

1281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESTUDIOS DE LA BIOMINERALIZACIÓN DEL OXALATO DE CALCIO EN PLANTAS SUPERIORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

DAVID JÁUREGUI ZÚÑIGA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ABEL MORENO CÁRCAMO**



MÉXICO, D.F.

2005

m.341187



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Agradecimientos:

Esta tesis fue financiada en parte con los proyectos CONACyT 36155E, DGAPA-UNAM IN204702 y UC-Mexus.

Agradezco las becas otorgadas por el CONACyT, DGEP-UNAM y PAEP-UNAM.

Al Dr. José David Sepúlveda Sánchez, a la M. en C. Kumiko Shimada Miyazaca y al Dr. Jorge Sepúlveda Sánchez por facilitar sus equipos para la realización de parte de los experimentos aquí presentados.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Abel Moreno, Dra. Adela Rodríguez y Dr. Federico Sánchez, por la dirección de esta tesis.

A todas las personas que con sus comentarios ayudaron a mejorar esta tesis.

En especial al Dr. Antonio Asensio Calderón García por haberme invitado a una estancia de investigación y haberme facilitado sus instalaciones en la Universidad Politécnica de Cartagena, España.

Autorizo la publicación de esta tesis en la
biblioteca de la Universidad Nacional Autónoma de México y el
Sistema de Información de la Red de Bibliotecas Interregionales.
NOMBRE David Jáuregui
Zúñiga
FECHA 17/02/05
FIRMA [Firma]



Dedicatoria

A mi familia por todo su apoyo

A mis amigos por los ratos de esparcimiento, a Cesar y Pablo por haber aportado algunas ideas para esta tesis

En especial a Martha por siempre estar ahí.



Índice

	Pag.
Abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract	5
Justificación	6
Objetivos del trabajo	8
Capítulo 1 Introducción general	9
1.1 Generalidades de la biomineralización.....	10
1.2 Biomineralización en plantas.....	11
1.2.1 Formación de cristales en plantas.....	11
1.2.2 Matriz orgánica.....	13
1.2.3 Células formadoras de cristales.....	14
1.2.4 Biosíntesis del ácido oxálico.....	15
1.2.5 Función de los cristales en las plantas.....	16
1.3 Problemas en el estudio de las proteínas involucradas en la biomineralización.....	17
Capítulo 2 Caracterización cristalográfica	19
2.1 Materiales y métodos.....	20
2.2 Resultados y discusión.....	21
Capítulo 3 Caracterización bioquímica de la matriz	28
3.1 Materiales y métodos.....	29
3.1.1 Aislamiento de la matriz proteica asociada a los cristales	29
3.1.2 Identificación y purificación de las proteínas con afinidad por el oxalato de calcio.....	29
3.1.3 Identificación de las glicoproteínas presentes en la matriz.....	30
3.2 Resultados y discusión.....	31
3.2.1 Proteínas de la matriz asociadas a los cristales de oxalato de calcio.....	31
3.2.2 Identificación y purificación de las proteínas con afinidad por los cristales de oxalato de calcio.....	32
3.2.3 Identificación de las proteínas glicosiladas de la matriz.....	34
Capítulo 4 Interacciones proteína-cristal	35
4.1 Materiales y métodos.....	36
4.1.1 Ensayos de los efectos de las proteínas sobre la nucleación.....	36
4.1.2 Ensayos <i>in vitro</i> de la interacción proteína-cristal.....	36



4.2 Resultados y discusión.....	37
4.2.1 Efecto de las proteínas sobre la nucleación del oxalato de calcio.....	37
4.2.2 Interacción de las proteínas con el oxalato de calcio.....	38
4.2.3 Arreglo cristalino de las caras de los cristales de oxalato de calcio.....	42
Capítulo 5 Función de los cristales en las plantas.....	45
5.1 Materiales y métodos.....	46
5.2 Resultados y discusión.....	47
Capítulo 6 Conclusiones generales.....	53
Capítulo 7 Bibliografía.....	57
Apéndice A.....	65
Apéndice B.....	67
Apéndice C.....	68



Abreviaturas

AFM	Atomic force microscopy
BSA	Bovine serum albumin
CaOx	Calcium oxalate
COMA1	Calcium oxalate macromolecule associated 1
COMA2	Calcium oxalate macromolecule associated 2
COM	Calcium oxalate monohydrate
COD	Calcium oxalate dihydrate
EDS	Energy dispersive spectroscopy
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
Oc-17	Ovocleidin-17
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Scanning electron microscopy



Resumen

La presencia de cristales de oxalato de calcio es una característica distintiva en la mayoría de las plantas. Estos cristales se desarrollan dentro de una “cámara de cristal” formada por una matriz orgánica de origen proteico que se encuentra en la vacuola de células especializadas denominadas idioblastos. Aspectos importantes de la formación de cristales en las plantas aun no han sido estudiados. Este trabajo examina algunos aspectos de la biomineralización del oxalato de calcio en el frijol común incluyendo: caracterización cristalográfica y estructural de los cristales extraídos de la testa del frijol, identificación y caracterización parcial de las principales proteínas de la matriz orgánica, estudio de la interacción de estas proteínas con el oxalato de calcio y análisis de las posibles funciones biológicas de estos cristales en el frijol. Los cristales encontrados en la testa del frijol fueron de oxalato de calcio monohidratado, mostraron una morfología prismática y la mayoría se mostró como la fusión de dos cristales. Se aisló la matriz proteica asociada a los cristales y se determinó la presencia de al menos 7 polipéptidos con pesos moleculares aproximados de 17, 24, 27, 42, 52, 68 y 250 kDa. Algunas de ellas mostraron diferentes grados de glicosilación por el método de tinción de Schiff y azul de Alcian. Se aislaron dos proteínas de pesos moleculares aproximados de 27 y 250 kDa, se probó su efectividad para modificar la nucleación y morfología de los cristales de oxalato de calcio y se comparó con el extracto crudo total. Estas proteínas al igual que el extracto crudo inhibieron la nucleación del oxalato de calcio y modificaron específicamente la cara {120} del cristal. También se evaluó la posible función de estos cristales como almacenes de calcio o detoxificadores de metales pesados en la planta. Se encontró una relación positiva entre la concentración de calcio en el medio y la producción de cristales de oxalato de calcio. Por otro lado, la presencia de metales pesados afectó la producción de cristales disminuyendo su número, por lo que los cristales de oxalato en el frijol actúan como depósitos de calcio pero no intervienen en la detoxificación de metales pesados.



Abstract

The presence of calcium oxalate crystals is a distinctive characteristic in most of the plants. These crystals are developed into a “crystal chamber” made by an organic matrix constituted by proteins. This chamber is localized into a central vacuole of specialized cells called idioblasts. Important aspects of this phenomenon have not been characterized. This work examines some aspects of the calcium oxalate biomineralization in common bean: Crystallographic and structural characterization of the bean seed coats crystals, identification and partial characterization of the organic matrix proteins and study of the proteins-calcium oxalate interaction. The evaluation of the possible roles of these crystals in bean was also analyzed. Calcium oxalate crystals found in the bean seed coat were identified as calcium oxalate monohydrate, these crystals were twinned prismatic-shaped. On the other hand, the crystal-associated proteic matrix was isolated and proteins with approximated molecular weights of 17, 24, 27, 42, 52, 68 and 250 kDa were identified. Some of these proteins showed different glycosylation grades by periodic acid-Schiff and Alcian blue stain methods. Two proteins of molecular weights of 27 and 250 kDa were isolated. The activity of these proteins over the nucleation and morphology of calcium oxalate crystals was proved and compared to the crude extract. These proteins and the crude extract inhibited the calcium oxalate nucleation and modified in a specific way the face {120}. We evaluated the possible role of the calcium oxalate crystals as calcium sink and its participation in heavy metal detoxification. In this study we found a positive relationship between calcium concentration in the growth medium and the production of calcium oxalate crystals. On the other hand, the presence of heavy metals in the growth medium decreased the number of crystals inside the plant. This study corroborates that one of the most important role of the calcium oxalate crystal in bean is to serve as a calcium sink, but does not contribute to heavy metal detoxification.



Justificación

La biomineralización es el fenómeno por el cual los organismos vivos forman precipitados minerales con características bien definidas, ejemplos de este fenómeno están ampliamente distribuidos en la naturaleza, desde bacterias hasta vertebrados y con tamaños que abarcan desde micras (cristales de magnetita en bacterias) hasta kilómetros (arrecifes de coral) y funciones tan diversas como el soporte estructural (vertebrados) o la orientación geomagnética (bacterias o abejas).

Desde que Lowenstam inició (en la década de los años 60) estudios sistemáticos de la biomineralización, la investigación acerca de la diversidad de los minerales formados por los organismos y de los procesos que participan en este fenómeno se ha incrementado en gran medida; sin embargo, el conocimiento es aun muy limitado. Aun en los sistemas mejor estudiados (formación de dientes, huesos, conchas en moluscos, esqueletos en corales o cascarones de huevo) se tiene poco conocimiento de los factores que controlan este fenómeno y como es que las estructuras minerales, producto de este tipo de mineralización, adquieren características tan distintivas y diferentes de su contraparte inorgánica.

En las plantas, la biomineralización del oxalato de calcio es un fenómeno ampliamente distribuido, pero poco conocido, estudiado y entendido. Se conocen mas de 250 familias de plantas que precipitan este mineral y se ha registrado su presencia en prácticamente todos los tipos de tejido vegetal. En algunas cactáceas puede llegar a representar el 80 % del peso seco total de la planta. Pese a todo lo anterior, el conocimiento e investigación en este campo es casi nulo; por lo cual, se necesita una intensa investigación en este campo para poder responder preguntas tales como ¿Qué mecanismos actúan en el control del deposito mineral? ¿Cómo se controla la cristalinidad, tamaño de partícula, dureza y tipo de mineral precipitado? ¿Por qué algunas plantas acumulan mas oxalatos que otras? ¿Qué función biológica, fisiológica o ecológica tienen en la planta? Entre muchas otras.

El conocimiento generado de las investigaciones en este campo, puede ayudarnos a entender mejor la fisiología de las plantas, así como los mecanismos que utilizan para su adaptación al medio ambiente. También puede ser aplicado directamente en el diseño y



síntesis de nuevos materiales magnéticos, electrónicos o farmacéuticos a escala nanométrica y con propiedades bien definidas o para entender y remediar procesos de biomineralización que inciden directamente en la salud humana (formación de cálculos renales, calcificación de arterias o malformación de huesos y dientes).



Objetivo general:

Realizar la caracterización bioquímica parcial de la matriz orgánica asociada a los cristales de oxalato de calcio de *Phaseolus vulgaris* y establecer su posible función en la regulación de la biomineralización en plantas superiores.

Objetivos particulares:

- Estudiar estructuralmente los minerales formados por los procesos de biomineralización en *P. vulgaris*.
- Identificar las principales macromoléculas que conforman la matriz orgánica que está asociada a los cristales de oxalato de calcio de *P. vulgaris*.
- Aislar y purificar las principales macromoléculas que se encuentran en la matriz que intervienen en la precipitación mineral del oxalato de calcio en *P. vulgaris*.
- Caracterizar parcialmente las principales macromoléculas implicadas en la biomineralización de *P. vulgaris* y de su interacción con los cristales de oxalato de calcio.
- Determinar las posibles funciones de los cristales de oxalato de calcio en *P. vulgaris*.



Capítulo 1

Introducción general



1.1 Generalidades de la biomineralización

La biomineralización se define como el proceso por el cual los organismos vivos forman sólidos inorgánicos cristalinos o amorfos (1 y 2). Los productos de este proceso pueden ser: monocristales o agregados cristalinos y pueden formar estructuras que difieren en función y nivel de complejidad. Hasta el momento se han podido identificar alrededor de 70 tipos diferentes de minerales precipitados por los organismos, de los cuales más del 50 % son compuestos de calcio (2 y 3).

Existen dos procesos fundamentales de biomineralización reconocidos: el primero de ellos es denominado “biológicamente inducido”, en este proceso (ejemplificado por algunas bacterias como los estromatolitos) el organismo modifica su microambiente local (cambiando el pH, la concentración de algún ion, etc.) creando las condiciones necesarias para que se de la precipitación mineral. Este tipo de biomineralización crea agregados policristalinos con características y morfologías idénticas a las reflejadas por los minerales precipitados en condiciones inorgánicas similares (1). Este proceso no está rigurosamente controlado y puede representar un estado primitivo en la evolución de la formación mineral biogénica.

El otro sistema de biomineralización es el “mediado por una matriz orgánica”, en este sistema la matriz orgánica controla la precipitación y las características principales de los cristales minerales (tamaño, forma, orientación cristalográfica, microporosidad, etc). Se ha propuesto que esta matriz es de naturaleza principalmente proteica y consta de dos fases bien definidas: la fracción soluble y la fracción insoluble en soluciones acuosas (4). La fracción soluble está formada por una mezcla de numerosas proteínas altamente cargadas (generalmente ricas en ácido aspártico y glutámico), cada una de las cuales, presumiblemente, realiza una función específica y están en contacto directo con la fase mineral (3, 5, 6, 7 y 8). La fracción insoluble está compuesta por muy pocas proteínas, las cuales son ricas en aminoácidos no polares tales como glicina y alanina (9). Estas proteínas (tipo colágena o seda) se sugiere que pueden actuar como el soporte estructural de las



proteínas ácidas o de otro tipo de macromoléculas o complejos que promuevan la precipitación mineral (3, 6 y 10).

1.2 Biomineralización en plantas

1.2.1 Formación de cristales en plantas

Cristales de oxalato de calcio ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)$) han sido observados en más de 250 tipos diferentes de plantas e igualmente en algunas bacterias, hongos y animales (11, 12, 13, 14, 15 y 16). Por otro lado también se han encontrado yacimientos minerales de este compuesto (17), pero en todos los casos los cristales son formados del calcio medioambiental y del ácido oxálico sintetizado biológicamente (18), por lo que estos yacimientos siempre estarán asociados a la actividad biológica. La formación del oxalato de calcio parece ser un proceso esencial en la mayoría de las especies de plantas conocidas y en ciertos casos (como en algunas cactáceas) cerca del 90 % del calcio total en la planta puede encontrarse secuestrado en forma de cristales de este mineral (13). Las plantas pueden llegar a acumular del 3 al 80 % de su peso seco en forma de estos cristales. Los cristales se desarrollan dentro de una “cámara de cristal” formada por una matriz orgánica, que se encuentra en la vacuola central de células especializadas (idioblastos) (14, 19, 20, 21 y 22).

Debido a que el oxalato de calcio tiene un producto de solubilidad muy bajo (1.3×10^{-9} moles/Kg de agua), es de esperarse que un nivel de control en la precipitación de este mineral se de a nivel de la compartimentalización de los iones calcio y oxalato o la separación de sus caminos de transporte para evitar la precipitación del oxalato de calcio en cualquier parte de la célula (21). Las cámaras de cristal son importantes en este nivel de control debido a que compartimentalizan el proceso de cristalización dentro de la vacuola, por lo cual es lógico concluir que estas proveen selectividad y control sobre la entrada de iones dentro del espacio de cristalización (21 y 23).



El oxalato de calcio en la naturaleza puede presentarse en una forma monohidratada (whewellita) o dihidratada (weddellita). Cristalográficamente la whewellita corresponde al sistema cristalino monoclinico y la weddellita corresponde al sistema cristalino tetragonal (Tabla 1 y Fig. 1). El más común en las plantas es el monohidratado (11, 13 y 14). Por otro lado las plantas pueden producir cristales de oxalato de calcio en una gran variedad de formas y tamaños, aunque la mayoría de los cristales pueden clasificarse en cuatro tipos principales con base a su morfología: rafidios (cristales aciculares en agregados), drusas (agregados cristalinos esféricos), estiloides (cristales aciculares) y prismas (Fig. 2). Generalmente la morfología de los cristales y su distribución dentro de los tejidos en la planta son especie-específicos. El grado de hidratación de los cristales en las plantas también es especie-específico. Estas características revelan la importancia de estos cristales en la sistemática y taxonomía botánica (15, 24 y 25).

Tabla 1 Datos cristalográficos de los dos tipos de cristales de oxalato de calcio

	Weddellita ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) + \text{H}_2\text{O}$)	Whewellita ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) + 2\text{H}_2\text{O}$)
Sistema cristalino	Tetragonal	Monoclinico
Grupo espacial	I4/m	P2 ₁ /n
Parámetros de celda unitaria	a=12.371 Å y c=7.357 Å	a= 9.976 Å b=7.294 Å y c=6.291 Å $\beta=107^\circ$
Densidad (g/cm^3)	2.2	2.02

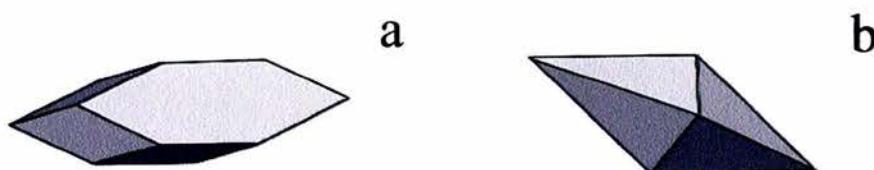


Figura 1 Morfologías típicas de la a) whewellita y b) weddellita.



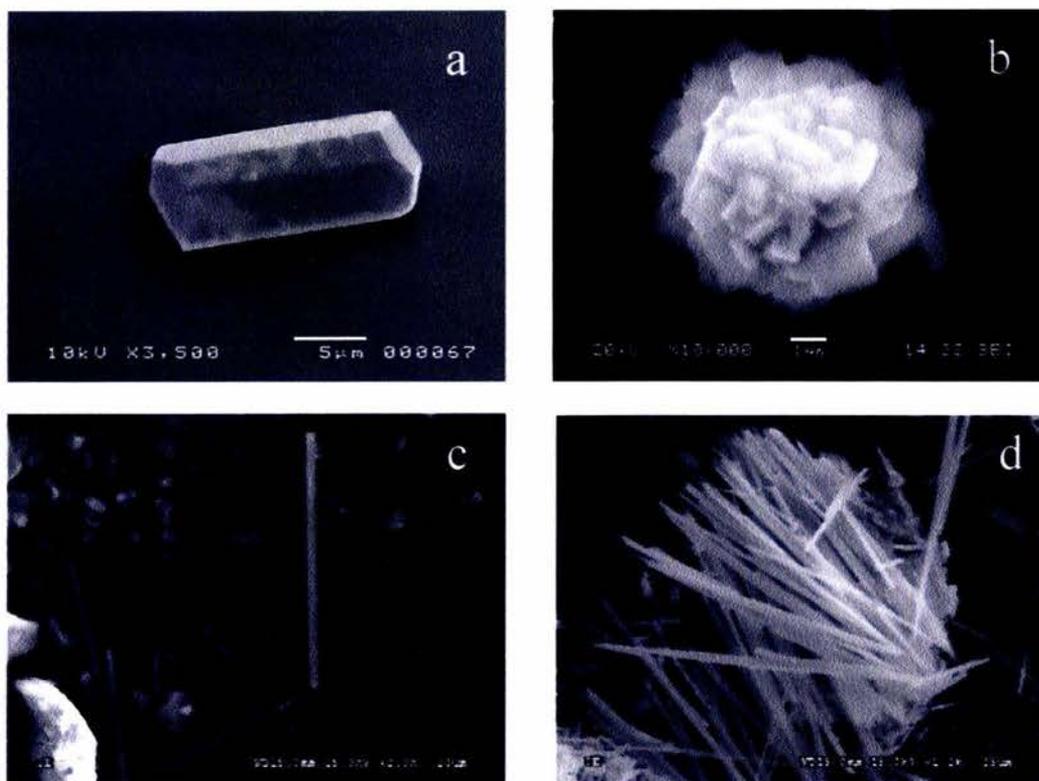


Figura 2. Diferentes morfologías de cristales de oxalato de calcio a) Prisma formado en la testa de *Phaseolus vulgaris*, b) Drusa formada en el endospermo de *Vitis vinifera*, c) Estiloide formado en las hojas de *Ditrichia viscosa*, d) Rafidios formados en las hojas de *Vitis vinifera*.

