



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIOS QUÍMICO-BIOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES DE LOS
PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN TOMANDO COMO MODELOS
LOS CARBONATOS EN SERES VIVOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LEGORRETA FLORES ANGÉLICA NOEMI

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABEL MORENO CÁRCAMO

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA

FACULTAD DE MEDICINA, INMEGEN

DR. LAURO BUCIO GALINDO

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIOS QUÍMICO-BIOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES DE LOS
PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN TOMANDO COMO MODELOS
LOS CARBONATOS EN SERES VIVOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LEGORRETA FLORES ANGÉLICA NOEMI

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABEL MORENO CÁRCAMO

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA

FACULTAD DE MEDICINA, INMEGEN

DR. LAURO BUCIO GALINDO

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE, 2017

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/628/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

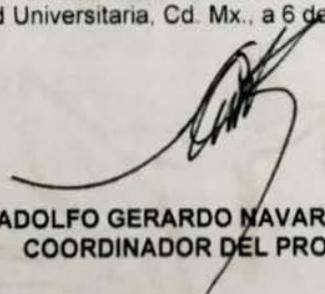
Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de agosto de 2017** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno(a) **LEGORRETA FLORES ANGÉLICA NOEMI** con número de cuenta **306094545** con la tesis titulada "**Estudios químico-biológicos y estructurales de los procesos de biomineralización tomando como modelos los carbonatos en seres vivos**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ABEL MORENO CÁRCAMO**:

Presidente: DR. HORACIO REYES VIVAS
Vocal: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Secretario: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA
Suplente: DR. LAURO BUCIO GALINDO
Suplente: DRA. MAYRA CUELLAR CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 6 de octubre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MJFM/ASR/ipp

iv

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por la estupenda educación y formación que recibí durante estos dos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca que me fue otorgada: CVU: 545536.

Al programa DGAPA PAPIIT No. IG200218 por el financiamiento de apoyo para la realización de este proyecto.

Debo agradecer de especial manera al Dr. Abel Moreno Cárcamo por permitirme realizar este trabajo, por compartir su conocimiento, por su paciencia, y su asesoría en la realización de esta tesis.

A mi comité tutor, Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda y Dr. Lauro Bucio Galindo, por toda la retroalimentación y ayuda que me otorgaron en la realización de este trabajo.

ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
CAC	Carbonato de calcio amorfo
CTLD	Dominio Tipo Lectina Tipo C
DCA	Dromaiocalcina
DHB	Dihidroxibenzoico.
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
ITO	Óxido de indio y estaño
MSA	Alineamiento de secuencias múltiple
OC	Ovocleidina
OCX	Ovocalixina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
RCA	Rheacalcina
SCA	Struthiocalcina
SA	Ácido Sinaapínico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tiempo de vuelo

ÍNDICE

Agradecimientos	v
Acrónimos.....	vi
Índice.....	vii
Lista de figuras	x
Lista de cuadros.....	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 BIOMINERALIZACIÓN.....	1
1.2 BIOMINERALIZACIÓN DEL CaCO₃	2
1.3 BIOMINERALIZACIÓN DEL CASCARÓN DE HUEVO	3
1.4 BIOGÉNESIS DEL CASCARÓN DE HUEVO.....	4
1.5 ETAPAS DE LA FORMACIÓN DEL CASCARÓN.....	5
1.6 MATRIZ ORGÁNICA.....	7
1.7 PROTEÍNAS DE LA MATRIZ ORGÁNICA.....	8
1.8 PROTEÍNAS CON UN DOMINIO TIPO LECTINA TIPO C.....	9
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis	11
2.1 OBJETIVOS.....	11
2.2 HIPÓTESIS	12
Capítulo 3. Antecedentes	13
Capítulo 4. Metodología	14

4.1 MODELOS DE ESTUDIO.....	14
4.1.1 CASCARÓN DE <i>Dromaius novaehollandiae</i>	14
4.1.2 CASCARÓN DE <i>Crocodylus moreletti</i>	15
4.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	16
4.2.1 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DCA-1 Y DCA-2.....	17
4.2.1.1 Purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	17
4.2.1.2 Purificación por cromatografía de fase reversa.....	17
4.2.2 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CCA-1 Y CCA-2.....	18
4.2.2.1 Purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	18
4.2.2.2 Purificación por cromatografía de fase reversa.....	18
4.2.3 GELES DE ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE SDS-PAGE.....	19
4.2.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	20
4.2.5 GELES BIDIMENSIONALES.....	20
4.2.6 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS LC-MS/MS.....	20
4.2.7 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	21
4.3 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA.....	23
4.3.1 ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA.....	23
4.3.2 CRECIMIENTO DE CRISTALES DE CaCO₃ EN PRESENCIA DE PROTEÍNAS.....	24
4.3.3 DIFRACCIÓN DE ELECTRONES.....	25
4.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS.....	26
<u>Capítulo 5. Resultados.....</u>	<u>27</u>
5.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	27
5.1.1 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DCA-1 Y DCA-2.....	27
5.1.2 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CCA-1 Y CCA-2.....	30
5.1.3 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO.....	32
5.1.4 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	33
5.2 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA.....	35
5.2.1 ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA.....	35
5.2.2 CRECIMIENTO DE CRISTALES EN PRESENCIA DE PROTEÍNAS.....	37
5.2.3 DIFRACCIÓN DE ELECTRONES.....	39
5.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS.....	43
5.3.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS LC-MS/MS.....	43
5.3.2 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS MÚLTIPLE.....	43
<u>Capítulo 6. Discusión.....</u>	<u>46</u>

Capítulo 7. Conclusiones	51
Referencias	53
Anexo	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Polimorfos del CaCO_3 .	3
Figura 2. Esquema general del oviducto de aves.	5
Figura 3. Micrografía de corte transversal del cascarón de <i>Gallus gallus</i> .	6
Figura 4. Distribución de proteínas en las diferentes secciones del cascarón.	7
Figura 5. Micrografía de corte transversal del cascarón de <i>Dromaius novaehollandiae</i> .	14
Figura 6. Micrografía de corte transversal del cascarón de <i>Crocodylus moreletti</i> .	15
Figura 7. Sistema para la síntesis de cristales de CaCO_3 .	24
Figura 8. Cromatograma de exclusión molecular.	27
Figura 9. Cromatograma de fase reversa.	28
Figura 10. Espectro de masas de la proteína DCA-1.	29
Figura 11. Espectro de masas de la proteína DCA-2.	29
Figura 12. Cromatograma de Exclusión molecular.	30
Figura 13. Cromatograma de Fase reversa.	30
Figura 14. Espectro de masas de la proteína CCA-1.	31
Figura 15. Espectro de masas de la proteína CCA-2.	31
Figura 16. Geles Bidimensional de las proteínas.	32
Figura 17. Gráficos de Voltamperometría Cíclica.	33
Figura 18. Gráfico de comparación de la respuesta de voltamperometría cíclica.	34
Figura 19. Gráfico de DLS en diferentes concentraciones.	35
Figura 20. Gráfico de DLS en 3 diferentes medios.	36
Figura 21. Micrografías de la cristalización <i>in vitro</i> de CaCO_3 con las proteínas.	38
Figura 22. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 sin proteína.	39
Figura 23. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína DCA-1.	40
Figura 24. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína DCA-2.	40
Figura 25. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína CCA-1.	41

Figura 26. Difracción de electrones en las muestras de CaCO ₃ en presencia de la proteína CCA-2.....	42
Figura 27. Alineamiento de secuencias múltiple de las proteínas.	44
Figura 28. Árbol filogenético Neighbor-joining.....	45
Figura 29. Espectro de XANES de compuestos con diferentes estados de oxidación del Azufre.....	58
Figura 30. Análisis de XANES de S en el cascarón de Hadrosauridae.	59
Figura 31. Análisis de XANES de S en el cascarón de <i>Dromaius novaehollandiae</i>	60
Figura 32. Análisis de XANES de S en el cascarón de <i>Crocodylus moreletti</i>	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Preparación de geles SDS-PAGE al 12%	19
Cuadro 2. Péptidos obtenidos de las proteínas CCA-1 y CCA-2	43
Cuadro 3. Matriz de porcentaje de identidad entre las proteínas homólogas	44
Cuadro 4. Matriz de distancia entre las proteínas homólogas	45
Cuadro 5. Distancias experimentales del Control.	62
Cuadro 6. Distancias experimentales de la proteína DCA-1	62
Cuadro 7. Distancias experimentales de la proteína DCA-2	63
Cuadro 8. Distancias experimentales de la proteína CCA-1.	63
Cuadro 9. Distancias experimentales de la proteína CCA-2	63

RESUMEN

La biomineralización es el proceso mediante el cual los organismos vivos producen minerales sólidos, un modelo para su estudio se encuentra en el cascarón de huevo de aves y reptiles. En este trabajo se presenta el aislamiento, purificación y caracterización de las proteínas DCA-1 y DCA-2 del cascarón de *Dromaius novaehollandiae* y la proteína CCA-1 y CCA-2 del cascarón de *Crocodylus moreletii*, dichas proteínas pertenecen a un familia que presenta un dominio tipo Lectina tipo-C y están implicadas con los procesos de formación y crecimiento de los cristales de CaCO_3 . Las proteínas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y fase reversa, y se analizaron por espectrometría de masas; una vez que se comprobó la pureza se realizaron experimentos que demostraron la interacción proteína- CaCO_3 por medio de voltamperometría cíclica de las cuales las proteínas DCA-2 y CCA-2 presentaron una mayor intensidad. Posteriormente se realizaron experimentos para demostrar la influencia de las proteínas de estudio sobre la morfología de los cristales de CaCO_3 las cuales se observaron por Microscopía Electrónica de Barrido, de lo cual se demostró que había un cambio en el hábito en relación a la concentración de las proteínas, así mismo las muestras se analizaron por difracción de electrones para determinar el polimorfismo en el cual se encontraba el CaCO_3 , de lo cual se obtuvo para la DCA-1 el polimorfo calcita, para la DCA-2 no fue concluyente entre calcita y vaterita y para las proteínas CCA-1 y CCA-2 fue aragonito. Finalmente se realizó un alineamiento de secuencias múltiple con las proteínas homólogas de otras especies.

ABSTRACT

Biom mineralization is the process by which organisms form solid minerals; a model for their study is found in the egg shell of birds and reptiles. This work is focused on the study of intramineral proteins through the isolation, purification and characterization of the DCA-1 and DCA-2 proteins present in the *Dromaius novaehollandiae* eggshell and the CCA-1 and CCA-2 proteins present in the *Crocodylus moreletii* eggshell. These proteins belong to a family that has a C-type Lectin-like domain and are involved with the formation and growth processes of CaCO_3 crystals. Proteins were purified by molecular exclusion and reverse phase chromatography, and analyzed by mass spectrometry. Once the purity was verified, experiments were performed demonstrating the protein- CaCO_3 interaction by through cyclic voltammetry of which the DCA-2 and CCA-2 proteins presented a higher intensity. Subsequently experiments were performed to demonstrate the influence of the study proteins on the morphology of CaCO_3 crystals which were observed by SEM, which showed that there was a change in the habit in relation to the concentration of the proteins, as well. The samples were analyzed by electron diffraction to determine the polymorphism in which the CaCO_3 was found, for which the DCA-1 was obtained the polymorph calcite, for DCA-2 it was not conclusive between calcite and vaterite and for the CCA-1 and CCA-2 proteins were aragonite. Finally, multiple sequence alignment was performed with homologous proteins from other species.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIOMINERALIZACIÓN

La biomineralización es el proceso mediante el cual los seres vivos producen materiales sólidos, frecuentemente controlados por macromoléculas biológicas, los cuales están típicamente conformados por cristales inorgánicos y moléculas orgánicas, conocidos como biominerales [1,2]. Los procesos de biomineralización se dividen fundamentalmente en dos grupos con base en su grado de control biológico:

- Biomineralización “inducida biológicamente”, en la cual los minerales inorgánicos son depositados por la precipitación adventicia que se produce como resultado de interacciones entre la actividad biológica y el medio ambiente circundante. El sistema biológico tiene poco control sobre el tipo y hábito de los minerales depositados, aunque los procesos metabólicos empleados por el organismo establecen condiciones químicas que favorecen su formación de forma indirecta [3,4]. Debido a que los biominerales producidos por este mecanismo se depositan adventiciosamente, una consecuencia de esto es que el tamaño, la forma, la estructura, la composición y la organización son a menudo mal definidos y heterogéneos[5].
- Biomineralización “mediada por matriz orgánica”, es un proceso altamente regulado, en el cual el organismo construye un marco estructural orgánico compuesto por macromoléculas biológicas (proteínas, polisacáridos y lípidos principalmente) sobre la

cual se da la formación y el crecimiento de la fase mineral. El tipo de mineral, la orientación de los ejes cristalográficos, el crecimiento, la morfología y la ubicación final del mineral ésta controlada por el organismo. Aunque el grado de control varía según las especies, casi todos los procesos de mineralización ocurren en un ambiente aislado [4,6].

Los biominerales producidos por esta vía se distinguen por propiedades químicas cristalinas específicas y reproducibles, tamaños de partícula uniformes, estructuras y composiciones bien definidas, altos niveles de organización espacial, etc. Los resultados pueden ser notablemente complejos, con estructuras con una función biológica específica.[3,5]

Debido a que los procesos de biomineralización son tan variados como los organismos, los mecanismos antes mencionados describen las estrategias básicas de mineralización.

1.2 BIOMINERALIZACIÓN DEL CaCO_3

La biomineralización es muy común en la naturaleza y se reconocen más de 60 biominerales diferentes. El carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los compuestos inorgánicos más abundante dentro de los biominerales, en términos de las cantidades producidas y de su amplia distribución entre muchos taxones [3,7], debido a que es un elemento clave de estructuras esenciales para diversas funciones biológicas tales como son fuerza mecánica, soporte estructural, protección de tejidos blandos, protección contra depredadores, apoyo esquelético, y lo podemos encontrar en conchas de moluscos, exoesqueletos de crustáceos, cascarón de huevo, etc.[6,8].

El CaCO_3 existe en seis formas polimórficas denominadas calcita, aragonita vaterita, carbonato de calcio hexahidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), carbonato de calcio monohidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y carbonato de calcio amorfo (CAC). La calcita es el polimorfo de CaCO_3 más abundante y termodinámicamente más estable en condiciones ambientales, seguida por la aragonita la cual es más estable en ambientes de alta presión, son comunes en muestras biológicas y geológicas. La vaterita es metaestable con respecto a la calcita y aragonita o se estabiliza por adsorción de agua en sus superficies[5,9,10]. En la figura 1 se muestran los 3 polimorfos más comunes del CaCO_3 .

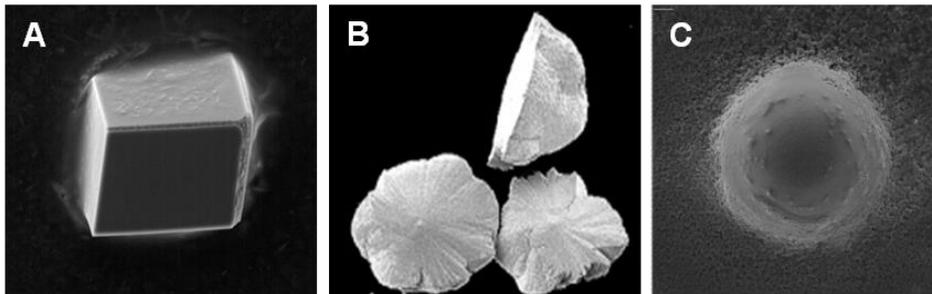


Figura 1 Polimorfos del CaCO_3 . A) Calcita, B) Vaterita y C) Aragonita.

1.3 BIOMINERALIZACIÓN DEL CASCARÓN DE HUEVO

El cascarón de huevo de las aves es un compartimiento microambiental que permite múltiples propósitos, principalmente protección física al embrión y contra la invasión de microorganismos, amortigua las fluctuaciones de temperatura, regula el intercambio de gases, iones y agua, y proporcionan una fuente de calcio para el esqueleto embrionario. El cascarón de huevo de las aves está compuesto de 95 % de CaCO_3 en forma de calcita y aproximadamente 5 % de una matriz orgánica [11,12].

El proceso de formación del huevo está bien caracterizado en *Gallus gallus*, cada huevo es individualmente segregado y ovopositado a intervalos de aproximadamente 24 horas. Este patrón es diferente en la mayoría de los reptiles, donde múltiples huevos son formados y adquieren su cascarón en un solo compartimiento del oviducto, seguida de la expulsión simultánea de todo el embargue. Por otro lado, en cocodrilos, como los pájaros, la formación de los huevos ocurren en diferentes segmentos del oviducto; sin embargo, el embargue se pone todo al mismo tiempo.[13]

1.4 BIOGÉNESIS DEL CASCARÓN DE HUEVO

Después de la ovulación la yema/óvulo viaja a través del oviducto (figura 2), un órgano tubular donde se secretan componentes específicos para la formación del huevo; está organizado en cinco regiones especializadas: *a) el infundíbulo*, que recibe el óvulo y es donde se deposita la membrana vitelina, *b) el magnum* que secreta albúmina [12], *c) el istmo* que secreta los precursores de las membranas del cascarón, proceso que ocurre en aproximadamente 1 hora donde se forma una malla de fibras organizadas en lámina interior y exterior, morfológicamente distintas que encierran la albúmina. Las fibras de la membrana se componen de aproximadamente 10% de colágeno (tipos I, V y X) y 70 a 75% de otras proteínas y glicoproteínas. La membrana interna permanece no calcificada, mientras que las fibras de la membrana externa se han mineralizado en sitios discretos y se incorporan a la base del cascarón de huevo, *d) el istmo rojo* o glándula tubular, donde se da la formación de la matriz orgánica cuando los componentes orgánicos se deposita sobre la membrana de la cáscara externa [13–15],y finalmente *e) el útero* que añade calcio al cascarón, forma la cutícula y aumenta el peso del cascarón [12,13,16].

