

Ferritina	20 mg/mL
CdSO ₄ / (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 M / 0.5 M

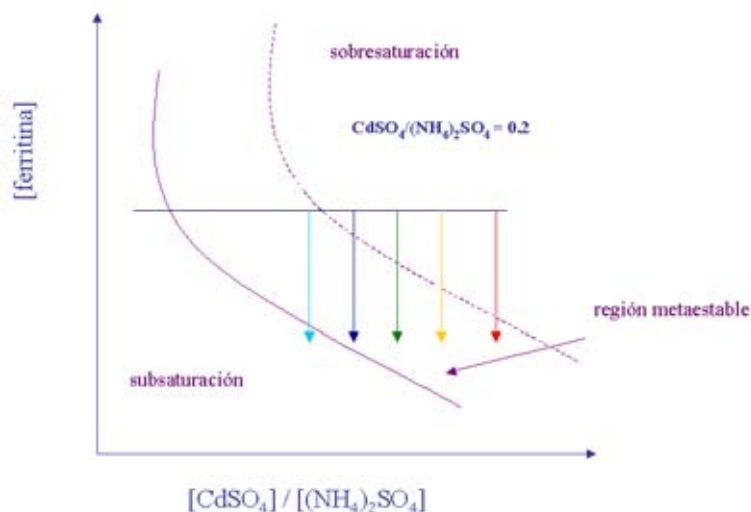


figura 20. Diagrama teórico del sistema ferritina – CdSO₄/(NH₄)₂SO₄. Las líneas de colores muestran la disminución de la relación de agentes precipitantes CdSO₄/(NH₄)₂SO₄ hasta un valor de 0.2 por debajo del cual no aparecen cristales.

V. 3 Cristalización electroasistida galvanostáticamente

Para llevar a cabo los experimentos de electrocristalización aplicando una corriente constante, se utilizó una celda comercial de cuarzo con 45 μ L de volumen (figura 8), a la cual se le adaptaron dos electrodos de platino de 0.25 mm de diámetro. La celda de cuarzo se utilizó con el fin de monitorear el proceso mediante dispersión dinámica de luz, con la menor interferencia posible. Los electrodos de platino se usan comúnmente como electrodos inertes que no participan en ninguna reacción redox y solamente conducen la



corriente. La corriente se mantuvo fija durante todo el experimento mediante un galvanostato que tienen un intervalo de corriente de $0.1 \mu\text{A}$ a 10 mA .

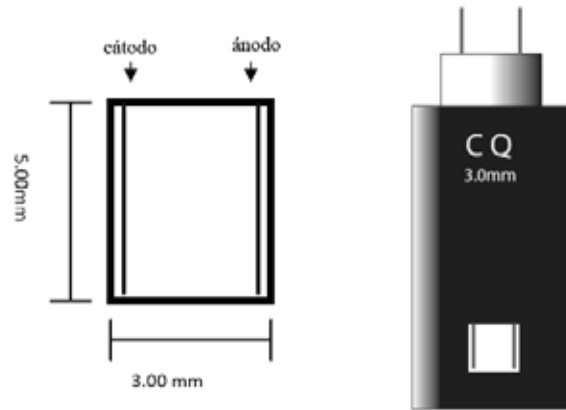


figura 8. Celda empleada para la electrocristalización
(Pérez 2008)

Los experimentos de electrocristalización se llevaron a cabo en solución acuosa, a dos diferentes valores fijos de intensidad de corriente. Todos fueron monitoreados *In situ* mediante DLS.

Primero se llevó a cabo un experimento en la celda y las condiciones ya descritos, en ausencia de corriente eléctrica como control. Los resultados se muestran en la figura 21.

Comparando esta figura con la figura 14f vemos que, una vez agregado el agente precipitante desaparece el estado monomérico de la proteína, que únicamente presenta agregados en solución. Las especies que predominan en casi el 50% de la solución, según se observa, son agregados de entre 200 y 400 nm. En menor proporción vemos agregados que oscilan entre los 1000 y 2000 nm. Los cristales obtenidos, después de dos días de este ensayo sin corriente son pequeños y muy abundantes, depositándose sobre todo en ambos electrodos y en las paredes de la celda (figura 22).

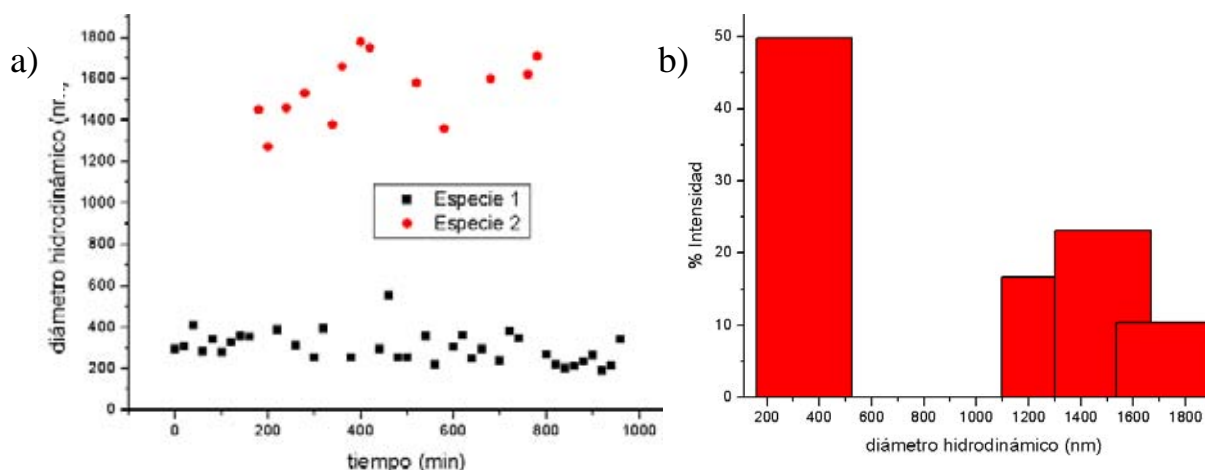


figura 21. a) Diámetro hidrodinámico de agregados de ferritina durante la cristalización, sin corriente. b) Porcentaje de intensidad de la luz dispersada por dichos agregados a 20 °C y pH 5. Ferritina 20 mg/mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M y CdSO_4 0.1 M.

Posteriormente se llevó a cabo un experimento en solución acuosa con una intensidad de corriente constante de 0.1 μA . En este experimento se observa la siguiente distribución del tamaño de partícula en solución: agregados entre los 150 y 350 nm de diámetro, además del monómero y el dímero ligeramente en menor proporción que los primeros (figura 23).

Observamos en este experimento que agregando una corriente eléctrica al sistema durante la cristalización, desaparecen los grandes agregados (1000 nm), quedando únicamente los agregados menores (300 nm) e incluso reapareciendo el monómero en la solución aunque en menor proporción. Los cristales que se observan después de 30 horas, son de mucho mayor tamaño y menor abundancia que en el experimento llevado a cabo sin corriente (figura 24).

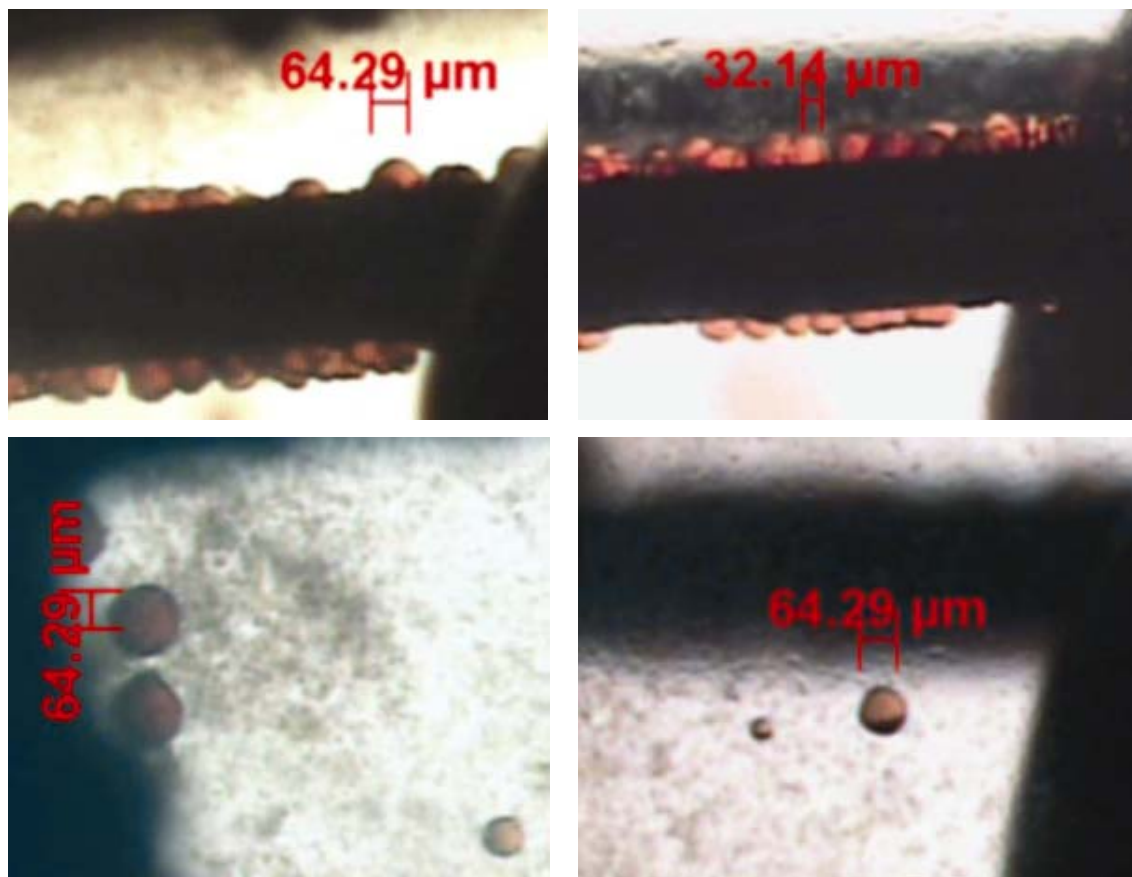


figura 22. Cristales de ferritina obtenidos en una celda de cuarzo con dos electrodos de platino en contacto durante la cristalización sin aplicar corriente en solución acuosa, 20 °C, pH 5. Ferritina 20 mg/mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M y CdSO_4 0.1 M.

Un segundo experimento en solución se llevó a cabo aplicando una intensidad de corriente de 1.0 μA . En este caso se observa únicamente un solo tipo de tamaño de partícula (figura 25), que corresponde a agregados de gran diámetro hidrodinámico, que oscilan entre los 800 y 1800 nm.

En la figura 26 se muestra una serie de fotografías obtenidas al final de este experimento (30 horas después) en donde aparecen cristales no muy bien definidos y la presencia de burbujas debidas a la reacción de hidrólisis del agua.