1.2.2 Matriz orgánica

Las matrices intravacuolares son estructuras macromoleculares que se ha sugerido juegan un papel muy importante en el control del crecimiento y forma del cristal (5, 20 y 26). Estas matrices forman una cámara de cristal la cual separa el espacio intravacuolar del espacio donde se forma el cristal. La “cámara de cristal” es una estructura que envuelve al cristal, la cual está formada por una membrana proteica que se forma del material que se encuentra en la vacuola (18, 19 y 21). Las macromoléculas en el interior de la “cámara de cristal”, se sugiere que crean y controlan el microambiente alrededor de los cristales en formación, modificando la forma, crecimiento y orientación de éstos (20, 21, 23 y 26).



Recientemente se han identificado proteínas de la matriz asociada a los cristales de oxalato de calcio, estos primeros estudios indican la posibilidad de que la matriz orgánica en las plantas esté conformada por una fracción soluble y una fracción insoluble en agua, similar a lo que pasa en otros sistemas de biomineralización (20, 23, 26 y 27). Aun no se ha podido obtener la estructura primaria de estas proteínas; sin embargo, el análisis de los aminoácidos que presentan estas proteínas indica que ambas fracciones están conformadas por proteínas ácidas (26 y 27).

En los sistemas animales las proteínas ácidas cumplen una función primordial en la formación de los cristales, debido a que pueden unirse específicamente a caras determinadas del cristal con las cuales tienen complementariedad cristalográfica (6). También pueden inhibir la nucleación cristalina cuando están en solución, promover la nucleación cuando están adheridas a un sustrato (por ejemplo, el que forman las proteínas insolubles) (28), modelar la forma del cristal (modificando la velocidad de crecimiento de ciertas caras cristalinas o promoviendo la desaparición o aparición de nuevas caras), controlar el estado de hidratación del cristal y la formación de agregados cristalinos o monocristales. Todo lo anterior en colaboración con factores fisicoquímicos como el pH de la solución, el nivel de supersaturación, la concentración diferencial de los iones calcio y oxalato, entre otras (29).

1.2.3 Células formadoras de cristales

Los idioblastos son células que están especializadas para la acumulación de Ca^{2+} en forma de oxalato de calcio cristalino. Se ha reportado la presencia de estas células tanto en la epidermis como en el tejido mesófilo. Estas células crecen muy rápidamente y se diferencian de las demás células vegetales circundantes por su gran tamaño (Fig. 3) (18, 30 y 31). Se ha demostrado, por medio de la hibridación *in situ* para RNA ribosomal, que los idioblastos jóvenes son células extremadamente activas, además poseen una gran cantidad de mitocondrias, aparato de Golgi, ribosomas y retículo endoplásmico, organelos asociados con los procesos metabólicos, los cuales proveen la energía necesaria para el secuestro del



calcio, la síntesis de proteínas, lípidos y polisacáridos y la producción de ácido oxálico (31).

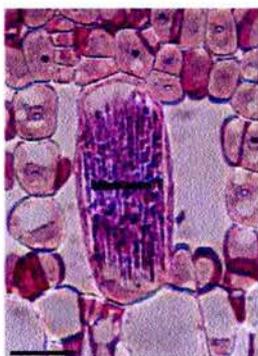


Figura 3 Idioblasto de *Pistia estratiotes*. Fotografía tomada de Li y col. (2003). Escala: 10 μm .

Cuando los idioblastos poseen un cristal totalmente formado en su interior se inhibe el flujo de calcio hacia el interior de la célula, pero permanecen activas, lo cual está relacionado con su habilidad para utilizar el calcio cristalino almacenado bajo condiciones de déficit de calcio. Esto demuestra la capacidad de estas células para regular los procesos de transporte de calcio a través de la membrana plasmática (31, 32 y 33).

1.2.4 Biosíntesis del ácido oxálico

En las plantas se han propuesto diferentes vías para la biosíntesis del ácido oxálico, entre las que destacan: el rompimiento del isocitrato, la hidrólisis del oxaloacetato, la oxidación del glicolato/glioxilato y el rompimiento oxidativo del ácido L-ascórbico (30, 34 y 35). Estudios recientes, en los que se utilizan precursores marcados radiactivamente, han indicado que la vía del ácido L-ascórbico es la más importante en la formación del ácido oxálico para la formación de cristales de oxalato de calcio. Estos estudios también sugieren que, para la formación de cristales, el ascorbato es sintetizado en el interior de los idioblastos y no transportado de células que se encuentren a su alrededor (36 y 37).

Por otro lado, se ha propuesto que en los idioblastos, la síntesis del oxalato es llevada a cabo (por una enzima aún no caracterizada) en el citoplasma de la célula, posteriormente el ácido oxálico es transportado hacia la vacuola donde es incorporado a los cristales en el interior de las cámaras cristalinas (36). La síntesis se lleva a cabo rompiendo los carbonos 2 y 3 del ácido ascórbico (Fig. 4).



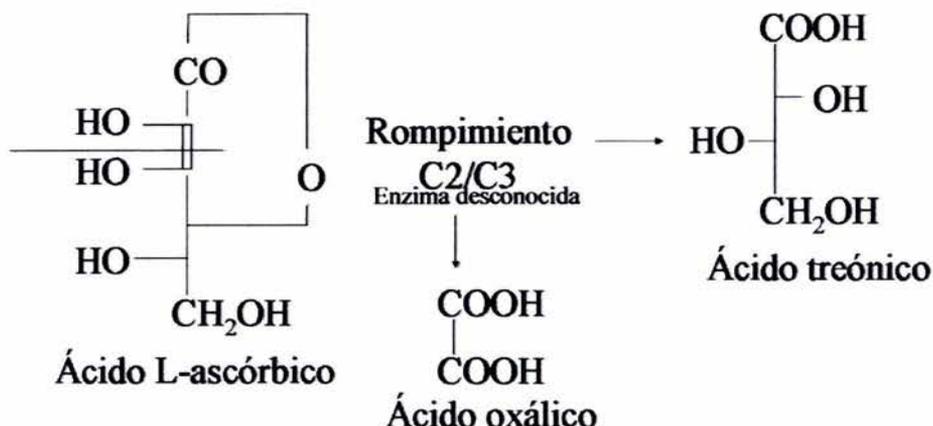


Figura 4 Síntesis del ácido oxálico a partir del ácido ascórbico

1.2.5 Función de los cristales en las plantas

La función de los cristales de oxalato de calcio en las plantas aún no ha sido bien determinada. En investigaciones recientes se ha propuesto que estos cristales pueden desempeñar diversas funciones, una de ellas (al parecer la más importante) es el secuestro y mantenimiento de los niveles de calcio en el interior de la planta (32 y 38). Algunos estudios que apoyan esta hipótesis han mostrado que el número y tamaño de los cristales de oxalato de calcio responden a un estrés por calcio (33 y 39). Asimismo, también demuestran que las diferentes morfologías presentadas por los cristales responden de manera diferente a ese tipo de estrés. Por ejemplo en la planta *Pistia stratiotes* (que forma drusas y rafidios) las drusas mostraron una respuesta particularmente más dinámica a las fluctuaciones en los niveles de calcio. Estas últimas aumentaron rápidamente en número y tamaño cuando la planta sufrió un estrés por exceso de calcio; mientras que, cuando el estrés fue debido a un déficit de calcio su número y tamaño disminuyó drásticamente (debido a una redisolución de los cristales para utilizar el calcio). Por otra parte, los rafidios tuvieron una respuesta similar a las drusas bajo un estrés por exceso de calcio; sin embargo, no sufrieron una disminución en número o tamaño cuando el estrés fue por déficit de calcio



(33). Los prismas de algunas leguminosas mostraron la misma respuesta que las drusas bajo exceso y déficit de calcio (38).

Los cristales de oxalato de calcio también pueden actuar como mecanismos de defensa de la planta (40, 41, 42 y 43). Investigaciones en *Sida rhombifolia* mostraron que hay una acumulación de rafidios en respuesta a un consumo por herbívoros simulado (39). Por el contrario en *Pancratium sickenbergeri* no hubo un aumento en el número de rafidios bajo este tratamiento; sin embargo, se observó que variedades de esta especie que contenían mayor cantidad de cristales eran menos consumidas (40, 42, 43, 44 y 45). Lo anterior demuestra que los rafidios pueden actuar como defensa inducida como en el caso de *S. rhombifolia* o como defensa adquirida como en *P. sickenbergeri*. Otros estudios han encontrado enzimas proteolíticas asociadas a los rafidios, corroborando su papel defensivo (46).

También se ha propuesto que los cristales de oxalato de calcio pueden actuar como depósitos inertes para metales pesados como Zn, Cd, Sr, Pb o Al (47, 48, 49 y 50), en todos estos casos los metales son incorporados dentro del cristal. Algunas funciones adicionales para los cristales son: ayudar a la formación de cámaras aéreas (51) o actuar como soporte estructural (52).

1.3 Problemas en el estudio de las proteínas involucradas en la biomineralización

Hay problemas graves que hacen muy difícil purificar y caracterizar las macromoléculas asociadas a los cristales en los sistemas de biomineralización. Debido a que estas macromoléculas están íntimamente asociadas a la fase mineral es muy difícil extraerlas manteniendo intacta su estructura y funcionalidad. Por otro lado, una vez extraídas las proteínas se agregan muy fácilmente ya que tienen una gran cantidad de residuos cargados y algunas están altamente glicosiladas, incluso pueden llegar a precipitarse definitivamente, lo cual hace muy difícil su manejo y separación (53, 54). Solo recientemente se han obtenido secuencias polipeptídicas completas de proteínas relacionadas con la biomineralización (55 y 56) y la mayoría de ellas ha sido obteniendo y secuenciando los



genes que codifican para ellas y no con las proteínas *per se*, esto dificulta establecer relaciones estructura-función.

También es difícil establecer la función específica de estas proteínas. En muchos de los sistemas de ensayos funcionales, las proteínas de la matriz son adicionadas a soluciones supersaturadas y su efecto sobre la nucleación y crecimiento es monitoreado (57). Sin embargo, es muy difícil diferenciar entre las contribuciones de los parámetros generales como son la densidad de cargas y los efectos específicos debido a la complementariedad estructural de las proteínas o los polisacáridos asociados al mineral. Otra aproximación es observar los cambios en las morfologías de los cristales en presencia de una o más proteínas en solución (58, 59 y 60). Esos cambios, si son específicos, muestran que las macromoléculas pueden interactuar con algunas caras cristalinas pero no con otras; sin embargo, es muy difícil el indexado de las caras debido al tamaño de los cristales que se obtienen (27). Aproximaciones adicionales se han realizado manteniendo las proteínas asociadas a un templete de β -quitina o proteína de la seda y evaluar el efecto sobre la nucleación y crecimiento de los cristales (61).



Capítulo 2

Caracterización cristalográfica



2.1 Material y métodos

Para la caracterización de los cristales de oxalato de calcio de la testa del frijol, se diseñó un método para aislarlos por medio de una diferencia de densidad. Se utilizaron semillas de frijol de la variedad Negro Jamapa. La testa de la semilla se separó manualmente de los cotiledones y se homogeneizó en agua destilada. El homogeneizado se pasó por un filtro de luz de malla de 120 micras y el filtrado se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. El botón resultante se resuspendió en una solución de politungstato de sodio (Fluka 71913) con una densidad ajustada a 2.0 g/cm^3 y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. Debido a que el material más pesado en el homogeneizado son los cristales de oxalato de calcio, con una densidad de 2.2 g/cm^3 , se lograron obtener con un grado adecuado de pureza en el botón del centrifugado, el sobrenadante con los restos del material orgánico se desechó y los cristales se lavaron exhaustivamente con agua destilada para eliminar los restos de politungstato de sodio.

Los cristales aislados se caracterizaron por difracción de rayos-X de polvos en un equipo Bruker-axs D-8 advance system, por SEM y EDS en un equipo JEOL JSM5900 LV con un espectrómetro Oxford acoplado y por AFM en un equipo Nanoscope IIIa (Digital Instruments). Los cristales para su caracterización por rayos-X de polvos y SEM no fueron procesados con ningún tratamiento. Para la caracterización superficial de los cristales por AFM, estos fueron sometidos a diferentes tratamientos. Para eliminar la materia orgánica proteica superficial los cristales se introdujeron en una solución de pepsina (Sigma P-700) a 10 mg/ml en amortiguador de citratos pH 3.0 durante 12 horas a temperatura ambiente. Para eliminar la materia orgánica total se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio 20 % durante 30 min. Como control los cristales fueron lavados con un amortiguador de citratos pH 3.0 durante 12 horas. Después de cada tratamiento los cristales fueron lavados exhaustivamente con agua destilada.

Para tener un punto de comparación en la caracterización estructural de los cristales de frijol, se sintetizaron cristales de oxalato de calcio *in vitro*. Para esto se mezclaron soluciones 20 mM de oxalato de potasio (Sigma O-0501) y 2 mM de cloruro de calcio



(Merck 2382) ($K_2C_2O_4 + CaCl_2 \rightarrow CaC_2O_4 + 2KCl$). La solución resultante se mantuvo en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente, los cristales se recuperaron por centrifugación y se lavaron con agua destilada. A estos cristales se les realizaron los mismos tratamientos que a los cristales extraídos de la testa del frijol, adicionalmente para obtener una disolución parcial de la superficie del cristal fueron tratados con una solución de EDTA (Sigma E-9884) 5 % durante 30 min. y lavados con agua destilada.

2.2 Resultados y discusión

Los cristales extraídos de la testa del frijol fueron identificados como oxalato de calcio monohidratado (whewellitita) (Fig. 5). Estos cristales presentaron dos morfologías básicas: prismas rectos y prismas en forma de escuadra, ambas formas fueron maclas de contacto y tuvieron aproximadamente la misma proporción en número (Fig. 6 y 7). Las operaciones de simetría que relacionaron a los dos cristales que forman las maclas en los cristales son: rotación de 180° sobre un eje en los prismas rectos y reflexión en un plano de espejo en los prismas en forma de escuadra, en estos cristales el ángulo que forma la escuadra es de 107° (Fig. 7 a y b) El tamaño promedio de los cristales fue de $20 \mu m$ de largo $7 \mu m$ de ancho y $5 \mu m$ de profundidad (29).

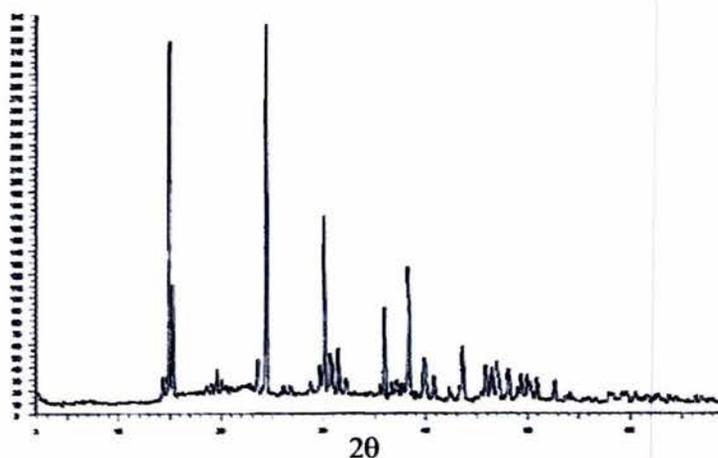


Figura 5. Difractograma de los cristales de oxalato de calcio de la testa del frijol





Figura 6. Cristales de oxalato de calcio monohidratado extraídos de la testa del frijol. En la micrografía se pueden observar las dos morfologías típicas de los cristales (rectos y en escuadra).

Tabla 2. Datos cristalográficos de los cristales de oxalato de calcio de la testa del frijol obtenidos por rayos-X de polvos.

d (Å)	I	Índices		
		h	k	l
5.93	95.8	-1	0	1
5.79	33.3	0	1	1
4.52	11.0	1	0	1
3.77	13.9	-1	1	2
3.64	100	0	2	0
3.00	12.3	1	1	2
2.96	51.0	-2	0	2
2.90	12.8	0	1	3
2.84	16.6	1	2	1
2.49	27.2	2	1	1
2.35	37.6	-1	1	4
2.26	13.8	0	1	4
2.07	17.2	1	2	3

I= intensidad en %
d (Å): espacio interplanar en ángstroms



No se pudo realizar la caracterización completa de las caras de los cristales debido a que mostraron un tamaño muy pequeño para obtener un patrón de difracción de monocristal y un tamaño muy grande para realizar difracciones puntuales en microscopía electrónica de transmisión. Tampoco se pudieron obtener los valores de los ángulos interfaciales de todas las caras expresadas por los cristales, debido a que no se pudo obtener la perspectiva adecuada en las micrografías de SEM. Sin embargo, se pudo establecer la posible expresión de cuatro caras en los cristales biogénicos y comparando estos cristales con la morfología en equilibrio de los cristales de oxalato de calcio monohidratado (COM), según el modelo calculado por Millan (2001) basado en energías de unión y cadenas de enlaces periódicos (62), se puede deducir, utilizando el programa Shape 7.0, que son las caras $\{120\}$, $\{010\}$, $\{100\}$ y $\{021\}$ en ese orden de importancia o tamaño de las caras (véase fig. 7 a y b).

Es importante destacar que los cristales de COM sintéticos no expresan normalmente la cara $\{021\}$, excepto en condiciones de temperatura mayor a 70°C y tiempos de crecimiento largo (62) y en esos casos el orden de importancia de las caras es $\{100\}$, $\{010\}$, $\{120\}$ y $\{021\}$ (Fig. 8 a y b), esto demuestra la participación de aditivos que propician la aparición de la cara $\{021\}$ y la modificación en las velocidades de crecimiento de las otras caras bajo las condiciones de crecimiento en el interior de la planta, es decir, menos de 40°C y velocidades de crecimiento rápido (un cristal dentro de la planta puede formarse en menos de una hora (32)). Entre los aditivos que pueden modificar la velocidad de crecimiento de ciertas caras o propiciar la aparición de nuevas caras se encuentran ciertas proteínas o polisacáridos, tal y como se ha demostrado en otros sistemas de biomineralización (formación de conchas de moluscos, cascarones de huevo, etc (4, 6, 7 y 27)).



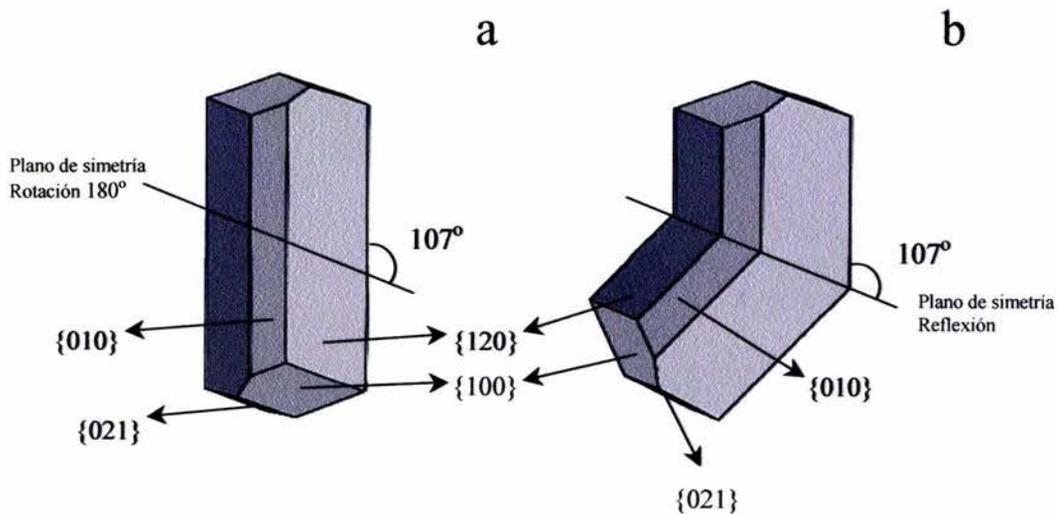


Figura 7. Representación esquemática de los cristales de COM del frijol mostrando las caras y los planos de simetría a) Prisma recto, b) Prisma en forma de escuadra. Diagramas realizados con el programa Shape 7.0.

