

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de ciencias

Estudios de la matriz orgánica de la concha
nácar del abulón (*Haliotis fulgens*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

PRESENTA

Eduardo Villarreal Ramírez

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Abel Moreno Cárcamo

MÉXICO, D.F.

Mayo, 2005



m345677



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Eduardo Villarreal Ramírez

FECHA: 15 JUNIO 2005

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Villarreal Ramírez Eduardo** con número de cuenta **91022006** con la tesis titulada: **"Estudios de la matriz orgánica de la concha nácar del abulón (*Haliotis fulgens*)"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Abel Moreno Cárcamo**.

| | |
|-------------|----------------------------------|
| Presidente: | Dr. Pedro García Barrera |
| Vocal: | Dr. Higinio Arzate |
| Secretario: | Dr. Abel Moreno Cárcamo |
| Suplente: | Dr. Lauro Bucio Galindo |
| Suplente: | Dra. Alejandra Hernández Santoyo |

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 28 de abril del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

APOYOS FINANCIEROS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación, bajo el proyecto IN204702.

Al CONACYT por la beca otorgada bajo el número 172740.

COMITÉ TUTORAL

A mi comité tutorial, por haber sido guías, luces, durante todo mi periodo de Maestría. Por haber estado siempre atentos a esta investigación y dar su brillantez crítica.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo, tutor principal de este trabajo. Le agradezco, por permitirme trabajar en su equipo de trabajo. Por todas sus enseñanzas, su paciencia y gran calidad humana.

Al Dr. Higinio Arzate, por brindarme un espacio, por aportar muchísimo a esta tesis. Por haber participado activamente en mi formación científica, durante todo este tiempo.

A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, por sus contribuciones al trabajo experimental. Además de ser diseñadora activa de la presente tesis por sus acertados y puntuales comentarios.

Sin ellos el presente trabajo no hubiera sido posible.

REVISIÓN Y APROBACIÓN DE TESIS

Al Dr. Pedro García Barrera, por haber aceptado ser parte del comité evaluador de esta tesis. Por sus aportaciones desde un punto de vista que enriquece el trabajo.

Al Dr. Lauro Bucio Galindo, por participar en la revisión de esta tesis. Sus aportaciones desde el punto de vista físico.

Al Dr. Pedro Bosch Giral, que sin ser parte del comité evaluador acepto amablemente a dar sus comentarios y opiniones, del presente trabajo.

Gracias a ellos este trabajo fue más redondo.

ASESORÍA Y ASISTENCIA TÉCNICA

Al Instituto de Química y a todo su personal.

A la Doctora Adela Rodríguez Romero.

A la Doctora Cristina Piña Barba.

Al Dr. David Sepúlveda.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa.

Al Dr. Enrique García Hernández.

Al Dr. José Guzmán.

Al M. en C. Luis Fernando Oropeza.

A la M. en C. Lucía del Carmen Márquez.

A todo el personal del Posgrado de Ciencias Biológicas.

A Nurit Mirkin y Miguel Herrera.

A Argelia Almaguer, Yunuen Moreno, Araceli Salgado, Marco Álvarez, Bruno Carmona, René Olivares y Pedro López.

Al staff de bioquímica: Caro, Martha, Meche, Nancy, Adrián, Cesar, David y Pablo.

PERSONALES

A mis Padres y hermanos, en primera y en última instancia.

A todos gracias.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| RESUMEN | I |
| ABSTRACT | III |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Biomineralización: Conceptos y generalidades | 1 |
| 1.2 Principios Básicos en Biomineralización | 4 |
| 1.3 Antecedentes de Biomineralización en Moluscos | 6 |
| 2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 11 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 12 |
| 4 METODOLOGÍA | 13 |
| 4.1 Colecta de las Conchas, Obtención del Extracto y Purificación Parcial | 13 |
| 4.2 Electroelución | 15 |
| 4.3 Producción de Anticuerpos | 15 |
| 4.3.1 Inmunizaciones | 15 |
| 4.3.2 Inmunotransferencias (Western Blots) | 16 |
| 4.4 Purificación de anticuerpos | 17 |
| 4.5 Construcción de la Columna de Afinidad para la Proteína de Mr 35 000 | 17 |
| 4.6 Purificación de Proteínas Utilizando la Columna de Afinidad | 19 |
| 4.7 Pruebas Cristalización de Calcita <i>in vitro</i> | 19 |
| 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES | 20 |
| 5.1 Purificación parcial de una proteína de Mr 35 000 | 20 |
| 5.2 Producción de Anticuerpos y Purificación de Anticuerpos | 23 |
| 5.2.1 Inmunotransferencias (Western Blots) | 23 |
| 5.3 Purificación de Proteínas Utilizando la Columna Afinidad | 25 |
| 5.4 Estudios de Cristalización de Calcita In Vitro | 27 |
| 6 Conclusiones | 39 |
| 7 Perspectivas | 39 |
| 8 Bibliografía | 45 |
| 9 Anexos | 50 |