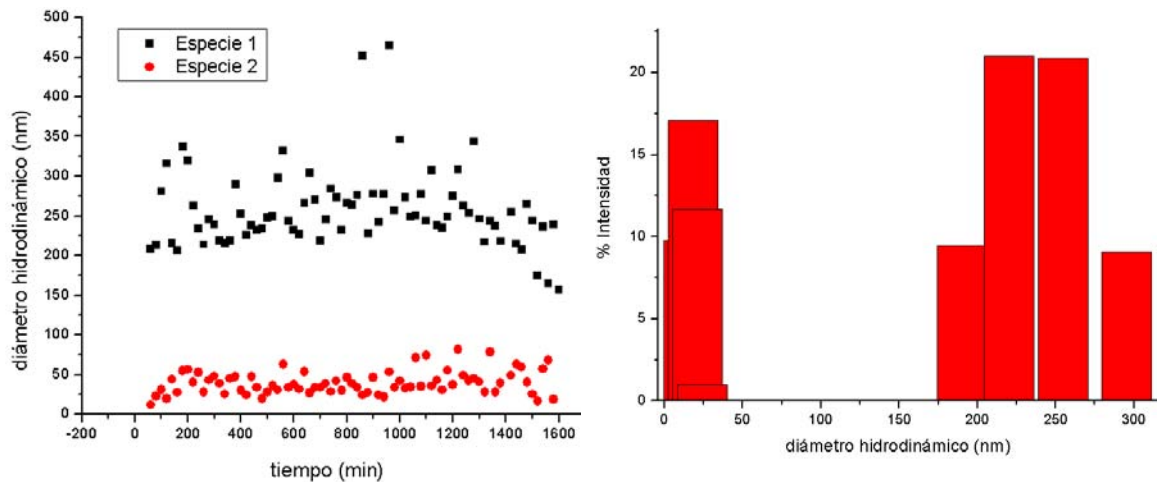


figura 23. a) Diámetro hidrodinámico de agregados de ferritina en solución acuosa durante la electrocristalización, con un valor fijo de $0.1 \mu\text{A}$ de corriente. b) Porcentaje de intensidad de la luz dispersada por dichos agregados a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 5. Ferritina 20 mg/mL , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M y CdSO_4 0.1 M .

Para estos tres casos, el examen visual de los cristales obtenidos se encuentra en concordancia con el tamaño de partícula encontrado en solución. Sin corriente encontramos agregados relativamente pequeños y en menor proporción, agregados que sobrepasan los 1500 nm que poseen pequeños coeficientes de difusión, lo que afecta el transporte de masa y por eso se observan cristales abundantes y de tamaño pequeño (figura 22).

Cuando se aplica una intensidad de corriente baja ($0.1 \mu\text{A}$) los grandes agregados desaparecen y reaparece el monómero debido a la mayor interacción de las moléculas de proteína con los iones en solución en presencia de un gradiente eléctrico. Además se mejora el transporte de masa y esto da como resultado la aparición de cristales bien definidos en la cercanía de los electrodos y en el seno de la solución (figura 24).

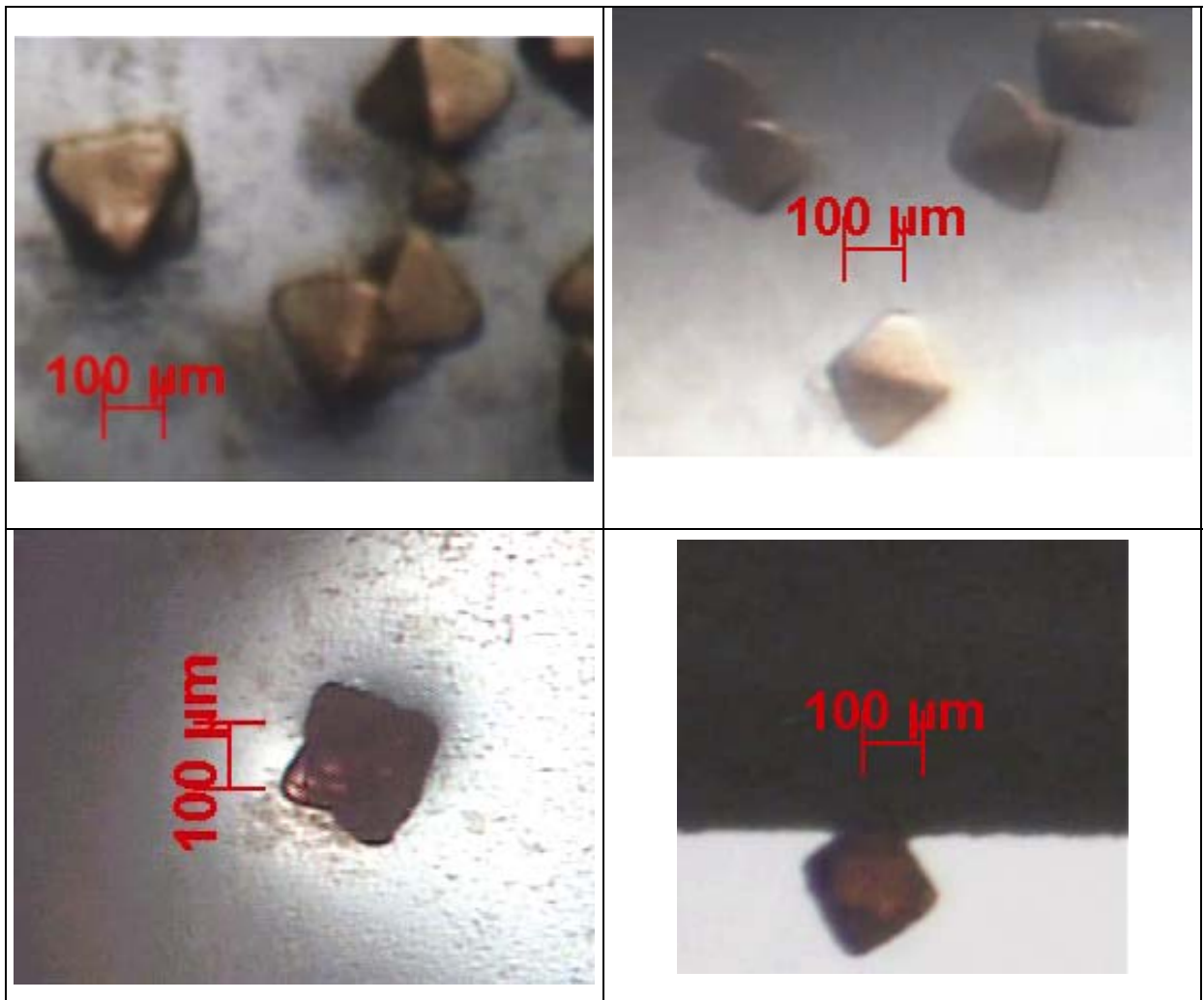


figura 24. Cristales de ferritina obtenidos en una celda de cuarzo con dos electrodos de platino en contacto durante la cristalización con una intensidad de corriente constante de $0.1 \mu\text{A}$ en solución acuosa, 20°C , pH 5. Ferritina 20 mg/mL , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M y CdSO_4 0.1 M .

Finalmente al imponer en la solución de cristales en crecimiento una intensidad de corriente mayor ($1.0 \mu\text{A}$), el potencial tan grande generado entre ambos electrodos aumenta considerablemente la interacción proteína-proteína apareciendo agregados de gran tamaño como única especie presente ($1000 - 1400 \text{ nm}$). Además, el desprendimiento de hidrógeno en las cercanías del



cátodo, genera perturbaciones en la solución y como resultado observamos cristales de morfología no definida (figura 26).

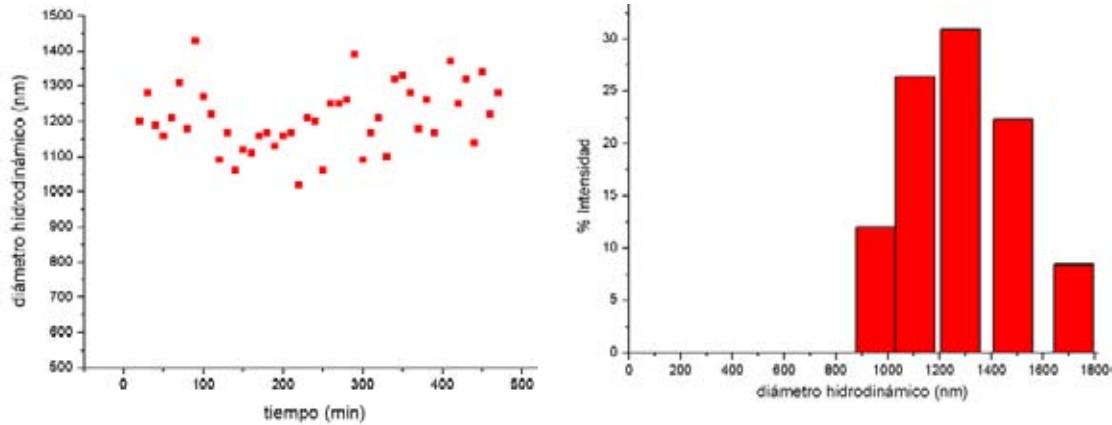


figura 25. a) Diámetro hidrodinámico de agregados de ferritina en solución acuosa durante la electrocristalización, con un valor fijo de 1.0 μA de corriente. b) Porcentaje de intensidad de la luz dispersada por dichos agregados a 20 °C y pH 5. Ferritina 20 mg/mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M y CdSO_4 0.1 M.

En estos experimentos vale la pena destacar la considerable disminución del tiempo de aparición y crecimiento de cristales.

Según la teoría clásica de nucleación cristalina (sección III.2) la formación del núcleo crítico (r^*) y por lo tanto el valor de energía libre crítica (ΔG^*) están en función del valor de potencial químico ($\Delta\mu$) de la solución.

$$\Delta G^* = r^* \Delta\mu / 2$$

Con la presencia de un campo eléctrico dentro de la solución y dado que son especies cargadas la que toman parte en la nucleación, la energía libre debe ser expresada en términos de una diferencia de potencial electroquímico: $\Delta\bar{\mu}$