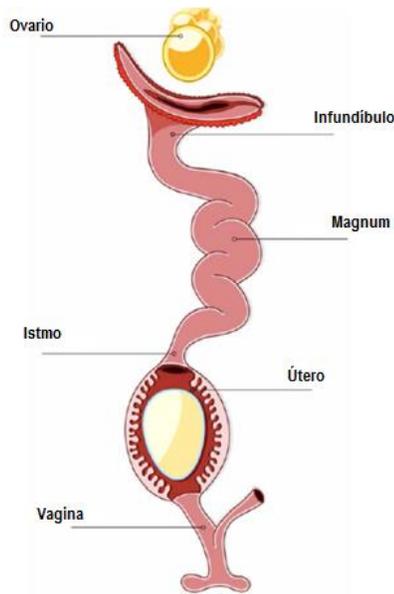


Figura 2. Esquema general del oviducto de aves

1.5 ETAPAS DE LA FORMACIÓN DEL CASCARÓN

Se pueden diferenciar tres etapas durante la formación del cascarón de huevo: a) inicial, b) crecimiento lineal y c) terminación. En la etapa inicial se realiza la deposición de agregados orgánicos sobre la membrana exterior, denominados núcleos, sobre los cuales ocurrirá la precipitación de CaCO_3 . La distribución de estos sitios de nucleación está bajo control genético y es regulado por la participación de macromoléculas biológicas; dichos sitios de nucleación se convierten en el origen de los conos mamilares. Durante esta etapa el crecimiento de los cristales es radial a medida que crecen se unen para formar las bases de la palizada mineral [13,17].

La segunda etapa es el crecimiento lineal de los cristales para formar la capa de la palizada mineral; en la cual hay una deposición de 0.33g por hora de CaCO_3 durante aproximadamente 10 h. El crecimiento de esta capa se da en forma perpendicular a la

superficie, lo cual se asume es resultado de una inhibición del crecimiento en las caras paralelas al eje “c” por medio de componentes orgánicos presentes en el fluido resultando en un alargamiento del cristal de calcita [13,14,18].

La última etapa es la terminación y dura aproximadamente 1.5 horas, una vez que el crecimiento cristalino columnar avanza hasta la calcificación del cascarón y culmina con la deposición de la cutícula, se inhibe la precipitación de CaCO_3 , la cual se cree ocurre en presencia de fosfato. El mecanismo de inhibición no se ha esclarecido, pero este planteamiento es apoyado por la presencia de fósforo en las capas superficiales del cascarón y de una fosfoproteína llamada Ovocalyxina-32 la cual se ha encontrado en la cutícula y se propone como un inhibidor potencial [14,17].

Cuando se ha completado la formación del cascarón de huevo presenta una estructura bien definida como se muestra en la figura 3, la cual se compone por una membrana fibrilar, la zona mamilar, la palizada mineral y finalmente la cutícula [19].

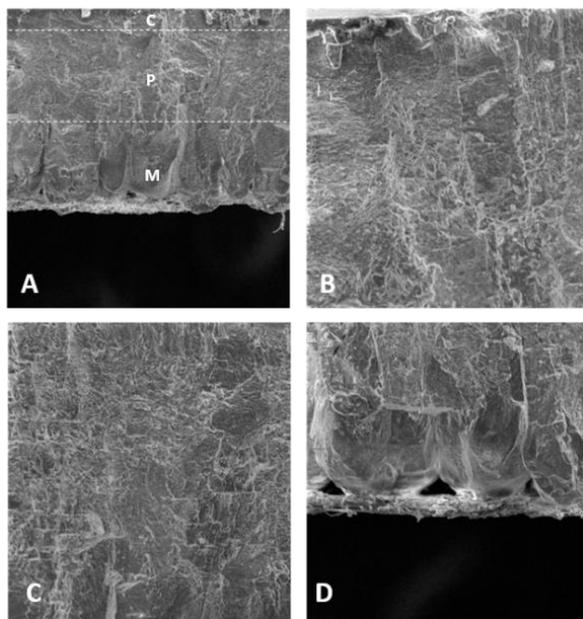


Figura 3 . Micrografía de corte transversal del cascarón de *Gallus gallus*. A) Imagen general de la estructura del cascarón B) Cutícula, C) Palizada mamilar y D) Botones mamilares

1.6 MATRIZ ORGÁNICA

Convencionalmente, la matriz orgánica es un biopolímero que consiste en un conjunto complejo de macromoléculas, tales como proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos etc.

Los constituyentes proteicos se incorporaron progresivamente del fluido uterino, durante el proceso de biomineralización por lo que se observa una distribución diferencial a lo largo de todas las regiones del cascarón como se muestra en la figura 4. Se cree que su función influye en la regulación de los procesos de biomineralización y defensa microbiana; estos constituyentes no minerales representan aproximadamente el 2% del peso del cascarón [5,14].

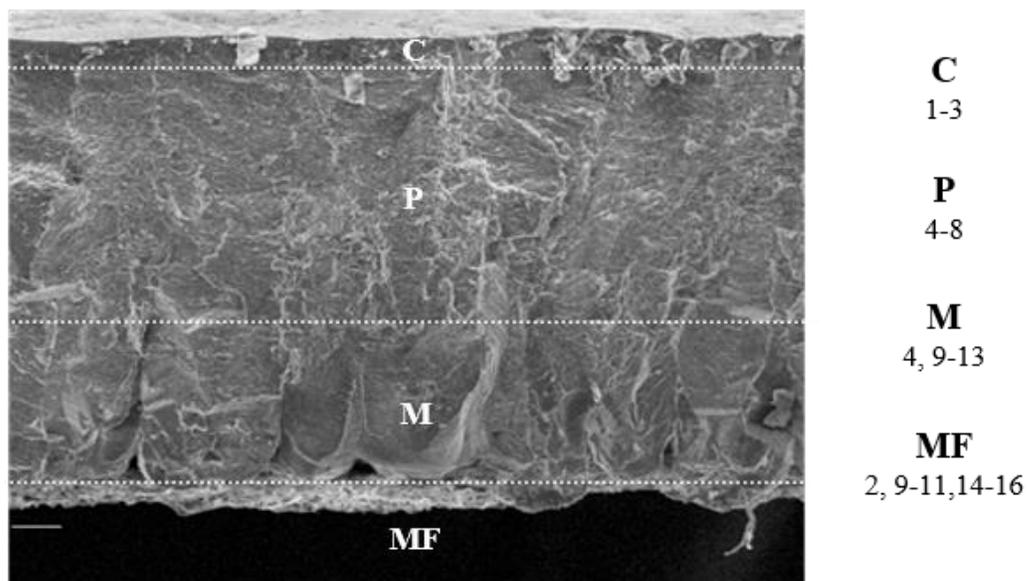


Figura 4. Distribución de proteínas en las diferentes secciones del cascarón. Cutícula: 1, OCX-32, 2,OCX-36 y 3, glicoproteínas, fosfoproteínas y pigmentos. Palizada: 4, proteínas con CTLD 5, ácido hialurónico; 6, ovoglicano y OC-116; OCX-25 y 8 OCX-36. Mamilar: 9, ovoalbúmina; 10, ovotransferrina; 11, lisozima 12, sulfato de condrotin 4, 13, clusterina. Membranas fibrilares: 14, colágeno tipo X 9, 10, 11 15, osteopontina; 16, lisil oxidasa.

En general, la matriz orgánica contiene una fracción “soluble” y una “insoluble” basadas en la solubilidad de los componentes macromoleculares en soluciones acuosas. La fracción “insoluble” se caracteriza por la presencia de componentes altamente hidrófobos y por un alto contenido en residuos de glicina y alanina; las cuales representan un componente estructural que proporciona un marco donde se lleva a cabo la mineralización, tal es el caso de colágenas y quitina. La fracción “soluble” se caracteriza por el predominio de glicoproteínas ácidas, y se considera que participan en la inducción de la nucleación y el crecimiento cristalino así como el control del polimorfo [6,20].

1.7 PROTEÍNAS DE LA MATRIZ ORGÁNICA

La composición de proteínas en la matriz orgánica se puede dividir en tres grupos:

- 1) Proteínas ubicuas: componentes que se encuentran en diversos tejidos tales como colágeno tipo X, osteopontina, clusterina y albúmina sérica.
- 2) Proteínas de la clara de huevo, se encuentran en la clara y en el cascarón, tales como albúmina, ovotransferrina y lisozima.
- 3) Proteínas específicas del cascarón: se compone de proteínas implicados en la mineralización [13,21]

Las proteínas específicas del cascarón, son los componentes más abundantes en relación a su secreción y al contenido en el cascarón. La secreción de este grupo de proteínas se da en un segmento limitado del oviducto (istmo rojo) durante la calcificación del cascarón.

Este grupo se encuentra conformado por las ovocleidinas (OC-17, OC-116), ovocalixinas (OCX-21, OCX-25, OCX-32 y OCX-36) y proteínas con un dominio tipo lectina tipo C (CTLD, por sus siglas en inglés) [6,13,22].

1.8 PROTEÍNAS CON UN DOMINIO TIPO LECTINA TIPO C

Las proteínas con un CTLD son una superfamilia de proteínas que presentan dominios homólogos a las Lectinas tipo-C pero no necesariamente poseen la capacidad de unión a carbohidratos, ni a sitios de unión a Ca^{2+} . Los miembros de esta superfamilia comparten un número de aminoácidos consistente en aproximadamente 110 a 140 residuos altamente conservados. Drickamer subclasificó a esta superfamilia en VII grupos basadas en la estructura de su dominio. Dentro del grupo VII se encuentran proteínas que son un componente principal de la matriz del cascarón de huevo [21,23,24], que se cree participan en el control del crecimiento y agregación de cristales de CaCO_3 durante la mineralización del cascarón [289].

Miembros de este grupo de proteínas se encuentran en cascarones de huevo de distintas aves; en el caso del Superorden Galloanserae se ha encontrado que poseen una proteína con un CTLD, tal es el caso de la Ovocleidina-17 (OC-17) [25,26] en el cascarón de *Gallus gallus* y la Ansocalcina (ANCA) [27,28] en el cascarón de *Anser anser*.

Por otro lado dentro del Superorden Palaeognathae, se ha encontrado que miembros de este grupo poseen dos proteínas con un CTLD, dentro de las que se encuentran la Struthiocalcina-1 y la Struthiocalcina-2 (SCA-1 y SCA-1 respectivamente) en el cascarón de *Struthio Camelus* [22,29,30], así mismo se encuentran la Rheacalcina-1 y la

Rheacalcina-2 (RCA-1 y RCA-2, respectivamente) en el cascarón de *Rhea americana* (RCA-1, RCA-2) y finalmente las proteínas Dromaiocalcina-1 y Dromaiocalcina-2 (DCA-1 y DCA-2 respectivamente) en el cascarón de *Dromaius novaehollandiae* [31,32].

En este trabajo se pretende aislar y caracterizar las proteínas DCA-1 y DCA-2 del cascarón de *Dromaius novaehollandiae* y las proteínas homólogas encontradas en el cascarón de *Crocodylus moreletii*, un grupo externo a las aves que poseen cascarones de huevo morfológicamente distintos.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVOS

General

Realizar un estudio químico-estructural de las proteínas DCA-1 y DCA-2 presentes en el cascarón de *Dromaius novaehollandiae* y de las proteínas homólogas encontradas en el cascarón de *Crocodylus moreletti*.

Particulares

- Aislar y purificar las proteínas DCA-1 y DCA-2 del cascarón de huevo de *Dromaius novaehollandiae*.
- Aislar y purificar las proteínas homólogas del cascarón de huevo de *Crocodylus moreletti*.
- Caracterizar bioquímicamente las proteínas DCA-1, DCA-2 y las homólogas de *Crocodylus moreletti*.
- Realizar estudios de interacción proteína-CaCO₃ por medio de Voltamperometría cíclica.
- Realizar estudios de DLS para evaluar los estados de agregación de las proteínas en diferentes soluciones con un gradiente de temperatura.
- Estudiar la influencia de las proteínas sobre la cristalización *in vitro* de cristales de CaCO₃.

- Determinar el polimorfo de los cristales de CaCO_3 por medio de difracción de electrones.
- Realizar una identificación de las proteínas presentes en el cascarón de *Crocodylus moreletti*.
- Analizar las secuencias de proteínas presentes en otros cascarones homólogos a las DCA-1, DCA-2, y las identificadas en el cascarón de *Crocodylus moreletti*.

2.2 HIPÓTESIS

El cascarón de huevo de *Crocodylus moreletti* presentará proteínas con un CTLD homólogos a las proteínas presentes en el cascarón de *Dromaius novaehollandiae* que deberán estar relacionadas con los procesos de biomineralización en la interacción con CaCO_3 para la formación de cristales y el control estructural de la fase mineral.

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

La calcificación del cascarón de huevo representa un modelo único para el estudio de la biomineralización debido a su rápida formación (17-22 h) [33]. Numerosas proteínas han sido identificadas en la matriz orgánica de cascarones y los estudios realizados sugieren su participación durante el proceso de biomineralización, sin embargo no es concluyente que su función sea directamente asociada con una participación en la calcificación del cascarón, tal es el caso de OC-116 [34,35], OCX-32 [36,37], OCX-36 [38,39] osteopontina [40,41], y lisozima [42–44].

Por otro lado, se han realizado estudios en *Gallus gallus* para determinar la participación de las proteínas durante la biomineralización, donde se encontró que durante la formación de agregados cristalinos en forma de calcita la proteína que se encuentra mayoritariamente es la OC-17 [45,46] la cual fue la primera proteína intramineral específica del cascarón de *Gallus gallus* con un CTLD que se aisló, caracterizó y determinó su estructura tridimensional [26,47].

En el cascarón de huevo de otras especies se encuentran proteínas homólogas, en el caso de *Struthio Camelus* presenta como componentes mayoritarios a dos proteínas con un CTLD (SCA- 1, SCA-2) las cuales han sido caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente [22,29,30]. En el caso de la *Rhea americana* se han identificado la Rheacalcina-1 (RCA-1) y la Rheacalcina-2 (RCA-2) [31,32]. Así mismo se demostró por comparación de secuencias que el cascarón de *Dromaius novaehollandiae* también contienen dos proteínas homólogas, DCA-1 y DCA-2. [31]

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1 MODELOS DE ESTUDIO

4.1.1 Cascarón de *Dromaius novaehollandiae*

Dromaius novaehollandiae es un ave perteneciente al orden Casuariiformes; sus huevos miden aproximadamente 130 mm de longitud, pesan alrededor de 450g, son de color verde oscuro y se ovopositan en una hondonada en la tierra árida en la sabana. En la matriz orgánica del cascarón se encuentran dos proteínas como componentes mayoritarios denominadas DCA-1 y DCA-2 que presentan un porcentaje de identidad alrededor del 70% con las proteínas homólogas reportadas en otros cascarones [14,30–32,48]. En la figura 5 se muestra un corte transversal del cascarón.

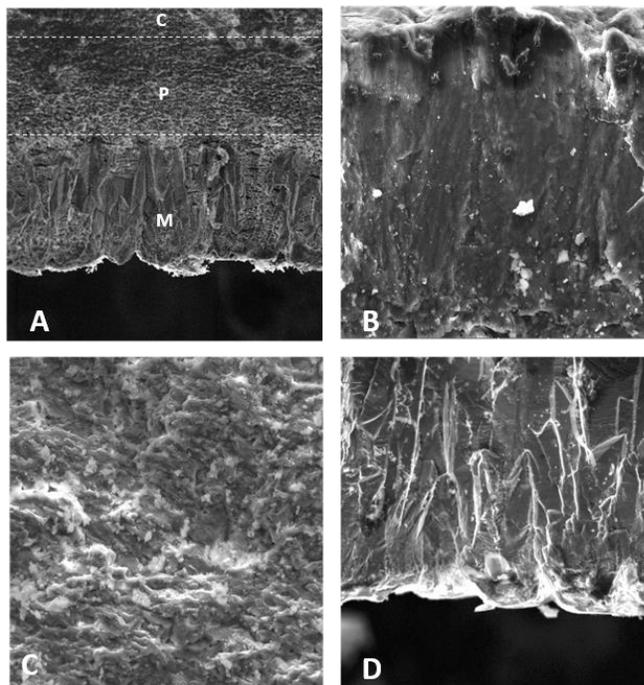


Figura 5. Micrografía de corte transversal del cascarón de *Dromaius novaehollandiae*. A) Imagen general de la estructura del cascarón B) Cutícula, C) Palizada mamilar y D) Botones mamilares.