Estudios de la matriz orgánica de la concha nácar del abulón (*Haliotis fulgens*)

RESUMEN

La biomineralización estudia todo lo referente a los procesos y los mecanismos que utilizan los seres vivos para formar y depositar minerales. Es un campo de trabajo, que en los últimos años ha tenido un gran crecimiento. Este reciente interés en este campo ha sido a gracias a las implicaciones que tiene en varias ramas de la ciencia.

La biomineralización es un campo con una gran capacidad de desarrollo, tanto por sus aportaciones a la ciencia básica, como por sus futuros alcances tecnológicos. Pero aun se tiene un gran desconocimiento sobre las unidades participantes, así como de los mecanismos y funcionamiento preciso del sistema. Por ello es necesario a conocer los elementos que componen este sistema, para después descifrar su funcionamiento.

En este trabajo se trató de dilucidar algunos de los componentes de la matriz orgánica de la concha de los moluscos. Para ello se extrajo la matriz orgánica. En ella se observan distintas macromoléculas. Nosotros nos dimos a la tarea de aislar a alguna de ellas.

Por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, logramos una purificación parcial de algunas proteínas. La proteína en mayor abundancia fue una con una masa molecular relativa de (M_r) 35

II

000. Esta proteína fue electroeluidá y posteriormente utilizada para producción de anticuerpos policlonales.

La producción de anticuerpos policlonales se realizó en conejos de la cepa New Zealand White, inmunizándolos con la proteína de M_r 35 000. Con el suero sanguíneo obtenido de los conejos, se realizaron varias inmunodetecciones. En ellos se logró observar la producción exitosa de anticuerpos para la proteína de interés. Posteriormente los anticuerpos producidos en los conejos fueron purificados con una columna de Bio-Rad Affi-Gel Protein A. A partir del la purificación del anticuerpo, construimos una columna de afinidad de sefarosa activada con bromida de cianógeno y acoplada a los anticuerpos. De la elución de la columna de afinidad, se purifico una fracción importante de la matriz orgánica de la concha del abulón.

También se realizaron pruebas de cristalización de calcita *in vitro*, por medio de la técnica de gota sedente. En las cajas de cristalización se les agregó diferentes concentraciones de proteína. Por medio de microscopía electrónica de barrido, se observaron modificaciones al hábito del cristalino de la calcita. Con ello se encontró que la concentración de proteína utilizada tiene la capacidad de modificar la morfología de la calcita en concentraciones muy pequeñas.

Studies of the organic matrix of the sea shell of abalone

(*Haliotis fulgens*)

Abstract

Biom mineralization refers to the processes and the mechanisms that living organisms use to form and deposit minerals. This is a field that holds a great potential of development in basic science, as well as by its future technological scope. Current knowledge about participant units in this phenomenon, as well as the mechanisms and precise function of the system still obscure. For these reasons it is necessary to know and elucidate the elements that regulate this system.

In this work we elucidated some of the components of the organic matrix of the sea shell of the mollusks. The organic matrix was extracted and different macromolecules isolated by means of reversed-phase HPLC. We partially purified some protein species. The major protein species was one with M_r 35 000. This protein species was electroeluted and used as an antigen to produce polyclonal antibodies in New Zealand White rabbits. Antibodies were purified through Protein A affinity chromatography column.

We have use an antibody bound to CNBr-activated Sepharose affinity chromatography column in order to purified the M_r 35 000 from the seashell crude extract. The eluted proteins were used for in vitro calcite mineralization tests, which were performed using the sitting drop

technique with different protein concentrations. We used scanning electronic microscopy (SEM) to determine how the Mr 35,000 species regulates the shape, and morphologic patterns of calcite crystals. The calcite precipitates in spherulitic forms, and groups of three. Our results showed that the protein species with Mr 35,000 regulates the morphologic changes in calcite crystals using concentrations at the ng level.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIOMINERALIZACIÓN: CONCEPTOS Y GENERALIDADES

La biomineralización es un área de estudio multidisciplinaria que abarca tanto el terreno inorgánico como el orgánico y que estudia los procesos y mecanismos que utilizan los seres vivos para formar y depositar minerales. Los biominerales llegan a ser especie específicos y con muy distintas funciones. Este fenómeno aun no se encuentra esclarecido por completo^{1,2}.