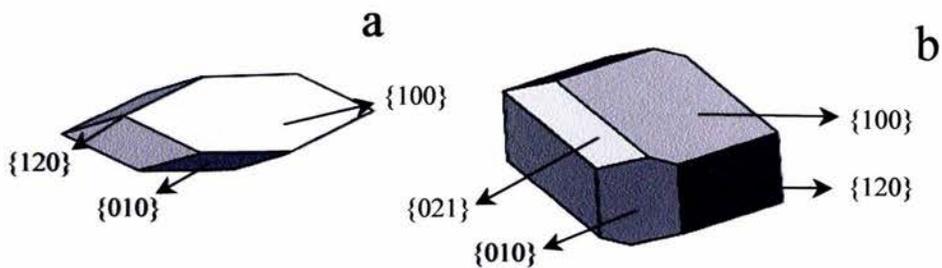


Figura 8. Representación esquemática de los cristales de COM. a) Cristal de oxalato sintético obtenido *in vitro*. b) Morfología en equilibrio del cristal de oxalato determinada por Millan (63). Diagramas realizados con el programa Shape 7.0.



Las micrografías de fuerza atómica mostraron la misma morfología prismática que se observó por SEM. En estas micrografías también se pudieron observar pequeños glóbulos de forma esferoidal con un tamaño entre 15 y 50 nm, la presencia de estos glóbulos fue constante y su distribución fue homogénea en todo el cristal (Fig. 9a). La presencia de nanoesferas similares ha sido reportada en otros sistemas de biomineralización (formación de dientes y de conchas de moluscos), en estos sistemas las nanoesferas se han asociado a la matriz proteica que regula el crecimiento cristalino (63 y 64). Los tratamientos con las soluciones de hipoclorito de sodio al 20 % para remover la materia orgánica disolvieron las nanoesferas en la superficie del cristal (Fig. 9b), el tratamiento con pepsina solo las disolvió parcialmente (Fig. 9c); sin embargo, los lavados con agua o con el amortiguador de citratos pH 3.0 no mostraron ningún efecto evidente. Esto demuestra el origen orgánico de las nanoesferas y que al menos parte sustancial de ellas es de origen proteico. Adicionalmente los cristales tratados con hipoclorito de sodio además de la disolución de las nanoesferas mostraron pequeñas escoriaciones y estructuras fibrilares sobre la superficie del cristal (véase figura 9b), lo que denota una disolución parcial, esta disolución parcial no fue compartida por los cristales procesados con la pepsina. Cristales sintéticos procesados con el mismo tratamiento no mostraron ningún signo de disolución (Fig. 10a) y al ser parcialmente disueltos con EDTA 5% mostraron figuras de ataque perfectamente simétricas (Fig. 10b), que no corresponden con las morfologías mostradas por los cristales biogénicos. Estas variaciones en la microestructura superficial de los cristales pueden ser explicadas por la fuerte asociación que presenta la fracción orgánica que cubre al cristal con este último, incluso podríamos afirmar que hay interpenetración entre la matriz orgánica y el cristal, coexistiendo cristal y matriz orgánica a nivel superficial. Esto también podría explicar la poca solubilidad de las nanoesferas en el amortiguador y el agua.



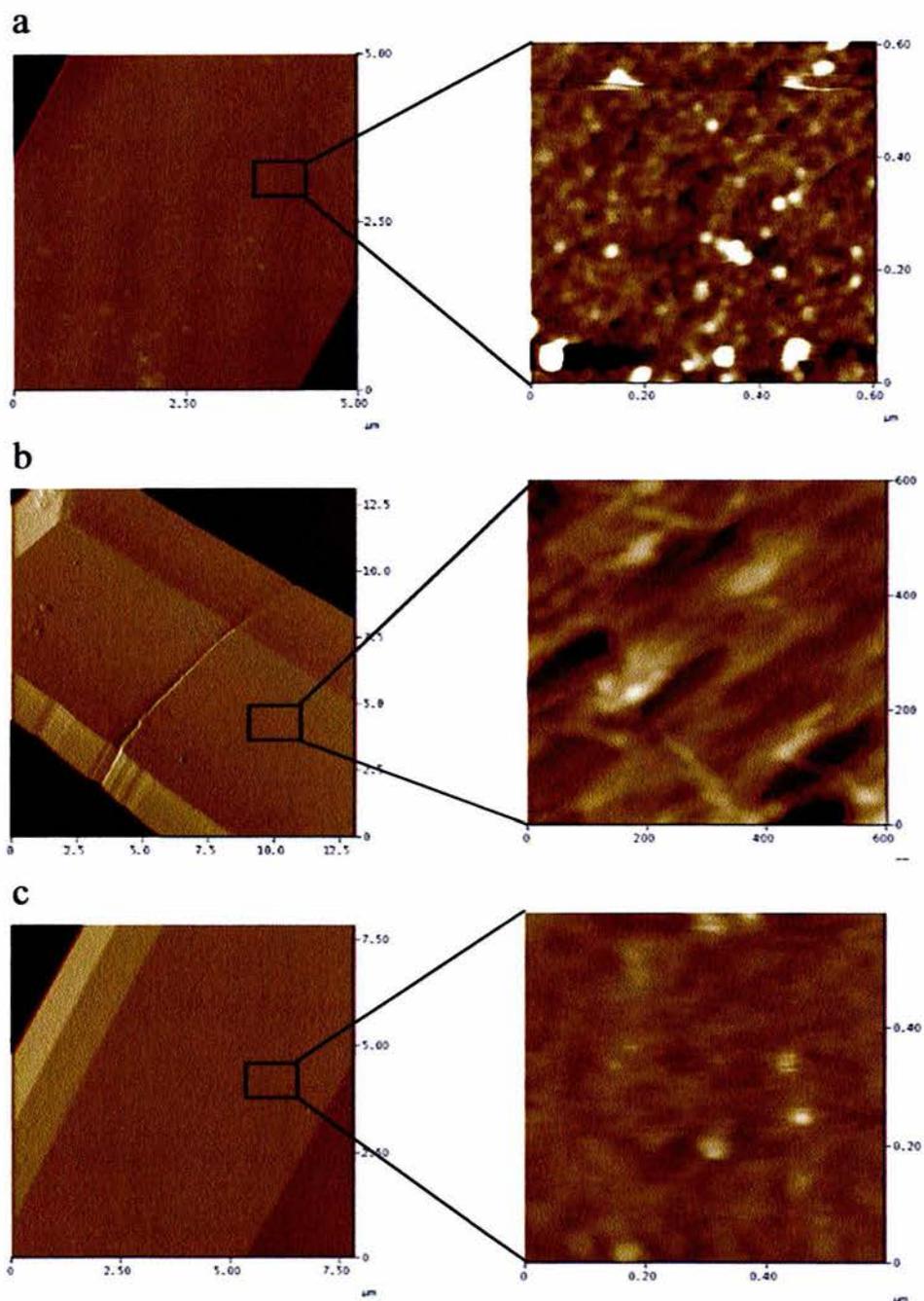


Figura 9. Micrografías de AFM de cristales de COM de la testa del frijol. Las micrografías de la parte lateral muestran acercamientos a la superficie del cristal de las micrografías superiores. a) Cristal lavado con agua en donde se muestran las nanoesferas de materia orgánica. b) Cristal lavado con hipoclorito de sodio en donde se muestran las muestras de disolución del cristal. c) Cristal tratado con pepsina en donde se ve la disolución parcial de las nanoesferas orgánicas.



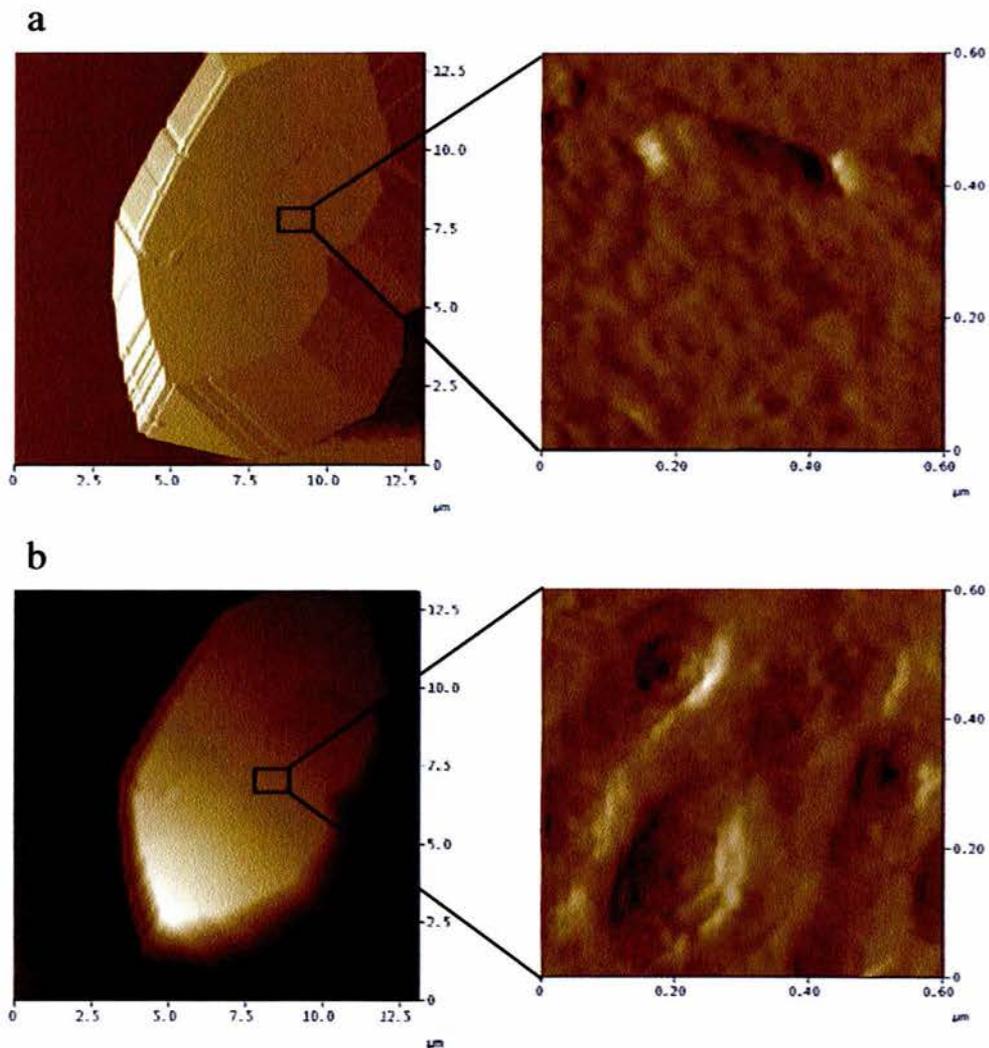


Figura 10. Micrografías de AFM de cristales de COM sintéticos. Las micrografías de la parte lateral muestran acercamientos a la superficie del cristal de las micrografías superiores. a) Cristal lavado con hipoclorito de sodio. b) Cristal tratado con EDTA 5 %.



Capítulo 3

Caracterización bioquímica de la matriz



3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Aislamiento de la matriz proteica asociada a los cristales

Para aislar la matriz proteica asociada a los cristales de oxalato de calcio de la testa del frijol, éstos fueron disueltos en una solución de EDTA al 5 % a 4 °C con agitación constante durante 4 días. La solución resultante fue dializada exhaustivamente contra un amortiguador de acetatos 100 mM pH 5.6 y se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min. El sobrenadante, con la fracción proteica soluble fue concentrado por ultrafiltración en un AMICON® con una membrana de corte de 3 kDa y caracterizado por SDS-PAGE. El botón con la fracción proteica insoluble fue resuspendido en una solución 8 M de urea y se caracterizó por SDS-PAGE.

3.1.2 Identificación de las proteínas con afinidad por el oxalato de calcio y purificación de las principales proteínas de la matriz

Debido a que necesariamente las proteínas que intervienen directamente en la regulación de la biomineralización deben de tener una gran afinidad por los cristales de oxalato de calcio, se procedió a determinar las proteínas que presentaban una mayor afinidad por los cristales de este mineral. Para lo cual se pusieron a incubar cristales de oxalato de calcio sintéticos en la fracción soluble de la matriz durante 24 hrs en agitación constante a 4°C. Los cristales sintéticos de oxalato de calcio se obtuvieron al mezclar soluciones 2mM de cloruro de calcio y 20 mM de oxalato de potasio (para asegurarse la predominancia de COM), la solución se mantuvo en agitación constante durante cuatro horas a temperatura ambiente y los cristales se recuperaron por centrifugación y se lavaron con agua destilada. Después de las 24 hrs de incubación los cristales de oxalato de calcio se lavaron exhaustivamente con agua destilada para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente a los cristales. Posteriormente, se utilizó una solución de 5 % (w/v) de EDTA pH 7.2 para extraer las proteínas unidas específicamente que mostraron afinidad por el oxalato de calcio. La solución de EDTA con las proteínas se dializó exhaustivamente contra un amortiguador de



acetatos 100 mM pH 5.6, se concentró por ultrafiltración con una membrana de corte de 3 kDa y se caracterizó por SDS-PAGE.

La solución resultante de la incubación, con las proteínas que mostraron afinidad por el oxalato de calcio, se pasó por una columna de filtración molecular Superdex 200 HR previamente equilibrada con un amortiguador de acetatos 100 mM pH 5.6 más 150 mM de cloruro de sodio, por medio de este procedimiento se obtuvo una proteína pura de 27 kDa (COMA2). Paralelamente la solución que resultó de la primera incubación de los cristales con la solución de proteínas de la matriz, también se sometió a una segunda y tercera incubación (con el mismo método reportado arriba), con lo cual se obtuvo una proteína pura de 250 kDa (COMA1).

3.1.3 Identificación de las glicoproteínas presentes en la matriz

El extracto crudo de las proteínas se corrió en un gel de poliacrilamida al 12 % y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la membrana se cortó en diferentes tiras y cada una de ellas fue teñida con Ponceau S (Sigma P-3504) para detección de proteínas totales, ácido peryódico-Schiff (Sigma S-5133) para detección de glicoproteínas totales y con azul de Alcian (Sigma A-5268) para glicoproteínas con azúcares cargados negativamente.

Tinción con ácido peryódico-Schiff:

1. Se lavó la membrana durante 5 min en agua destilada.
2. Se incubó la membrana en una solución de 1 % de ácido peryódico en 3% de ácido acético durante 30 min.
3. Se lavó en agua destilada tres veces durante 5 min.
4. Se lavó en una solución 0.1 % de metabisulfito de sodio dos veces durante 5 min.
5. Se incubó durante 15 min en el reactivo de Schiff.
6. Se lavó la membrana en una solución 0.1 % de metabisulfito de sodio dos veces durante 5 min.



Tinción con azul de Alcian:

1. Se lavó la membrana durante 5 min en agua destilada.
2. Se incubó en una solución 0.125 % de azul de Alcian en 10 % de ácido acético durante dos horas.
3. Se destiñó la membrana en una solución al 10 % de ácido acético, hasta que las bandas fueron visibles.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Proteínas de la matriz asociadas a los cristales de oxalato de calcio

Varias proteínas han mostrado su importancia en la biomineralización en sistemas animales, comúnmente formando una matriz compleja (5, 20 y 26). En plantas también se han reportado proteínas que forman una matriz, que son importantes en la biomineralización del oxalato de calcio y pueden afectar la precipitación y morfología de este mineral (23, 26 y 27). En este estudio se encontró una matriz proteica asociada a los cristales de COM de la testa del frijol común, el porcentaje en peso de las proteínas en relación al peso total del cristal fue de aproximadamente 0.01 %, esta relación es muy similar a la encontrada en los moluscos (4) y erizos de mar (8), no así en los cálculos renales en donde alcanza casi el 2 % del peso total (27 y 65). La matriz proteica mostró dos componentes principales, una fracción soluble y una fracción insoluble en amortiguadores acuosos. La composición proteica de la fracción soluble de la matriz determinada por SDS-PAGE está compuesta por varios polipéptidos con pesos aproximados de 17, 24, 27, 42, 52, 68 y 250 kDa (Fig. 11a), hasta ahora no hay reportes de la composición proteica de la fracción soluble de la matriz asociada a los cristales de oxalato de calcio de otras especies vegetales, por lo cual no hay un punto de comparación. La fracción insoluble solo mostró dos polipéptidos con pesos aproximados de 55 y 60 kDa (Fig. 11b), un estudio anterior mostró el mismo número de proteínas y con pesos similares (26), lo cual nos podría indicar, que al igual que en la biomineralización en animales, la fracción insoluble de la matriz estaría compuesta solo por unas pocas proteínas muy similares entre sí y conservadas en todas las especies vegetales que biomineralizan oxalato de calcio.



Debido al método de extracción de los cristales y de las proteínas mismas, podemos deducir que estas proteínas son intracristalinas, como se ha reportado anteriormente en animales (8) y plantas (27), esta característica las hace muy difíciles de manejar, ya que se agregan y precipitan muy fácilmente, aun las proteínas de la fracción soluble.

3.2.2 Identificación y purificación de la proteínas con afinidad por los cristales de oxalato de calcio

Se determinaron las proteínas de la matriz que mostraron afinidad por los cristales de oxalato de calcio mediante el experimento de incubación, estas fueron las de pesos moleculares aproximados de 27, 42, 68 y 250 kDa (Fig. 11c). Cuando se realizaron experimentos de incubación sucesivos, se observó que las proteínas de 27, 42 y 68 kDa disminuían su concentración muy rápidamente enriqueciendo en el extracto crudo a la proteína COMA1, cuando se llevó a cabo la tercera incubación esta proteína se obtuvo con un grado de pureza de cerca del 98 % (Fig. 11d). Lo anterior demuestra la gran afinidad que COMA1 tiene por el oxalato de calcio. Cuando las proteínas que mostraron afinidad por el oxalato de calcio fueron fraccionadas en una columna de exclusión molecular se obtuvo la proteína de 27 kDa (COMA2) con un 90 % de pureza en estado monomérico en la última fracción (Fig. 11e). En las demás fracciones se obtuvo una mezcla de las otras proteínas y de COMA2 con diferentes grados de agregación (Fig. 12). La proteína COMA1 debido a su estado de agregación no pudo pasar por la columna, por lo cual se optó por el método de la incubación con cristales de COM, antes descrito, para purificarla.



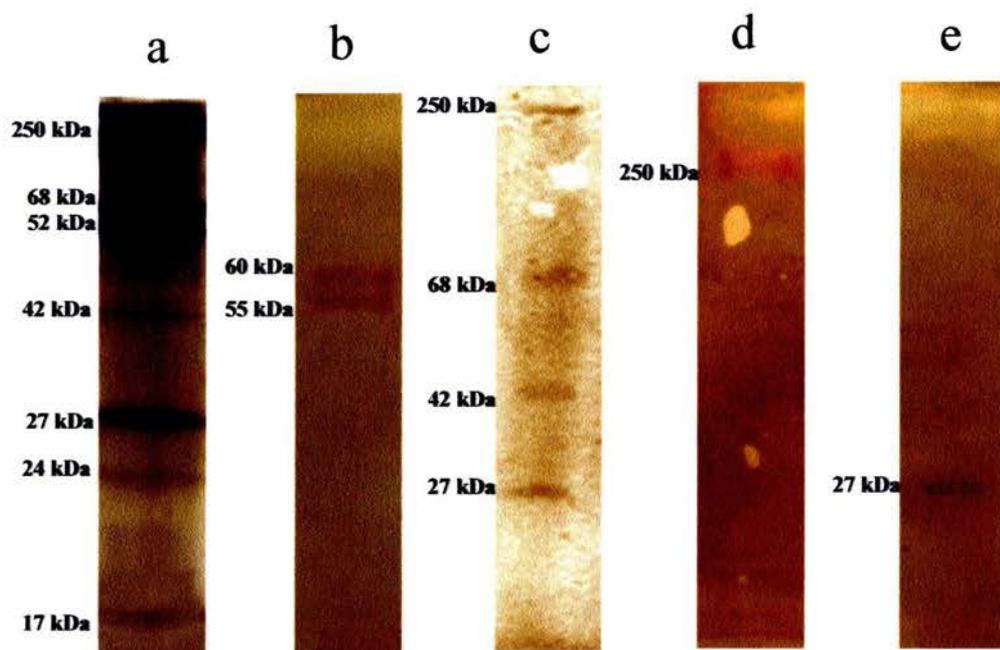


Figura 11. SDS-PAGE de las proteínas de la matriz. a) Extracto crudo de la fracción soluble. b) Extracto crudo de la fracción insoluble. c) Proteínas con afinidad por el oxalato de calcio producto de la primera incubación. d) Proteína COMA1. e) Proteína COMA2.