4.1.2 Cascarón de *Crocodylus moreletti*

Crocodylus moreletti es un cocodrilo perteneciente al orden Crocodylia; sus huevos miden aproximadamente 40 mm de longitud, pesan alrededor de 50g y se ovopositan cerca del agua o en la vegetación flotante en pantanos, estanques o humedales. Presentan un cascarón flexible por lo que es relevante conocer las proteínas homólogas a las presentes en cascarones de aves (DCA-1, DCA-2) que participan en el proceso de biomineralización [49,50]. En la figura 6 se muestra un corte transversal del cascarón.

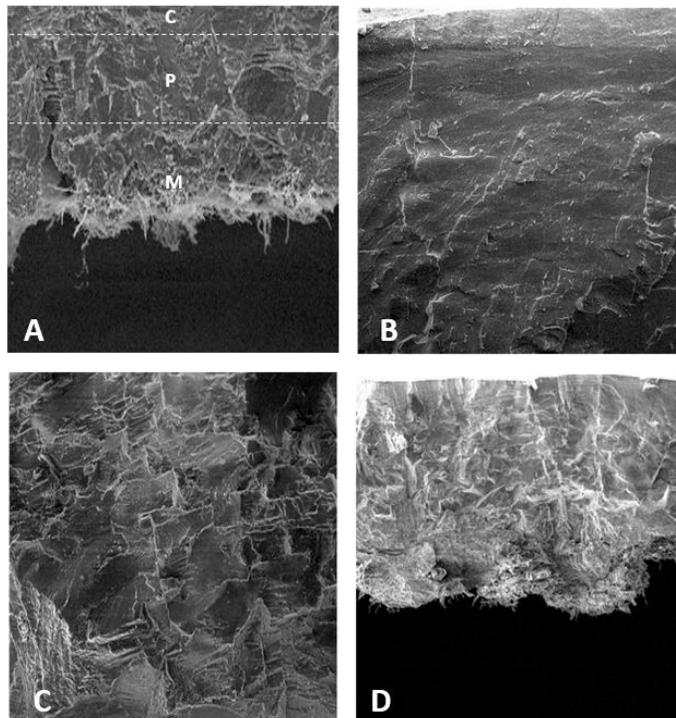


Figura 6. Micrografía de corte transversal del cascarón de *Crocodylus moreletti*. A) Imagen general de la estructura del cascarón B) Cutícula, C) Palizada mamilar y D) Botones mamilares.

4.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Para el aislamiento de las proteínas intraminerales los cascarones de huevo se lavaron con agua y una disolución de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés) al 5% durante 45 min a 4°C, posteriormente se secaron a temperatura ambiente. Los cascarones limpios se trituraron en un mortero de porcelana hasta que las partículas fueran de menor tamaño posible.

La extracción se inició con 100g de cascarón en polvo que se disolvieron en una solución de ácido acético al 10% en una relación de 20mL de ácido acético por un 1g de cascarón de huevo, durante 72horas a 4°C en agitación constante [22]. El extracto obtenido se filtró en un sistema de tipo embudo Büchner, con una membrana de 0.45µm (Millipore, MA, USA). El extracto se concentró mediante la técnica de crioconcentración [51], y la muestra obtenida se dializó con una membrana de un corte de 3kDa en una solución de ácido acético al 5% durante 24 horas en agitación constante a 4°C.

Posteriormente las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 70% y se resuspendieron en ácido acético al 5%.

4.2.1 Purificación de las proteínas DCA-1 y DCA-2

4.2.1.1 Purificación por cromatografía de exclusión molecular

La purificación de las proteínas DCA-1 y DCA-2 se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) de exclusión molecular, se utilizó una columna Shodex, en un equipo SHIMADAZU (Kyoto, Japón).

Se empleó como fase móvil un buffer de 0.1M acetato de amonio a pH 5 con 50mM de NaCl, a un flujo de 1ml/min, el volumen de inyección fue de 500µL. La muestra se midió a una absorbancia de 220 y 280nm.

4.2.1.2 Purificación por cromatografía de fase reversa

Como siguiente paso de purificación se realizó HPLC fase reversa con una columna C-18; el volumen de inyección fue de 500µl. El disolvente A consistió en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) y el disolvente B en acetonitrilo (ACN) con 0.1% de TFA. Se realizó un gradiente de concentración lineal de 0-100% en 60 minutos. La muestra se midió a una absorbancia de 220 y 280nm.

Como paso final de purificación se realizó un gradiente de concentración escalonado correspondiente a 0-40%, 40%-55% y 55%-100%.

4.2.2 Purificación de las proteínas CCA-1 y CCA-2

4.2.2.1 Purificación por cromatografía de exclusión molecular

La purificación de las proteínas CCA-1 y CCA-2 se realizó mediante HPLC con una columna de exclusión molecular. Se empleó como fase móvil un buffer de 0.1M acetato de amonio a pH 5 con 50mM de NaCl, a un flujo de 1ml/min. La columna se equilibró durante 45 min y se inyectó la muestra con un volumen de 500µL. La muestra se midió a una absorbancia de 220 y 280nm.

4.2.2.2 Purificación por cromatografía de fase reversa

Como siguiente paso de purificación se realizó HPLC fase reversa con una columna C-18. El volumen de inyección fue de 500µl. El disolvente A fue agua con 0.1% TFA y el disolvente B fue acetonitrilo con 0.1% de TFA, en gradiente de concentración lineal de 0-100%.

4.2.3 Geles de Electroforesis Desnaturalizante SDS-PAGE

La electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE se utilizó para evaluar el proceso de purificación de las proteínas en función a su peso molecular mediante la determinación de bandas proteicas en geles de poliacrilamida al 12%.

Los geles se realizaron sobre placas de cristal con un tamaño de 0.75mm x 10cm x 7cm, y se prepararon con los reactivos y proporciones que se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Preparación de geles SDS-PAGE al 12%

COMPONENTES	GEL SEPARADOR 12%	GEL CONCENTRADOR
Agua destilada (μL)	2200	1267
1.6M Tris pH 8.8 (μL)	1250	---
0.5M Tris pH 6.8 (μL)	---	1000
10% SDS (μL)	50	40
40% Acrilamida/bis acrilamida (μL)	1500	405
TEMED (μL)	10	6
10% Persulfato de Amonio (μL)	50	40

Una vez que polimerizaron los geles las muestras se incubaron con un buffer de carga 2X durante 10 min a 90°C y se cargaron. La electroforesis se realizó aplicando un potencial eléctrico de 90V durante aproximadamente 100min en un equipo de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 (Biorad). Finalmente, los geles se tiñeron con Azul-Coomassie R-250 a temperatura ambiente durante 5 min, y se destiñeron con agua destilada durante 50 min.

4.2.4 Espectrometría de masas

Los experimentos de espectrometría de masas fueron realizados para la determinación de la masa intacta en un espectrómetro de masas Burkner Esquire, utilizando la técnica MALDI-TOF con una matriz de una mezcla de ácido sinapínico y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB).

4.2.5 Geles Bidimensionales

Para realizar los geles bidimensionales las muestras fueron tratadas con buffer de lisis y se cargaron en tiras de IPG de 7 cm a pH 3-8 (Bio-Rad). El enfoque isoeléctrico se realizó utilizando un Ettan IPGphor (GE Healthcare) bajo las siguientes condiciones, hidratación pasiva durante 16 h sin corriente eléctrica, 500 V durante 1h 30min, 800 V durante 1h, 7000 V durante 2h 30min y 2200 V durante 1h 30min. Posteriormente, las tiras se redujeron (DTT al 2%) y alquilaron (2.5% de yodoacetamida) en buffer de equilibrio (6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, glicerol al 30% y SDS al 2%). Después de la separación por punto isoeléctrico, la tira se equilibró con DTT (10 mg/ml) y las muestras se separaron en la segunda dimensión en un gel de poliacrilamida SDS al 12% usando un Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Finalmente, las muestras se tiñeron con Azul de Coomassie.

4.2.6 Identificación de las Proteínas por Espectrometría de Masas LC-MS/MS

El análisis de cromatografía líquida acoplado a Espectrometría de masas, se realizó en la Unidad de Proteómica en el Institut de recherches cliniques de Montréal, Canadá.

Los puntos de interés para la identificación de las proteínas se escindieron manualmente de los geles bidimensionales 2D y fueron tratadas para su posterior análisis por medio de una

digestión con tripsina. Las muestras se analizaron mediante LC-MS/MS con un automuestreador automático Finnigan MicroAS y un sistema de bomba MS Surveyor acoplado a un LTQ-Orbitrap. La columna utilizada para el análisis fue una columna C-18 de sílice y los buffers consistieron en: Buffer A) ácido fórmico al 2% y B) ácido fórmico al 2% y ACN al 100%. Los péptidos se cargaron en la columna y se eluyeron con un gradiente de 2 pendientes a una velocidad de flujo de 600 nL/min. El disolvente B aumentó primero de 2 a 35% en 18 min y luego de 35 a 80% de B en 7 min

4.2.7 Voltamperometría Cíclica

Las determinaciones electroanalíticas se realizaron mediante la técnica de Voltamperometría Cíclica a una velocidad de barrido de 100mVs^{-1} ; para evaluar las respuestas de las proteínas con los iones se realizó una titulación con adiciones de Na_2CO_3 . Se utilizó un Potenciostato/galvanostato PAR273, con un arreglo convencional de 3 electrodos; como electrodo de referencia se utilizó un calomel saturado (EG&G PAR), $E=0.241\text{ V versus NHE}$, como electrodo auxiliar se empleó un alambre de platino y finalmente el electrodo de trabajo se elaboró utilizando como base una placa de óxido de indio y estaño (ITO) en el que se colocó un anillo tórico (0.3 cm de diámetro interno) el cual se llenó con una mezcla de polvo de grafito (1-2 μm , 99.99% de pureza) y aceite mineral en una relación de 0.8g de grafito con 0.2ml de aceite mineral. Estos electrodos se sonicaron en agua destilada durante 10 min y después se enjuagaron con etanol.

Las proteínas se utilizaron a una concentración de 1mg/ml, se colocaron 5 μL sobre la pasta de carbono y se utilizó después de que el agua se evaporará (aproximadamente 30 minutos).

El potencial electroquímico se hizo circular entre -1,5 a +0,3V en todos los casos. Este rango de voltaje nos permitió evitar la electrolisis del agua.

Como electrolito de soporte se utilizó 0.01 M Perclorato de Litio (LiClO_4) 5 ml, el cual fue desoxigenado por burbujeo de N_2 (g) (INFRA, 99.9%) durante 15 min. Las adiciones estándar de iones carbonato se hicieron con una micropipeta que se tomaron de un stock de 100mM Na_2CO_3 .

4.3 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA

4.3.1 Estudios de Dispersión de Luz Dinámica

La técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) permite determinar: el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico y el peso molecular. El desplazamiento de las moléculas en solución está dado por movimientos brownianos, esta movilidad está relacionada con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la partícula; ya que la molécula se encuentra en movimiento la señal medida presentará fluctuaciones, midiendo dichas fluctuaciones en la intensidad de dispersión con respecto al tiempo y mediante la ecuación de Stokes-Einstein es posible conocer la medida del radio hidrodinámico.

La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la masa molecular y concentración por lo que es posible conocer el peso molecular de la proteína. Debido a la sensibilidad a pequeñas cantidades de agregados es posible identificar el índice de polidispersidad de las moléculas.

Los experimentos se realizaron en un equipo DLS (Non Invasive Back Scattering) que cuenta con un diodo laser de una longitud de onda de 633nm y un controlador de temperatura, en un modelo Malvern

Las proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 se utilizaron a una concentración de 1mg/mL y se filtraron por una malla de 0.02 μ m para remover cualquier partícula extraña; las muestras se introdujeron en el equipo de DLS, y se realizó un barrido de temperatura de 4°C a 27°C para cada proteína en diferentes concentraciones de Carbonato de Sodio (Na₂CO₃) correspondientes a 10mM, 70mM y 100mM, y otro experimento se realizó con

diferentes medios correspondientes a Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y Na_2SO_4 a una concentración de 70Mm.

4.3.2 Crecimiento de cristales de CaCO_3 en presencia de Proteínas

Se realizó un experimento para la formación *in vitro* de cristales de CaCO_3 en el cual se hizo reaccionar 0.1M Carbonato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y 0.1M Cloruro de Calcio (CaCl_2), los cuales fueron producidos en un sistema (*mushroom*) por medio de la técnica de difusión en fase vapor, para que la síntesis fuera a una presión homogénea como se muestra en la figura 7.

Para determinar el efecto de las proteínas en la morfología de cristales de CaCO_3 se sintetizaron cristales en presencia de las proteínas a concentraciones crecientes correspondientes a 100 μg , 250 μg y 500 μg , las cuales se mezclaron con CaCl_2 en una relación 1:1, y se colocaron sobre los soportes con un volumen final de 4 μL .

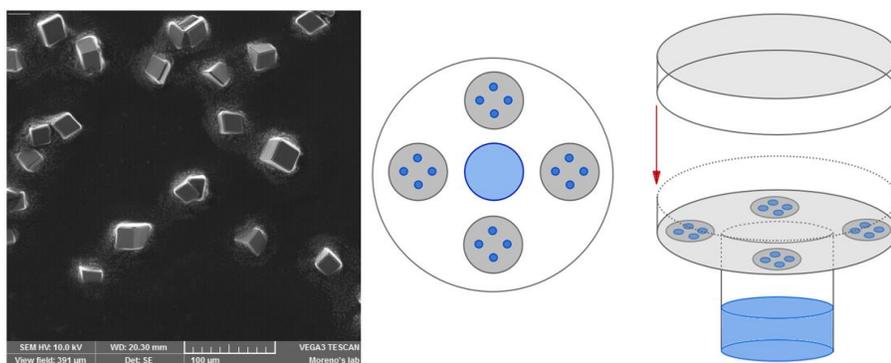
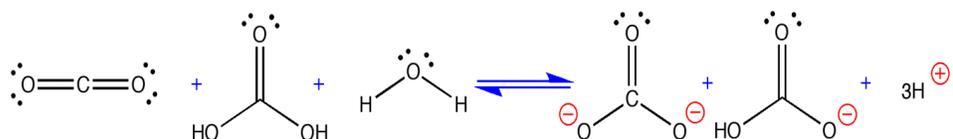
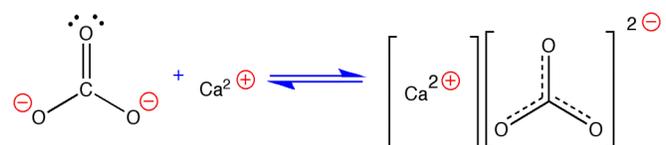


Figura 7. Sistema para la síntesis de cristales de CaCO_3

Al difundirse el amonio se produce un incremento del pH necesario para que se produzca la precipitación de CaCO_3 , según la siguiente reacción.



Posteriormente en presencia de iones calcio en la gota se produce la precipitación de CaCO_3 :



4.3.3 Difracción de electrones

La difracción de electrones se realizó en un microscopio JEOL 2010F operado a 200 kV. Con el fin de preservar los detalles estructurales de las muestras analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), el modo de difracción de electrones tuvo que ser realizado mediante la aplicación de dosis bajas; esto implica usando un haz de iluminación coherente estrecho, que se realizó teniendo la abertura de condensador más pequeña ($20\mu\text{m}$) y una lente de condensador fuertemente excitada (8.06V). Usando esos ajustes la dosis para registrar una imagen debe ser del orden de 200 electrones $\cdot\text{nm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se adquirieron patrones de difracción de electrones con tiempos de exposición de 0.5 y 1s con una lente de cámara de 30 cm. Debido a la sensibilidad de las muestras, sólo los cristales de referencia podían alinearse en un eje de zona apropiado, para

las muestras con las proteínas se ajustó la inclinación para obtener la iluminación simétrica de los puntos difractados. Tras la adquisición de los patrones, debido a la reducción del número de puntos de difracción y a su baja intensidad, se realizó su indización comparándolos con patrones teóricos disponibles utilizando el programa JEMS, después de encontrar una posible coincidencia se compararon con las distancias de los planos de difracción teóricas actuales para encontrar la fase más adecuada CaCO_3 .

4.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS

Se realizó un alineamiento de secuencias múltiple (MAS, por sus siglas en inglés) de las proteínas homologas correspondientes a OC-17, SCA-1, SCA-2, DCA-1, DCA-2, RCA-1 y RCA-2, las cuales fueron obtenidas en la base de datos UniProt en formato FASTA, el alineamiento de secuencias fue realizado por ClustalW. El árbol filogenético de las proteínas intraminerales fue construido en base a la secuencia de aminoácidos y por el algoritmo de Neighbor-joining, en el programa “R” con la librería phangorn.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

5.1.1 Purificación de las proteínas DCA-1 y DCA-2

El aislamiento de las proteínas se realizó con la metodología de Mann y Sielder [22]. La extracción de las proteínas intraminerales generalmente inicia con un proceso de desmineralización, en el trabajo se utilizó ácido acético [22,31] ya que el componente mineral está fuertemente asociado a la matriz orgánica, y posteriormente se obtuvo la fracción soluble en la cual se encuentran las proteínas de interés.

El primer paso en la purificación de las proteínas DCA-1 y DCA-2 se llevó a cabo por cromatografía de exclusión molecular, en el cual se observaron 4 fracciones como se muestra en la figura 8(A), la fracción 4 se colectó ya que en ella se encontraban las proteínas DCA-1 y DCA-2; para confirmar si era la fracción correcta se realizó un gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 12% que se muestra en la figura 8 (B) donde se aprecian 3 bandas, 2 correspondientes a las proteínas DCA-1 y DCA-2.