$$\Delta G^* = r^* \Delta\bar{\mu} / 2$$

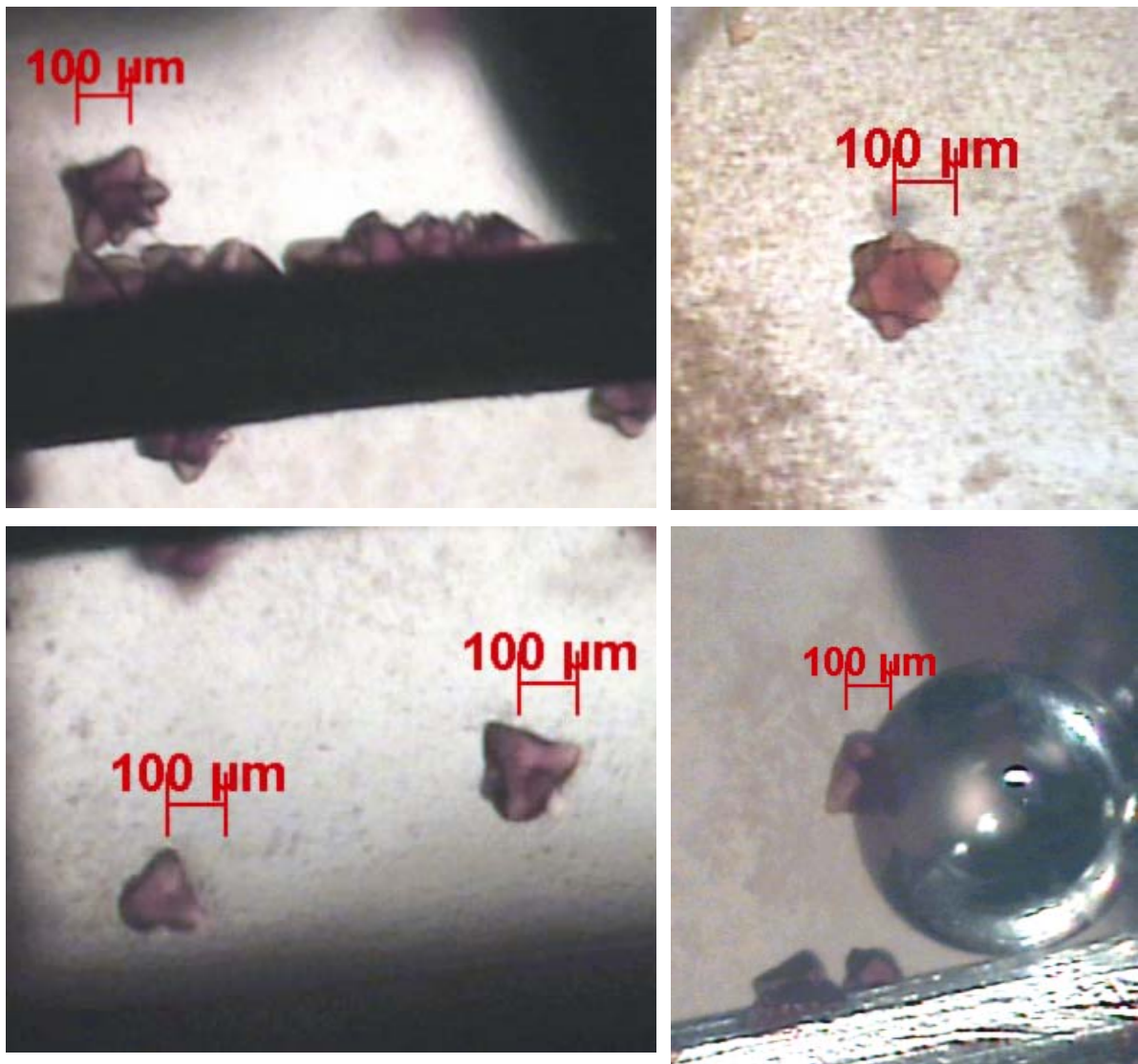


figura 26. Cristales de ferritina obtenidos en una celda de cuarzo con dos electrodos de platino en contacto durante la cristalización con una intensidad de corriente constante de $1.0 \mu\text{A}$ en solución acuosa, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5$. Ferritina 20 mg/mL , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M y CdSO_4 0.1 M .



En donde el potencial químico está dado por:

$$\bar{\Delta\mu} = \Delta\mu + zF\Delta\phi$$

z: carga de las especies iónicas

F: constante de Faraday

$\Delta\phi$: diferencia de potencial

Lo que apreciamos con estos resultados es una contribución negativa del segundo miembro de esta ecuación, que está disminuyendo el valor de la barrera energética y por lo tanto aumentando la rapidez de nucleación (figura 27).

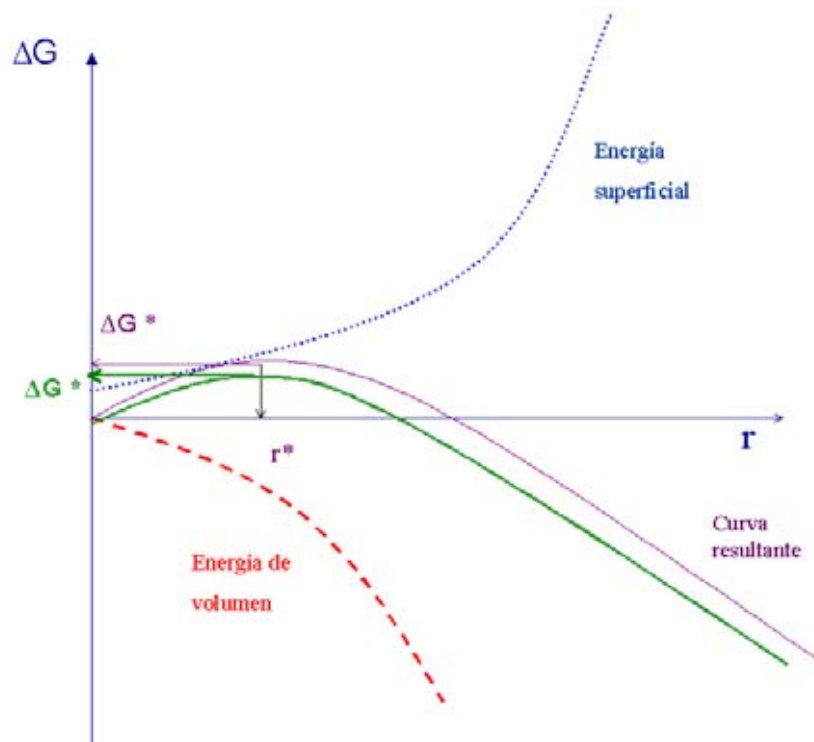


figura 27. Disminución en la barrera energética de nucleación debido a la presencia de un campo eléctrico en contacto con la solución.

Una vez aparecidos los núcleos, una aceleración del transporte de las especies cargadas hacia la interfase difusiva (sección III.3), debida a la



presencia del campo eléctrico, aumenta también la rapidez de crecimiento de los cristales.

V.4 Comparación de la calidad cristalina mediante difracción de rayos X

Cristales obtenidos en solución con 0.1 μA de corriente constante fueron comparados con cristales obtenidos sin corriente en la misma celda y con cristales crecidos en batch, en las mismas condiciones, mediante difracción de rayos X. Esto se realizó con el fin de investigar el efecto de aplicar un campo eléctrico interno constante sobre una solución donde se está llevando a cabo un proceso de cristalización. Se tomaron una serie de datos de tres cristales de tamaño similar. Todos los cristales difractaron a una resolución de 2.0 \AA . Las gráficas de intensidad en función del inverso de la resolución se muestran en la figura 28.

Podemos notar que no hay una diferencia apreciable entre ambos controles en cuanto a la intensidad que dispersan a diferentes resoluciones. En cuanto al cristal obtenido aplicando un campo eléctrico, observamos que la intensidad de la radiación dispersada es mayor prácticamente en todo el intervalo de resolución. Esto indica que el cristal contiene un mayor orden en su entramado cristalino, ya que la intensidad de la radiación dispersada es inversamente proporcional a la cantidad de defectos o desorden dentro del cristal. Es decir que el campo eléctrico no solo mejora la cinética de crecimiento, sino que mejora apreciablemente la calidad cristalina, al propiciar un mejor acomodo de las moléculas de proteína en la superficie del cristal en crecimiento.

En parte se puede refutar la teoría de que la presencia de estos agregados evita la cristalización de la proteína (Thomas *et al.*, 1998) y provoca la desnaturalización de algunas zonas de las moléculas que los conforman (Petsev *et al.*, 2000). De otra manera no se obtendrían cristales con la calidad que podemos observar en esta gráfica.

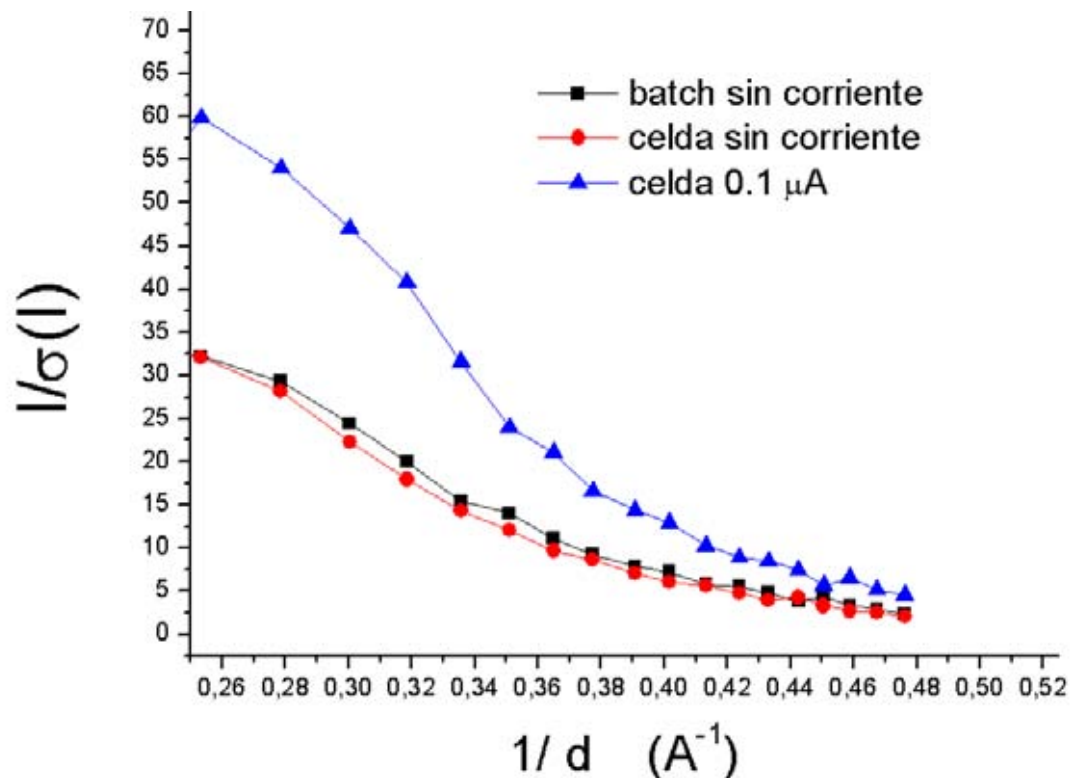


figura 28. Gráfico donde se compara la calidad cristalina entre un cristal crecido en batch, un cristal crecido en la celda de trabajo sin corriente y un cristal crecido en la celda con 0.1 μA de corriente. Ferritina 20 mg/mL, $CdSO_4$ 0.1 M, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 M, pH 5, 20 °C.

V. 5 Cristalización electroasistida aplicando un intervalo de potencial

Se estudió el proceso de cristalización de ferritina aplicando un intervalo de potencial mediante voltamperometría cíclica, tal y como se describe en la sección de métodos (IV.5). Se utilizó una placa de platino como electrodo de trabajo, un alambre del mismo material como contraelectrodo y un alambre de plata como electrodo de cuasireferencia.

Se colocaron 50 μL de una solución con $CdSO_4$ 0.1 M / $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 M y ferritina 20 mg/mL a temperatura ambiente.



Un primer experimento se llevó a cabo en un intervalo de potencial entre -1.5 y 1.5 V con una velocidad de barrido de 40 mV/s (figura 29).