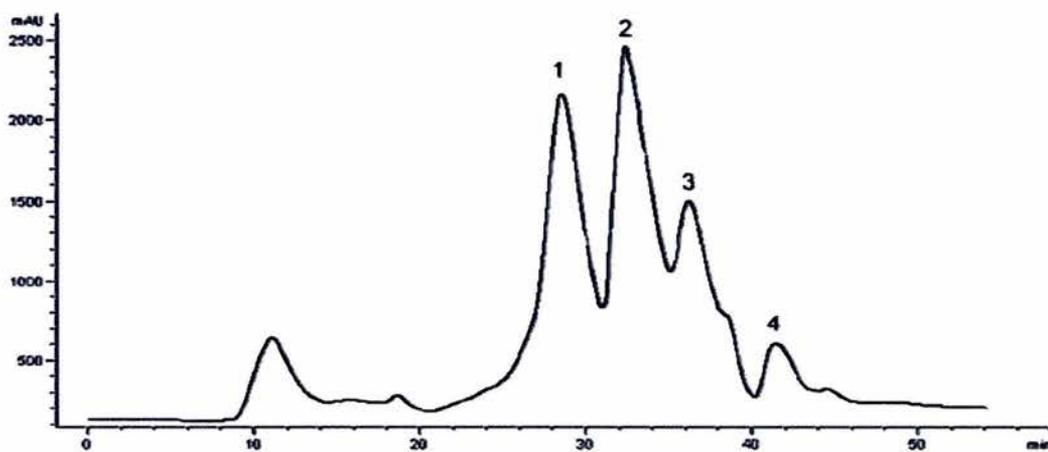


Figura 12. Cromatograma de exclusión molecular de las proteínas con afinidad por el oxalato de calcio.



3.2.3 Identificación de las proteínas glicosiladas de la matriz

Las tinciones con ácido peryódico-Schiff y azul de Alcian mostraron proteínas con diferentes grados de glicosilación. La tinción con azul de Alcian tiñe específicamente glicoproteínas con azúcares cargados negativamente, solo la proteína de 55 kDa se tiñó con azul de alcian (Fig. 13a), la tinción con ácido peryódico-Schiff tiñe glicoproteínas con azúcares neutros o cargados, las proteínas 27, 35 y 55 kDa se tiñeron con este método lo cual demuestra su estado de glicosilación (Fig 13b). Es importante mencionar que las proteínas relacionadas con la biomineralización en otros sistemas muestran también diferentes grados de glicosilación, se ha propuesto que los azúcares de las glicoproteínas pueden actuar directamente sobre las caras de los cristales, envenenándolas y modificando su velocidad de crecimiento y regular así la forma y crecimiento del biomineral, por lo cual el hecho de que las proteínas encontradas por nosotros estén glicosiladas es un posible indicativo de que pueden actuar regulando la biomineralización del oxalato de calcio en la testa del frijol.

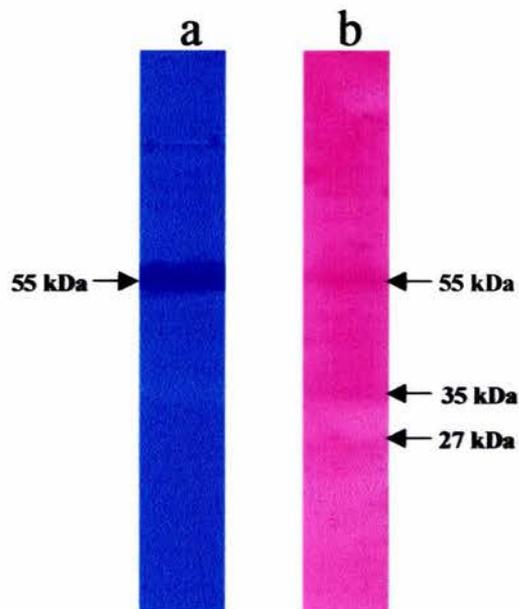


Figura 13. Tinciones para detectar glicoproteínas. a) Tinción con azul de Alcian. B) Tinción con ácido peryódico-Schiff.



Capítulo 4

Interacciones proteína-cristal.



4.1 Material y métodos

4.1.1 Ensayos de los efectos de las proteínas sobre la nucleación

Para determinar los efectos de las proteínas de la matriz sobre la nucleación del COM se diseñaron una serie de experimentos que consistieron en medir la nucleación por medio de la turbidez de una solución, para esto se preparó una solución 20 mM de oxalato de potasio y una solución 2 mM de cloruro de calcio en amortiguador de acetatos 150 mM pH 5.6 y posteriormente fueron filtradas por membranas de 0.22 μm de tamaño de poro inmediatamente antes de realizar los experimentos, 500 μL de cada una de las soluciones fue mezclada en una cubeta de espectrofotómetro y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 620 nm a intervalos de 12 segundos durante un minuto con un espectrofotómetro SmartSpec (Biorad). La precipitación del oxalato de calcio se inició inmediatamente después de que se pusieron en contacto las dos soluciones, transcurrido un minuto de experimentación las medidas de la absorbancia se hicieron muy irregulares, esto debido a que los microcristales empezaron a precipitarse. Paralelamente al control, se realizaron experimentos introduciendo a la cubeta diferentes concentraciones del extracto crudo de la matriz, las proteínas purificadas COMA 1, COMA 2, ácido aspártico (Sigma A-9256), lisina (Sigma A-9256), albúmina de suero bovino (BSA) (Merck 12018) y ovocleidina-17 (oc-17) (proteína relacionada con la biomineralización de cascarones de huevo de aves purificada en nuestro grupo de trabajo (66)). Las concentraciones fueron 1.0, 2.5 y 5.0 μg totales en la solución. Cada experimento se repitió al menos cinco veces para determinar su reproducibilidad y se promediaron los valores. En todos los casos la cuantificación de proteínas fue determinada por el método de Lowry.

4.1.2 Ensayos *in vitro* de la interacción proteína cristal

Por otro lado, se estudió la modificación morfológica de los cristales de COM, debido a la presencia del extracto crudo de la matriz, COMA1 y COMA2. Esto se realizó colocando un 1 ml de una solución de oxalato de potasio 2 mM en una bolsa de diálisis con corte de 3500 Da, a esta solución se le adicionaron concentraciones totales de proteína de 0, 2.5, 5,



15 y 25 μg , la bolsa fue sellada y se introdujo en un recipiente con 40 ml de una solución de cloruro de calcio 0.5 mM. El recipiente fue sellado para evitar cambios de concentración en las soluciones y se mantuvo sin agitación a 4° C durante una semana. Todas las soluciones fueron preparadas en amortiguador de acetatos 150 mM pH 5.6 y filtradas por membranas de 0.22 μm de tamaño de poro inmediatamente antes de realizar los experimentos. Posteriormente fue extraída la solución del interior de la membrana y filtrada por membranas de celulosa de 0.22 μm de tamaño de poro, los cristales fueron retenidos en la membrana y se lavaron con agua destilada. La membrana con los cristales fue montada en un portamuestra de aluminio y se cubrió con oro para observarla por SEM (JEOL 5410 LV).

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Efecto de las proteínas sobre la nucleación del oxalato de calcio

La nucleación del oxalato de calcio se inició inmediatamente cuando se puso en contacto la solución de oxalato de sodio y de cloruro de calcio, la solución se empezó a poner turbia por la aparición de núcleos de oxalato de calcio, por lo que aumentó su absorbancia a 620 nm en el espectrofotómetro. El aumento en la absorbancia fue un indicativo del aumento en la aparición de núcleos.

Se observó una fuerte inhibición de la nucleación del oxalato de calcio debido a la presencia de las proteínas de la matriz, tanto del extracto crudo como de las proteínas aisladas, en ambos casos la inhibición fue dependiente de la concentración. Hubo una diferencia notable en cuanto al grado de inhibición de las diferentes proteínas y el extracto crudo como se muestra en la figura 14 (a-d). El extracto crudo mostró una mayor inhibición que la proteína COMA2, pero una menor inhibición que la proteína COMA1, esto puede deberse a que en el extracto crudo hay concentraciones diferentes de estas dos proteínas. Este fenómeno puede deberse a que en el extracto hay una mezcla de proteínas que pueden inhibir o promover la nucleación y que todas ellas actúen de una manera sinérgica para regular la biomineralización del oxalato de calcio en el interior de la planta.



Contrariamente, un estudio anterior reportó que el extracto crudo de la matriz de los cristales de oxalato de calcio del jitomate y tabaco promovían la nucleación (27), estos resultados opuestos a los encontrados por nosotros, pueden deberse a que en el jitomate y el tabaco hay otro grupo de proteínas que actúan de una forma diferente para controlar la biomineralización en esas plantas y esta diferencia podría deberse a que los cristales encontrados en el frijol presenta morfologías diferentes a los cristales encontrados en el jitomate y tabaco. La inhibición causada por el extracto crudo y por las proteínas COMA1 y COMA2 fue muy superior en comparación con las otras proteínas y aminoácidos estudiados, aunque no obstante la BSA y la oc-17 causaron una pequeña inhibición (Fig. 15), que podría explicarse por una interacción no específica de cargas o por la afinidad que presentan estas proteínas por el calcio. Estos resultados demuestran la especificidad de las proteínas de la matriz para inhibir la nucleación del oxalato de calcio.

4.2.2 Interacción de las proteínas con el oxalato de calcio

Los cristales de oxalato de calcio crecidos en presencia de las proteínas de la matriz mostraron una morfología diferente a los crecidos en ausencia de ellas. En condiciones normales los cristales de oxalato de calcio muestran tres caras principales la {100}, la {120} y la {010}. El extracto crudo de las proteínas de la matriz y las dos proteínas aisladas modificaron específicamente la cara {120} del cristal de oxalato de calcio, esta cara se redondeó y desapareció cuando la concentración de proteínas llegó a 25 $\mu\text{g/ml}$, la cara {100} y la cara {010} no se modificaron ni en forma ni en tamaño. Esta modificación hizo que los cristales de oxalato de calcio se redondearan y alargaran (Fig. 16). Reportes similares han sido hechos por Bouropoulos y col. (27); sin embargo, aunque ellos mencionan la interacción específica de las proteínas de la matriz del jitomate y tabaco sobre la cara {120}, los cristales no mostraron la misma morfología que los obtenidos por nosotros.

El nivel de modificación de la cara del cristal sólo varió en magnitud con el extracto y las dos proteínas. El extracto crudo fue el que modificó de una manera mas evidente la cara {120} (Fig. 16) a concentraciones de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ modificó de manera visible al cristal y a



concentraciones de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la cara $\{120\}$ se perdió. Las proteínas COMA1 y COMA2 modificaron en menor grado, siendo la proteína COMA1 la que modificó de manera visible al cristal solo a concentraciones de 25 μg .

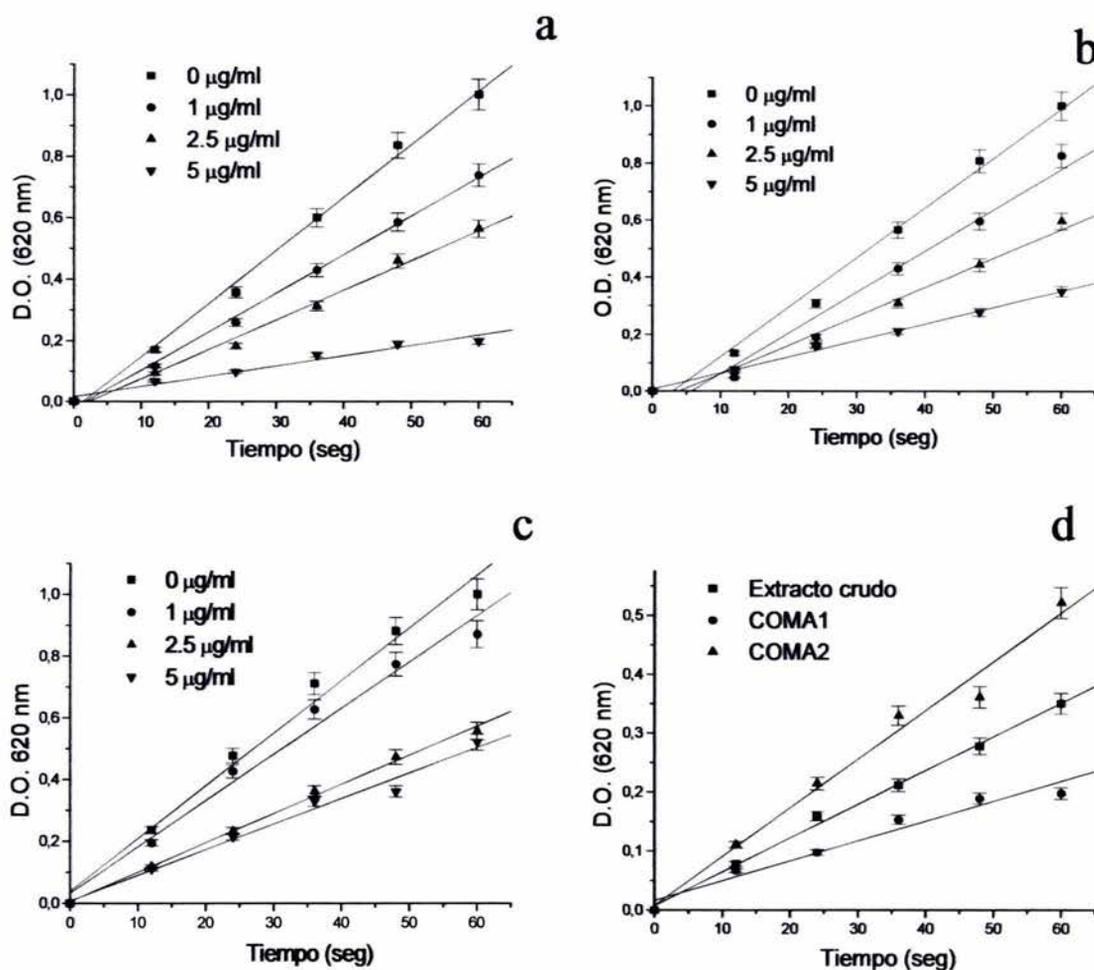


Figura 14. Efecto de las proteínas sobre la nucleación del oxalato de calcio. a) efecto del extracto crudo sobre la nucleación del oxalato de calcio a diferentes concentraciones. b) efecto de COMA1 a diferentes concentraciones. c) efecto de COMA1 a diferentes concentraciones. d) comparación de la inhibición de la nucleación del oxalato de calcio con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto crudo y de las proteínas COMA1 y COMA2.



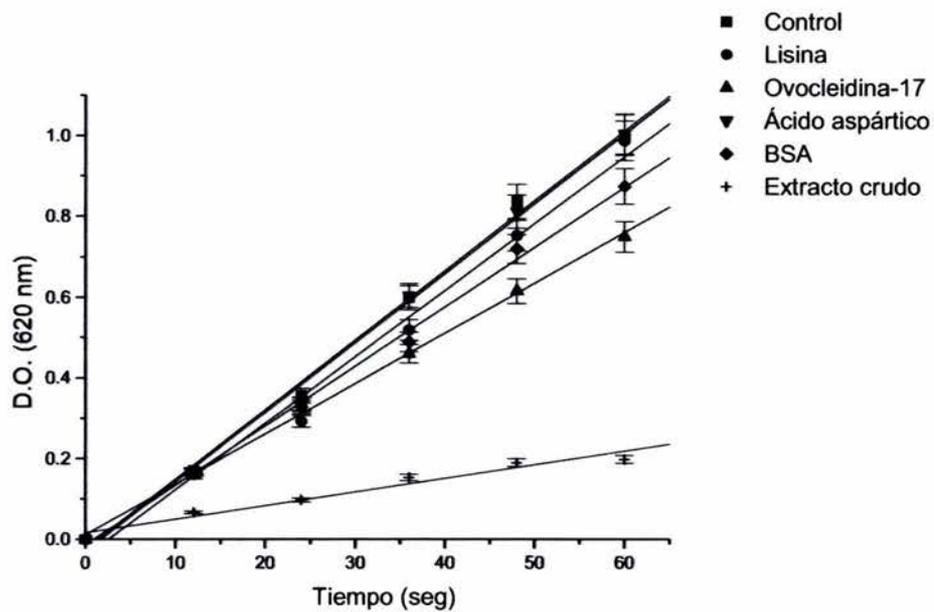


Figura 15. Comparación de la inhibición de la nucleación del oxalato de calcio sin ningún aditivo, con el extracto crudo, lisina, ovocleidina-17, ácido aspártico, albúmina de suero bovino. La gráfica muestra los experimentos a concentraciones de 5µg/mL, tanto de las proteínas como de los amino ácidos.



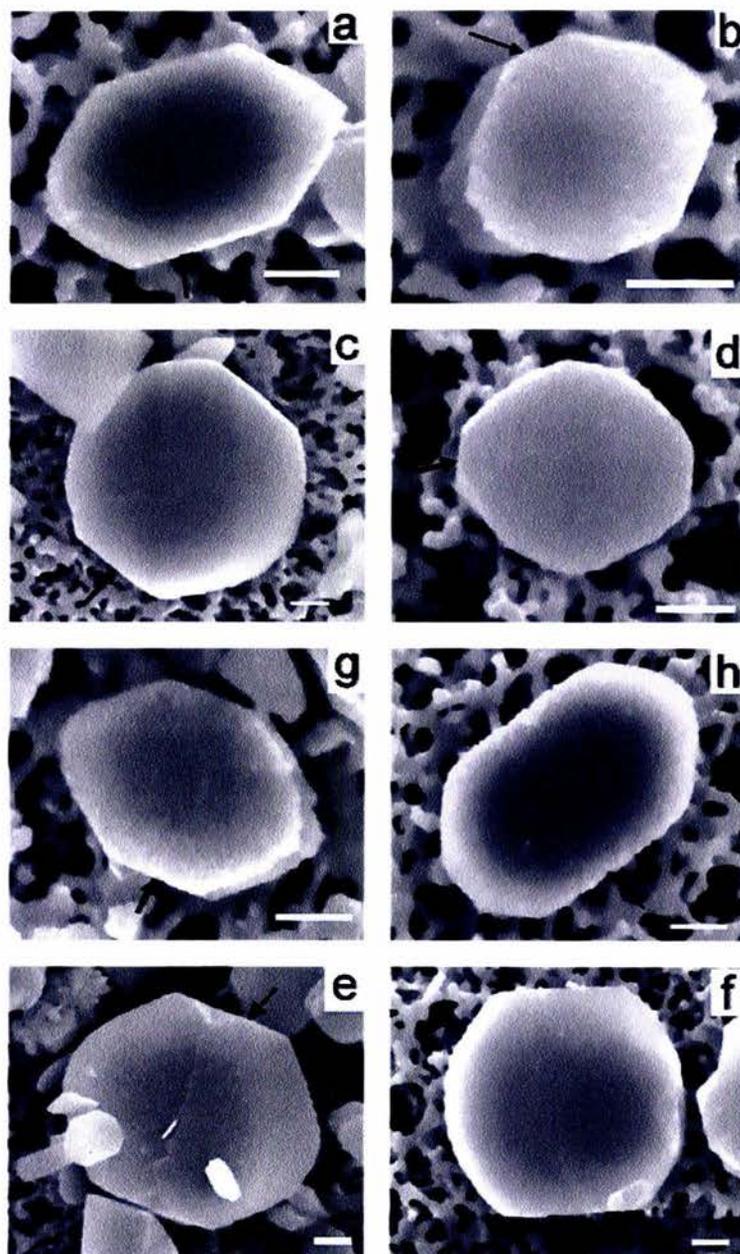


Figura 16. Cambios morfológicos de los cristales de oxalato de calcio. a) cristal crecido en ausencia de proteínas. b) cristal crecido con 2.5 µg/mL del extracto crudo. c) cristal crecido con 15 µg/mL del extracto. d) cristal crecido con 25 µg/mL del extracto crudo. e) cristal crecido con 2.5 µg/mL de COMA1. f) cristal crecido con 25 µg/mL de COMA1. g) cristal crecido con 2.5 µg/mL de COMA2. h) cristal crecido con 25 µg/mL de COMA2 (las flechas indican la cara {010}). Escala: 1µm.