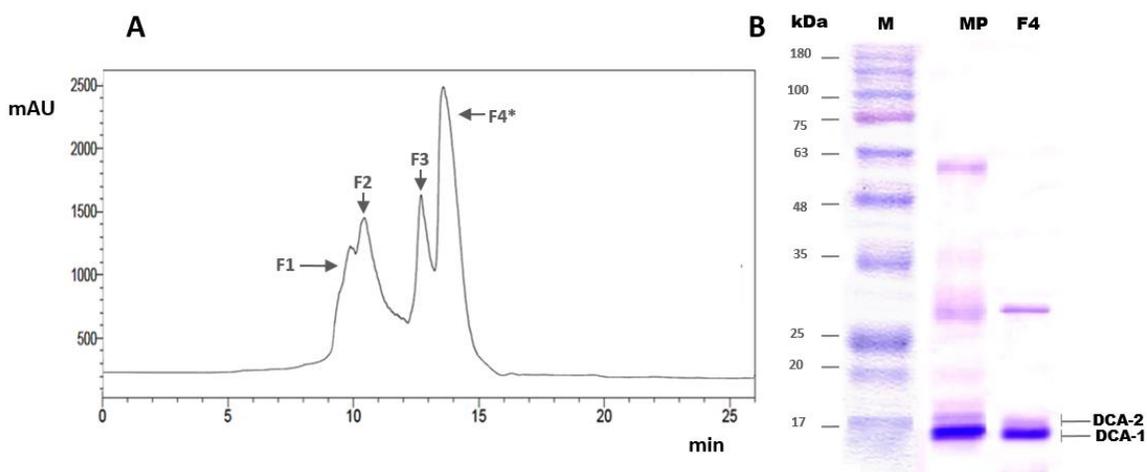


Figura 8. A) Cromatograma de exclusión molecular, B) Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 12%, en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 el extracto total y en el carril 3 las proteínas presentes en la fracción 4.

Posteriormente la fracción 4 se separó por cromatografía de fase reversa, en un gradiente de concentración lineal de 0-100% como se muestra en la figura 9(A), en el cual se detectaron 3 picos. Los picos 2 y 3 se colectaron y se separaron por cromatografía de fase reversa en un gradiente de concentración escalonado en el cual se obtuvo una mejor resolución como se muestra en la figura 9(C). Se realizó un gel de Poliacrilamida al 12% correspondiente a la figura 9 B) en el cual se observa que el pico 2 correspondió a la DCA-1 y el pico 2 a la DCA-2.

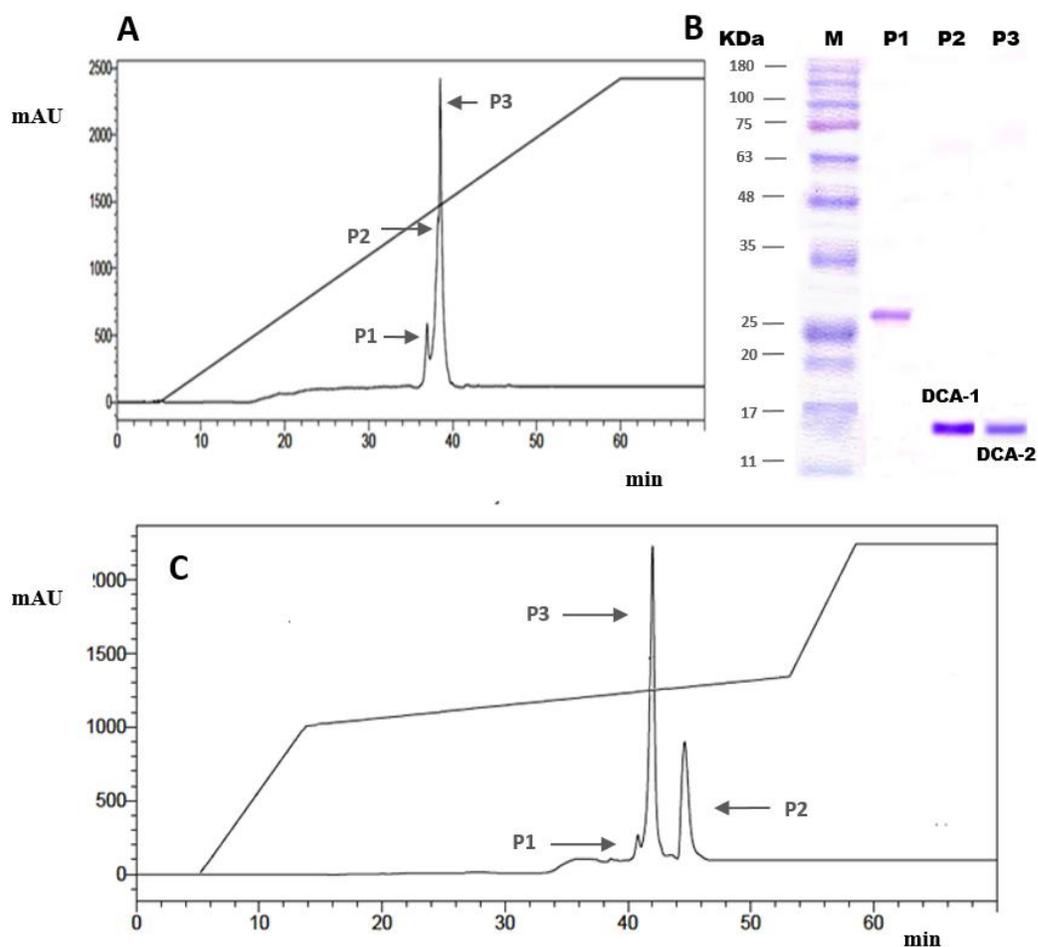


Figura 9. A) Cromatograma de fase reversa en un gradiente lineal, B) Gel de electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE 12%, en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 el pico 1, en el carril 3 el pico 2 y en carril 4 el pico 3 y C) Cromatograma de fase reversa en un gradiente escalonado.

Finalmente para determinar la masa molecular, las proteínas se analizaron por Espectrometría de masas MALDI-TOF con una matriz de una mezcla de SA y 2,5- DHB. Como se muestra en la figura 10 el peso obtenido para la proteína DCA-1 fue de 16.33 kDa. En el caso de la proteína DCA-2 se obtuvo un pico con un peso molecular de 16.66 kDa como se muestra en la figura 11, lo cual coincide con los pesos reportados por Mann and Sielder [32].

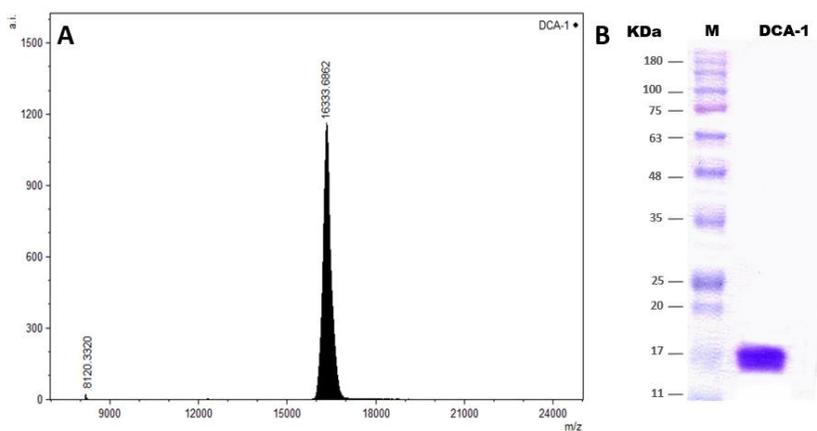


Figura 10. A) Espectro de masas de la proteína DCA-1 y B) Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 12%,.

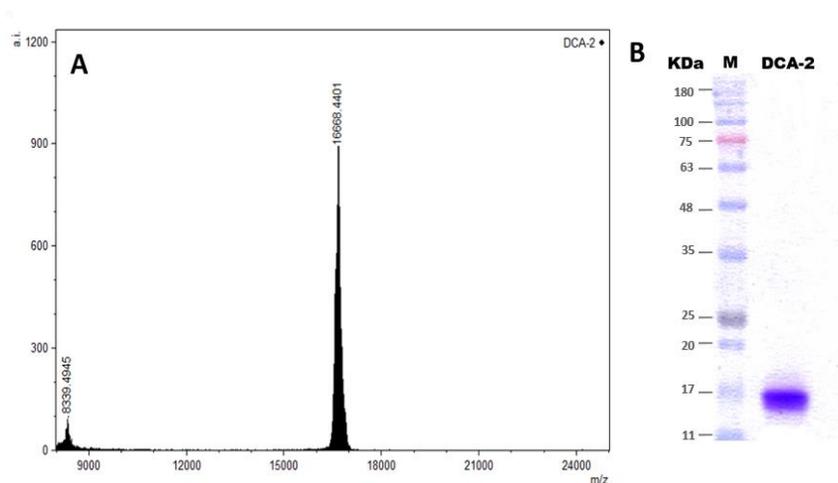


Figura 11. A) Espectro de masas de la proteína DCA-2 y B) Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 12%,.

5.1.2 Purificación de las proteínas CCA-1 y CCA-2

Se realizó cromatografía de exclusión molecular, en la cual se obtuvieron 3 fracciones (figura 12 A); la fracción 3 se colectó y se observó por un gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 12% en la cual se observaron proteínas con un peso alrededor de los 14kDa, como se muestra en la figura 12 (B); debido a que las proteínas presentes en otros cascarones incluyendo a la DCA-1 y DCA-2 homólogas a las que se buscan en este estudio presentan un peso cercano a estas bandas, se infirió que éstas son las proteínas de interés.

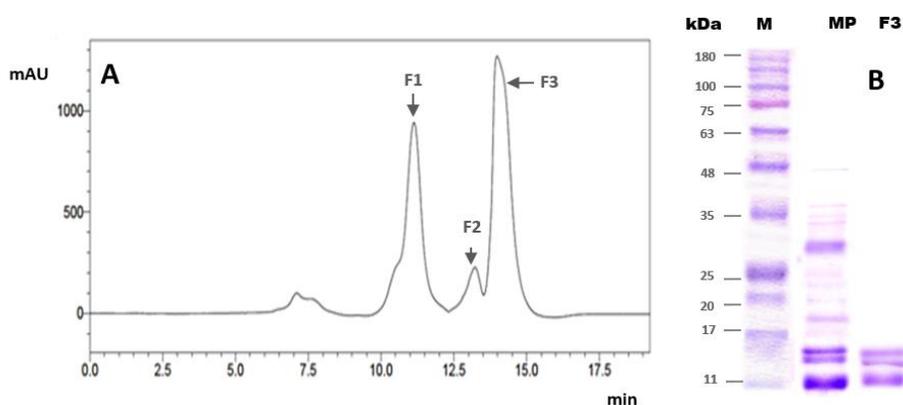


Figura 12. A) Cromatograma de Exclusión molecular y B) Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 12%, en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 el extracto total y en el carril 3 las proteínas presentes en la fracción 3.

Posteriormente, la fracción 3 se separó por cromatografía de fase reversa, en un gradiente de concentración lineal de 0-100% (figura 13), en el cual se observaron 2 picos.

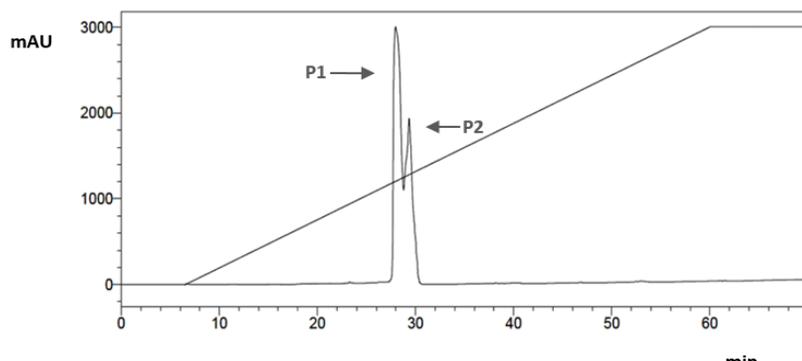


Figura 13. Cromatograma de Fase reversa

Finalmente para determinar la masa molecular, los picos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF con una matriz de una mezcla de SA y 2,5- DHB. El pico 1 presentó un peso molecular de 14.3 kDa a la que nos referiremos como Crococalcina-1 (CCA-1) y el pico 2 de 14.6kDa a la que nos referiremos como Crococalcina-2 (CCA-2) como se muestra en la figura 14 y 15 respectivamente.

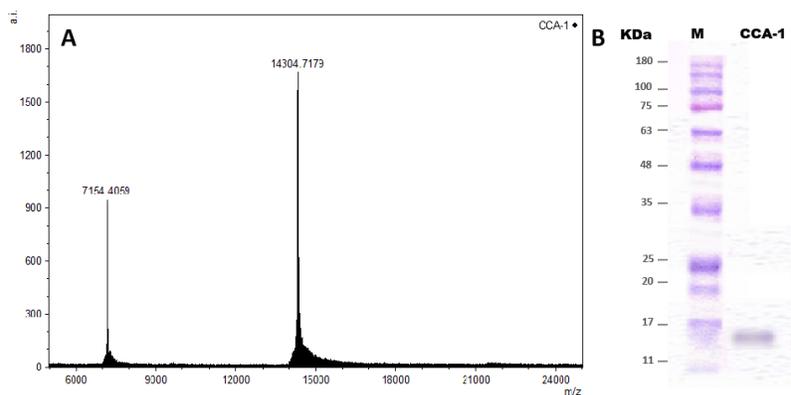


Figura 14. A) Espectro de masas de la proteína CCA-1 y B) Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 12%..

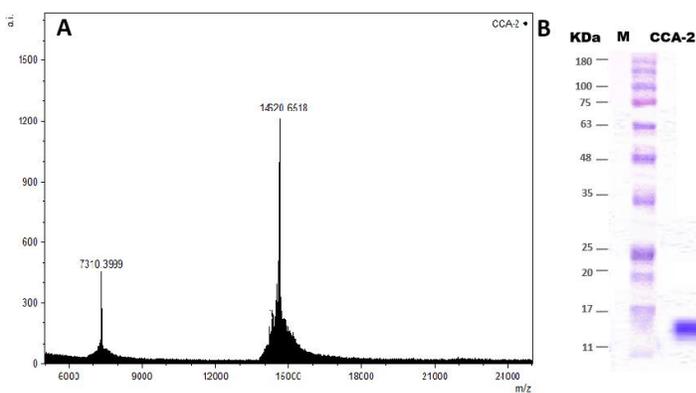


Figura 15. Espectro de masas de la proteína CCA-2 y B) Gel de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE 12%.

5.1.3 Determinación del Punto Isoeléctrico

Para determinar el punto isoeléctrico de las 4 proteínas estudiadas se realizaron geles bidimensionales mostrando los siguientes resultados. En el caso de las proteínas aisladas de *Dromaius novaehollandiae* se obtuvo para la DCA-1 un pI de 6.8 y para la DCA-2 de 5.3 (Figura 16A), lo que es cercano a los pI reportados para la DCA-1 de 6.4 y para la DCA-2 de 4.48 [32]. Para las proteínas obtenidas de *Crocodylus moreletii* se determino para la CCA-1 un pI de 5.2 y para la CCA-2 de 5.9 como se muestra en la figura 16B.

Los resultados obtenidos son acorde a las proteínas reportadas que participan en los procesos de biomineralización [30–33,52–54] debido a que las proteínas ácidas resultan ser determinantes para la interacción con el CaCO_3 .

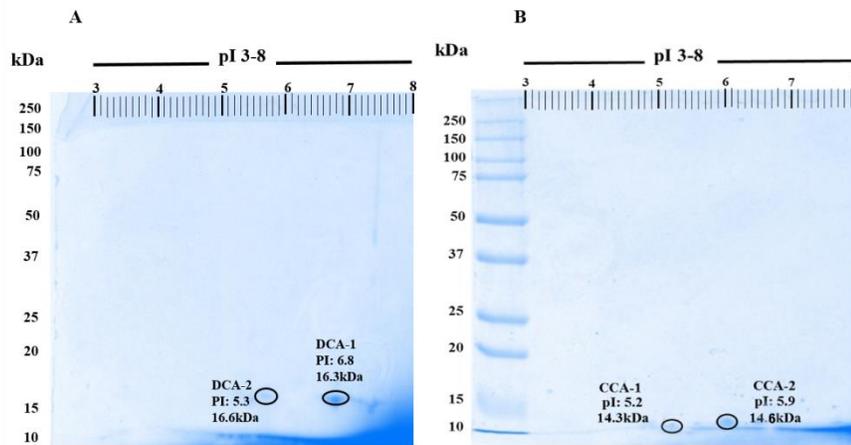


Figura 16. A) Gel Bidimensional de las proteínas DCA-1 y DCA-2 y B) Gel Bidimensional de las proteínas CCA-1 y CCA-2

5.1.4 Voltamperometría cíclica

Se realizaron experimentos electroquímicos para evaluar la interacción de las 4 proteínas de interés con diferentes iones por medio de voltamperometría cíclica, en la cual la variación y aumento de la intensidad de respuesta se puede utilizar como una prueba de interacción.

Se utilizaron iones CO_3^{2-} debido a que es el más abundante en la formación del cascarón y se comparó con iones PO_4^{3-} y SO_4^{2-} .