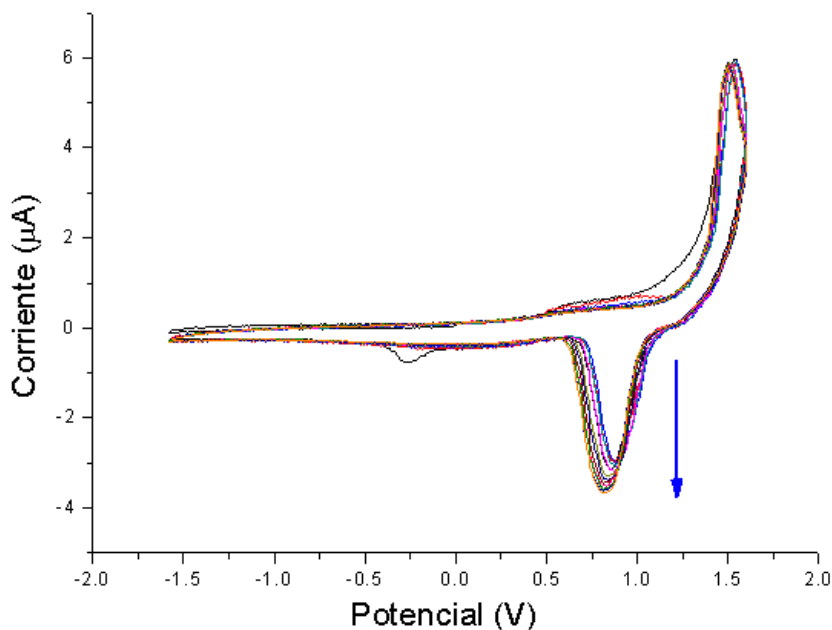


figura 29. Voltamperograma obtenido con una solución 20 mg/mL de ferritina, 0.1 M CdSO_4 y 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Intervalo -1.5 a 1.5 V. Velocidad de barrido 40 mV/s. Se muestran los primeros doce ciclos.

Apreciamos dos señales en esta figura, la primera en el límite del intervalo 1.5 V, que prácticamente se mantiene constante durante todo el experimento (aquí se muestran únicamente los primeros 12 ciclos). La segunda señal, cercana a 0.8 V, aumenta su intensidad a medida que transcurren los ciclos, como se hace notar en la figura 29 con una flecha.

Un segundo experimento se realizó con un intervalo de potencial de -0.5 a 2.5 V, con la misma velocidad de barrido. El resultado se muestra en la figura 30. En este voltamperograma se aprecian las mismas señales que en el anterior, además de algunas señales por debajo de 0.5 V. debidas probablemente a compuestos que se pueden estar formando a valores de potencial superiores a 2 V.

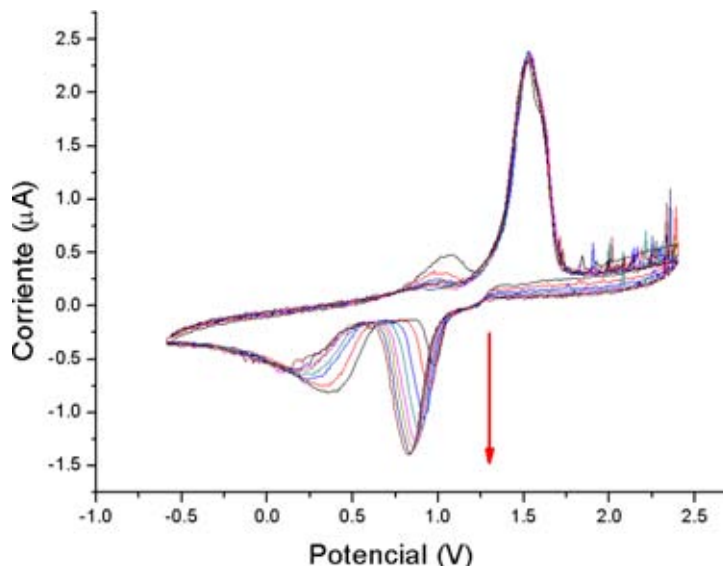


figura 30. Voltamperograma obtenido con una solución 20 mg/mL de ferritina, 0.1 M CdSO_4 y 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Intervalo -0.5 a 2.5 V. Velocidad de barrido 40 mV/s. Se muestran los primeros ocho ciclos.

Ambos tipos de experimentos dan como resultado, en un tiempo promedio de una hora, cristales de ferritina adsorbidos al electrodo de trabajo (Pt), como se muestran en la figura 31.

La naturaleza de las reacciones redox que se pueden observar en ambos voltamperogramas, si bien de importancia secundaria para los fines de esta tesis, se pueden atribuir al anión sulfato como se mostrará a continuación.

Sabemos que dichas reacciones no corresponden al electrolito soporte (acetato de sodio 0.05 M), ni tampoco al hierro presente en la proteína ya que los respectivos voltamperogramas (no incluidos), no presentan ninguna señal en los intervalos de potencial empleados.

En los voltamperogramas de los dos agentes precipitantes, CdSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por separado, así como una mezcla de ambos se pueden observar reacciones similares (figura 32). Este hecho, así como diferentes pruebas realizadas con diversas sales de sulfato, nos lleva a suponer que las reacciones observadas en el sistema de cristalización se deben este anión.

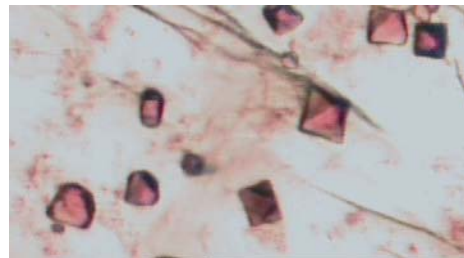
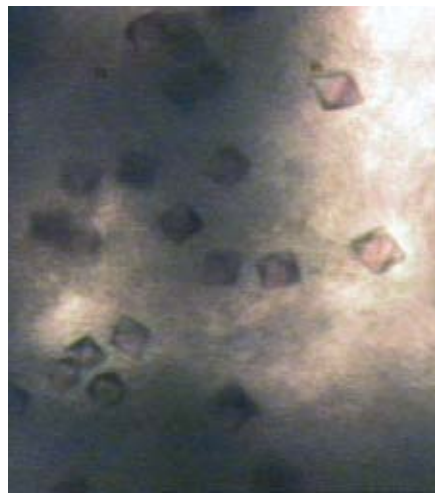
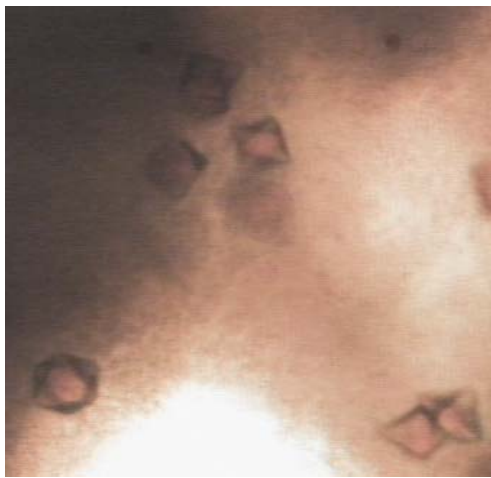
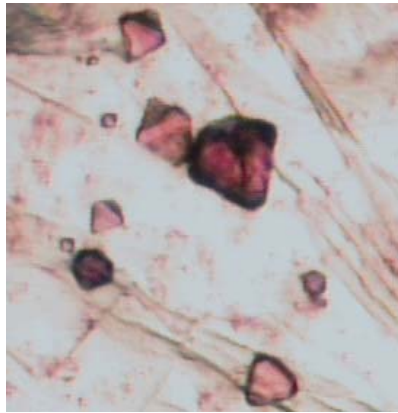


figura 31. Cristales obtenidos sobre un electrodo de Pt mediante los voltamperogramas observados en la figura 29. Ferritina 20 mg/mL, CdSO_4 0.1 M y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M.