4.2.3 Arreglo cristalino de las caras de los cristales de oxalato de calcio

El arreglo cristalino de las caras $\{100\}$ y $\{010\}$ (no modificadas por las proteínas de la matriz) muestra dos posiciones diferentes de los iones oxalato, unos se encuentran en posición paralela y los otros en posición perpendicular a la cara del cristal, estas caras son muy estables y con cargas balanceadas (Fig. 17) lo cual hace que estas sean muy estables y no sean modificadas por las proteínas (27). La cara $\{120\}$ muestra a los iones oxalato emergiendo en forma oblicua de las caras del cristal con una alta densidad de iones calcio lo que podría facilitar la interacción de macromoléculas cargadas negativamente (véase fig. 17). Estudios *in vitro* han sugerido que macromoléculas con un alto contenido de grupos funcionales aniónicos juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y agregación de los cristales de COM en la orina humana (65, 67 y 68). Recientemente Touryan y col. (69) incorporaron moléculas fluorescentes a cristales de oxalato de calcio monohidratado e identificaron el sitio exacto de unión de estas moléculas. Ellos identificaron la cara $\{120\}$ como el sitio de unión de las moléculas fluorescentes, las cuales provocaron la misma modificación que las macromoléculas estudiadas en este trabajo. Es importante mencionar que sólo moléculas cargadas negativamente tuvieron la capacidad de unirse a la cara antes mencionada y que moléculas cargadas positivamente no tuvieron ningún efecto sobre el cristal (69). Extrapolando los resultados anteriores se puede concluir que las macromoléculas asociadas a los cristales de oxalato de calcio están cargadas negativamente en las condiciones estudiadas.

Por otro lado, es importante mencionar que también se observó la presencia de una pequeña cantidad de cristales de oxalato de calcio dihidratado (COD) en todos los experimentos en donde se modificó la morfología de los cristales de COM, pero esos cristales no tuvieron ninguna modificación en ningún caso y con ninguna proteína (Fig. 18). Esto es debido probablemente a que los cristales de COD poseen una gran cantidad de moléculas de agua en las superficies cristalinas, lo cual reduce considerablemente las cargas superficiales de las caras (Fig. 19) (70). Todo lo anterior demuestra que en las interacciones proteína-cristal es importante la densidad de cargas de los grupos funcionales de las proteínas, así como el espaciamiento de estos grupos con relación a la geometría local de la cara mineral. Esto



determina la especificidad de las proteínas para regular el crecimiento de determinadas caras de los cristales, así como la especificidad para regular el crecimiento y morfología de polimorfos específicos de los minerales (en este caso regular el crecimiento y morfología de los cristales de COM y no los de COD).

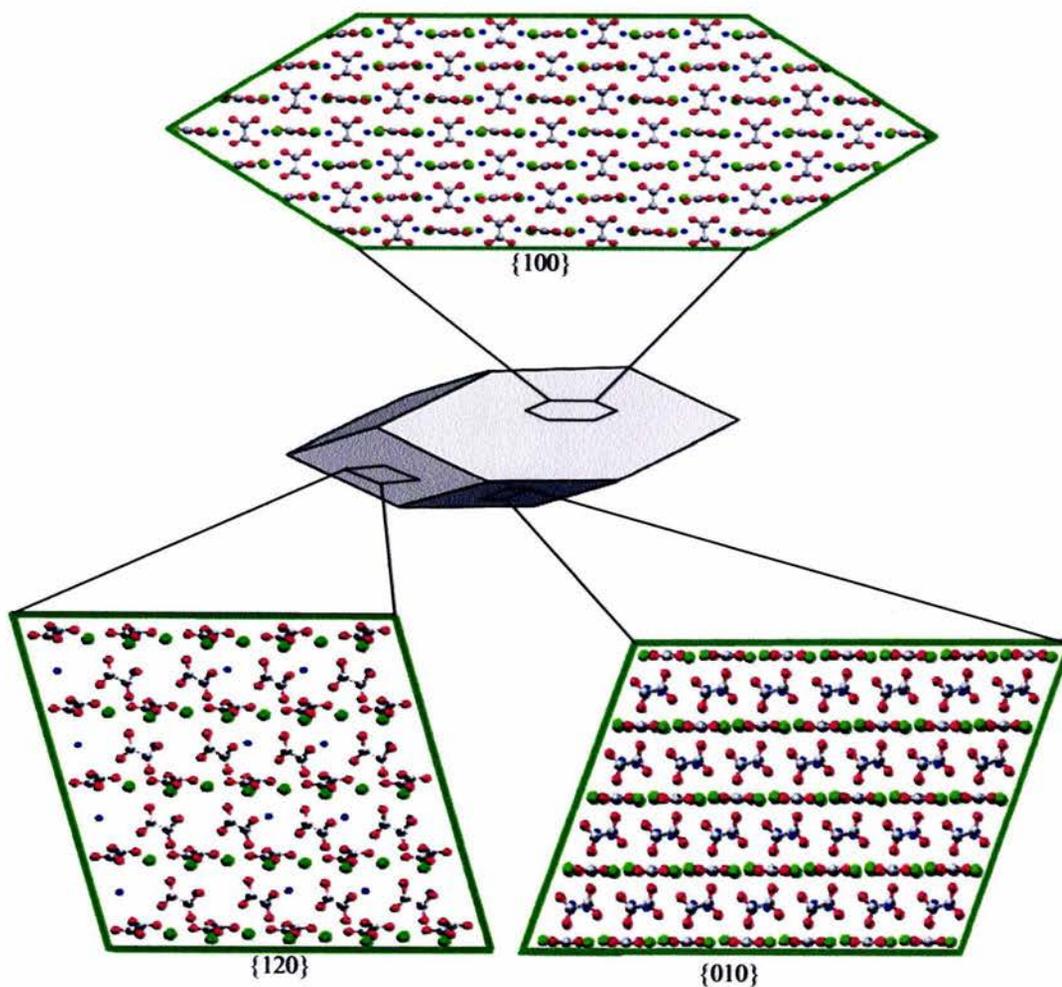


Figura 17. Arreglo cristalino en las caras $\{100\}$, $\{010\}$ y $\{120\}$. Calcio=verde, azul=agua, rojo=oxígeno, gris=carbono. Diagramas realizados con los programas Shape 7.0 y Mercury 1.2.1.



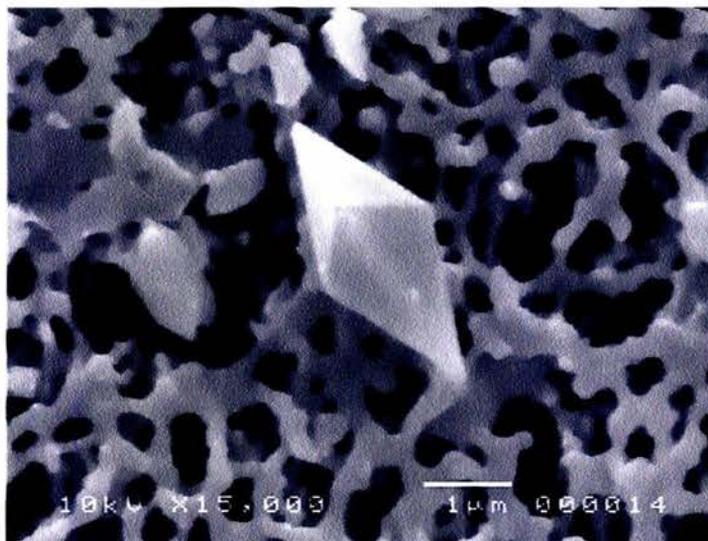


Figura 18. Cristal de oxalato de calcio dihidratado, mostrando su morfología bipiramidal típica.

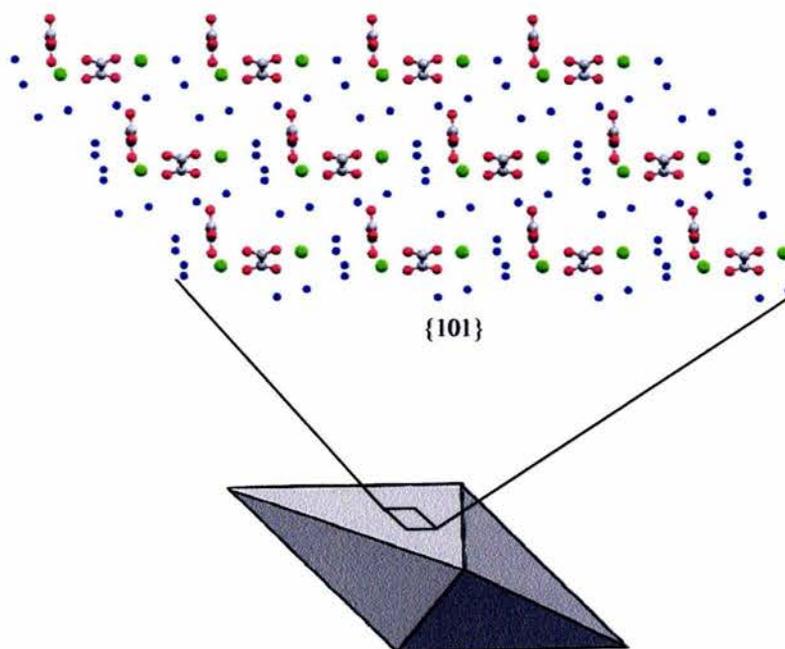


Figura 19. Arreglo cristalino en la cara {101}. La estructura molecular de todas las caras de los cristales de COD son iguales Calcio=verde, azul=agua, rojo=oxígeno, gris=carbono. Diagramas realizados con los programas Shape 7.0 y Mercury 1.2.1.



Capítulo 5

Función de los cristales en las plantas



5.1 Materiales y métodos

Se evaluó la posibilidad de que los cristales en las hojas del frijol puedan actuar como depósitos de metales pesados o como almacenes de calcio. Semillas de frijol de la variedad Negro Jamapa certificadas (Rancho Los Molinos certificación SAGARPA 851/E/V/99) fueron embebidas en agua destilada por 4 horas y germinadas en vermiculita. Cuando aparecieron las hojas de los cotiledones (después de 7 días), las plantas fueron separadas en grupos y transferidas a cultivos hidropónicos con una solución nutritiva de Hoagland (Sigma H-2395) (Apéndice B) adicionada con diferentes tratamientos. Los tratamientos son descritos en la tabla 3. Las soluciones fueron cambiadas cada tres días para mantener las concentraciones de nutrientes y metales en niveles óptimos. El experimento se detuvo cuando la cuarta hoja trifoliada estuvo completamente desarrollada (después de 30 días aproximadamente). Se colectaron las hojas que estaban completamente desarrolladas, se lavaron con agua destilada y se dividieron en dos grupos.

Tabla 3. Tratamientos a los que se sometieron las plantas de frijol.

	Calcio Normal	Calcio Alta	Calcio Baja	Calcio Normal Tratamiento con Zinc	Calcio Normal Tratamiento con Plomo	Calcio Alta Tratamiento con Zinc	Calcio Alta Tratamiento con Plomo
Ca(NO ₃) ₂ (Sigma C-4955)	0.5 mM	20 mM	50 µM	0.5 mM	0.5 mM	20 mM	20 mM
Zn(CH ₃ COO) ₂ (Sigma Z-4540)	-	-	-	1 mM	-	1 mM	-
Pb(CH ₃ COO) ₂ (Sigma L-3396)	-	-	-	-	1 mM	-	1mM

Las hojas de un grupo fueron utilizadas para determinar el número de cristales de COM por centímetro cuadrado en la hoja, para lo cual fueron clarificadas sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % durante 12 horas para remover toda la clorofila, después de esto las hojas fueron lavadas exhaustivamente con agua destilada y deshidratadas en series de etanol/agua, para después infiltrarlas con xileno y montarlas en preparaciones semipermanentes para su observación. Los cristales fueron observados bajo luz polarizada en un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Zeiss) con una cámara



digital acoplada, se tomó una imagen por hoja, 12 hojas por planta y 25 plantas por tratamiento. Es decir se obtuvieron 300 imágenes por tratamiento. Se contaron los cristales dentro de una área de 6 cm² por medio del software Scion image (beta 4.0.2).

Las hojas del segundo grupo fueron utilizadas para la cuantificación del calcio insoluble y metales pesados. Las hojas fueron homogeneizadas en agua destilada, el homogeneizado fue centrifugado a 3500 rpm durante 30 min, el sobrenadante se decantó y el botón se lavó con agua destilada varias veces, posteriormente el botón fue secado a temperatura ambiente y molido hasta obtener un polvo fino, 300 mg de cada tratamiento fueron pesados y digeridos con 20 ml de HCl 3 M. Las muestras fueron filtradas por papel filtro y medidas en un espectrómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 3110). Por otro lado, también se aislaron cristales de las hojas del frijol de acuerdo a la metodología previamente descrita y se les caracterizó por medio de SEM-EDS.

5.2 Resultados y discusión.

Las leguminosas en general tienen la capacidad de tolerar grandes cantidades de metales pesados (71 y 72), el frijol puede crecer en ambientes ricos en Pb y Zn sin sufrir grandes cambios en su morfología y desarrollo, esta planta puede almacenar los metales mencionados en forma cristalina en inclusiones de carbonato de plomo y fosfato de zinc; sin embargo, aún es desconocida la localización de estas inclusiones en la planta. La presencia de metales pesados (Zn y Pb) en el medio de crecimiento del frijol en las concentraciones manejadas en este estudio no afectó la morfología externa de las plantas, pero tuvieron un crecimiento más lento, lo mismo sucedió cuando las plantas crecieron en un medio deficiente en calcio. Cuando las plantas crecieron en un medio con un exceso de calcio, no hubo ningún cambio aparente en la morfología o velocidad de crecimiento.

El número de cristales en el interior de la hoja sufrió grandes cambios con los diferentes tratamientos. Se encontraron diferencias significativas en el número de cristales con las diferentes concentraciones de calcio (en la tabla 4 se resumen los datos del conteo de cristales y su desviación estándar). Las hojas de plantas crecidas en medios con



concentraciones altas de calcio contenían un número mucho mayor de cristales que las hojas crecidas en condiciones normales de concentración de calcio, mientras que las hojas crecidas con un déficit de calcio presentaron un menor número de cristales (Fig. 20 y 21). Lo anterior demuestra una relación positiva entre las concentración de calcio en el medio de crecimiento y el número de cristales en las hojas del frijol. Estos resultados indican que los cristales de COM pueden servir para secuestrar el exceso de calcio en el frijol; sin embargo, no se puede descartar otra posible función debido a la forma y distribución de estos cristales. Los cristales en la hoja del frijol presentan una morfología prismática y en condiciones normales están principalmente distribuidos en las nervaduras de las hojas, lo que podría indicar una función de sostén o reforzamiento en esos tejidos, igualmente en la testa, los cristales se distribuyen homogéneamente a lo largo de todo el tejido, por lo que podrían también cumplir una función de reforzamiento. Cuando hay un aumento en los niveles de calcio en el medio de crecimiento, los cristales también se distribuyen en el tejido mesófilo, pero cuando hay un déficit de calcio los cristales se concentran principalmente en las nervaduras, reforzando la teoría del soporte estructural.

Tabla 4. Datos del número de cristales por cm² en las hojas de plantas de frijol con diferentes tratamientos.

	Calcio Normal	Calcio Alta	Calcio Baja	Calcio Normal Tratamiento con Zinc	Calcio Normal Tratamiento con Plomo	Calcio Alta Tratamiento con Zinc	Calcio Alta Tratamiento con Plomo
Promedio ± desv. est.	19.50±3.81	31.87±3.31	6.96±2.06	6.52 ± 2.14	5.94 ± 3.24	13.96 ± 2.65	14.21 ± 3.21

Cuando las plantas son tratadas con metales pesados hay una disminución sustancial en el número de cristales de COM en las hojas (véase fig. 20 y 21). La disminución fue similar con ambos metales pesados usados en este experimento (Zn y Pb) y no mostró diferencias significativas con la disminución en el número de cristales debido al tratamiento de déficit de calcio. Con la disminución en el número de cristales estos se distribuyeron principalmente en las nervaduras. Cuando a las plantas tratadas con Pb y Zn se les adicionó una concentración mayor de calcio (20 mM) en el medio de crecimiento hubo un aumento



en el número de cristales en comparación a las plantas en las cuales no hubo un exceso de calcio, pero siguieron teniendo menor número de cristales en comparación con las plantas que no fueron tratadas con metales pesados (véase fig. 20 y 21). Por otro lado, los datos de concentración de calcio insoluble en las hojas medidos por espectrometría de absorción atómica, corroboraron los datos del conteo de los cristales, con excepción de los datos de las plantas tratadas con Pb, en donde el calcio insoluble mostró ser mayor que en las plantas tratadas con Zn y con un déficit de calcio (Fig. 22). La espectrometría de absorción atómica mostró pequeñas cantidades de Zn y Pb en las plantas tratadas; sin embargo, el microanálisis de los cristales de COM aislados de las plantas tratadas con esos metales no mostró su presencia (Fig. 23). Lo anterior demuestra que los cristales de COM al menos en el frijol no actúan como depósitos de metales pesados, debido a que la presencia de estos afecta la producción de cristales disminuyendo su número. La disminución del número de cristales debido a la presencia de Pb y Zn, puede ser debida a que el calcio participa en la detoxificación de metales pesados y por lo tanto la planta desvía el flujo de calcio de la formación de cristales hacia las vías de detoxificación.



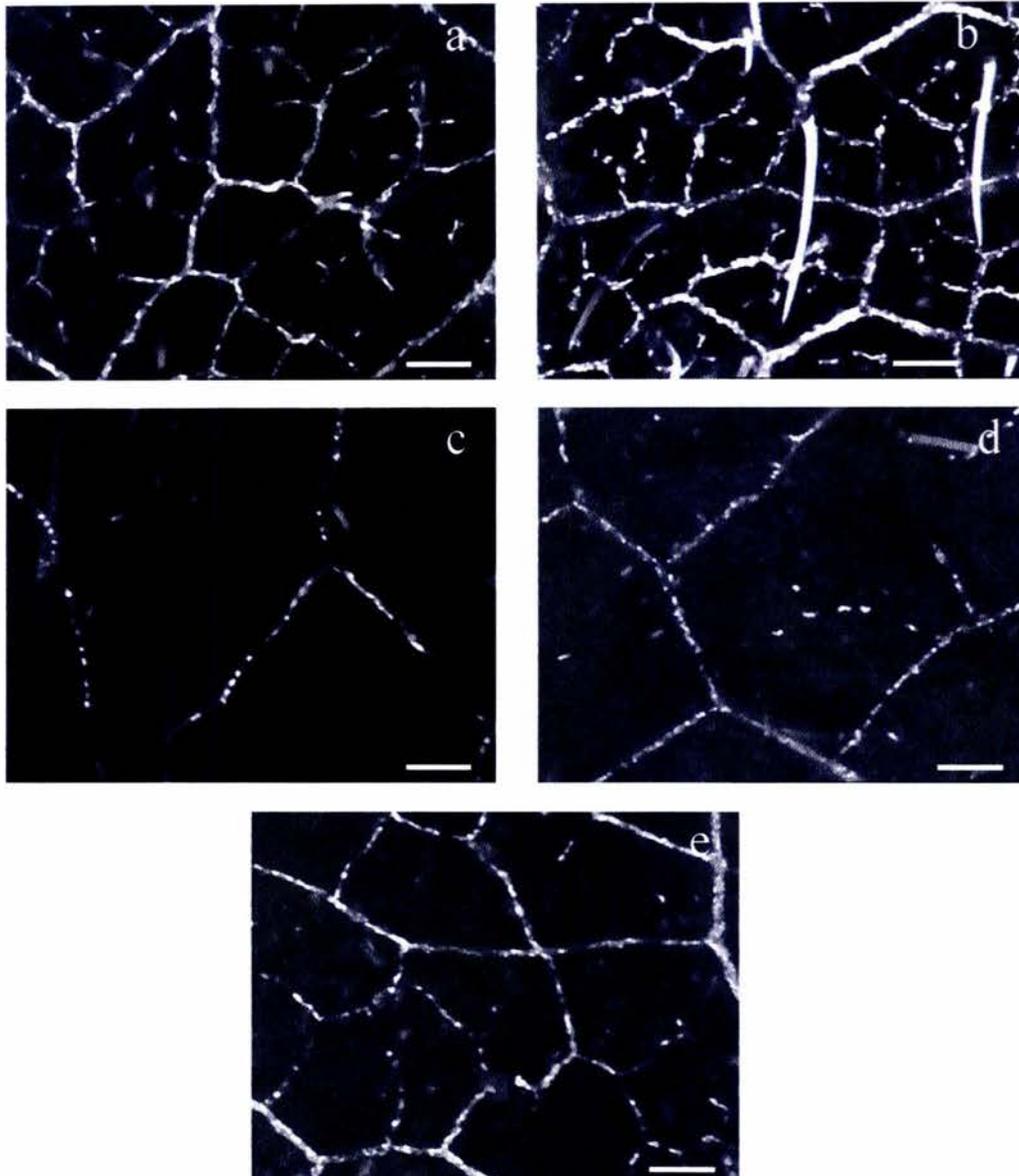


Figura 20. Imágenes de hojas clarificadas con luz polarizada, los puntos luminosos son cristales de oxalato de calcio a) Concentración normal de calcio sin metales pesados. b) Alta concentración de calcio sin metales pesados. c) Baja concentración de calcio sin metales pesados. d) Concentración normal de calcio con tratamiento con plomo. e) Alta concentración de calcio con tratamiento con plomo. Escala: 1 cm



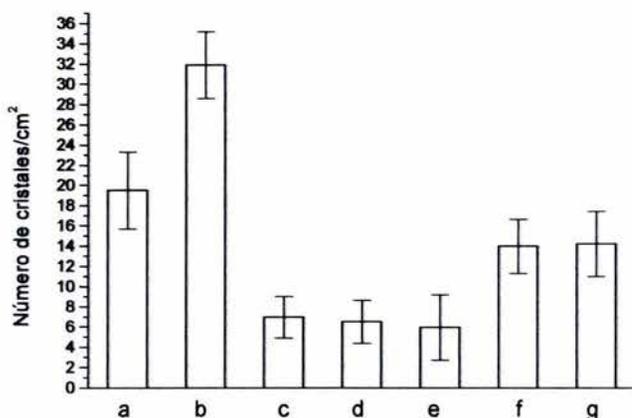


Figura 21. Número de cristales por cm² en las hojas de las plantas con los diferentes tratamientos. a) Concentración normal de calcio. b) Concentración alta de calcio c) Concentración baja de calcio. d) Concentración normal de calcio con tratamiento con zinc. e) Concentración normal de calcio con tratamiento con plomo. f) Concentración alta de calcio con tratamiento con zinc. g) Concentración alta de calcio con tratamiento con plomo.