De los resultados obtenidos se determinó que las 4 proteínas presentaban una mayor intensidad al interactuar con iones CO_3^{2-} como se muestra en la figura 17, dicha interacción fue observada como un incremento de corriente de la barrera anódica, que fue proporcional a la concentración de los iones.

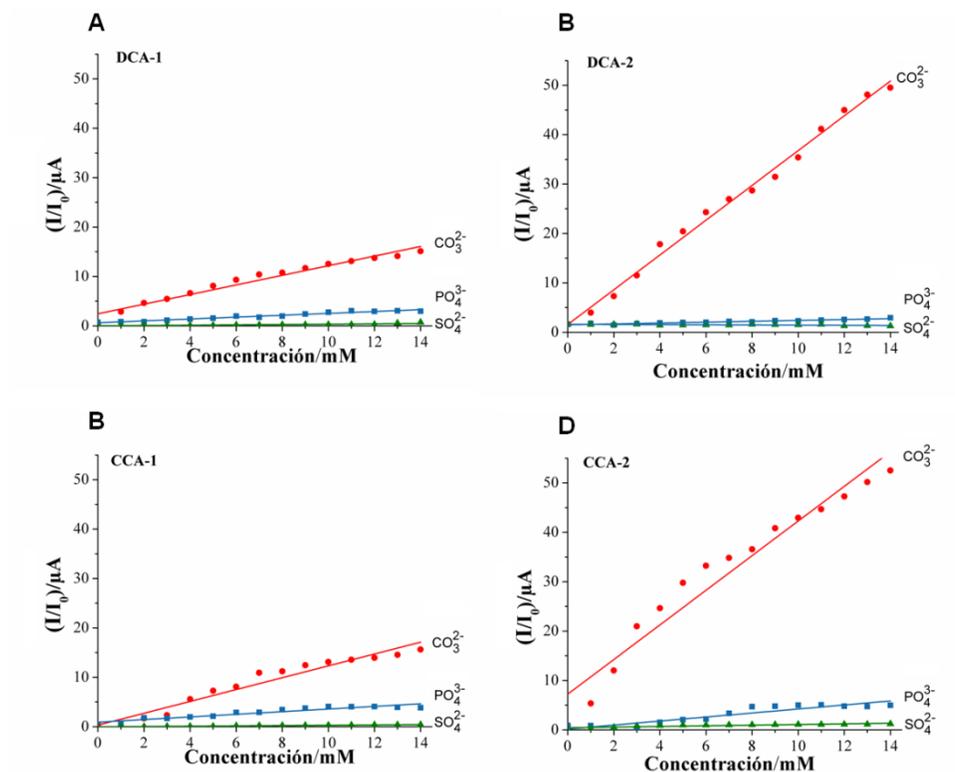


Figura 17. Gráficos de Voltamperometría Cíclica. A) Proteínas DCA-1 con 3 diferentes aniones: CO_3^{2-} , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} , B) Proteínas DCA-2 con 3 diferentes aniones: Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y Na_2SO_4 , C) Proteínas CCA-1 con 3 diferentes aniones: Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y Na_2SO_4 y D) Proteínas CCA-2 con 3 diferentes aniones: Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y Na_2SO_4

Al comparar los resultados de las proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 en la interacción con los iones CO_3^{2-} se observó una mayor respuesta en las proteínas DCA-2 y CCA-2, lo que puede indicar funciones distintas durante la formación del cascarón como se muestra en la figura 18.

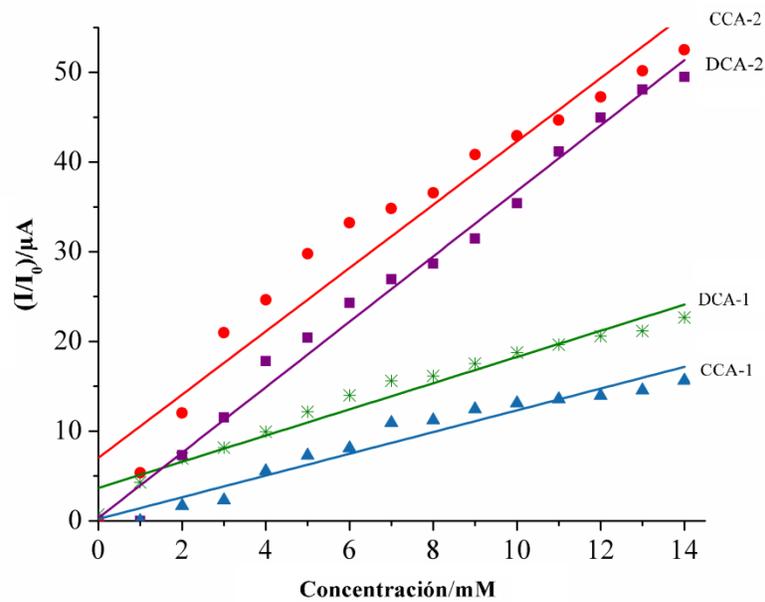


Figura 18. Gráfico de comparación de la respuesta de voltamperometría cíclica obtenida de las proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2.

5.2 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA

5.2.1 Estudios de Dispersión de Luz Dinámica

Se realizaron experimentos para evaluar el comportamiento de las proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 en función a su radio hidrodinámico en un gradiente de temperatura de 4 a 30°C, en un medio de Na_2CO_3 en diferentes concentraciones correspondiente a 10mM, 70mM y 100mM, como se muestra en la figura 12. Se observó que las proteínas en presencia de Na_2CO_3 en una concentración de 10mM 70mM forman agregados que se mantienen en el intervalo de temperatura con un R_h alrededor de 50-100nm (figura 19 A y B). Por otro lado, en concentraciones de 100mM como se muestra en la figura 19C los agregados presentan un mayor tamaño que va incrementando conforme aumenta la temperatura.

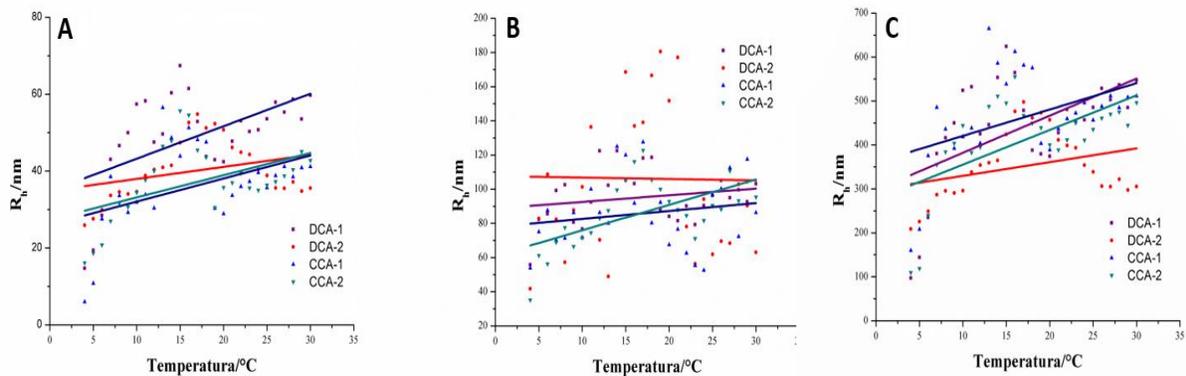


Figura 19. A) Proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 en un medio de 10mM de Na_2CO_3 , B) Proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 en un medio de 70mM de Na_2CO_3 y C) Proteínas DCA-1, DCA-2 y CCA-1 en un medio de 100mM de Na_2CO_3

Así mismo se evaluó el comportamiento de las proteínas a una concentración de 70mM en diferentes medios correspondiente a Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y Na_2SO_4 , como se observa en la figura 20. Al comparar el comportamiento de los agregados en una concentración de 70mM como se observa que en un medio de Na_2CO_3 , las proteínas de estudio presentaron un R_h de 100nm, pero en los medios con Na_3PO_4 y Na_2SO_4 se observa que el R_h de los agregados incrementa notoriamente con un promedio de 500nm.

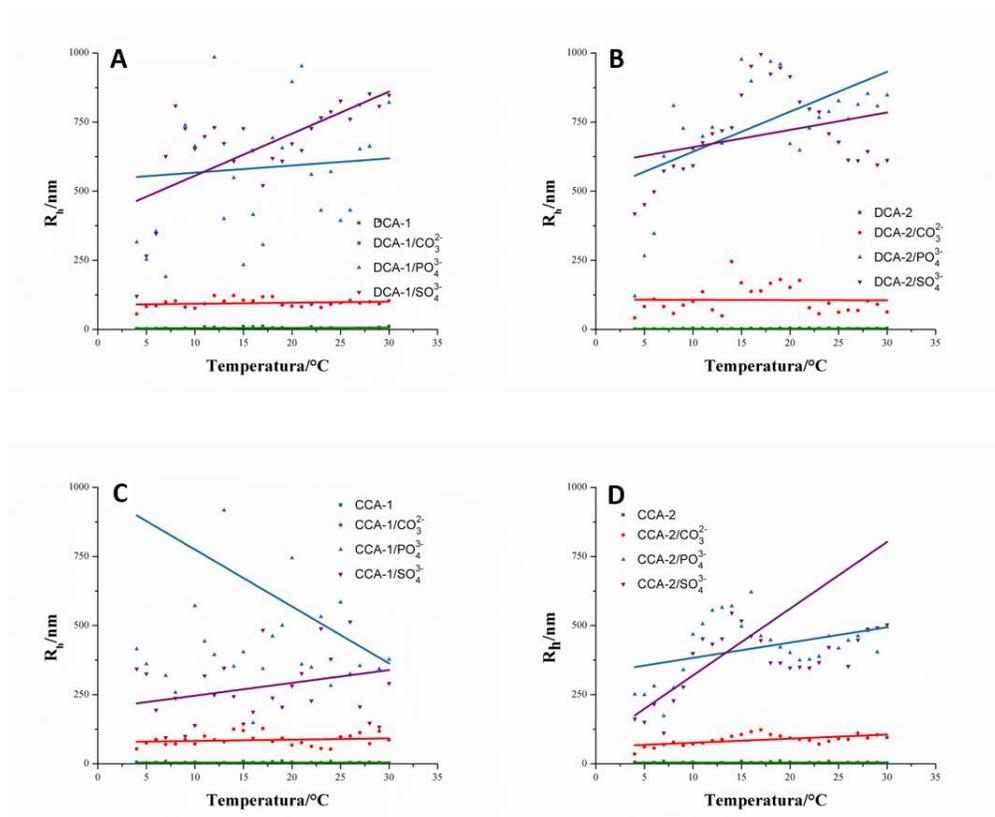


Figura 20. Proteínas en 3 diferentes condiciones correspondientes a Na_2CO_3 , Na_3PO_4 y Na_2SO_4 , a una concentración de 70mM. A) Proteína DCA-1, B) Proteínas DCA-2, C) Proteína CCA-1 y D) Proteína CCA-2

Los resultados de dispersión de luz dinámica en las proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 en diferentes concentraciones y medios muestran un comportamiento de agregación denotado en el aumento de R_h , lo cual se sugiere como un mecanismo de estas proteínas sobre las cuales se depositan los agregados cristalinos durante la biomineralización [27,47]

5.2.2 Crecimiento de cristales en presencia de Proteínas

Para determinar el efecto de las proteínas en la morfología de cristales de CaCO_3 , la cristalización *in vitro* se realizó en presencia de las proteínas DCA-1, DCA-2, CCA-1 y CCA-2 a concentraciones crecientes correspondientes a 100 μg , 250 μg y 500 μg , las cuales se mezclaron con CaCl_2 en una relación 1:1.

Los cristales obtenidos sin proteína presentaron un hábito rombohedral. Se observa que al aumentar la concentración de las proteínas estudiadas se modifica el hábito cristalino, así mismo los resultados muestran un aumento en el tamaño en comparación a los cristales de CaCO_3 sin proteína.

En los experimentos realizados en presencia de las proteínas DCA-1 (figura 21 A-C).y DCA-2 (figura 21 D-F), se observa que la interacción da como resultado una unión entre cristales individuales de CaCO_3 y por ende un aumento en el tamaño en una relación proporcional a la concentración.

La interacción con las proteínas CCA-1 y CCA-2 presentó una modificación con un hábito esferoide como se muestra en la figura 21 (G-I), y 21 (J-L) respectivamente. Los ensayos realizados podrían respaldar que dichas proteínas participan en el crecimiento de los cristales de CaCO_3 .

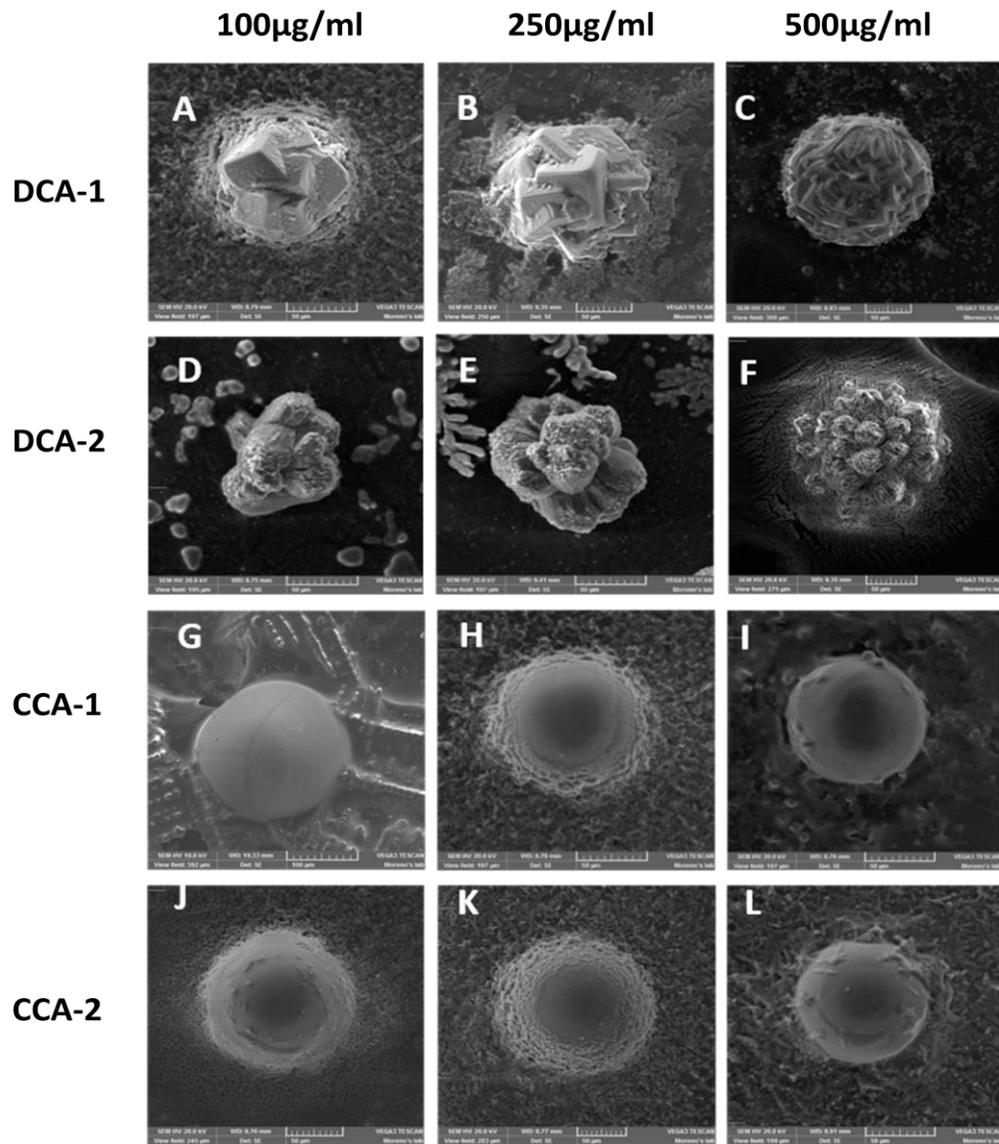


Figura 21. Micrografías de la cristalización *in vitro* de CaCO_3 con las proteínas de estudio en concentraciones crecientes correspondientes a 100µg/ml, 250µg/ml y 500µg/ml de proteína. A-C) En presencia de la proteína DCA-1, D-F) En presencia de la proteínas DCA-2, G-I) En presencia de la proteínas CCA-1 y J-L) En presencia de la proteínas CCA-2.

Una de las características del proceso de mineralización del cascarón de huevo es el control de la morfología cristalina. La gran mayoría de los organismos producen cristales de un mineral específico y una morfología uniforme en un sitio particular, sin embargo el mismo organismo puede producir el mismo mineral pero con diferentes morfologías en sitios distintos [55].

5.2.3 Difracción de electrones

Se realizaron estudios de difracción de electrones con el fin de determinar el tipo de polimorfo en el cual se encuentran los cristales sintetizados de CaCO_3 , así como las muestras obtenidas de la síntesis de CaCO_3 en presencia de las proteínas de interés.

En la figura 22 se observa la difracción de los controles obteniendo como resultado que la muestra se encuentra en el polimorfo calcita.