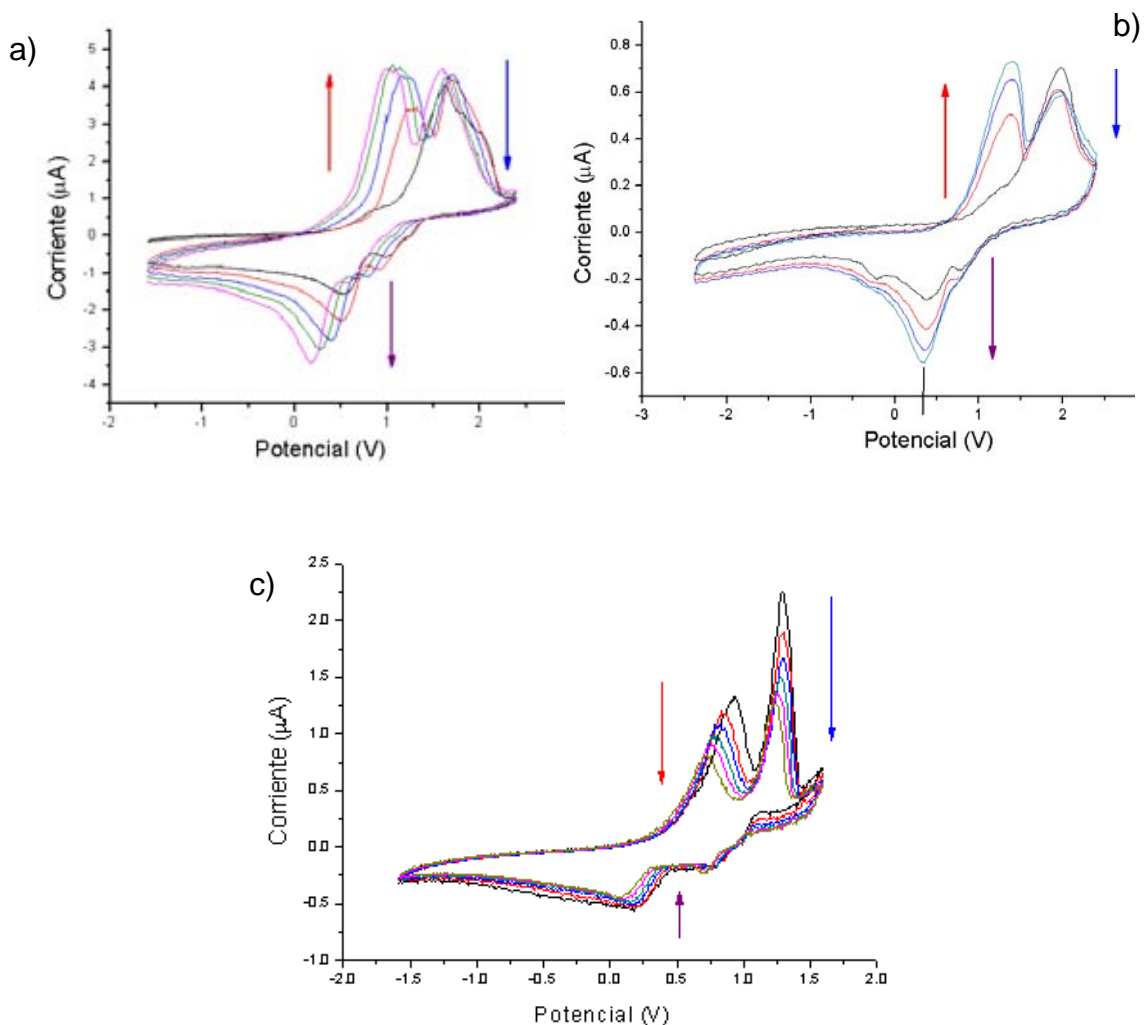


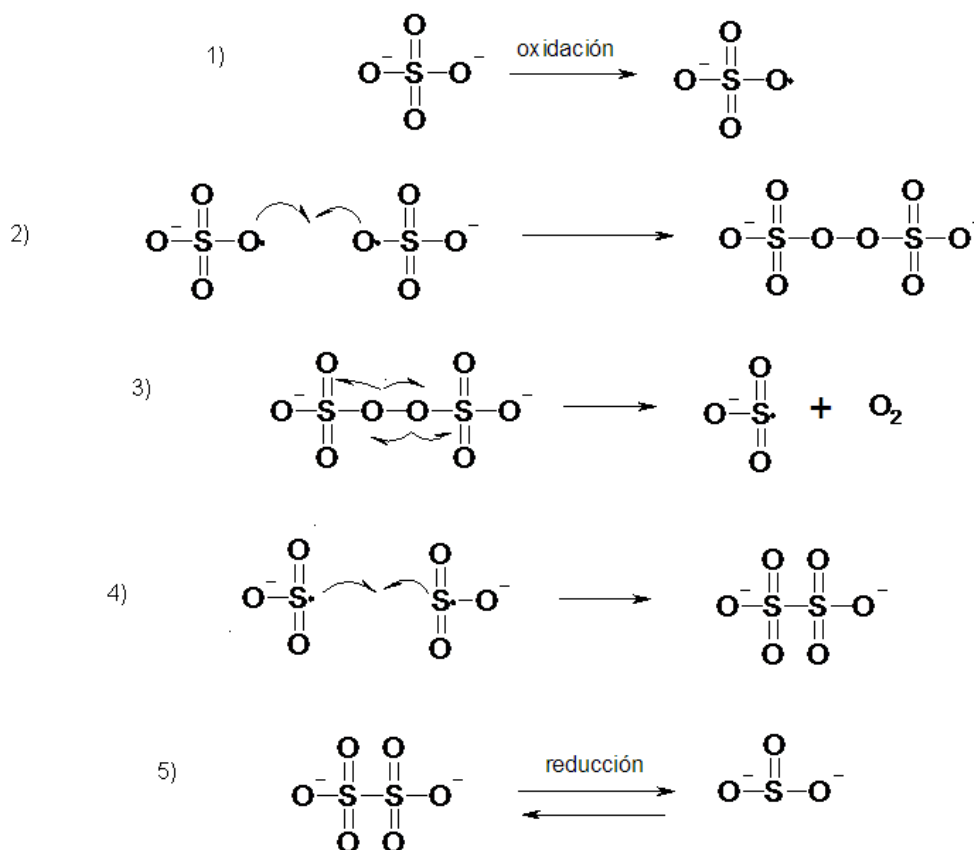
figura 32. Voltamperogramas obtenidos para a) una solución 0.05 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en un intervalo de -1.5 a 2.5 V; b) una solución 0.03 M de CdSO_4 , en un intervalo de -2.3 a 2.5 V y c) una mezcla de ambas sales CdSO_4 0.1 M / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M, en un intervalo de -1.5 a 1.5 V. Velocidad de barrido: 40 mV/s.

En general, en las figuras 32a y 32b se observan dos señales, la primera una oxidación irreversible en un potencial cercano a 1.7 V; la segunda una reducción reversible con un potencial de media onda cercano a 0.75 V. En el primer ciclo la primera señal que se observa es la oxidación a 1.7 V. Ya que la intensidad de esta señal disminuye a medida que transcurren los ciclos se cree que la especie que se oxida está presente desde el principio en la solución y su disminución se debe a que el sustrato no se está restituyendo en los



alrededores del electrodo. No observamos una correspondiente señal de reducción para esta señal. Lo que si observamos después es la reducción de otro sustrato con una intensidad de corriente que aumenta a medida que transcurren los ciclos y su correspondiente oxidación a partir del segundo ciclo y que también aumenta su intensidad conforme pasa el tiempo. Este comportamiento indica que se está formando un sustrato en 1.7 V que se descompone en cierto producto que posteriormente se reduce reversiblemente.

Según lo observado y con ayuda de los potenciales redox termodinámicos encontrados en tablas se propone el siguiente mecanismo para esta serie de reacciones:



El primer paso consiste en la oxidación de dos aniones sulfato (1) que posteriormente se juntan para formar persulfato (2). Esta especie es inestable



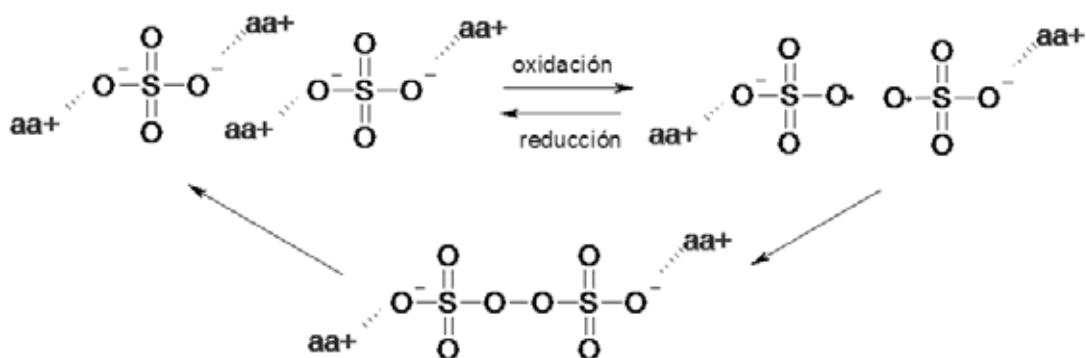
y sufre una descomposición espontánea, formando oxígeno y un radical (3) que enseguida reacciona con otro radical para formar la especie más estable bisulfito (4). Finalmente observamos la reducción reversible de esta especie a sulfito (5).

Cabe señalar que en todos los voltamperogramas se observa una pequeña señal de reducción cerca de un potencial de 1 V que se piensa, corresponde a una pequeña fracción de persulfato que no se descompone a bisulfito y que se reduce a sulfato.

En la figura 32c, donde se muestra el voltamperograma de la mezcla de agentes precipitantes CdSO_4 0.1 M / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M, se observan señales similares a las anteriores pero con dos diferencias notables: 1) En todas las señales la intensidad de corriente disminuye a medida que transcurren los ciclos y 2) la oxidación en 1.4 V muestra una caída de corriente correspondiente a la adsorción del sustrato en el electrodo. Esta última observación se ve confirmada por la presencia de un precipitado dentro de la solución, que al adsorberse disminuye el área activa del electrodo y por lo tanto la intensidad de corriente, al ser ésta una función de la primera. Se ha informado que la especie $\text{Cd}(\text{NH}_3)_6$ es una especie sólida sumamente estable (Mikuli *et al.*, 2007), por lo que se piensa que este adsorbato puede tratarse de un complejo del tipo $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_m(\text{NH}_3)_n] \text{X}$, donde $m+n=6$ y $\text{X} = \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$.

Este último voltamperograma difiere de aquellos de las figuras 29 y 30, en donde además de la mezcla de agentes precipitantes se encuentra presente la proteína, en que no se observa la presencia del adsorbato en la superficie del electrodo, debido posiblemente que todos los iones se encuentran coordinados con la proteína. Lo que observamos es únicamente la oxidación del sulfato para formar persulfato y la reacción inversa (reacción 2 del mecanismo propuesto arriba) en un potencial cercano a 1.3 V.

Que la especie persulfato no se descomponga para formar bisulfito se puede explicar si pensamos en que muy probablemente los aniones sulfato se encuentran interaccionando electrostáticamente con los aminoácidos que poseen carga positiva (aa+) en la superficie de la proteína:



Cabe remarcar que la propuesta de estas reacciones se basa únicamente en los datos termodinámicos que se pueden consultar en los libros y no se toma en cuenta la cinética de las mismas. Para tener un sustento químico o estructural a esta propuesta, se debe de realizar una serie de experimentos electroquímicos adicionales cuya realización rebasa los propósitos de esta tesis. O bien, estudios de difracción de rayos X de los cristales de ferritina obtenidos mediante esta técnica en donde podamos constatar la interacción proteína-sulfato.

En cualquier caso, la manipulación de la diferencia de potencial dentro de la solución de ferritina y agente precipitante, lleva a una disminución considerable en el tiempo de nucleación y crecimiento de cristales comparado con los experimentos galvanostáticos mostrados en la sección V.3. Este hecho se debe quizá a las grandes corrientes que se establecen en ambos sentidos, en intervalos cortos de tiempo lo que, según nos sugieren estos resultados conllevan a una disminución del valor de ΔG^* y a un transporte de masa óptimo para el crecimiento de cristales.

V. 6 Caracterización de la superficie cristalina mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Los cristales obtenidos de esta manera (figura 31) que fueron caracterizados *In situ*, mediante Microscopía de Fuerza Atómica. En la figura 33a se muestra la



superficie del electrodo de platino antes de comenzar el experimento. En las figuras 33b-33d observamos pequeños núcleos de cristales en crecimiento después de 15 minutos de experimento.

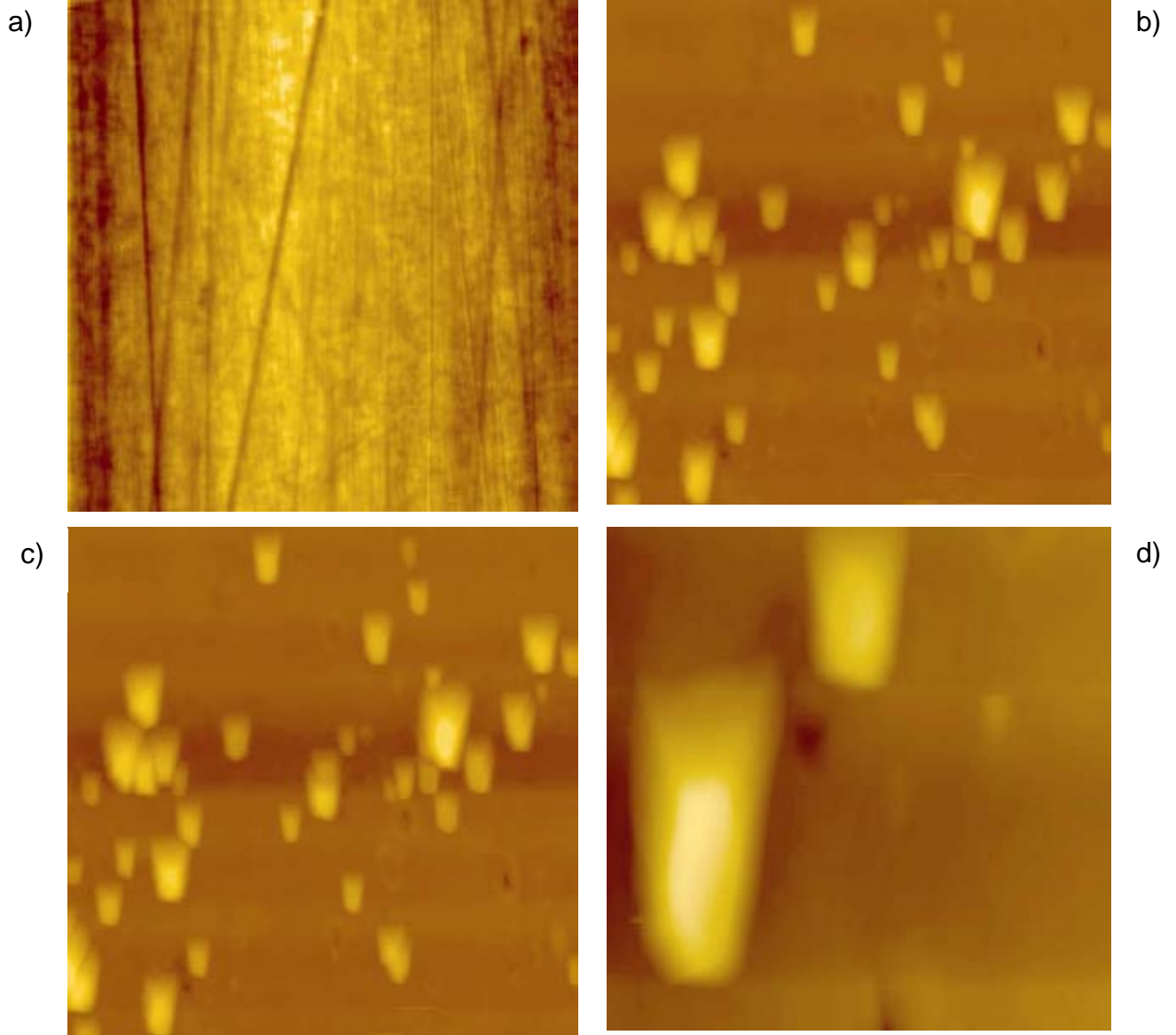


figura 33. a) Superficie del electrodo de Pt antes de la electrocristalización b)-d) Imágenes obtenidas mediante AFM después de 15 minutos de cristalización mediante voltamperometría cíclica. a)-c) 12 x 12 μm . d) 4 x 4 μm