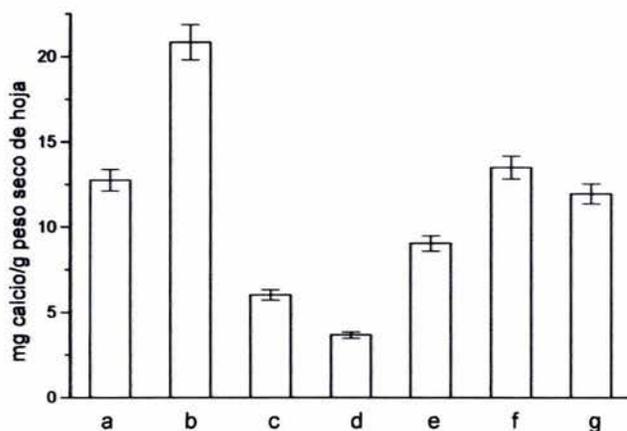


Figura 22. Calcio insoluble determinado por espectrometría de absorción atómica. a) Concentración normal de calcio. b) Concentración alta de calcio c) Concentración baja de calcio. d) Concentración normal de calcio con tratamiento con zinc. e) Concentración normal de calcio con tratamiento con plomo. f) Concentración alta de calcio con tratamiento con zinc. g) Concentración alta de calcio con tratamiento con plomo.



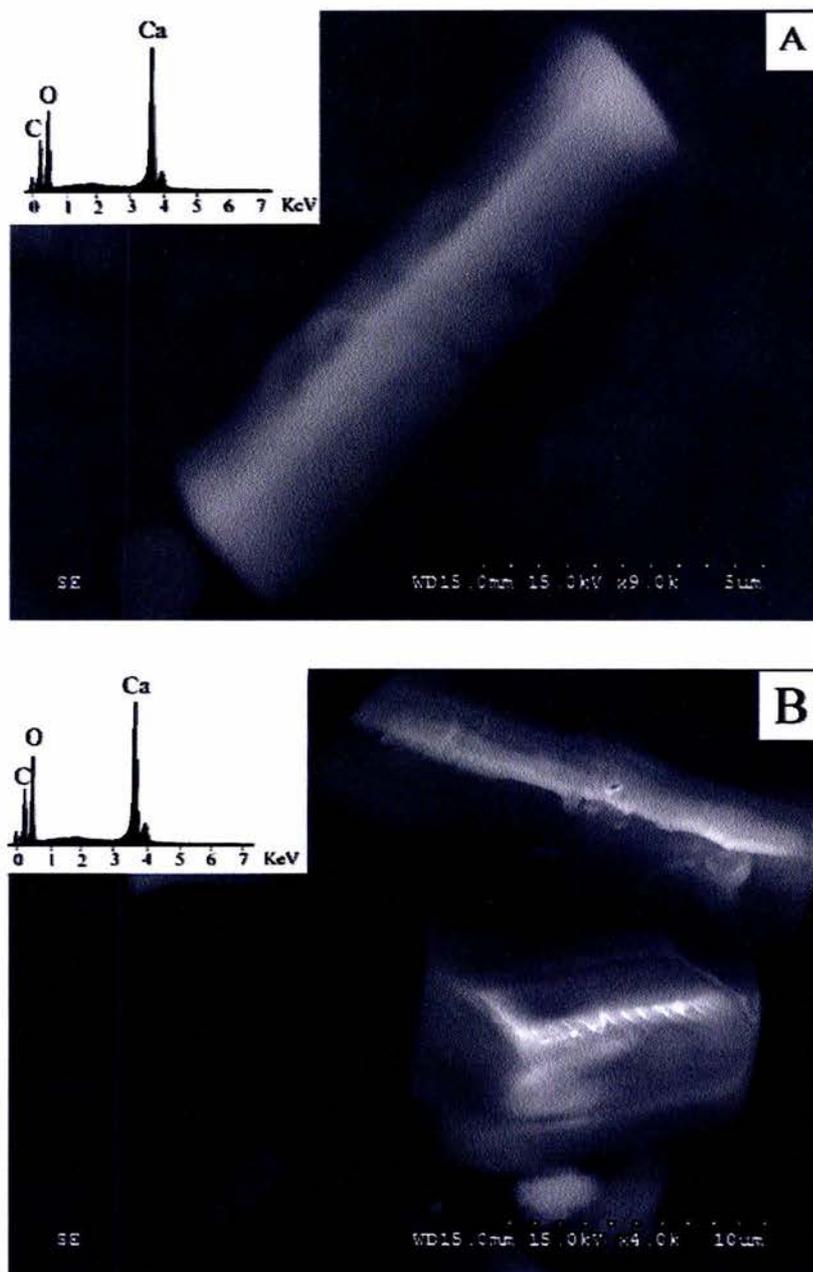


Figura 23. Micrografías de SEM de los cristales de oxalato de calcio extraídos de las hojas tratadas con metales pesados. a) Cristal aislado de las plantas tratadas con zinc, insertado en la imagen se encuentra el espectro de microanálisis del cristal. b) Cristal aislado de las plantas tratadas con plomo, insertado en la imagen se encuentra el espectro de microanálisis del cristal.



Capítulo 6

Conclusiones generales



Las plantas forman cristales de oxalato de calcio con morfologías únicas bajo condiciones bien controladas, este es un fenómeno ampliamente distribuido y parte fundamental de la fisiología de muchas especies de plantas; sin embargo es poco estudiado y comprendido. Este trabajo establece el primer estudio de la composición proteica de la matriz asociada a los cristales de oxalato de calcio en la testa del frijol común y de su interacción con los cristales de oxalato de calcio *in vitro*.

En este trabajo se encontraron proteínas asociadas a los cristales de oxalato de calcio que presumiblemente forman parte de la matriz orgánica que regula su formación y crecimiento. Esta matriz está compuesta por dos fracciones, estas son la fracción soluble, la cual está formada por al menos 6 proteínas principales de las cuales cuatro presentan una gran afinidad por el oxalato de calcio. Es importante mencionar que no hay reportes anteriores de la composición proteica de la fracción soluble de la matriz asociada a los cristales de ninguna especie vegetal, lo cual hace imposible cualquier estudio comparativo. La fracción insoluble está formada por al menos dos proteínas, las cuales sólo se pudieron solubilizar con altas concentraciones de urea. Un estudio anterior reportó el mismo número de proteínas y de pesos moleculares similares en la fracción insoluble de la matriz asociada a los cristales de *Pistia stratiotes* a los encontrados por nosotros. Los cristales en *P.stratiotes* son rafidios, por lo que se puede inferir que la fracción insoluble es de una composición constante en las diferentes especies de plantas, no importando la morfología del cristal, lo cual nos llevaría a concluir que las proteínas de la fracción soluble son las responsables de la morfología del cristal, aunque son necesarios más estudios para corroborar esta afirmación.

Se aislaron dos de las proteínas que mostraron afinidad por el oxalato de calcio y se determinó su interacción con los cristales de oxalato de calcio tanto a nivel de nucleación como de morfología. Tanto la fracción soluble de la matriz como las dos proteínas aisladas mostraron el mismo efecto en la nucleación y morfología (inhibieron la nucleación y modificaron específicamente la cara {120}). Cabe recalcar que solo la cara {120} se modificó, es decir hubo una interacción cristalográfica específica entre las proteínas y el cristal. Esto es importante ya que se ha propuesto que la regulación de la morfología y



crecimiento de los cristales producto de la biomineralización se da a través del reconocimiento cristalográfico de ciertas proteínas o macromoléculas con caras específicas del cristal, por lo que es muy importante la distribución espacial de cargas y el espaciamiento de estas en la estructura tridimensional de la proteína y en el cristal. De estos resultados se puede concluir que las proteínas son primordiales para la regulación de la biomineralización; sin embargo, no pueden ser descartados otros factores (tanto bióticos como abióticos) que puedan participar en esta regulación.

Se identificaron glicoproteínas en la fracción soluble de la matriz, esto es importante debido a que en todos los estudios anteriores sobre biomineralización se ha reportado la presencia de glicoproteínas y se les ha dado un papel crucial en la regulación del crecimiento y forma del cristal. Por lo cual las glicoproteínas presentes en la matriz de los cristales de oxalato de calcio en el frijol pueden ser muy importantes en la regulación de este proceso.

En este trabajo se pudo determinar que una de las funciones primordiales de los cristales de oxalato de calcio en el frijol es actuar como depósitos de calcio, por otro lado la morfología y distribución de estos cristales parece indicar también una función de soporte estructural; sin embargo no actuaron como depósitos de metales pesados, por lo que se descarta su participación en la detoxificación de este tipo de metales, al menos en el frijol. Es importante mencionar que otros estudios le han otorgado funciones de protección a cristales de oxalato de calcio de forma acicular, cristales de forma prismática nunca han sido relacionados con esta función. De esto se puede inferir que la morfología de los cristales de oxalato de calcio en el interior de la planta determina su función, esto explicaría, en parte, la variedad de morfologías que las plantas le confieren a los cristales de oxalato que precipitan en su interior.

Aun hay mucho que descubrir acerca de la formación y función de los cristales de oxalato de calcio en plantas. No se tiene el conocimiento exacto de cuantas proteínas están involucradas en la formación de los mismos, ni la función específica de cada una de ellas, no se conoce la interacción proteína-cristal a nivel molecular ni los mecanismos de regulación de la formación de los cristales. Por lo anterior, éste es un campo muy fértil para



investigaciones multidisciplinarias. Pruebas inmunoquímicas y moleculares, pueden proveernos de información acerca de la localización y expresión específica de proteínas relacionadas con la cristalización dentro de los idioblastos. Experimentos con sondas fluorescentes para calcio, pueden darnos medidas exactas de los gradientes en concentración de calcio alrededor y dentro de los idioblastos para poder encontrar los mecanismos de regulación. Son necesarios análisis de las secuencias de las proteínas involucradas en la biomineralización y estudios a nivel estructural son fundamentales para aclarar como es estas proteínas regulan el crecimiento de los cristales dentro de la célula, estos análisis pueden revelar características morfológicas determinantes en los diferentes tipos de cristales sintetizados por la planta, así como en las proteínas que regulan su crecimiento.

Con un conocimiento más profundo de este fenómeno, se podrán realizar diversas aplicaciones para el beneficio del ser humano. Por ejemplo en el desarrollo de plantas modificadas genéticamente (que produzcan una mínima cantidad de oxalato), para que puedan ser una fuente importante de calcio en la dieta del humano (el oxalato es considerado un antinutriente debido a que secuestra varios minerales necesarios en la dieta del humano) y por otro lado evitar el riesgo de envenenamiento (el oxalato es considerado un potente veneno) o formación de cálculos renales (los cálculos renales son formados en su mayoría por oxalato de calcio). Se podrán desarrollar materiales biocompatibles diseñados molecularmente para múltiples aplicaciones, como la formación de implantes óseos o dentales sin el riesgo de incompatibilidad o corrosión de los materiales. Igualmente se podrán desarrollar nuevas alternativas para curar enfermedades propias de la vida moderna, como la formación de cálculos renales o la formación imperfecta de huesos y dientes.



Capítulo 7

Bibliografía



Bibliografía

1. Watabe N. Crystal growth of calcium carbonate in biological systems. *J. Cryst. Growth*, 1974 24/25: 116-121.
2. Lowenstam H. Minerals formed by organisms. *Science*, 1981 211: 1126-1131.
3. Lowenstam HA. Weiner S. Mineralization by organisms and the evolution of biomineralization. En: Westbrook P. De Jong EW. (eds) *Biomineralization and biological metal accumulation, biological and geological perspective*. Riedel Publishing Company, Dordrecht, Neth. 1983 pp. 191-204.
4. Weiner S. Traub W. Lowenstam HA. Organic matrix in calcified exoskeletons. In: Westbrook P. De Jong EW. (eds) *Biomineralization and biological metal accumulation, biological and geological perspective*. Riedel Publishing Company, Dordrecht, Neth. 1983 pp. 191-204.
5. Termine JD. Belcourt AB. Conn KM. Kleiman HK. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J. Biol. Chem.* 1981 256: 10403-10408.
6. Addadi L. Weiner S. Interactions between acid proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985 82: 4110-4114.
7. Weiner S. Addadi L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *Trends Biol. Sci.* 1991 16: 252-256.
8. Aizenber J. Hanson J. Ilan M. Leiserowitz L. Koetzle TF. Addadi L. Weiner S. Morphogenesis of calcitic sponge spicules a role for specialized proteins interacting with growing crystals. *FASEB J.* 1995 9: 262-268.
9. Meenakshi VR. Hare PE. Wilbur KM. Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 1971 40: 1037-1043.
10. Mann S. Molecular recognition in biomineralization. *Nature* 1988 332: 119-124
11. Arnott HJ. Pautard FGE. Calcification in plants. En: Schraer H. (ed) *Biological calcification: Cellular and molecular aspects*. Appleton-Century-Crofts, New York. 1970 pp. 375-446.
12. Gallaher RN. The occurrence of calcium in plant tissue as crystals of calcium oxalate *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 1975 6: 315-330.



13. Hodgkinson A. Oxalic acid metabolism in higher plants. In: Hodgkinson A. (ed) *Oxalic Acid Biology and Medicine*. Academic Press, New York. 1977 pp. 131-158.
14. Franceschi VR. Horner HT. Calcium oxalate in plants. *Bot. Rev.* 1980 46: 361-427.
15. Prychid JC. Rudall PJ. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Ann. Bot.* 1999 84: 725-739.
16. Nakata P. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci.* 2003 164: 901-909.
17. Gude AJ. Young EJ. Kennedy VC. Riley LB. Whewellite and celestite from a fault opening in San Juan Co. Utah. *Am. Min.* 1960 45: 1257-1265.
18. Horner HT. Wagner BL. Calcium oxalate formation in higher plants. En: Kahn SR. (ed) *Calcium oxalate in biological systems*. CRC Press, Boca Raton 1995 pp. 53-72.
19. Horner HT. Wagner BL. The association of druse crystals with the developing stonium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) anthers. *Am. J. Bot.* 1980 67: 1347-1360.
20. Webb MA. Cavaletto JM. Carpita NC. Lopez LE. Arnott HJ. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis* *Plant J.* 1995 7: 633-648.
21. Webb MA. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* 1999 11: 751-761.
22. Nakata PA. McCon M. Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiol.* 2000 124: 1097-1104.
23. Mazen AM. D. Zhang D. Franceschi VR. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: Physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. *New Phytol.* 2004 161: 435-448.
24. Monje PV. Baran EJ. Characterization of calcium oxalates generated as biominerales in cacti. *Plant Physiol.* 2002 128:707-713.
25. Zona S. Raphides in palm embryos and their systematic distribution. *Ann. Bot.* 2004 93: 415-421.
26. Li X. D. Zhang D. Lynch-Holm VJ. Okita TW. Franceschi VR. Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiol.* 2003 133: 549-559.



27. Bouropoulos N. Weiner S. Addadi L. Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: Morphology and *in vitro* interactions of crystal-associated macromolecules. *Chem. Eur. J.* 2001 7: 881-1888.
28. Campbell AA. Ebrahimpour A. Perez L. Smesko SA. Nancollas GH. The dual role of polyelectrolytes and proteins as mineralization promoters and inhibitors of calcium oxalate monohydrate. *Calcif. Tiss. Int.* 1989 45: 122-128.
29. Jáuregui-Zúñiga D. Reyes-Grajeda JP. Sepúlveda-Sanchez JD. Whitaker JR. Moreno A. Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol* 2003 160: 239-245.
30. Keates SA. Tarlyn N. Loewus FA. Franceschi VR. L-Ascorbic acid and L-galactose are sources of oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry* 2000 53:433-440.
31. Kostman TA. Franceschi VR. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation plants. *Protoplasma* 2000 214: 166-179.
32. Franceschi VR. Calcium oxalate formation is a rapid reversible process in *Lemna minor* L. *Protoplasma* 1989 148: 130-137.
33. Volk GM. Lynch-Holm VJ. Kostman TA. Gross LJ. Franceschi VR. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol.* 2002 4: 34-45.
34. Loewus FA. Wagner G. Yang JC. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975 258: 7-23.
35. Yang J. Loewus FA. Metabolic conversion of L-ascorbic acid in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiol.* 1975 56:283-285.
36. Horner HT. Kausch AP. Wagner BL. Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblast of *Yucca torreyi* in liquid root culture. *Int. J. Plant Sci.* 2000 161: 861-868.
37. Kostman TA. Tarlyn NM. Loewus FA. Franceschi VR. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblast. *Plant Physiol.* 2001 125: 634-640.



38. Zindler-Frank E. Hönow R. Hesse A. Calcium and oxalate content of leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *J. Plant Physiol.* 2001 158: 139-144.
39. Molano-Flores B. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Ann. Bot.* 2001 88: 387-391.
40. Ward D. Spiegel S. Saltz S. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lilly. *J. Chem. Ecol.* 1997 23: 333-347.
41. Finley DS. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Rev. Biol. Trop.* 1999 47:27-31.
42. Saltz D. Ward D. Responding to a three-pronged attack: desert lilies subject to herbivory by dorcas gazelles. *Plant Ecol.* 2000 148: 127-138.
43. Ruiz N. Ward D. Saltz D. Calcium oxalate in leaves of *Pancratium sickenbergeri*: constitutive or inducive defense? *Func. Ecol.* 2002 16: 99-105.
44. Salinas ML. Ogura T. Soffchi L. Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals raphides in *Agave tequiliana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact dermat.* 2001 44: 94-96.
45. Hudgins JW. Krekling T. Franceschi VR. Distribution of calcium oxalate crystals in the conifers: a constitutive defense mechanism? *New Phytol.* 2003 159: 677-690.
46. Bradbury JH. Nixon RW. The acidity of raphides from the edible aroids. *J. Sci. Food Agric.* 1988 76: 608-616.
47. Van Balen E. Van de Geyn SC. Desmet GM. Autoradiographic evidence for the incorporation of cadmium into calcium oxalate crystals. *Z. Pflanzen.* 1980 97: 306-312.
48. Franceschi VR. Shueren AM. Incorporation of strontium into plant calcium oxalate crystals. *Protoplasma* 1986 130: 199-205.
49. Mazen AM. Maghraby OM. Accumulation of Cadmium, lead and Strontium and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biol. Plant.* 1998 40: 411-417.
50. Mazen AM. Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related accumulation of toxic metals. *Russ. J. Plant Physiol.* 2004 51: 281-285.