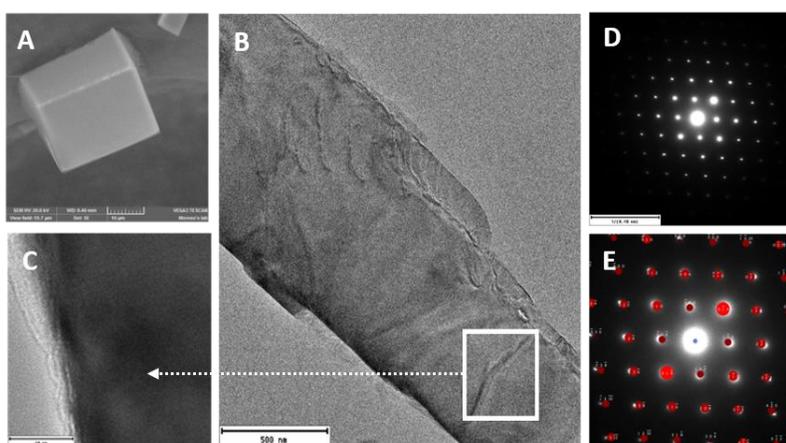


Figura 22. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 sin proteína. A) Imagen tomada en SEM de CaCO_3 , B y C) Imagen tomada en TEM de la zona donde se realizó la difracción de electrones., D) Patrón de difracción de electrones y E) Indización de los datos en comparación con los patrones teóricos utilizando el programa JEMS.

De las proteínas presentes en el cascarón de *Dromaius novaehollandiae*, se obtuvieron los siguientes resultados de difracción de electrones, para la muestra que se sintetizó en presencia de la DCA-1 el polimorfo resultante fue calcita como se muestra en la figura 23.

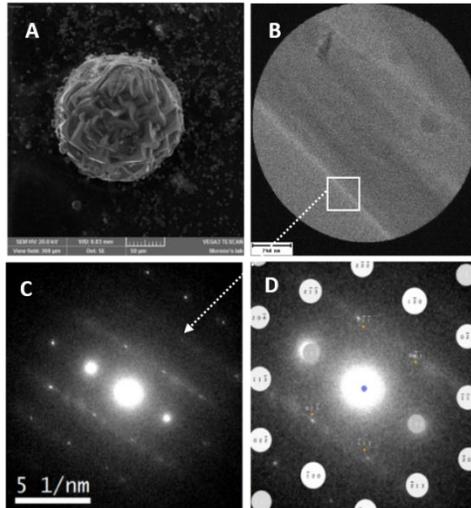


Figura 23. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína DCA-1. A) Imagen tomada en SEM de la muestra consistente en CaCO_3 /DCA-1, B) Imagen tomada en TEM de la zona donde se realizó la difracción de electrones., C) Patrón de difracción de electrones y D) Indización de los datos en comparación con los patrones teóricos utilizando el programa JEMS.

En el caso de la proteína DCA-2 (figura 24) los resultados obtenidos no fueron concluyente entre la fase calcita y vaterita, sin embargo debido a las características físicas del cascarón se puede afirmar que ambas proteínas inducen el polimorfo calcita.

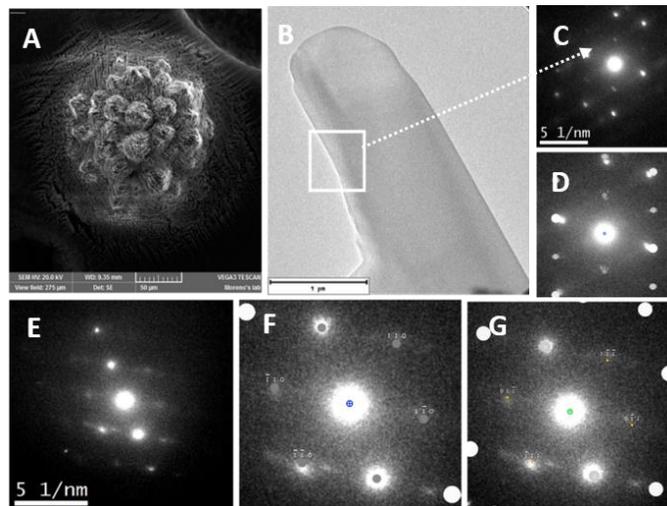


Figura 24. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína DCA-2 A) Imagen tomada en SEM de la muestra consistente en CaCO_3 /DCA-2, B) Imagen tomada en TEM de la zona donde se realizó la difracción de electrones, C y E) Patrón de difracción de electrones y D, F y G) Indización de los datos en comparación con los patrones teóricos utilizando el programa JEMS.

De las proteínas presentes en el cascarón de *Crocodylus moreletii*, se obtuvieron los siguientes resultados de difracción de electrones, para la muestra que se sintetizó en presencia de la CCA-1 el polimorfo resultante fue aragonito como se muestra en la figura 25.

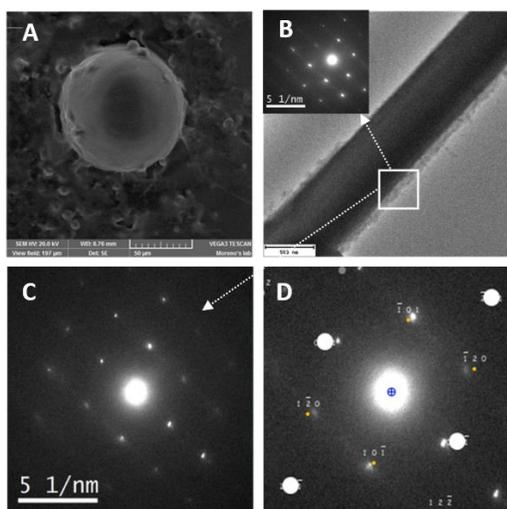


Figura 25. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína CCA-1 A) Imagen tomada en SEM de la muestra consistente en CaCO_3 /CCA-1, B) Imagen tomada en TEM de la zona donde se realizó la difracción de electrones, C) Patrón de difracción de electrones y D) Indexación de los datos en comparación con los patrones teóricos utilizando el programa JEMS.

Para la proteína CCA-2 los resultados obtenidos demostraron que la muestra se encontró en el polimorfo aragonito como se muestra en la figura 26. La calcita y aragonita son los dos polimorfos más estables del CaCO_3 , aunque tienen una estructura similar, muchos organismos son capaces de depositar selectivamente un polimorfo dependiendo de los requerimientos del organismo y de la influencia del medio circundante [7,56,57].

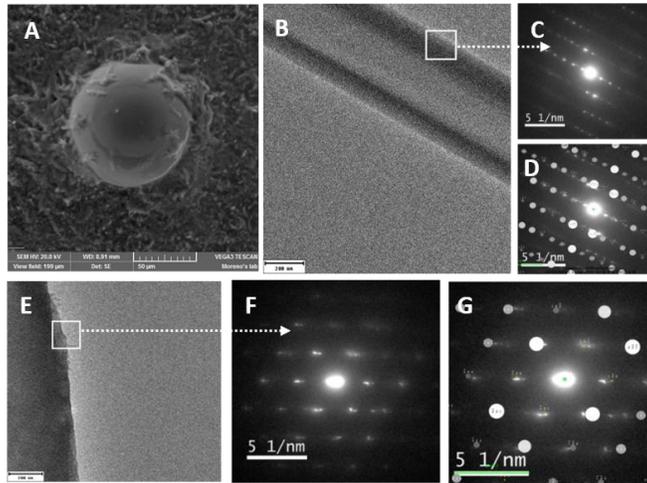


Figura 26. Difracción de electrones en las muestras de CaCO_3 en presencia de la proteína CCA-2. A) Imagen tomada en SEM de la muestra consistente en CaCO_3 /CCA-2, B y E) Imagen tomada en TEM de la zonas donde se realizó la difracción de electrones, C y F) Patrones de difracción de electrones y D y G) Indexación de los datos en comparación con los patrones teóricos utilizando el programa JEMS.

5.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS

5.3.1 Identificación de las Proteínas por Espectrometría de Masas LC-MS/MS

De los estudios realizados para la identificación para las proteínas CCA-1 y CCA-2 de *Crocodylus moreletii*, se obtuvieron los péptidos mostrados en el cuadro 2, de los cuales se observa que, la proteína CCA-1 presenta fragmentos que se encuentran en las proteínas homólogas correspondientes a la DCA-1, SCA-1 y RCA-1; en cuanto a la proteína CCA-2 lo resultados no fueron determinantes para confirmar que sea una proteína perteneciente a este grupo.

Cuadro 2. Péptidos obtenidos de las proteínas CCA-1 y CCA-2

Proteína	Péptidos obtenidos	Proteínas homólogas
CCA-1	FVSQCQRGEEEEENVWIGLR ALRDGCHLASIHSAAEEHR LWAWSDGSK GNCYGYFR	DCA-1 SCA-1 RCA-1
CCA-2	EGPFKKLFGR	

5.3.2 Alineamiento de secuencias múltiple

Con el fin de conocer el porcentaje de identidad de las proteínas reportadas que presentan un CTLD en el cascarón de huevo de aves se realizó un MAS, como se muestra en la figura 27.

Las aves pertenecientes al superorden Palaeognathae incluidas *Struthio camelus*, *Rhea americana* y *Dromaius novaehollandiae* en comparación con la secuencia de *Gallus gallus* presentaron un porcentaje de identidad de 36-44%. Así mismo dentro del Superorden Paleognathae las 2 proteínas con un CTLD presentes en cada especie se agruparon

básicamente en 2 grupos uno compuesto por las proteínas “tipo 1”, las cuales presentaron los siguientes porcentajes de identidad 69.70% entre SCA-1 y DCA-1, 73.48% entre SCA-1 y RCA-1 y 77.04% entre DCA-1 y RCA-1 y las proteínas “tipo 2” con los siguientes resultados 82.98% entre SCA-2 y DCA-2, 78.45% entre SCA-2 y RCA-2 y 78.17% entre DCA-2 y RCA-2.

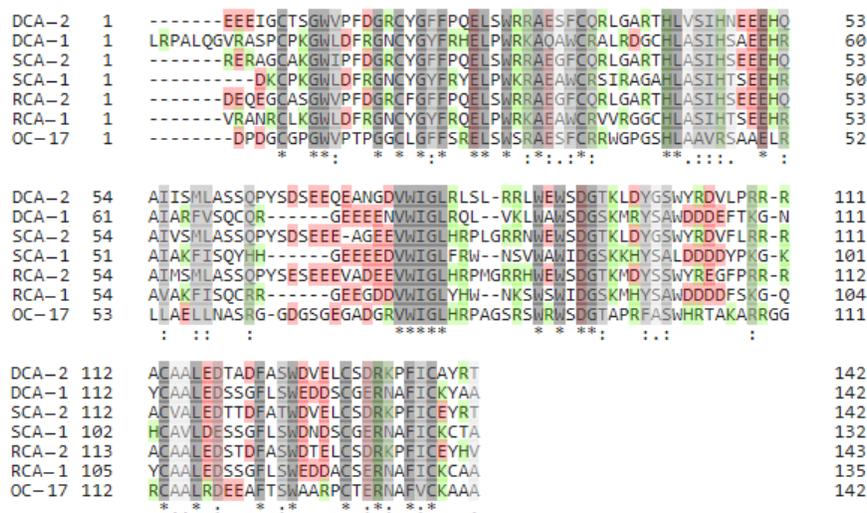


Figura 27. Alineamiento de secuencias múltiple de las proteínas, realizado con el programa ClustalW. El color rojo señala los residuos ácidos y el color verde los residuos básicos.

Cuadro 3. Matriz de porcentaje de identidad entre las proteínas homólogas

	SCA-1	DCA-1	RCA-1	OC-17	DCA-2	SCA-2
SCA-1	100.00	69.70	73.48	36.36	40.91	40.46
DCA-1	69.70	100.00	77.04	38.81	43.70	44.03
RCA-1	73.48	77.04	100.00	38.06	41.48	41.79
OC-17	36.36	38.81	38.06	100.00	42.86	44.29
DCA-2	40.91	43.70	41.48	42.86	100.00	82.98
SCA-2	40.46	44.03	41.79	44.29	82.98	100.00
RCA-2	41.67	45.19	42.22	46.10	78.17	84.51

Dicha agrupación de secuencias también se demostró al realizar un árbol filogenético sin raíz de tipo Neighbor-joinin en “R” como se muestran en la figura 28 con una matriz de distancias basada en un alineamiento de secuencias múltiple representado en el cuadro 4, en el que se observa el mismo tipo de agrupación en el caso de las proteínas pertenecientes al superorden Paleognathae, demostrando que las proteínas son homólogas en las distintas especies. Así mismo se observa que la proteína OC-17 se encuentra más cercana a las proteínas DCA-2, SCA.2 y RCA-2.

Cuadro 4. Matriz de distancia entre las proteínas homólogas

	SCA-1	DCA-1	RCA-1	OC-17	DCA-2	RCA-2
DCA-1	0.407					
RCA-1	0.292	0.292				
Ov-17	1.011	1.09	0.974			
DCA-2	0.902	0.937	0.869	0.836		
RCA-2	0.902	0.920	0.869	0.760	0.239	
SCA-2	0.937	0.955	0.885	0.805	0.189	0.166

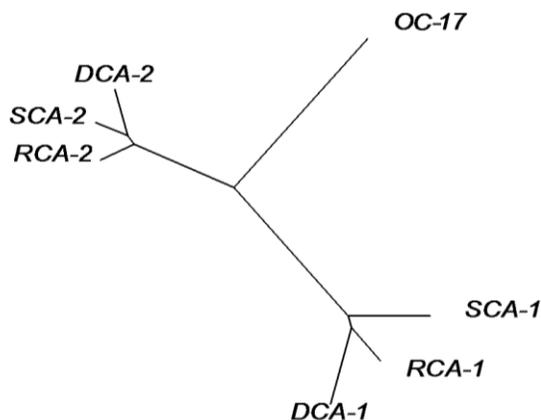


Figura 28. Árbol filogenético Neighbor-joining, realizado en “R” el cual distribuye a las proteínas de acuerdo a su la matriz de distancia basada en el porcentaje de identidad.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La biomineralización es un proceso altamente distribuido entre los seres vivos, que generalmente es modulados a través de mecanismos fisicoquímicos especializados y por medio de macromoléculas orgánicas, de esta manera son capaces de ejercer un control superior sobre los procesos de mineralización [1,17].

La comprensión detallada de las participación de las proteínas presentes en el cascarón durante la biomineralización no es evidente y diversos estudios se han realizado en proteínas que se encuentran en la matriz orgánica tales como OC-116 [34,35], OCX-32 [36,37], OCX-36 [38,39] osteopontina [40,41], ovotransferrina [58] , ovoalbúmina [59] lisozima [42–44]. Estos estudios avalan la idea de que éstas proteínas interaccionan con el CaCO_3 sin embargo no es concluyente que su función sea directamente asociada con dicha interacción. Adicionalmente se han hecho estudios de la participación de las proteínas intraminerales en diferentes etapas de la mineralización donde se ha encontrado que en la etapa de formación de agregados cristalinos en forma de calcita la proteína que se encuentra como componente principal es la OC-17 en el caso de *Gallus gallus* así mismo se encuentra altamente concentrada en los cuerpos mamilares[45,46].

Dicha proteína presenta un CTLD; en otras especies también se encuentran proteínas con dicho dominio, tal es el caso de ANCA en ganso [27,28], SCA-1,2 en *Struthio Camelus*, RCA-1,2 en *Rhea americana* y en las proteínas estudiadas en este trabajo DCA-1,2 la cual también resulto ser las más abundantes en el cascarón en *Dromaius novaehollandiae* (figura 8). A pesar de que la ubicación y abundancia de éstas proteínas sugiere que están involucradas en la formación del cascarón, su función no ha sido esclarecida; tales

relaciones pueden ser resultado de procesos como epitaxia a nivel molecular, adsorción de moléculas orgánicas sobre la superficie del cristal o por interacciones electrostáticas [55].

En relación a las interacciones es razonable suponer que la carga negativa de los residuos de aminoácidos ácidos y la carga positiva de los residuos básicos en las proteínas interactúan con los iones calcio y iones carbonato, respectivamente, dicha suposición se respalda con los resultados obtenidos en voltamperometría cíclica para las 3 proteínas (Figura 17) en la cual dicha interacción incrementa de acuerdo a un aumento en la concentración,

En estudios realizados a OC-17 [55] y ANCA [60] mostraron respuestas distintas al interactuar con CaCO_3 ; esta diferencia puede adjudicarse a la presencia repetida de aminoácidos cargados negativa y positivamente en la secuencia de la ANCA (63EEED, 93DDDE y 85KKR) que no se conservan en OC-17 [28]. Dichas secuencias se encuentran también en nuestra proteínas de estudio como en DCA-1 (72EEEE y 102DDDE) y en la DCA-2(1EEE, 48EEE y 108RRR); en cuanto a la proteína CCA-1 a pesar de no tener secuencia uno de los péptidos identificados se componía por aminoácidos con carga negativa (EEEE).

Tales regiones con cargas negativas también se producen en las proteínas presentes en cascarones del superorden Palaeognathae, en el caso de SCA-1 (63EEEEED, 93DDDD y 85KKH), SCA-2 (49EEE, 69EEEEAGEE y 108RRR) [22]; RCA-1 (95DDD) en RCA-2 (48EEE, 68EEE, 86 RRH y 109RRR) [32]; lo que puede indicar que estos aminoácidos podrían estar asociados con una interacción electrostática con el CaCO_3 .