En la figura 34 se muestra la caracterización de la superficie de estos cristales. Estas imágenes nos sugieren que este tipo de cristalización asistida mediante voltamperometría cíclica, provoca la formación de múltiples núcleos, que al crecer se juntan para formar un solo cristal de superficie suave, a través de un mecanismo que se conoce como crecimiento competitivo.

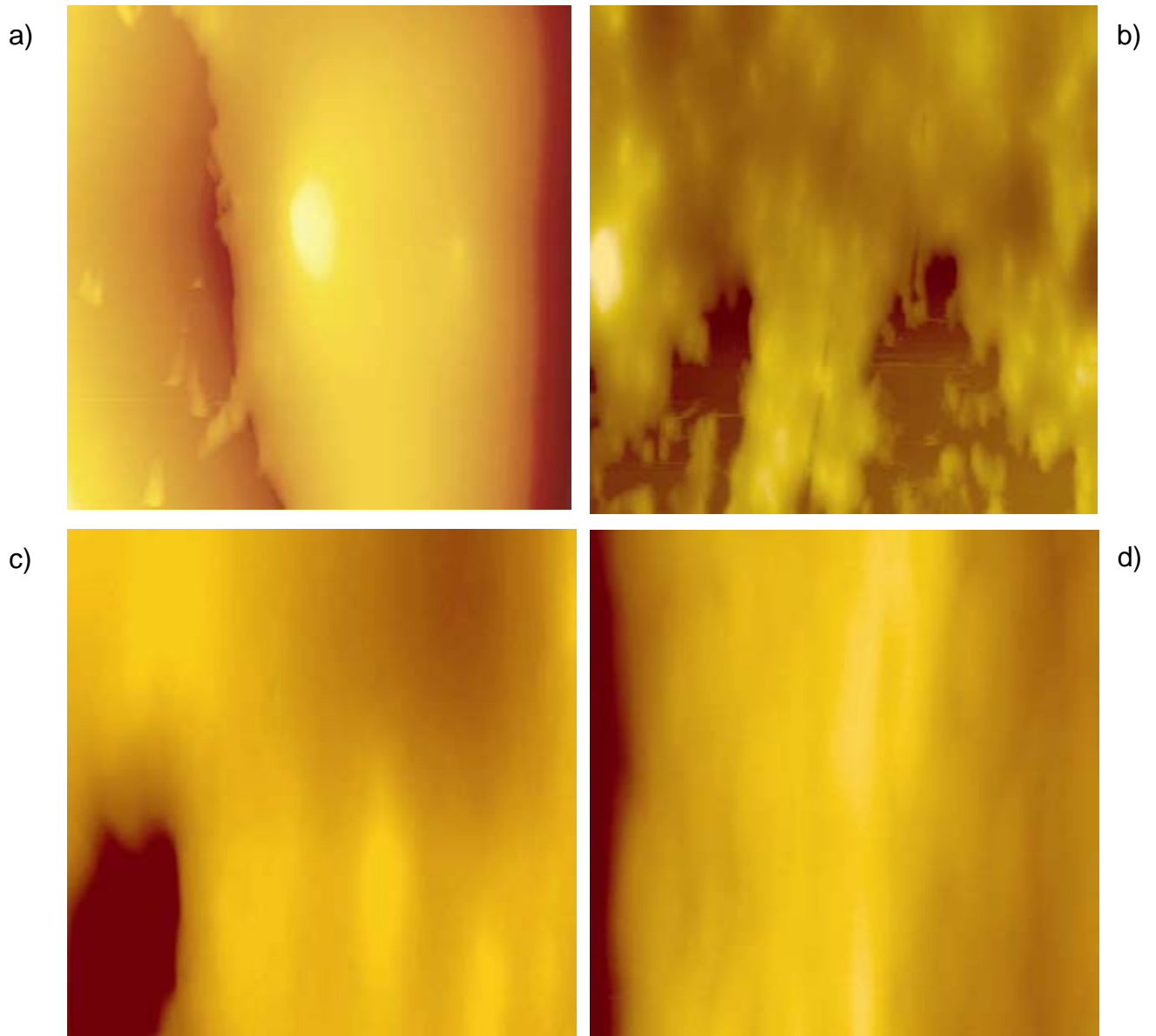


figura 34. Superficie de cristales de ferritina obtenidos mediante voltamperometría cíclica sobre un electrodo de platino. a) y b) 12 x 12 μm . c) 3 x 3 μm . d) 700 x 700 nm.



V.7 Fijación de cristales de ferritina mediante electrosíntesis de pirrol

Se colocaron cristales de ferritina obtenidos mediante la técnica batch, sobre la superficie de un electrodo de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG). Este electrodo se ha utilizado ampliamente como electrodo en múltiples aplicaciones, ya que posee una estructura bien definida, una superficie atómicamente plana y por la facilidad con la que se renueva entre experimento y experimento (Chang & Bard, 1991). Se agregó a la celda de fluidos una disolución 0.77 M de pirrol / 0.34 M LiClO_4 y aplicando un intervalo de potencial de -2.8 a 2.8 V se observó el crecimiento del polímero en los alrededores de los cristales (figura 35).

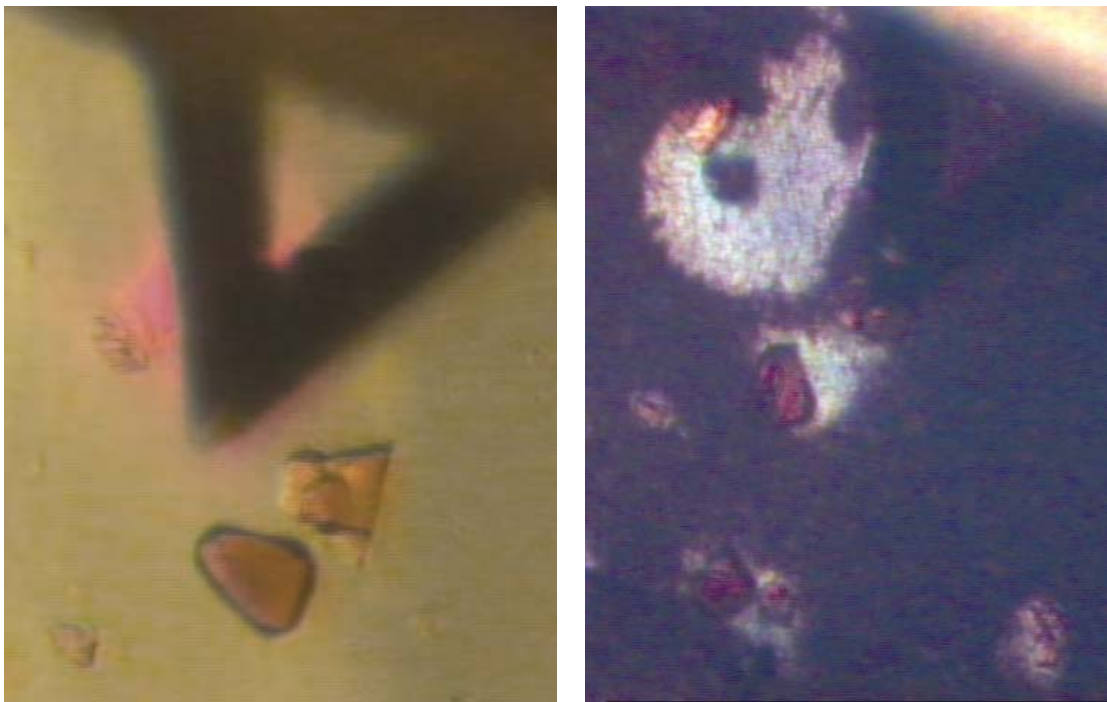


figura 35. Cristales de ferritina sobre la superficie de HOPG, antes y después de la polimerización de pirrol.



En la figura 36 se presenta la caracterización superficial de a) HOPG antes de la polimerización, b) HOPG después de la polimerización y c) la superficie del cristal.

De estas imágenes podemos concluir que el polímero no crece en la superficie del cristal sino únicamente a su alrededor. Dado que es posible aplicar una pequeña fuerza al cristal (0.3 N/m) sin que se mueva y obtener una imagen topográfica de calidad, podemos decir que esta técnica resulta ser eficiente en la inmovilización de cristales de ferritina como ha demostrado serlo para otras metaloproteínas (Hernández-Pérez *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2007).

Durante la realización de estos experimentos se encontraron dificultades para caracterizar la superficie de cristales que no presentan una cara plana, ya que se trata de cristales del sistema cúbico con simetría octaédrica (semejantes a romboedros). Obtener cristales de otro sistema, por ejemplo ortorrómbicos, facilitaría en gran medida su inmovilización mediante la técnica aquí descrita, así como su caracterización superficial.

La inmovilización de proteínas (especialmente enzimas) en estado cristalino abre diversas posibilidades en el área biotecnológica, como el desarrollo de un posible biosensor y el estudio de diversas reacciones en estado sólido donde la proteína tome parte activa. También es de utilidad en la dilucidación de mecanismos de crecimiento cristalina, así como para su caracterización superficial mediante AFM, técnica que presenta el inconveniente de requerir la inmovilización total de la muestra a estudiar.