51. Kausch AP. Horner HT. The relationship of air space formation and calcium oxalate crystal development in young leaves of *Typha angustifolia* L. (Typaceae). Scan. Electron Microsc. 1981 3: 263-272.
52. Modenesi P. Bombardi V. Giordani P. Brunialti G. Corallo A. Calcium oxalate and medullary architecture in *Xanthomaculina convoluta*. Lichenologist 2000 32: 505-512.
53. Dauphin Y. Cuif JP. Isoelectric properties of the soluble matrices in relation to the chemical composition of some scleractinian skeletons. Electrophoresis 1997 7: 1180-1184.
54. Crenshaw MA. The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. Biomineralization 1972 6: 6-11.
55. George A. Sabsay B. Simonian PA. Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein: Implications for induction of biomineralization J. Biol. Chem. 1993 268: 12624-12630.
56. Sarashina I. Endo K. (1998) Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. Am. Mineral. 1998 83: 1510-1515.
57. Wheeler AP. George JW. Evans CA. Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oystershell. Science 1981 212: 1397-1398.
58. Herman A. Addadi L. Weiner S. Interactions of sea-urchin skeleton macromolecules with growing calcite crystals: a study of intracrystalline proteins. Nature 1988 331:546-548.
59. Didymus JM. Oliver P. Mann S. DeVries AL. Hauschka PV. Westbroek P. Biomimetic approaches to crystal engineering: influence of low molecular weight and macromolecular organic additives on the morphology of calcium carbonate. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1993 89: 2891-2900.
60. Albeck S. Weiner S. Addadi L. Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth in vitro Chem. Eur. J. 1996 2: 278-284.
61. Falini G. Albeck S. Weiner S. Addadi L. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. Science 1996 271: 67-69.



62. Millan A. Crystal growth shape of Whewellite polymorphs: Influence of structure distortions on crystal shape. *Cryst. Growth Des.* 2001 1: 245-254.
63. Moradian-Oldak J. Leung W. Fincham AG. Temperature and pH-dependent supramolecular self-assembly of amelogenin molecules: A dynamic light- scattering analysis. *J. Struct. Biol.* 1998 122: 320-327.
64. Sikes CS. Wheeler AP. Wierzbicki A. Dillaman RM. DeLuca L. Oyster shell protein and atomic force microscopy of oyster shell folia. *Biol. Bull.* 1998 194: 304-314.
65. Kurutz JW. Carvalho M. Nakagawa Y. Neprocalcin isoforms coat crystal surfaces and differentially affect calcium oxalate monohydrate crystal morphology, growth and aggregation. *J. Cryst. Growth.* 2003 255: 392-402.
66. Reyes-Grajeda JP. Jáuregui-Zúñiga D. Rodríguez-Romero A. Hernández-Santoyo A. Bolanos-Garcia V. Moreno A. Crystallization and preliminary X-ray análisis of ovocleidin-17 a major protein of the *Gallus gallus* eggshell calcified layer. *Protein and peptide letters* 2002 9:253-257.
67. Jung T. Sheng X. Choi CK. Woo-Sik K. Wesson JA. Ward MD. Probing crystallization of calcium oxalate monohydrate and the role of macromolecule additives with *in situ* atomic force microscopy. *Langmuir* 2004 20: 8587-8596.
68. Qiu SR. Wierzbicki A. Orme CA. Cody AM. Hoyer JR. Nancollas GH. Zepeda S. De Yoreo JJ. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization by osteopontin and citrate. *Proc. Nat. Acad Sci.* 2004 101: 1811-1815.
69. Touryan LA. Clark RH. Gurney RW. Stayton PS. Kahr B. Vogel V. Incorporation of fluorescent molecules and proteins into calcium oxalate monohydrate single crystals. *J. Cryst. Growth* 2001 23: 380-388.
70. Furedi-Milhofer H. Sikiric M. Tunik L. Filipovic-Vincekovic N. Garti N. Interactions of organic additives with ionic crystal hydrates: The importance of the hydrated layer. *Int. J. Modern Phys. B* 2001 16: 359-366.
71. Piechalak A. Tomaszewska B. Baralkiewicz D. Malecka A. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 2002 60: 153-162.



72. Sarret G. Vangronsveld J. Manceau A. Musso M. D'Haen J. Menthonnex J. Hezemann J. Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. Environ Sci Technol 2001 35:2854-2859.



Apéndice A

Cristalización del oxalato de calcio *in vitro*.

La cristalización *in vitro* del oxalato de calcio usualmente es utilizada para investigar fenómenos como la nucleación, crecimiento y agregación de los cristales y como estas son afectadas por diferentes variables como son la temperatura, pH o aditivos de diversa naturaleza. El oxalato de calcio puede cristalizar en forma monohidratada (whewellita) o dihidratada (weddellita) y ambas formas tienen características muy diferentes y precipitarán uno u otro estado dependiendo de las características físicas del ambiente donde cristalicen.

Según Frey-Wyssling¹ la prevalencia de uno u otro estado de hidratación depende del ambiente de cristalización, es decir en ambientes ricos en iones calcio prevalecerá el estado dihidratado, mientras que en ambientes ricos en iones oxalato, prevalecerá el estado monohidratado. El autor llegó a esta conclusión realizando experimentos de precipitación en geles de agarosa (geles ultraestructuralmente formados por fibras que no poseen grupos funcionales que puedan reaccionar). Sin embargo, en los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se obtuvieron mezclas de ambos hidratos y en proporciones similares en ambientes ricos en calcio y en oxalato en condiciones similares a las reportadas por el autor. Por otro lado, en experimentos de precipitación realizados en solución, siempre se obtuvo una mayoría de cristales de whewellita, por sobre los cristales de weddellita independientemente de si en el vaso de reacción, había exceso de iones calcio u oxalato. Cuando la precipitación se llevó a cabo en geles de sílice el polimorfo que se obtuvo mayoritariamente fue el dihidratado en ambientes ricos en iones calcio y también en ambientes ricos en iones oxalato.

El oxalato de calcio dihidratado es termodinámicamente metaestable, por lo cual tiende a disolverse en ambientes acuosos y a transformarse en la forma monohidratada por un proceso de disolución-recristalización, esto explica porque se obtienen mayoritariamente los cristales monohidratados en cristalizaciones en solución. En los geles de agarosa se da la precipitación de ambos polimorfos en números similares debido a que la matriz del gel

¹Frey-Wyssling A. Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. *Am. J. Bot.* 1981 68: 130-141.



protege de la disolución a los cristales dihidratados, aunque después de tres semanas de la experimentación estos cristales presentaron signos de disolución. Los geles de sílice facilitan la formación de la fase dihidratada debido a que ultraestructuralmente están formados por partículas que poseen una gran cantidad de grupos hidroxilo en su superficie, estos grupos hidroxilo interactúan con las aguas superficiales que se encuentran en la estructura molecular de los cristales de oxalato de calcio dihidratado y lo estabilizan inhibiendo su disolución que en condiciones normales (en solución y en geles de agarosa) si se da.



Apéndice B. Composición del medio nutritivo de Hoagland.

Componente	mg/L
KNO ₃	2500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400
(NH ₄) H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200
MnSO ₄ · H ₂ O	10.0
H ₃ BO ₃	5.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
KI	1.0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15.
Fe · EDTA	20.
Mio-Inositol	1000
Tiamina	5.0
Acido Nicotínico	5.0
Piridoxina	0.5
Sacarosa	10
pH	5.6



Apéndice C.

Artículos publicados

Revistas indexadas

Jáuregui-Zúñiga D. Reyes-Grajeda JP. Sepulveda-Sanchez JD. Whitaker JR. and Moreno A. Chrystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seeds coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Physiology*. 2003 160: 239-245.

Jáuregui-Zúñiga D. Reyes-Grajeda JP. and Moreno A. Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*). 2005 *Plant Science in Press*.

Revistas no indexadas

Jáuregui-Zúñiga D. y Moreno A. La biomineralización del oxalato de calcio en plantas: Retos y potencial. *Revista de Educación Bioquímica* 2004 23: 206-21.



Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*

David Jáuregui-Zúñiga¹, Juan Pablo Reyes-Grajeda¹, José David Sepúlveda-Sánchez², John R. Whitaker³*, Abel Moreno¹

¹ Instituto de Química, UNAM. Circuito Exterior, C.U. México, D.F. 04510. México

² Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Edificio W Laboratorio de Microscopía Electrónica. México, D.F. 09340. México

³ Department of Food Science and Technology, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616 USA

Received July 11, 2002 · Accepted October 8, 2002

Summary

Calcium oxalate crystals are a major biomineralization product in higher plants. Their biological function and use are not well understood. In this work, we focus on the isolation and crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals from seed coats of *Phaseolus vulgaris* (prisms) and leaves of *Vitis vinifera* (raphides and druses) using ultrastructural methods. A proposal based on crystal growth theory was used for explaining the existence of different morphologies shown by these crystals grown inside specialized cells in plants.

Key words: biocrystallization – biomineralization – crystal morphology – natural crystal growth – X-ray diffraction

Abbreviations: AFM = Atomic Force Microscopy. – SEM = Scanning Electron Microscopy. – EDS = Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

Introduction

Biomineralization is the process in which living organisms form inorganic crystals or crystalline aggregates, most of the time regulated by biological macromolecules (Watanabe 1974, Lowenstam 1981, Lowenstam and Weiner 1983, Weiner et al. 1983, Addadi and Weiner 1985). In the case of plants this crystal precipitation may take place inside vacuoles or sometimes in different parts of the cell (Horner and Wagner 1983, Kausch and Horner 1983, Panheleux et al. 1999). There are two main kinds of these precipitates: first the biologically induced biomineralization in which the living organism only

causes mineral precipitation and second, the organic matrix is involved. In the latter, the matrix controls the precipitation and the arrangement of crystalline aggregates. It has been shown that orientation of the crystal axes and the ultrastructure are under genetic control (Watanabe 1974, Lowenstam 1981, Lowenstam and Weiner 1983, Weiner et al. 1983, Addadi and Weiner 1985), but this has not yet been fully demonstrated or explained on the basis of crystal growth theory.

In higher plants, calcium oxalate crystals are typically developed within intravascular membrane chambers of specialized cells (called idioblasts). The variety of crystal shapes found in plants are species-specific indicating that they are genetically controlled, analogous to biomineralization in animals (Webb et al. 1995, Webb 1999, Prychid and Rudall 1999,

* E-mail corresponding author: jwhitaker@ucdavis.edu

Nakata and McCon 2000). Calcium oxalate exists in two crystalline forms in plants: (1) calcium oxalate monohydrate (whewellite), and (2) a less commonly found crystalline phase, calcium oxalate dihydrate (weddelite).

It is important to explain how this biomineralization phenomenon takes place in nature, to find the biomolecules responsible for controlling this biochemical process (protein-inorganic interaction), and to investigate the biophysical process (based on crystallochemical interactions of the kinetically or thermodynamically stable phases). Understanding the biomineralization processes is important for determining the biological processes of crystal growth in biomedical sciences (e.g., bile and renal stones, sclerotization of exoskeletons in insects and endoskeleton formation in other living organisms).

Following the approach above, we have isolated, characterized, and analyzed the crystal morphology of calcium oxalate crystals grown in leaves of *Vitis vinifera* and in seed coats of *Phaseolus vulgaris* using atomic force microscopy, scanning electron microscopy and image analysis methods. Chemical characterization of these crystals was performed using scanning electron microscopy coupled to an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS) for micro-probe analyses. For crystallographic characterization, X-ray diffraction methods (powder and monocrystal) were used. These crystals and their characterization were compared to the crystals of calcium oxalate synthetically grown in gels. Based on our X-ray data, an explanation is proposed for existence of two polymorphs (monoclinic phase and the tetragonal phase) of calcium oxalate based on fundamental properties of crystal growth and crystallochemical behavior of crystals grown in biological systems.

Materials and Methods

The leaves from *Vitis vinifera* L. (variety Red Grape Cavernet du Sauvignon) and bean seed coats from *Phaseolus vulgaris* L. (Black Mexican Bean) were obtained from plants grown in a greenhouse. These leaves and bean seed coats were initially cleaned several times using double-distilled water and were washed twice with 10% to 20% ethanol in order to remove any microorganisms and particles usually deposited on the leaf surface. After removing these environmental impurities, the leaves were put into a solution of 20% (v/v) sodium hypochlorite for separating pigments. The leaves were then washed with double-distilled water. These two steps were repeated several times. Then, the samples were dehydrated using concentration gradients of ethanol or isopropanol, and pure xylene. Separation of crystals was carried out after homogenization of the crude material in sodium hypochlorite (20% v/v; see above) over 48 hours. The crystals were collected by filtration on sterile cotton meshes, followed by centrifugation for 30 minutes at 3,000 rpm. The precipitate at the bottom of the vial was re-suspended in chloroform or carbon tetrachloride and centrifuged for 45 minutes. This procedure was repeated several times until clear crystals of calcium oxalate were obtained in high optical purity. All these procedures were monitored using a binocular lens

(Carl-Zeiss, Stemi 11) in order to be sure that collection of crystals was properly done.

For the preliminary 2D structural analyses (morphological and etching images) a Nanoscope IIIa from DIGITAL Instruments was used for atomic force microscopy imaging and data acquisition. All measurements and images were obtained by scanning at $15.0\ \mu\text{m} \times 15.0\ \mu\text{m}$ in contact mode at room temperature ($20 \pm 0.5\ ^\circ\text{C}$). The scanning velocity was 1 Hz, maintaining low contact forces (0.3 N/m). Images were analyzed with software provided by DIGITAL Instruments. The AFM images of calcium oxalate were obtained by depositing the isolated crystals onto a cleavage surface of mica using electrostatic forces to ensure proper deposition. The SEM micrographs for the compositional analyses of these crystalline aggregates were obtained by fixing the small crystals onto the sample holder (conductive graphite) of the scanning electron microscope. The prismatic calcium oxalate crystals for *P. vulgaris* and needle-shaped (raphides) for *V. vinifera* were scanned and evaluated. For the chemical characterization of calcium oxalate crystals, a JEOL Scanning Electron Microscope JSM5000 LV was used coupled to an X-ray Spectrometer for micro-probing analyses (Oxford type EDS) working at 20 KeV. All micrographs were collected and compared using standard calcium oxalate salt (blank) and the isolated crystals from *P. vulgaris* and the crystals obtained *in vitro* at higher supersaturations. For X-ray characterization, an X-ray powder diffraction apparatus from Bruker-axs D-B advanced system was used. For single crystals the structural analysis was done by a Bruker Apex CCD diffractometer using the $\text{Mo K}\alpha$ radiation. All intensities, as well as the crystallographic data analyses for powders and single crystals, were performed using the software provided by Bruker Co.

Results and Discussion

Calcium oxalate crystals observed in plants typically form four main types of crystal morphologies: (1) styloids, acicular crystals that form singly; (2) raphides or needle-shaped crystals that form in bundles; (3) druses or spherulraphides (multiple crystal forms of spherical conglomerates); and (4) prisms consisting of regular prismatic shapes. The specific function of these crystals is not well known (Horner and Wagner 1983, Webb et al. 1995, Webb 1999). However, there are two possible functions. One is that they provide an important reservoir for excess calcium absorbed and the second explanation is that the crystals help defend the plants against herbivores (Bradbury and Nixon 1998, Arnott and Webb 2000, Saltz and Ward 2000).

Figure 1 shows different crystals grown inside leaves of *V. vinifera* and seed coats of *P. vulgaris*. The crystals from leaves of *V. vinifera* were observed under polarized light (Figs. 1a and 1b). Figures 1c and 1d show crystals from the seed coats of *P. vulgaris*. Prismatic crystals were always observed from seed coats of *P. vulgaris*, while for *V. vinifera* raphides and druses (polycrystals) were observed as reported by Webb (1999). Figures 2, 3 and 4 show the shapes of the isolated crystals and their compositional analysis done by the SEM-EDS technique; e.g., druses (Fig. 2) and raphides (Fig. 3) for *V. vinifera*, and prismatic crystals of *P. vulgaris* (Fig. 4).

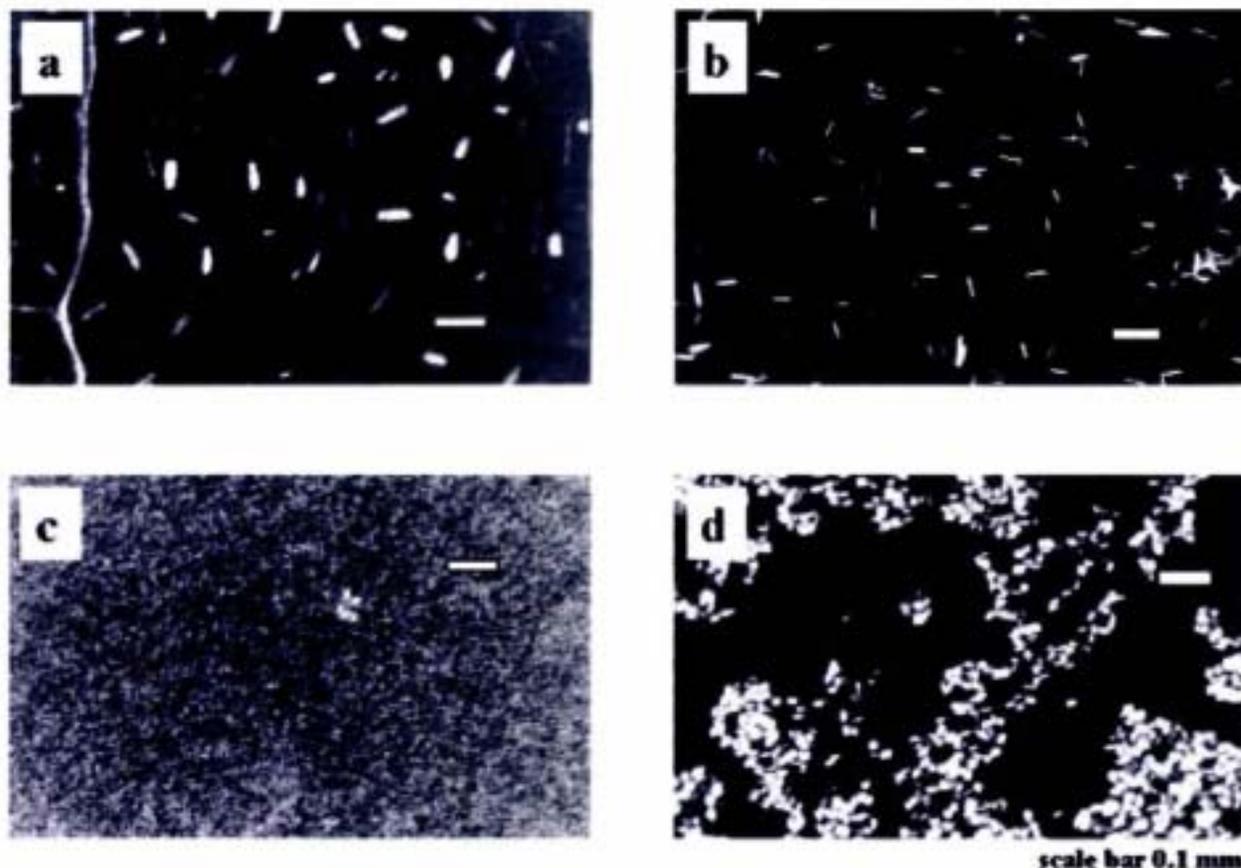


Figure 1. Calcium oxalate crystals in natural media: (a) in the leaf of *Vitis vinifera*, (b) isolated crystals of *V. vinifera*; (c) crystals from seed coats of *Phaseolus vulgaris*, (d) isolated crystals of *P. vulgaris*.

For the characterization analyses, all intensities from the EDS-profiles showed a chemical composition typically obtained for calcium oxalate: calcium, and carbon and oxygen (from the oxalate ion). The spectra of each compositional analysis are shown in the lower part of each image. These images, as well as the crystallochemical characterization for raphides and druses, correspond to those published elsewhere (Webb et al. 1995).