En relación a la similitud de estructura primaria, las proteínas analizadas en este estudio han sido clasificadas en 2 grupos, DCA-1 que se agrupa junto con SCA-1, RCA-1 y ANCA y DCA-2 que se agrupa con OV-17, SCA- 2 y RCA-2 , las cuales a diferencia del primer grupo presentan modificaciones postraduccionales, específicamente fosforilaciones en serinas [32]; los residuos fosforilados pueden tener un papel importante en la biomineralización ya sea por la interacción con iones de Ca^{2+} [61] o mediante la inhibición de la deposición de CaCO_3 [62].

En relación a la modificación morfológica modulada por las proteínas analizadas en el estudio de cristalización *in vitro* de CaCO_3 , se observó un cambio en el hábito cristalino así como un aumento en el tamaño en relación positiva a la concentración de la proteína (figura 21); dicho cambio morfológico está asociado con la naturaleza ácida de las proteínas estudiadas, esto es sustentado por trabajos anteriores en el cual se comparaba el efecto de cuatro proteínas de tamaño similar que variaba en la carga electrostática, donde se encontró que el efecto morfológico está relacionado con una carga neta negativa [63], así mismo otro estudio comparó el efecto de fragmentos con distintas cargas y demostró que el cambio morfológico se acentuaba con las cargas negativas [64].

El aumento del tamaño de los agregados cristalinos también se observó en los experimentos realizados para DLS a través de la medición del R_h , el cual incrementaba en relación a la concentración al igual que en un estudio reportado de la proteína ANCA[28] donde presentó un mecanismo de agregación en solución en un medio de CaCO_3 [64]; otras investigaciones sugieren que el aumento de los agregados cristalinos se debe a un mecanismo de ensamblaje para la formación del biomineral [33]. Una hipótesis propone

que los aminoácidos ácidos influyen por la interacción de su cadena lateral con las con el Ca^{2+} en la superficie de calcita [57].

Dentro de los factores que se relacionan para establecer un determinado polimorfo del CaCO_3 están involucradas proteínas ácidas de la matriz orgánica [54,56,65–67], tal es el caso de las proteínas de este trabajo en el cual los análisis de difracción mostraron la siguiente relación entre proteína-polimorfo, DCA-1-calcita, DCA-2 no fue concluyente entre calcita y vaterita , CCA-1- aragonito y CCA-2 aragonito; estudios anteriores demostraron que en proteínas de conchas de molusco con regiones consistentes en residuos de ácido aspártico y ácido glutámico desempeñaba un papel en la deposición del CaCO_3 indistintamente entre la forma de calcita y aragonita [57] así mismo se demostró que en una proteína de concha de molusco al eliminar los residuos de ácido glutámico y aspártico resultaba en la pérdida de modulación del polimorfismo, debido a que el grupo carboxilo en la cadena lateral resulta necesario para dicha modulación [54].

Adicional a lo anterior, se han encontrado proteínas que pueden modular un polimorfo específico en relación a la fase polimórfica del biomineral del cual se aíslan, tal es el caso de proteínas de conchas de moluscos las cuales se componen de una capa calcítica y otra aragonítica; estudios *in vitro* demostraron que las proteínas aisladas de la capa calcítica inducían la deposición del CaCO_3 en forma de calcita y las proteínas aisladas de la capa aragonítica en forma de aragonito [53,68,69]; así mismo se conoce que los cascarones de aves se encuentran en forma de calcita y en reptiles generalmente los cascarones son de aragonito[70], esto es acorde con nuestros resultados donde el polimorfo inducido *in vitro* también resulto ser el mismo del cual se aislaron.

Además de los componentes de la matriz orgánica existen otros agentes que influyen en el polimorfo de los biominerales; factores externos como los iones de Mg^{2+} presentes en el mar pueden inhibir la deposición de calcita y favorecer la deposición de aragonito[53]; por lo que el lugar en el que los huevos son ovopositados influyen en el polimorfo.

Las proteínas con un CTLD son un grupo altamente conservado en las aves; un carácter exclusivo del orden superorden Palaeognathae es poseer dos proteínas de este tipo, mientras que en el resto de aves solo se ha encontrado una. De lo anterior podríamos suponer que una especie ancestral de las aves del superorden Neognathae perdió una de las proteínas con un CTLD, sin embargo la ANCA resulta tener una mayor identidad con el grupo 2 de las proteínas de paleognatos, mientras que OC-17 tiene una mayor identidad con el grupo 1, lo que nos lleva a pensar que hubo al menos dos eventos de pérdida de una de las proteínas con un CTLD y a pensar que realizan funciones similares dentro de la formación del cascarón. Es necesario conocer esta proteína en más grupos de aves y reptiles para esclarecer la historia evolutiva de este grupo.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Las condiciones de aislamiento y purificación de las proteínas DCA-1 y DCA-2 de cascarón de *Dromaius novaehollandiae* fueron óptimas para la separación de las proteínas.

Las modificaciones realizadas al protocolo de Mann [22], contribuyeron a tener una mejora en la resolución de los picos. El peso molecular obtenido para la DCA-1 fue de 16.33kDa y para la DCA-2 fue de 16.66kDa. En el caso de las proteínas del cascarón de *Crocodylus moreletii* los pesos obtenidos fueron para la CCA-1 14.3kDa y para la CCA-2 14.6kDa.

Los estudios de voltamperometría cíclica demostraron la interacción proteína- CaCO_3 , observada en la intensidad que aumentaba en relación a la concentración de los iones, donde las proteínas pertenecientes al grupo 2, es decir DCA-2 y CCA-2, presentaron una mayor intensidad de respuesta en comparación a la DCA-1 y CCA-1.

De los estudios realizados para evaluar el estado de agregación de las proteínas por medio de DLS, se concluyó que a pesar de que la proteína tenga una tendencia a agregarse durante la mineralización del cascarón, el tamaño de los agregados es directamente influenciado para la concentración y el medio, de los cuales el Na_2CO_3 resultó ser el que se mantenía más uniforme en el rango de temperatura a una concentración de 10 y 70mM.

En los experimentos de cristalización *in vitro* de CaCO_3 se observa que los cristales obtenidos con proteína presentaron una modificación en su hábito directamente proporcional a la concentración de la proteína. La diferencia en las respuestas entre las proteínas de estudio resultó ser muy evidente, en el caso de las proteínas CCA-1 y CCA-2, los agregados cristalinos presentaron un hábito esferoide.

A pesar de no tener la secuencia de las proteínas presentes en el cascarón de *Crocodylus moreletii*, la identificación de proteínas por espectrometría de MS/MS de la CCA-1 presentó similitud de los péptidos obtenidos con las proteínas DCA-1, SCA-1 y RCA-1. El análisis de secuencias múltiple, demostró la relación existente entre las proteínas con un CTLD presentes en el cascarón de huevo de distintas especies. La comparación de secuencias dentro del Superorden Paleognathae demostró su particular cercanía taxonómica con un grado de identidad de 69.70% entre SCA-1 y DCA-1, 73.48% entre SCA-1 y RCA-1 y 77.04% entre DCA-1 y RCA-1.

REFERENCIAS

- 1 Mann S (2001) *Biom mineralization, principles and concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford Uni.
- 2 Hopwood JD & Mann S (1997) Synthesis of barium sulfate nanoparticles and nanofilaments in reverse micelles and microemulsions. *Chem. Mater.* **9**, 1819–1828.
- 3 Weiner S, Israel R, Dove PM, Tech V & Virginia USA (2001) An Overview of Biom mineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. , 1–29.
- 4 Lowenstam HA (1981) Minerals Formed by Organisms. *Science (80-)*. **211**, 1126–1131.
- 5 Mann S (2001) *Biom mineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, 1st ed. (R. Compton, S. Davies, and J. Evans, eds.) Oxford Chemistry Masters.
- 6 Weiner S (1984) Organization of Organic Matrix Components in Mineralized Tissues. *Am. Zool.* **24**, 945–951.
- 7 Sarashina I & Endo K (1998) Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell : Implications for calcium carbonate biom mineralization. *Am. Mineral.* **83**, 1510–1515.
- 8 Arakaki A, Shimizu K, Oda M, Sakamoto T, Nishimura T & Kato T (2015) Biom mineralization-inspired synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials:organic molecular control of self-organization of hybrids. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 974–989.
- 9 Meldrum FC (2017) Calcium carbonate in biom mineralisation and biomimetic chemistry Calcium carbonate in biom mineralisation and biomimetic chemistry. *Int. Mater. Rev.* **48**, 187–224.
- 10 Dhama NK, Reddy MS & Mukherjee A (2013) Biom mineralization of calcium carbonates and their engineered applications : a review. **4**, 1–13.
- 11 Arias JL & Ferna MS (2003) Biomimetic processes through the study of mineralized shells. *Mater. Charact.* **50**, 189–195.
- 12 Arias JL & Fernandez MS (2001) Role of extracellular matrix molecules in shell formation and structure. *Worlds. Poult. Sci. J.* **57**, 349–357.
- 13 Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodríguez-Navarro, A. B., & McKee MD (2012) The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front Biosci* **17**, 1266–1280.
- 14 Rose ML & Hincke MT (2009) Protein constituents of the eggshell : eggshell-specific matrix proteins. *Cell. Mol. life Sci.* **66**, 2707–2719.
- 15 Fernandez MS, Araya M & Arias JL (1997) Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biol.* **16**, 13–20.
- 16 Fernandez MS, Passalacqua K, Arias JI & Arias JL (2004) Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation. *J. Struct. Biol.* **148**, 1–10.
- 17 Hernández-Hernández A, Vidal ML, Gómez-Morales J, Rodríguez-Navarro AB, Labas V, Gautron J, Nys Y & García Ruiz JM (2008) Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃). *J. Cryst. Growth* **310**, 1754–1759.
- 18 Hincke MT (2013) Understanding control of calcitic biom mineralization—Proteomics to the rescue. *Proteomics* **13**, 3369–3370.
- 19 Arias, J. L., Fink DJ, Xiao SQ, Heuer AH & Caplan AI (1993) Biom mineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int. Rev. Cytol.* **145**, 217–250.
- 20 Pereira-Mouries L, Almeida MJ, Ribeiro C, Peduzzi J, Barthelemy M, Milet C & Lopez E (2002) Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. *FEBS J.* **269**, 4994–5003.
- 21 Arias L, Mann K, Nys Y, Garcia-ruiz JM & Fernandez MS (2008) Eggshell Growth and Matrix Macromolecules. In *Handbook of Biom mineralization: Biological Aspects and Structure Formation* pp. 309–327. Weinheim.
- 22 Mann K & Siedler F (2004) Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and posttranslational modifications. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1696**, 41–50.
- 23 Drickamer K (1999) C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 585–590.
- 24 Zelensky AN & Gready JE (2005) The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **272**, 6179–6217.
- 25 Mann K & Siedler F (1999) The amino sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell

- calcified layer. *IUBMB Life* **47**, 997–1007.
- 26 Reyes-grajeda JP, Moreno A & Romero A (2004) Crystal Structure of Ovocleidin-17, a Major Protein of the Calcified Gallus gallus Eggshell IMPLICATIONS IN THE CALCITE MINERAL GROWTH PATTERN. *J. Biol. Chem.* **279**, 40876–40881.
 - 27 Lakshminarayanan R, Valiyaveetil S, Rao VS & Kini RM (2003) Purification, Characterization, and in Vitro Mineralization Studies of a Novel Goose Eggshell Matrix Protein, Ansocalcin. *J. Biol. Chem.* **278**, 2928–2936.
 - 28 Lakshminarayanan R, Kini RM & Valiyaveetil S (2002) Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5155–5159.
 - 29 Ruiz-Arellano RR & Moreno A (2014) Obtainment of spherical-shaped calcite crystals induced by intramineral proteins isolated from eggshells of ostrich and emu. *Cryst. Growth Des.* **14**, 5137–5143.
 - 30 Ruiz-Arellano RR, Medrano FJ, Moreno A & Romero A (2015) Structure of struthiocalcin-1, an intramineral protein from *Struthio camelus* eggshell, in two crystal forms. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **71**, 809–818.
 - 31 Mann K (2004) Identification of the major proteins of the organic matrix of emu (*Dromaius novaehollandiae*) and rhea (*Rhea americana*) eggshell calcified layer. *Br. Poult. Sci.* **45**, 483–90.
 - 32 Mann K & Siedler F (2006) Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **143**, 160–170.
 - 33 Lakshminarayanan R, Valiyaveetil S, Rao VS & Kini RM (2003) Purification, characterization, and in vitro mineralization studies of a novel goose eggshell matrix protein, ansocalcin. *J. Biol. Chem.* **278**, 2928–2936.
 - 34 Mann K, Hincke MT & Nys Y (2002) Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn. *Matrix Biol.* **21**, 383–387.
 - 35 Hincke MT, Gautron J, Tsang CP, McKee MD & Nys Y (1999) Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.* **274**, 32915–32923.
 - 36 Hincke MT, Gautron J, Mann K, Panh M, McKee MD, Bain M, Solomon SE & Nys Y (2003) Purification of ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein. *Connect. Tissue Res.* **44**, 16–19.
 - 37 Gautron J, Hincke MT, Mann K, Panhéleux M, Bain M, McKee MD & Nys Y (2001) Ovocalyxin-32, a Novel Chicken Eggshell Matrix Protein isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization. *J. Biol. Chem.* **276**, 39243–39252.
 - 38 Kovacs-nolan J, Cordeiro C, Young D, Mine Y & Hincke M (2014) Veterinary Immunology and Immunopathology Ovocalyxin-36 is an effector protein modulating the production of proinflammatory mediators. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **160**, 1–11.
 - 39 Murayama E, Vignal A, Morisson M, McKee MD, Re S, Belghazi M, Vidal M, Nys Y & Hincke MT (2007) Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 5273–5286.
 - 40 Fernandez MS, Escobar C, Lavelin I, Pines M & Arias JL (2003) Localization of osteopontin in oviduct tissue and eggshell during different stages of the avian egg laying cycle. *J. Struct. Biol.* **143**, 171–180.
 - 41 Chien Y, Hincke MT & McKee MD (2009) Avian Eggshell Structure and Osteopontin. *Cells Tissues Organs* **189**, 38–43.
 - 42 Wang X, Sun H, Xia Y, Chen C, Xu H, Shan H & Lu JR (2009) Journal of Colloid and Interface Science Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization. *J. Colloid Interface Sci.* **332**, 96–103.
 - 43 Voinescu AE, Touraud D, Lecker A, Pfitzner A, Kunz W & Ninham BW (2007) Mineralization of CaCO₃ in the presence of egg white lysozyme. *Langmuir* **7**, 12269–12274.
 - 44 Hincke MT, Gautron J, Panheleux M, Garcia-ruiz J & McKee MD (2000) Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biol.* **19**, 443–453.
 - 45 Sun C, Xu G & Yang N (2013) Differential label-free quantitative proteomic analysis of avian eggshell matrix and uterine fluid proteins associated with eggshell mechanical property. *Proteomics* **13**, 3523–3536.
 - 46 Marie P, Labas V, Brionne A, Harichaux G, Hennequet-antier C, Rodriguez-navarro AB, Nys Y & Gautron J (2015) Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein

- functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase. *J. Proteomics* **126**, 140–154.
- 47 Mann K (1999) Isolation of a glycosylated form of the chicken eggshell protein ovocleidin and determination of the glycosylation site. Alternative glycosylation/phosphorylation at an N-glycosylation sequon. *FEBS Lett.* **463**, 12–14.
 - 48 Wellman-labadie O, Lakshminarayanan R & Hincke MT (2008) Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. *FEBS Lett.* **582**, 699–704.
 - 49 Fernández MS, Simoncini MS & Dyke G (2013) Irregularly calcified eggs and eggshells of *Caiman latirostris* (Alligatoridae: Crocodylia). *Naturwissenschaften* **100**, 451–457.
 - 50 Ferguson MARKWJ (1982) The structure and composition of the eggshell and embryonic membranes of *Alligator mississippiensis*. *J. Zool.* **36**, 99–152.
 - 51 Virgen-ortíz JJ & Osuna-castro JA (2012) Method to concentrate protein solutions based on dialysis-freezing-centrifugation: Enzyme applications. *Anal. Biochem.* **426**, 4–12.
 - 52 Lakshminarayanan R, Chi-jin EO, Loh XJ, Kini RM & Valiyaveetil S (2005) Purification and Characterization of a Vaterite-Inducing Peptide, Pelovaterin, from the Eggshells of *Pelodiscus sinensis* (Chinese Soft-Shell Turtle). *Biomacromolecules* **6**, 1429–1437.
 - 53 Falini G, Al S, Weiner S & Addadi L (1996) Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Sci. Pap. Ed.* **271**, 67–69.
 - 54 Tsukamoto D, Sarashina I & Endo K (2004) Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1175–1180.
 - 55 Nys Y, Gautron J, Mckee MD & Hincke MT (2001) Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. *Worlds. Poult. Sci. J.* **57**, 401–413.
 - 56 Takeuchi T, Sarashina I, Iijima M & Endo K (2008) In vitro regulation of CaCO₃ crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein. *FEBS Lett.* **582**, 591–596.
 - 57 Addadi BL & Weiner S (1992) Control and design principles in biological mineralization. *Angew. Chemie Int. Ed.* **31**, 153–169.
 - 58 Gautron J, Hincke MT, Panheleux M, Garcia-Ruiz JM, Boldicke T & Nys Y (2001) Ovotransferrin is a Matrix Protein of the Hen Eggshell Membranes and Basal Calcified Layer. *Connect. Tissue Res.* **42**, 255–267.
 - 59 Hincke MT (1995) Ovalbumin is a Component of the Chicken Eggshell Matrix. *Connect. Tissue Res.* **31**, 227–233.
 - 60 Panheleux M, Bain M, Fernandez MS, Morales I, Gautron J, Arias JL & Nys Y (1999) Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: A comparative study Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: *Br. Poult. Sci.* **40**, 240–252.
 - 61 Hecker A, Testenière O, Marin F & Luquet G (2003) Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of Orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. *FEBS Lett.* **535**, 49–54.
 - 62 Mann K, Olsen J V., Maček B, Gnad F & Mann M (2007) Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer. *Proteomics* **7**, 106–115.
 - 63 Rodriguez-Navarro A, Messier R, Jimenez-Lopez C & Garcia-Ruiz JM (1999) Importance of electrostatic interactions between calcite surfaces and proteins. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **599**, 353–359.
 - 64 Ajikumar PK, Lakshminarayanan R, Ong BT, Valiyaveetil S & Kini RM (2003) Eggshell matrix protein mimics: designer peptides to induce the nucleation of calcite crystal aggregates in solution. *Biomacromolecules* **4**, 1321–1326.
 - 65 Addadi, L., & Weiner S (1985) Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 4110–4114.
 - 66 Matsushiro A, Miyashita T, Miyamoto H, Morimoto K, Tonomura B, Tanaka A & Sato K (2003) Presence of protein complex is prerequisite for aragonite crystallization in the nacreous layer. *Mar. Biotechnol.* **5**, 37–44.
 - 67 Henderson GE, Murray BJ & Å KMM (2008) Controlled variation of calcite morphology using simple carboxylic acids. *J. Cryst. Growth* **310**, 4190–4198.
 - 68 Levi Y, Albeck S, Weiner S, Brack A & Addadi L (1998) Control over aragonite crystal nucleation and growth: an in vitro study of biomineralization. *Chem. Eur. J.* **4**, 389–396.
 - 69 Feng QL, Pu G, Pei Y, Cui FZ, Li HD & Kim TN (2000) Polymorph and morphology of calcium