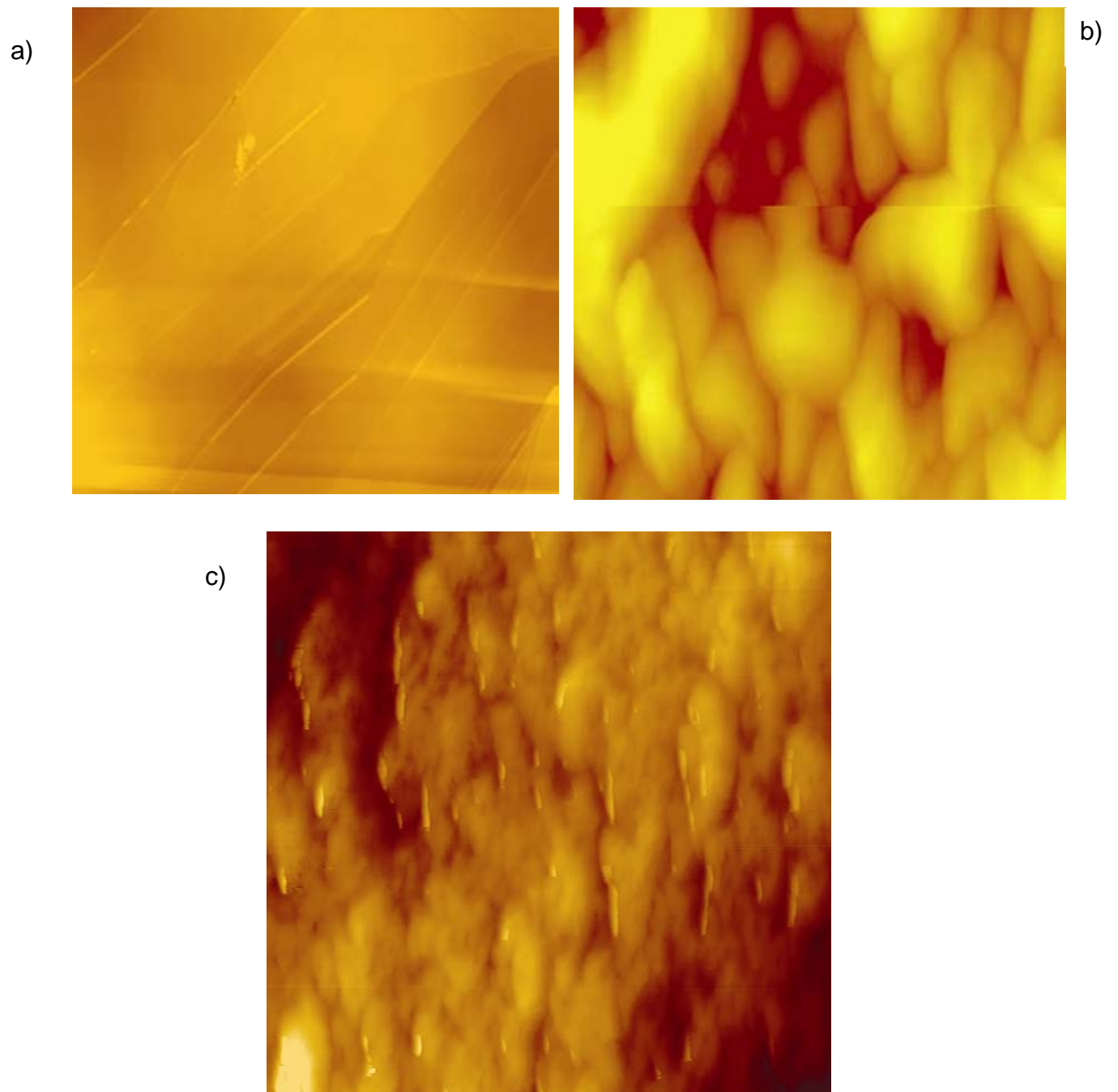


figura 36. a) Superficie de HOPG antes de la polimerización. b) Superficie de HOPG después de la polimerización c) Superficie de un cristal de ferritina inmovilizado. Escala: 12 x 12 μm , para las tres imágenes.



VI. CONCLUSIONES



- Acoplando los efectos de dos agentes precipitantes y sus concentraciones CdSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se ha conseguido la obtención de cristales adecuados para difracción de rayos X (aún cuando la muestra de proteína es altamente polidispersa). Con estos resultados, se encontró que la relación óptima para estos fines es $\text{CdSO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0.1 \text{ M} / 0.5 \text{ M}$.
- Cualitativamente, en un experimento galvanostático, demostramos que se obtienen mejores cristales con valores de corriente bajos (aproximadamente $0.1 \mu\text{A}$).
- La presencia de un campo eléctrico ha resultado en una disminución en el tiempo de nucleación y crecimiento de cristales de ferritina.
- Los cristales obtenidos en presencia de un campo eléctrico tienen una calidad cristalina mayor (mayor valor de la relación I/σ), lo que nos lleva a concluir que la transferencia de masa inducida mediante esta técnica es un proceso ordenado y controlado, que no genera flujos convectivos.
- Utilizando voltamperometría cíclica se disminuye aún más el tiempo de nucleación y consecuentemente del crecimiento cristalino, debido a la generación de núcleos que al crecer forman un solo cristal.
- Se utilizó la reacción de polimerización de pirrol para inmovilizar eficientemente cristales sobre la superficie de un electrodo de grafito para estudios de análisis topográfico empleando técnicas de AFM.

**VII. Logros y perspectivas**

Logros	Perspectivas
Se obtuvieron cristales de ferritina sin llevar cabo una purificación previa de la muestra.	Revisar el concepto de impureza y la importancia real de la polidispersidad de la muestra de proteína a cristalizar.
Se obtuvieron cristales de alta calidad, en presencia de una corriente constante, acoplado y monitoreando el proceso mediante DLS.	Diseñar una celda de bajo costo que nos permita monitorear el proceso de cristalización mediante DLS y en donde además los cristales resultantes sean fácilmente manipulables.
Se logró disminuir el tiempo de nucleación, así como de crecimiento cristalino utilizando voltamperometría cíclica.	Comparar la calidad de los cristales obtenidos mediante esta técnica, con aquellos obtenidos galvanostáticamente y en microbatch, mediante técnicas de rayos X.
Se inmovilizaron exitosamente cristales de ferritina del sistema cúbico, utilizando la reacción de polimerización de pirrol.	Llevar a cabo el experimento de inmovilización con cristales que presenten caras más planas (sistema ortorrómbico, por ejemplo).



VIII. REFERENCIAS



1. Acosta F., Eid D., Marín-García L., Frontana-Urbe A. y Moreno A., (2007), "From Cytochrome c Crystals to a Solid-State Electron-Transfer Device", *Crystal Growth & Design*, 7, 2187–2191.
2. Al-Haq M.I., Lebrasseur E., Choi W.K., Tsuchiya H., Torii T., Yamazaki H. y Shinohara E., (2007a), "An apparatus for electric – field – induced protein crystallization", *Applied Crystallography*, 40, 199–201.
3. Al-Haq M.I., Lebrasseur E., Tsuchiya H., Torii T., (2007b), "Protein crystallization under an electric field" *Crystallography Reviews*, 13, 29-64.
4. Amorós J.L., (1990), "El cristal: morfología, estructura y propiedades físicas", 4ta ed., Ediciones Atlas, Madrid, 600p.
5. Amos L., (2005), "Tubulin and Microtubules", *Life Science Encyclopedia*, doi: 10.1038/npg.els.0003890, John Wiley & sons, 1–7.
6. Andrews S.C., Arosio P., Bottke W., Briat J.F., von Darl M., Harrison P.M., Laulhere J.P., Levi S., Lobreaux S., Yewdall S.J., (1992), "Structure, Function and Evolution of Ferritins" *J. Inorg. Biochem.*, 47, 16-174.
7. Arosio P., Adelman T.G., Drysdale J.W., (1978), "On ferritin heterogeneity: Further evidence for heteropolymers" *J. Biol. Chem.*, 253, 4451-4458.
8. Arosio P., Gatti G., Bolognesi M., (1983), "Selective crystallization of horse isoferritins" *Biochimica et Biophysica Acta*, 744, 230–232.
9. Bancel P., Cajipe V., Rodier F., (1999), "Manipulating crystals with light", *J. Cryst. Growth*, 196, 685–690.
10. Banyard S. H., Stammers D.K., Harrison P.M., (1978), "Electron density map of apoferritin at 2.8 Å resolution" *Nature*, 271, 282-284.
11. Bartling K., Sambanis A., Rousseau R.W., (2007) "Dependence of apoferritin crystal growth on temperature and cadmium concentration", *Cryst. Growth and Design*, 7, 569–575.
12. Bernal J.D., Crowfoot D., (1934), "X-Ray Photographs of Crystalline Pepsin", *Nature*, 133, 794-795.
13. Beck F., (1988), "Electrodeposition of polymer coatings", *Electrochim. Acta*, 33, 839–850.
14. Binning G. & Quate C.F., (1986), "Atomic Force Microscope", *Phys. Ref. Lett.*, 56, 930–933.
15. Budevski E., Staikov G., Lorenz W.J., (2000) "Electrocrystallization: Nucleation and growth phenomena", *Electrochimica Acta*, 45, 2559-2574
16. Bugg C. E., (1986), "The future of crystal growth", *J. Cryst. Growth*, 76, 535– 544



17. Cang X.H., Bi R.C., (2001), "Influence of gravity on post nucleation transport in liquid/liquid diffusion chamber of protein crystallization", *J. Cryst. Growth*, 232, 473–480.
18. Chang H. & Bard A.J., (1991), "Observation and characterization by Scanning Tunneling Microscopy of structures generated by Cleaving Highly Oriented Pyrolytic Graphite", *Langmuir*, 7, 1143-1153.
19. Chasteen N., Harrison P.M., (1999) "Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage", *J. Structural Biology*, 126, 182-194.
20. Chayen N.E., Shaw-Stewart P.D., Blow D., (1992), "Microbath crystallization under oil: a new technique allowing many small volume crystallization trials", *J. Cryst. Growth*, 122, 176-180.
21. Chernov A.A., García-Ruiz J.M., Thomas B.R., (2001), "Visualization of the impurity depletion zone surrounding apoferritin crystals growing in gel with holoferritin dimmer impurity", *J. Cryst. Growth*, 232, 184-187.
22. Chiang C.K., Fincher C.R., Park Y.W., Heeger A.J., Shirakawa H., Louis E.J., Gau S.C., McDiarmid A.G., (1978), "Electrical conductivity in doped polyacetylene", *Phys. Rev. Letters*, 39, 1098–1101.
23. Chin C., Dence J.B., Warren J.C., (1976), "Crystallization of human placental estradiol 17 β - dehydrogenase: a new method for crystallizing labile enzymes", *J. Biol. Chem.*, 251, 3700–3705.
24. Dall'Olio A., Dascola G., Varacca V., Bocchi V., (1968), "Resonance paramagnetique electronique et conductivite d'un noir d'oxypyrrrol electrolytique", *C.R. Acad. Sci. Paris Serie C*, 267, 433-435.
25. D'arcy A., Elmore C., Stihle M., Johnston J.E., (1996), "A novel approach to crystallizing proteins under oil", *J. Cryst. Growth*, 168, 175–180.
26. DeLucas L.J., Bugg C.E., (1987), "New directions in protein crystal growth", *Trends Biotechnol.*, 5, 188-193
27. Díaz M., Rojas A., Vera E., Cortes M., (2005), "Síntesis electroquímica y caracterización eléctrica de polímeros conductores a partir de pirrol", *Rev. colomb. de fís.*, 37, 357–360.
28. Douglas T., Dickson D.P.E., Betteridge S., Charnock J., Garner C.D., Mann S., (1995), "Synthesis and structure of an iron (III) sulfide-ferritin bioinorganic nanocomposite", *Science*, 269, 54-57.
29. Epstein A., Wegner G., Rosseinsky D., Albery W., Roth S., Heeger A., (1989), "General Discussion", *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 88, 235-238.