We also studied the crystal morphology by atomic force microscopy in order to have additional information about the existence of different kinds of crystal growth mechanisms in nature. But, we did not observe any resemblance of these mechanisms of crystal growth on the surfaces of the crystals to those observed in synthetically obtained crystals by Shouwu et al. (2002). This was due to the procedures used for isolation of the crystals since dissolution of faces of the crystals was not properly controlled. The AFM images of crystals isolated from leaves of *V. vinifera* and seed coats of *P. vulgaris* did not show any indication of the mechanism of crystal growth (etching figures) found inside the specialized cells in plants.

In order to understand the mechanism of crystal growth *in vitro* for calcium oxalate crystals grown at different supersatu-

rations, we designed a crystal growth cell, based on the method of crystal growth in gels (Henisch 1988), as shown in Figure 5. We observed that the only crystallographic phase synthetically obtained was that corresponding to the tetragonal system $I4/m$ with cell parameters: $a = 12.375 \text{ \AA}$, $b = 12.375 \text{ \AA}$ and $c = 7.377 \text{ \AA}$, where $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ for the dihydrate salt, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (weddelite). We grew crystals in different concentrations of gel media, but we did not obtain any crystallographic phase other than the tetragonal phase. By growing crystals in solution at different supersaturation values, we found only the monoclinic phase, using the same salt solutions as those used for the gel media. This result proved our hypothesis that calcium oxalate monohydrate is mainly obtained at high supersaturations. Our results agree with the work published by Martin et al. (1984; reference cited in Shouwu et al. 2002). Martin et al. (1984) demonstrate that calcium oxalate from water and simple salt solutions exhibits strong preference for the calcium oxalate monohydrate.

Crystals isolated from seed coats of *P. vulgaris* (prisms) were analyzed by X-ray powder diffraction. We obtained a mixture of the monoclinic and the tetragonal phases; the tetragonal phase was obtained in very small amounts. The

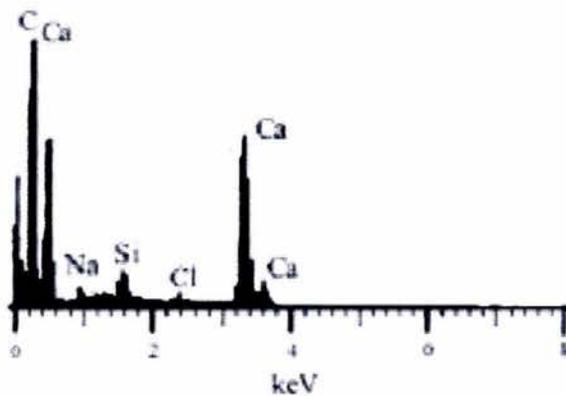
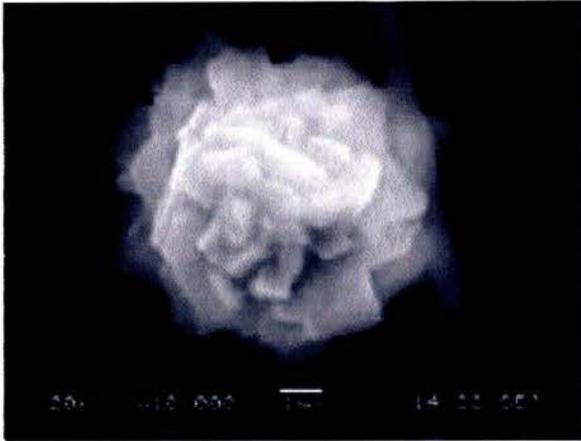


Figure 2. SEM-EDS structural characterization of a druse from leaves of *V. vinifera*, the spectrum of the X-ray intensities corresponds to the structural analysis using EDS for chemical characterization of this morphology.

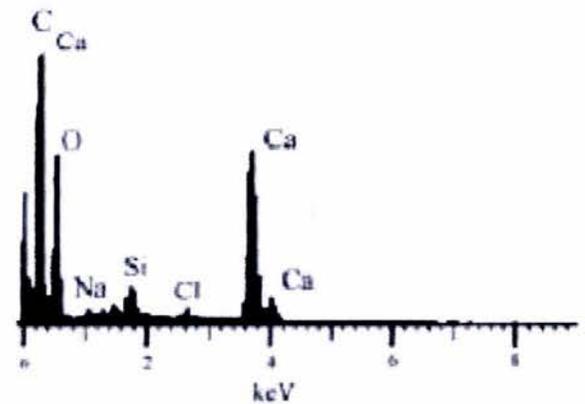
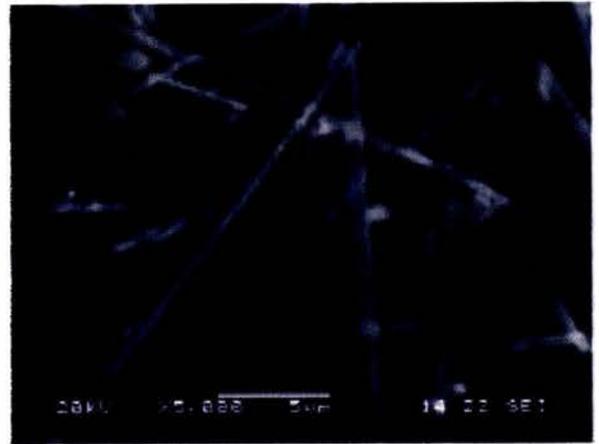


Figure 3. SEM-EDS structural characterization of raphides from *V. vinifera*, the spectrum of the X-ray intensities corresponds to the structural analysis using EDS for the chemical characterization of this morphology.

monoclinic monohydrate form of calcium oxalate (*whewellite*) usually obtained in plants was characterized structurally by X-ray diffraction method and its crystallographic symmetry corresponded to the monoclinic space group P21/c with cell parameters: $a = 6.290 \text{ \AA}$, $b = 14.583 \text{ \AA}$ and $c = 10.116 \text{ \AA}$, $\alpha = 90$, $\beta = 109.46$, and $\gamma = 90$.

At this stage, we know that in gels the only stable phase obtained is that corresponding to the tetragonal phase, being the thermodynamic form for this calcium oxalate. In diffusive transport, we always obtained the tetragonal phase grown inside the gel. Comparing our results to those observed for plant-obtained crystals, it appears that nature follows specific mechanisms of crystal growth to pack the crystallographic structure depending on the type of plant and on the stress and the degree of supersaturation used to obtain the kinetically (monoclinic) or thermodynamically (tetragonal) phases of calcium oxalate.

In order to deal with this biological problem, we isolated crystals from *V. vinifera* plant leaves and compared them with a commercial sample [where usually the solid phase is obtained at high supersaturation (*whewellite*)] and by the X-ray powder diffraction method. Comparison with commercial calcium oxalate showed the following crystallographic data. From the calcium oxalate (commercial sample from Fluka catalog number 21201), we obtained only a set of intensities from the spectra corresponding to the monoclinic *whewellite* ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ monoclinic system). For the crystals from *P. vulgaris* analyzed by the same method, we obtained the monoclinic *whewellite* mixed with a small amount of the tetragonal phase (*weddellite*). In both cases the monohydrate form was observed, except for the small amount of the tetragonal phase found in the crystals coming from seed coats of *P. vulgaris*.

Figure 6 shows the comparative X-ray diffraction spectra between calcium oxalate crystals from seed coats of *P. vulgaris* and the commercial sample. It shows that the monoclinic

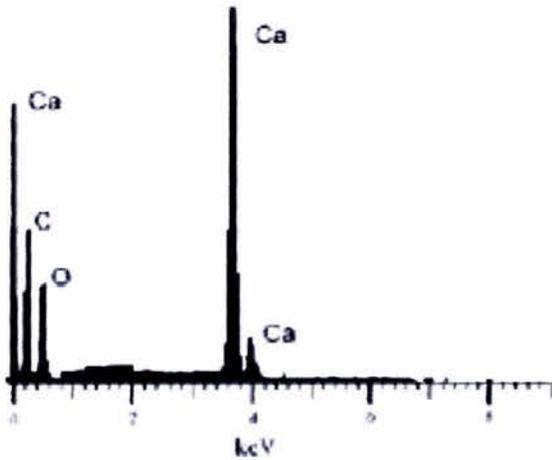
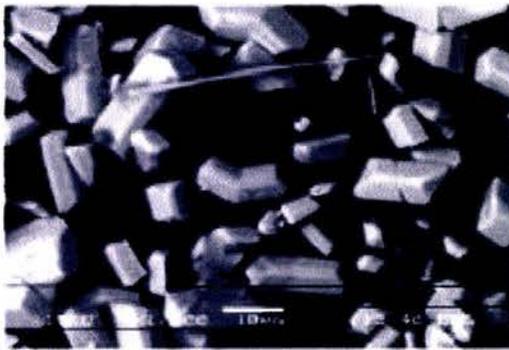


Figure 4. SEM-EDS structural characterization of prismatic crystals of *P. vulgaris*. The spectrum of the X-ray intensities corresponds to the chemical analysis using EDS for this morphology of crystals.

phase that corresponds to the prismatic-shaped crystals also corresponds to the monoclinic phase, and this is obtained in the seed coats of *P. vulgaris*, as well as for the raphides. How-

ever, taking into account the crystal growth behavior of calcium oxalate in gels, where the diffusion transport controls the process, the tetragonal phase was always obtained. This tetragonal system is the thermodynamically stable phase obtained under diffusive transport compared to the monoclinic phase obtained at higher supersaturations in solution. This result is particularly interesting as we can now explain, based on supersaturation data from the crystal growth theory, that in the leaves of plants the growth of crystals of calcium oxalate is obtained at higher supersaturations (higher concentrations of ions) and as a consequence, there is a shorter induction time for crystal growth of the tetragonal phase. This produces mainly the acicular crystals (raphides) located in bundles. For the seed coats of *P. vulgaris*, the mechanism is partially diffusion-dependent and the supersaturation is lower than that obtained on the leaves producing also the monoclinic phase, but with a prismatic-shaped morphology. Another interesting result from a previous publication demonstrated that the monohydrate form of calcium oxalate (raphides) is mainly obtained in specific types of plants and even in specific places in the body of the plants (Webb et al. 1995). Analysis of the commercial calcium oxalate done by X-ray powder diffraction demonstrated that our hypothesis based on crystal growth mechanisms and supersaturation data is correct. The tetragonal phase usually needs longer time for the nucleation and very specific conditions to grow into single crystals. With respect to the monoclinic raphides, the production of these crystals may explain how plants protect their leaves against herbivores by producing needle-like crystals located in bundles that produce a more unpleasant taste and pain than those shown for prismatic-shaped crystals in the seed coats of *P. vulgaris*.

There may be another explanation for the data, based on a simple biochemical assumption. Oxalate or calcium ions occur in higher amounts in leaves, as a main product from the

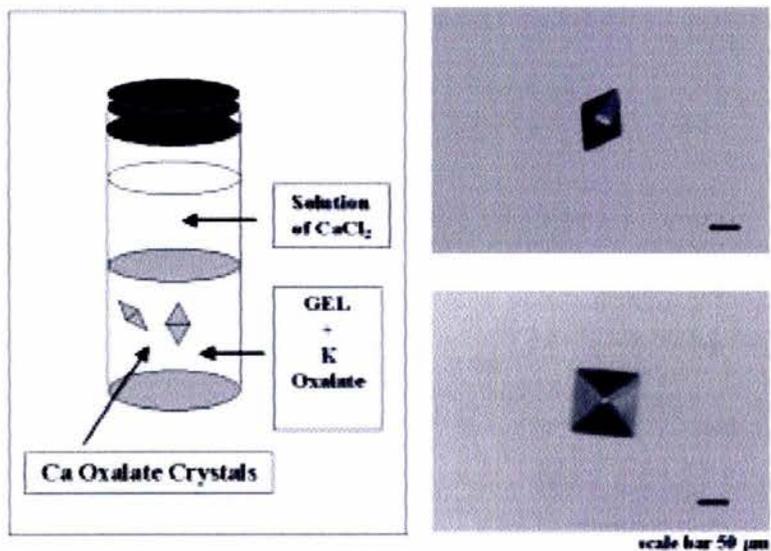


Figure 5. Crystal growth of calcium oxalate in gels: (a) the crystal growth cell used to grow these crystals, (b) lateral view of the tetragonal phase, and (c) top view of the tetragonal phase.

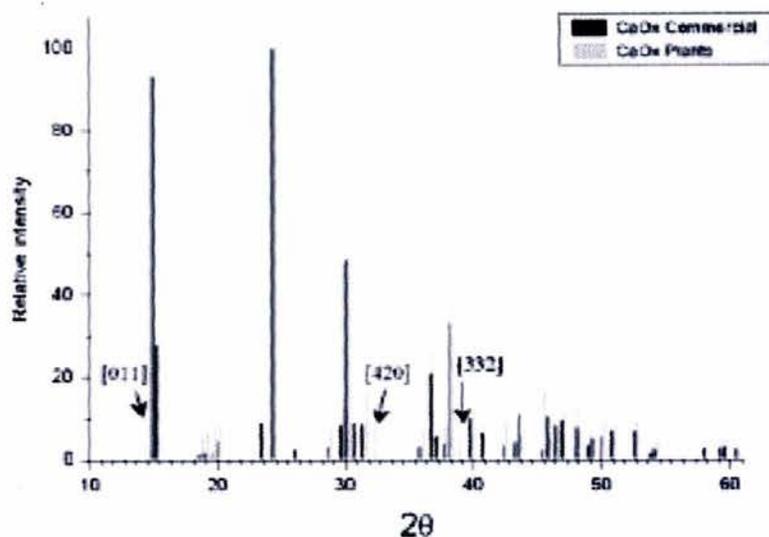


Figure 6. X-ray powder diffraction spectra of calcium oxalate crystals grown inside idioblasts (from *P. vulgaris*) (grey light spectrum line), and from commercial sample (black spectrum line). From this it was observed that in plants the monoclinic phase was mixed with small amounts of the tetragonal phase (arrow marks correspond to the intensities of the tetragonal phase).

metabolic pathway than that obtained in the bean seed coats where prisms are usually obtained at lower supersaturations. This could explain the higher concentration for the precise supersaturation needed to obtain different crystal morphologies depending on the stress of the plant. Based on crystal growth mechanisms, it is easier to dissolve needles than prismatic crystals. Therefore, plants could control the process of crystal growth/dissolution depending on the stress situation and on the quick availability of calcium where needed. We are now performing experiments where we have isolated the major soluble proteins that control the calcium oxalate precipitation. Our next goal will be focused on finding the specific crystallographic faces that are affected due to the presence of these specific biomolecules for calcium oxalate crystal growth. We are also doing experiments to look for proteins that produce higher effects on the nucleation and crystal growth of calcium oxalate systems (to be published).

This is the first time we have isolated calcium oxalate crystals from *P. vulgaris*, have analyzed them in detail using coupled ultra-structural and analytical methods, and explained their morphology using a simple explanation based on crystal growth behavior. There are three publications using SEM-EDS to characterize crystals of calcium oxalate from *V. vinifera*, where raphides characterization corresponded to a monoclinic phase (Horne and Zindler-Frank 1982 a, b, Webb et al. 1995). These three publications helped us to proceed with our structural analyses and comparison for obtaining our conclusions on the *P. vulgaris* system with those observed in *V. vinifera*. It is important to mention that these cited papers focused on similar purposes although they are primarily based on the optical characterization of the crystal morphology. There were no crystallographic-based or crystal growth analyses as is shown here. We based our results not only upon the surface and structural analyses, but also upon the behavior of crystal growth and crystallochemical analyses

(using X-ray diffraction data and SEM-EDS). For precise details, future investigations should be focused on 3D structural data and should visualize either *in vivo* or *in vitro* the biomineralization behavior of calcium oxalate systems. Our approach hopefully will give information based on crystal growth to explain the mechanism of biomineralization phenomena in nature for living organisms. Growth of calcium oxalate crystals in the micro-cells used in the crystal growth experiments can emulate the growth inside the specialized cells in plants. Thus, changes in the crystal morphology can best be explained by classical theories of crystal growth. Genetic control is probably not necessary, at least, for the explanation of the morphology change in the calcium oxalate crystals. In avian eggshells, for instance, the crystal growth of calcite, which forms the mineral layer, follows a competitive crystal growth mechanism and perhaps it is followed also by an epitaxial crystal growth process. The crystal growth of calcium oxalate should follow the simple rules of classical theories of crystal growth as shown in this contribution. We think that the genetic control of the process (Webb et al. 1995, Prychid and Rudall 1999, Webb 1999, Nakata and McCon 2000) is a very interesting proposal, but its acceptance will depend on knowledge of the 3D structure of the specific proteins that are taking part in the crystallization process. More crystal modeling of this biomineralization phenomena and full structural data are needed for explaining the role of each participant of the biomineralization process (genes, proteins, polysaccharides and inorganics) so as to obtain the final answer. Some major progress in this direction has been made by investigations of changes in direction of axis growth during water crystallization in the presence of fish antifreeze proteins (Yeh and Feeney 1996).

Acknowledgements. One of the authors (A. M.) acknowledges financial support from DGAPA-UNAM grant project IN200199; all authors

acknowledge a grant from the CONACYT/UCMEXUS Program between the University of California Davis and UNAM México. One of the authors (A. M.) thanks Dr. Rubén Toscano from the X-ray diffraction laboratory of the Instituto de Química, UNAM (México) for the structural data of calcium oxalate single crystals.

References

- Addadi L, Weiner S (1985) Interactions between acid proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4110–4114
- Amott HJ, Webb MA (2000) Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): implications for crystal stability and function. *Int J Plant Sci* 161: 133–142
- Bradbury JH, Nixon RW (1998) The acidity of raphides from the edible aroids. *J Sci Food Agric* 76: 608–616
- Henisch HK (1988) *Crystal Growth in Gels and Liesegang Rings*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–47
- Homer HT, Wagner BL (1983) The association of druse crystals with the developing stamium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) anthers. *Amer J Bot* 67: 1347–1360
- Homer HT, Zindler-Frank E (1982 a) Calcium oxalate crystals and crystal cells in the leaves of *Rhynchosia caribaea* (Leguminosae: Papilionoideae). *Protoplasma* 111: 10–18
- Homer HT, Zindler-Frank E (1982 b) Histochemical, spectroscopic, and x-ray diffraction identifications of the two hydration forms of calcium oxalate crystals in three legumes and *Begonia*. *Can J Bot* 60: 3021–3027
- Kausch AP, Homer HT (1983) The development of mucilaginous raphide crystal idioblasts in young leaves of *Thypha angustifolia* L. (Thyphaceae). *Amer J Bot* 70: 691–705
- Lowerstam HA (1981) Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126–1131
- Lowerstam HA, Weiner S (1983) Mineralization by organisms and the evolution of biomineralization. In: Westbrook P, De Jong EW (eds) *Biomineralization and Biological Metal Accumulation, Biological and Geological Perspective*. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Neth, pp 191–204
- Nakata P, McCon M (2000) Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiol* 124: 1097–1104
- Parhéleux M, Bain M, Fernández MS, Morales I, Gauthier J, Arias JL, Solomon SE, Hincke M, Nys Y (1999) Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study. *Brit Poult Sci* 40: 240–252
- Prychid CJ, Rudall PJ (1999) Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Ann Bot* 84: 725–739
- Saltz D, Ward D (2000) Responding to a three-pronged attack: desert lilies subject to herbivory by dorcas gazelles. *Plant Ecol* 148: 127–138
- Shouwu G, Ward MD, Wesson JA (2002) Direct visualization of calcium oxalate monohydrate crystallization and dissolution with atomic force microscopy and the role of polymeric additives. *Langmuir* 18: 4284–4291
- Watanabe N (1974) Crystal growth of calcium carbonate in biological systems. *J Crystal Growth* 24/25: 116–121
- Webb MA (1999) Cell mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* 11: 751–761
- Webb MA, Cavakotto JM, Carpita NC, López LE, Amott HJ (1995) The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *Plant J* 7: 633–648
- Weiner S, Traub W, Lowerstam HA (1983) Organic matrix in calcified exoskeletons. In: Westbrook P, De Jong EW (eds), *Biomineralization and Biological Metal Accumulation, Biological and Geological Perspective*. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Neth, pp 205–224
- Yeh Y, Feeney RE (1996) Antifreeze proteins: structures and functions. *Chem Rev* 96: 601–617