- carbonate crystals induced by proteins extracted from mollusk shell. *J. Cryst. Growth* **216**, 459–465.
- 70 Driessens FCM & Verbeeck RK (1990) *Biominerals*, 1st ed. CRC Press, Florida.
- 71 A Castillo-Michel H, G Diaz-Sanchez A, Martinez-Martinez A & Hesse B (2016) Investigations of sulfur chemical status with synchrotron micro focused X-ray fluorescence and X-ray absorption spectroscopy. *Protein Pept. Lett.* **23**, 291–299.
- 72 Cusack M, Dauphin Y, Cuif J, Salomé M, Freer A & Yin H (2008) Micro-XANES mapping of sulphur and its association with magnesium and phosphorus in the shell of the brachiopod, *Terebratulina retusa*. *Chem. Geol.* **253**, 172–179.
- 73 Dauphin Y, Cuif J, Salomé M, Susini J & Williams CT (2006) Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 1761–1771.

ANEXO

Investigación sobre el estado químico del S por medio de μ XANES/ μ XRF

El azufre (S) es un macronutriente esencial para todos los organismos, una variedad de productos orgánicos y especies inorgánicas de S existen con estados de oxidación comprendidos entre -2 y +6. La forma más abundante en las biomoléculas es como tiol (R-SH) encontrados en residuos de cisteína (Cys); el amplio número de modificaciones del estado de oxidación que presenta el tiol, permite que este residuo realice un número incontable de las funciones bioquímicas y fisiológicas [71].

Una técnica que se utiliza para investigar el estado de oxidación del S es la espectroscopia de estructura del borde de absorción de rayos X (XANES, por sus siglas en inglés); en el proceso los rayos X inducen transiciones electrónicas desde los estados más internos hasta los de valencia. Estas transiciones producen espectros que reflejan las interacciones de los átomos cercanos al borde de absorción lo que proporciona información sobre la geometría de coordinación y los estados de valencia del átomo. Además con el uso de haces microenfocados en muestras biológicas se pueden obtener mapas de distribución del S utilizando rayos X de fluorescencia (XRF, por sus siglas en inglés).

A continuación se muestran un análisis de μ XANES/ μ XRF realizado a muestras de cascarones de Hadrosauridae, *Dromaius novaehollandiae* y *Crocodylus moreletti*.

Las energías seleccionadas se basaron en la dependencia del coeficiente de absorción de rayos X para los diferentes estados de oxidación y ambiente molecular del S, en este estudio fueron específicamente: 2482.6 eV para sulfato y 2473.4eV para Tiol. (figura 29)

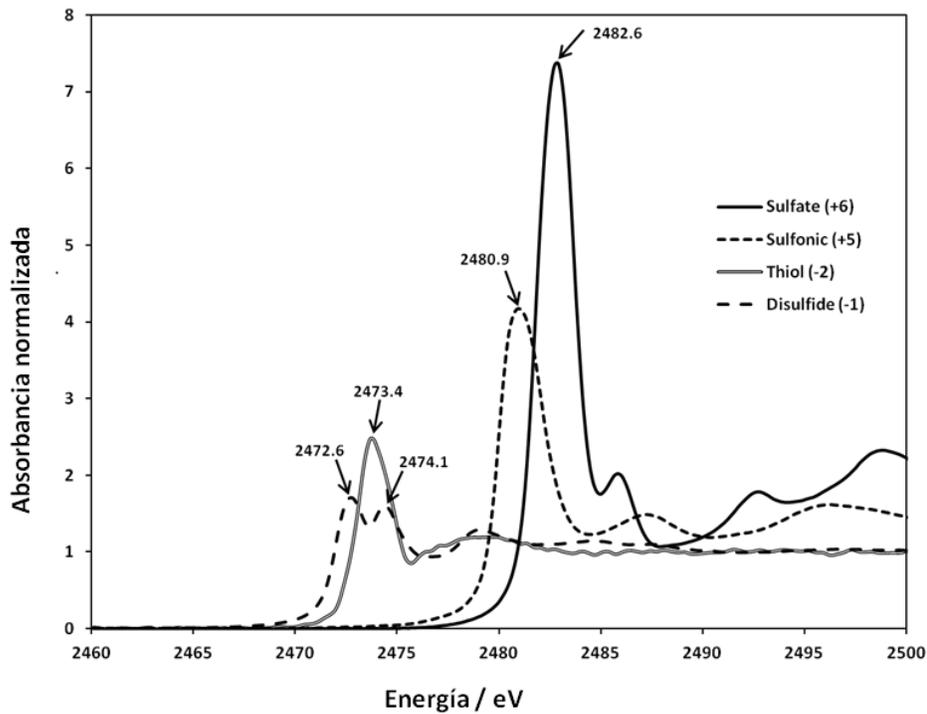


Figura 29. Espectro de XANES de compuestos con diferentes estados de oxidación del S. Los espectros se obtuvieron a partir de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sulfato), ácido cisteico (sulfónico), cisteína (tiol) y cistina (disulfuro), todos analizados como polvo finamente molido. Imagen tomada de [71].

Análisis de μ XANES/ μ XRF en cascarón de Hadrosauridae

Se analizaron dos regiones distintas del cascarón y se compararon con un patrón de L-cisteína y un patrón de sulfato; el espectro XANES de S en los puntos marcados muestra una contribución dominante de S orgánico con una posición del primer máximo de absorción alrededor 2473.4 eV similar al estándar de L-cisteína, como se muestra en la figura 30.

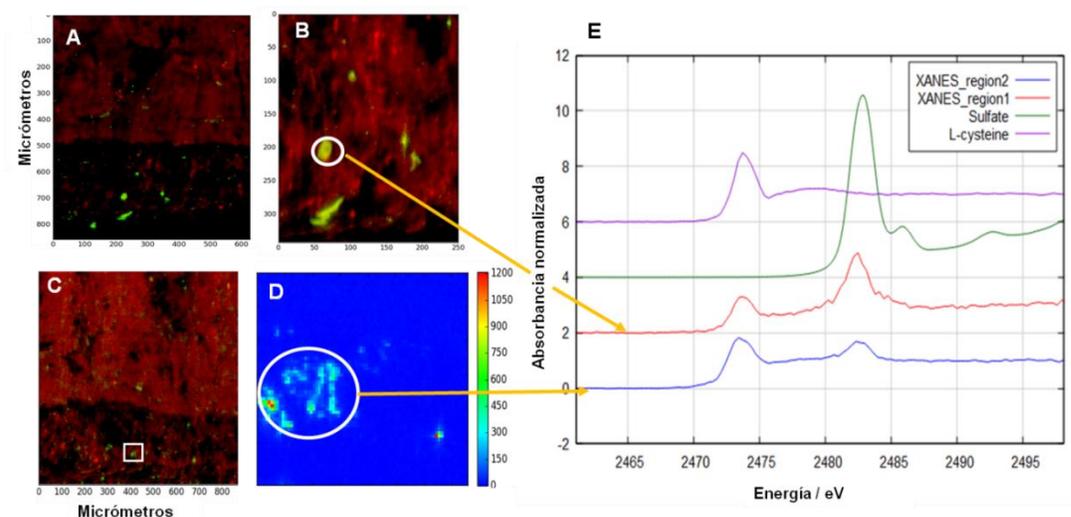


Figura 30. Análisis de XANES de S en el cascarón de Hadrosauridae. A y B) Se muestra la primera región de análisis del contenido de S, C y D) Se muestra la segunda región de análisis del contenido de S y E) Se observa el espectro de XANES de la región uno y dos correspondientes a la línea roja y la línea azul respectivamente, y el espectro de dos estándares, la línea morada corresponde a un patrón de L-cisteína y la línea verde corresponde a un patrón de sulfato

Análisis XANES *Dromaius novaehollandiae*

Se analizaron dos regiones distintas del cascarón una interna y otra externa, cada región presenta 3 escaneos individuales de diferentes puntos en las zonas marcadas por las elipses rojas; los 6 diferentes espectros mostraron un máximo de absorción alrededor 2473.4 eV similar al estándar de L-cisteína, y los espectros correspondientes a la zona 2, 3 y 5 mostraron un segundo pico alrededor de 2482.6 similar al espectro de sulfato, como se muestra en la figura 31.

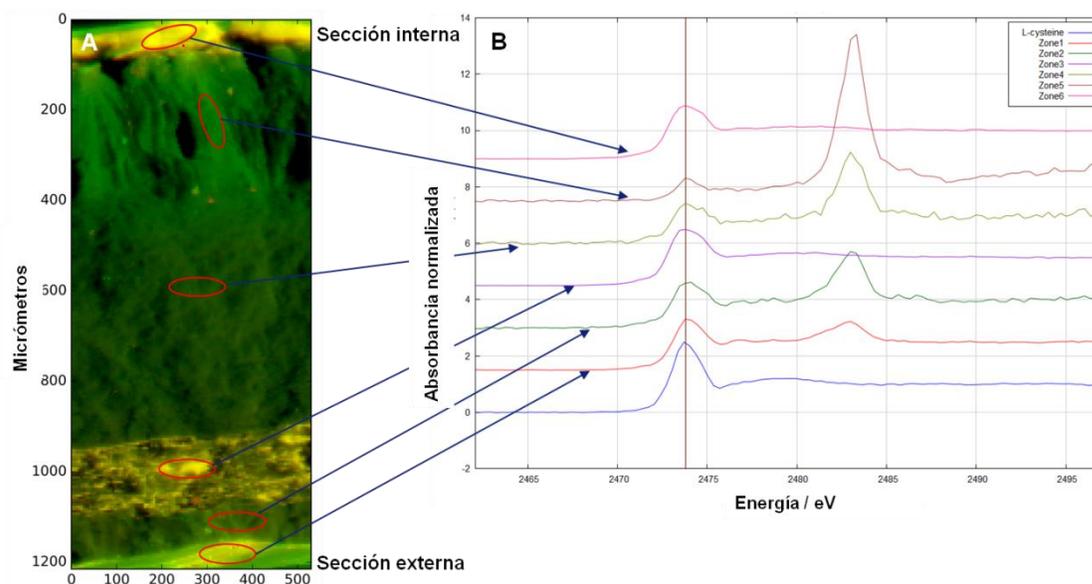


Figura 31. Análisis de XANES de S en el cascarón de *Dromaius novaehollandiae* A) Se muestra un corte transversal del cascarón que inicia del interior hasta la capa externa y las zonas de análisis de contenido de S marcadas con elipses rojas ; y, B) Se observa el espectro de XANES de las 6 zonas de análisis que van desde el interior hasta el exterior del cascarón, así mismo se observa un patrón de L-cisteína.

Análisis XANES *Crocodylus moreletti*

Se analizaron dos regiones distintas del cascarón correspondientes a la superficie interna y a la superficie externa, cada región es la suma de escaneos individuales (3-4 puntos diferentes) de las zonas marcadas con elipses rojas. Debido a que la muestra no se pudo analizar de forma transversal el análisis se realizó solo sobre las superficies. Los resultados muestran claramente la diferencia en la composición de estas dos fases. Una mayoritariamente SO_4 y la otra mayoritariamente S-S, (figura 32).

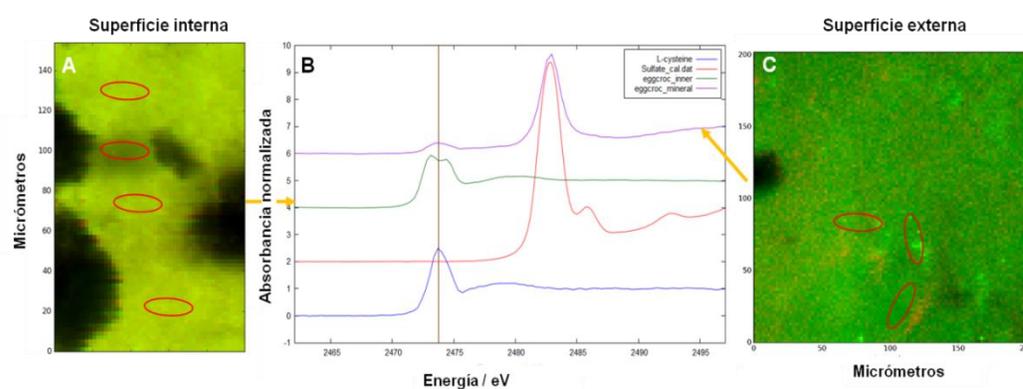


Figura 32. Análisis de XANES de S en el cascarón de *Crocodylus moreletti*. A y C) Se muestra las zonas elegidas en la superficie interna y externa respectivamente para el análisis del contenido de S, y B) Se observa el espectro de XANES de ambas superficies la interna de color verde y la externa de color morada, así mismo se observa el espectro de dos estándares, la línea azul corresponde a un patrón de L-cisteína y la línea roja corresponde a un patrón de sulfato

El estudio indica que los cascarones contienen principalmente S como L-cisteína así como sulfato. Dicha distribución es importante desde el punto de vista del control biológico del proceso de biomineralización debido a que el material compuesto resultante es fuertemente influenciado por la presencia, naturaleza y distribución de componentes orgánicos. El máximo a 2473.5 eV puede ser debido a las proteínas presentes en la matriz orgánica, ya que las proteínas fosforiladas están bien establecidas como una característica asociada a la biomineralización; el máximo en 2482.6 eV revela que gran parte del S está presente como sulfato esto puede deberse a la presencia de los GAG sulfatados[72,73].

1. VALORES OBTENIDOS POR MEDIO DE DIFRACCIÓN DE ELECTRONES.

Después de obtener los patrones de difracción debido a la reducción del número de puntos y a su baja intensidad, se realizó su indexación comparándolos con los patrones teóricos disponibles utilizando el programa JEMS, después de encontrar una posible coincidencia se obtuvieron las distancias de los planos de difracción y se compararon las distancias experimentales para encontrar la fase más adecuada CaCO_3 .

Cuadro 5. Distancias experimentales del Control.

Posición	Distancias Experimentales	Valores Teóricos			
		d [Å]]	h	k	l
(12)	3.85 Å	3.850	1	0	2
(1)	2.98 Å	3.030	0	1	4
(6.5)	1.85 Å	1.874	1	1	6

Cuadro 6. Distancias experimentales de la proteína DCA-1

Posición	Datos experimentales	Valores Teóricos			
		d [Å]]	h	k	l
(12)	3.910 Å	4.20	0	1	1
(2)	4.105	4.25	1	1	1
(4)	3.70	3.86	0	1	2
(3)	2.20	2.28	1	1	3

Cuadro 7. Distancias experimentales de la proteína DCA-2

Datos experimentales	Valores Teóricos			
	d [Å]]	h	k	l
4.04	3.90	1	1	2
3.01	2.84	0	0	6
3.34	3.21	1	1	4
3.94	3.98	0	2	0
3.96	3.86	0	1	2
2.7	2.49	1	1	0

Cuadro 8. Distancias experimentales de la proteína CCA-1.

Posición	Datos experimentales	Valores Teóricos			
		d [Å]]	h	k	l
(3)	3.33	3.27	0	2	1
(5.5)	2.15	2.108	1	2	2
(3.5)	1.98	1.977	2	2	1
5.5	2.10	2.3	1	3	0

Cuadro 9. Distancias experimentales de la proteína CCA-2

Distancias Experimentales	Valores Teóricos			
	d [Å]]	h	k	l
3.03	2.73	1	2	1
3.30	3.27	0	2	1
2.09	2.100	1	2	2
2.01	1.975	2	2	1