30. Feeling-Taylor A., Banish R., Hirsh R., Vekilov P., (1999), "Miniaturized scintillation technique for protein solubility determinations", *Rev. Sci. Instrum.*, 70, 2845–2849.
31. Fernández, T., (2003), "Polímeros conductores: síntesis, propiedades y aplicaciones electroquímicas", *Rev. Iberoam. Polímeros*, 4, 1–32.
32. Frank, J., (2006), "Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State", Oxford University Press, N.Y., 410p.
33. Frontana-Urbe B. & Moreno A., (2008), "On electrochemically-assisted protein crystallization and related methods", *Crystal Growth & Design*, *In press*.
34. Galkin O., Vekilov P., (2000), "Are Nucleation Kinetics of Protein Crystals Similar to Those of Liquid Droplets?" *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 156–163.
35. García-Ruiz J. M., Moreno A., Otálora F., Rondón D., (1998), "Teaching protein crystallization by the gel acupuncture method", *J. of Chem. Education*, 75, 442-446.
36. García-Ruiz, J. M., (2001), "A world without gravity : Research in space for health and industrial processes" editado por G. Seibert, pp. 159-172, ESA publication division.
37. Gavira J. A., García-Ruiz J.M., (2002), "Agarose as crystallisation media for proteins II: trapping of gel fibres into crystals", *Acta Cryst.*, D58, 1653-1656.
38. Gilliland G.J., (1988), "A biological macromolecule crystallization database: A basis for a crystallization strategy", *J. of Cryst. Growth*, 90, 51-59.
39. Goldsbury C., (2002), "Introduction to Atomic Force Microscopy (AFM) in Biology", *Curr. Protoc. in Protein Sci.*, Sup. 29, 17.7.1 – 17.7.17.
40. Granier T., Gallois B., Dautant A., Langlois B., Précigoux G., (1997) "Effect of microheterogeneity on horse spleen apoferritin crystallization", *Acta Cryst.*, D53, 580-587.
41. Harding S., (1998), "Light Scattering", *Current Protocols in Protein Science*, Supplement,11, 7.8.1 – 7.8.14
42. Harrison, P., Arosio P., (1996), "The ferritins" molecular properties, iron storage function and cellular regulation ", *Biochimica et biophysica acta* , 1275, 161-203.
43. Hasan M.R, Morishima D., Tomita K., Katsuki M., Kotani S., (2005), "Identification of a 250 kDa putative microtubule-associated protein as bovine ferritin: evidence for a ferritin-microtubule interaction", *FEBS J.*, 272, 822–831.
44. Hasan M.R., Koikawa S., Kotani S., Miyamoto S., Nakagawa H., (2006), "Ferritin forms dynamic oligomers to associate with microtubules in vivo: Implication for the role of microtubules in iron metabolism", *Experimental Cell Research*, 310, 1950–1960.



45. Hempstead P.D., Yewdall S.J., Fernie A.R., Lawson D.M., Artymiuk P.J., Rice D.W., Ford C.G., Harrison P.M., (1997), "Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and Horse L ferritins at high resolution", *J. Mol. Biol.*, 266, 424–448.
46. Hegenaver J., Saltman P., Hatlen L., (1979), "Removal of Cd (II) from crystallized ferritin", *Biochem. J.*, 177, 693–695.
47. Henisch H. K., (1988), "Crystals in Gels and Liesegang Rings", pp.197, Cambridge University Press.
48. Hernández-Pérez T., Mirkin N., Moreno A., Rivera M., (2002), "Immobilization of Catalase Monocrystals on HOPG by the Growth of Polypyrrole films for AFM investigations", *Electrochemical and Solid State Letters*, 5, E35 – E39.
49. Hirsh R.E., Raventos-Suárez C., Olson J.A., Nagel R., (1985), "Ligand State of Intraerythrocytic Circulating HbC Crystals in Homozygote CC Patients", *Blood*, 66, 775–778.
50. Hoare R. J., Harrison P.M., Hoy T.G., (1975), "Structure of horse-spleen apoferritin at 6 Å resolution", *Nature*, 255, 653-654.
51. Kadri A., Jenner M., Damak B., Lorber B., Giegé R., (2003), "Crystallogensis studies of proteins in agarose gel –combined effect of high hydrostatic pressure and pH", *J. Cryst. Growth*, 257, 390 – 402.
52. Langlois B., Dautant A., Granier T., Gallois B., Michaux M., Précigoux G., (1996), "Crystallization and preliminary X-ray analysis of an orthorhombic form of horse-spleen apoferritin", *Acta Cryst.*, D52, 597–600.
53. Laufberger D.V., (1937), "Sur la cristallisation de la Ferririne", *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 19, 1575-1582.
54. Levi S., Santambrogio P., Corsi B., Cozzi A., Arosio P., (1996), "Evidence that residues exposed on the three-fold channels have active roles in the mechanism of ferritin iron incorporation", *Biochem. J.*, 317, 467-473.
55. Lin M.J., Nagel R.L., Hirsh R.E., (1989), "Acceleration of hemoglobin C crystallization by hemoglobin S", *Blood*, 74, 1823–1825.
56. Lorber B., Giegé R., (2001), "Nucleation and growth of thaumatin crystals within a gel under microgravity on STS-95 mission vs. under Earth's gravity", *J. Cryst. Growth*, 231, 252-261.
57. McPherson, A., (1991), "A brief history of protein crystal growth", *J. Cryst. Growth*, 110, 1-10.



58. McPherson A., Malkin A.J., Kuznetsov Y.G., (2000), "Atomic Force Microscopy in the Study of Macromolecular Crystal Growth", *Annu. Rev. Biophys. Struct.*, 29, 361–410.
59. McPherson A., (2003), "Macromolecular crystallization in the structural genomics era", *J. Struct. Biol.*, 142, 1-2.
60. Mikuli E., Liszka M., Molenda M., (2007), "Thermal decomposition of $[\text{Cd}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_2$ ", *J. of Thermal Analysis and Calorimetry*, 89, 573–578.
61. Mirkin N., Frontana-Urbe B.A., Rodríguez-Romero A., Hernández-Santoyo A., Moreno A., (2003), "The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method", *Acta Cryst.*, D59, 1533–1538.
62. Moreno A., Sazaki G., (2004), "The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme", *J. Cryst. Growth* 264, 438-444.
63. Moreno A. & Rivera M., (2005), "Conceptions and first results on the electrocrystallization behaviour of ferritin", *Acta Cryst.*, D61, 1678–1681.
64. Mori Y., Takano K., Adachi H, Inoue S, Murakami H, Matsumura H., Sazaki T., (2006), "Protein crystallization using femto-second laser radiation and solution-stirring", Presentado en 11th edición del ICCBM, Quebec, Canadá.
65. Nakamura H., Fukuyama S., Yoshizaki I., Yoda S., (2003), "Theory of vapor diffusion in the high density protein crystal growth device and it's application to the measurement of the vapor pressures of the aqueous solution", *J. Cryst Growth*, 259, 149–159.
66. Nanev C. N., Penkova A., (2001) "Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields", *J. Cryst. Growth*, 232, 285–293.
67. Nieto-Mendoza E., Frontana-Urbe B.A., Sazaki G., Moreno A., (2005), "Investigations on electromigration phenomena for protein crystallization using crystal growth cells with multiple electrodes: effect of the potential control" *J. of Cryst. Growth*, 275, e1437-e1446.
68. Niitsu Y., Listowsky I., (1973), "Mechanism for the Formation of Ferritin Oligomers", *Biochemistry*, 12, 4690– 4695.
69. Otero T., Tejada R., Eola S., (1987), "Formation and modification of polypyrrole films on platinum electrodes by cyclic voltammetry and anodic polarization", *Polymer*, 28, 651-658.
70. Oxtoby D.W., (1998), "Nucleation of first-order phase transitions", *Acc. Chem. Res.*, 31, 91–97.
71. Penkova A., Pan W., Hodjaoglu F., Vekilov P., (2006), "Nucleation of protein crystals under the influence of solution shear flow", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1077, 214–231.



72. Pérez Y., Eid D., Acosta F., Marín-García L., Jakoncic J., Stojanoff V., Frontana-Uribe B. A., Moreno A., (2008), "Electrochemically Assisted Protein Crystallization of Commercial Cytochrome c without Previous Purification", *Crystal Growth & Design*, 8, 2493–2496.
73. Petsev D., Thomas B.R., Yau S.T., Vekilov P., (2000), "Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution: effects of added electrolytes", *Biophysical J.*, 78, 2060–2069.
74. Robert, M. C., (1999) "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins : A practical approach", editado por A. Ducruix & R. Giegé, 2nd ed., pp 149-175. Oxford University Press.
75. Sauter C., Lorber B., Giegé R., (2002), "Towards atomic resolution with crystals grown in gel: the case of thaumatin seen at room temperature", *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 48, 146-150.
76. Sazaki G., Yoshida E., Komatsu H., Nakada T., Miyashita S., Watanabe K., (1997), "Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals", *J. Cryst. Growth*, 173, 231–234.
77. Sazaki G., Moreno A., Nakajima K., (2004), "Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization", *J. Cryst. Growth*, 262, 499– 502.
78. Scott W.T., (1960), "The physics of electricity and magnetism", John Wiley & sons, New York, 635p.
79. Sica F., Demasi D., Mazzarella L., Zagari A., Capasso S., (1994), "Elimination of twinning in crystals of *Sulfolobus solfataricus* Alcohol Dehydrogenase Holo-Enzyme by growth in agarose gels" *Acta Cryst.*, D50, 508-511.
80. Suzuki Y., Miyashita S., Sazaki G., Nakada T., Sawada T., Komatsu H., (2000), "Effects of pressure on growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals", *J. Cryst. Growth*, 208, 638– 644
81. Taleb M., Didierjean D., Jelsch C., Mangeot J.P., Capelle B., Aubry A., (1999), "Crystallization of proteins under an external electric field", *J. Cryst. Growth*, 200, 575-582.
82. Taleb M., Didierjean D., Jelsch C., Mangeot J.P., Aubry A., (2001), "Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field", *J. Cryst. Growth*, 232, 250–255.
83. Tatur J., Hagen W.R., Matias P.M., (2007), "Crystal structure of the ferritin from the hyperthermophilic archaeal anaerobe *Pyrococcus furiosus*", *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 615-630.



84. Thomas B.R., Carter D., Rosenberger F., (1998), "Effect of microheterogeneity on horse spleen apoferritin crystallization", *J. Cryst. Growth*, 187, 499-510.
85. Thomas B.R., Chernov A.A., Vekilov P.G., Carter D.C., (2000), "Distribution coefficients of protein impurities in ferritin and lysozyme crystals. Self-purification in microgravity", *J. Cryst. Growth*, 211, 149–156.
86. Tsekova D., Popova S., Nanev C., (2002), "Nucleation rate determination by a concentration pulse technique: application on ferritin crystals to show the effect of surface treatment of a substrate", *Acta Cryst.*, D58, 1588–1592.
87. Vekilov P., Alexander J.I.D., (2000), "Dynamics of layer growth in protein crystallization", *Chem. Rev.*, 100, 2061–2089.
88. Vidal O., Robert M.C., Boué F., (1998), "Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of silica gel, a nucleation inhibitor", *J. Cryst. Growth*, 192, 271-281.
89. Wilson W., (2003), "Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth – A practical approach", *J. Structural Biology*, 142, 56-65.
90. Wutrich K., (2000), "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Proteins", *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley & Sons.