Históricamente el campo de la biomineralización tiene sus inicios en la primera mitad del siglo XX. En ese momento se descubrieron y se describieron muchos microorganismos con biominerales, muchos de estos minerales se identificaron correctamente³, a pesar de que la principal herramienta para estos investigadores fue el microscopio óptico.

En el texto clásico de D'Arcy Thompson de 1917, *On Growth and Form*, él considera el secuestro, confinamiento y ordenamiento de partículas inorgánicas a un estado de equilibrio dentro de un compartimiento protoplásmico, como un fenómeno de considerable importancia biológica³. En 1922, F.W. Clarke y W.C. Wheeler publicaron la primera lista de la composición de varios minerales de origen biológico¹. En 1930, O.B. Bøggild publicó un trabajo basado principalmente en la ultraestructura de la concha de los moluscos. Urist en 1962 estableció: "la naturaleza de los mecanismos locales de

calcificación es uno de los más importantes problemas sin resolver de la bioquímica”⁴.

Entre todos estos investigadores, destaca Heinz Lowenstam. En la década de los años 60, las investigaciones de Heinz Lowenstam, paleoecólogo del California Institute of Technology, uno de los mayores promotores e iniciadores de la biomineralización, llevaron a descubrir que muchos animales con hábitos migratorios, como aves, abejas, ballenas, entre muchos otros, elaboran magnetita que les ayuda a guiarse utilizando el campo magnético de la Tierra. En 1989, Lowenstam junto con Stephen Weiner (Instituto Weizmann, en Israel) escribieron un libro imprescindible en este campo “On Biomineralization”⁵.

La biomineralización se encuentra difundida en todos los reinos de los seres vivos y se observa en 55 phyla. Estos organismos son capaces de formar alrededor de 60 tipos diferentes de minerales. Estos minerales se llaman en la literatura científica: minerales biogénicos, biocerámicas, biominerales, biocompuestos o biomateriales. Algunos minerales biogénicos como los carbonatos de calcio, se forman a gran escala en la biosfera y tienen un gran impacto en la química oceánica, son elementos importantes de los sedimentos marinos y de muchas rocas sedimentarias^{1,2,4}.

Los biominerales están formados de macromoléculas (lípidos, proteínas y polisacáridos) y minerales. Las macromoléculas encontradas en los carbonatos de calcio se clasifican en tres grupos principales: glicoproteínas ricas en ácido aspártico, glicoproteínas ricas en serina y

ácido glutámico, y en el tercer grupo se encuentran las macromoléculas ricas en polisacáridos⁶. Los minerales encontrados son muy diversos, siendo los principales los carbonatos, fosfatos de calcio, silicatos, sulfatos, y óxidos⁷. Ejemplos de estos organismos que contienen minerales son: las bacterias magnetotácticas que sintetizan magnetita; radiolarios, diatomeas y crisófitas, que sintetizan materiales silicios; los moluscos mineralizan carbonatos de calcio para la formación de sus conchas y los vertebrados que mineralizan en mayor abundancia la hidroxiapatita^{2,8}.

Las funciones de los biominerales son amplias, siendo una de las más conocidas proporcionar un mayor esfuerzo a compresión a los tejidos. Las propiedades mecánicas de los biominerales se encuentran en relación directa a sus funciones, tales como el sostén, el molido, el cortar y el equilibrio. Aunque también tienen propiedades magnéticas, ópticas, piezoeléctricas, etc⁹. Normalmente los tejidos biomineralizados tienen diferentes propiedades mecánicas, que los minerales de origen geológico o los producidos por el hombre. La resistencia a la fractura del nácar es superior a 1500 Jm^{-2} , lo cual es significativamente más grande que el concreto con 25 Jm^{-2} . La resistencia a la fractura es tan sorprendente, como el hecho de que la naturaleza ha utilizado materiales relativamente simples, como Ca^{2+} y CO_3^{2-} , para formar estructuras verdaderamente complejas².

Cuando los organismos adquirieron la habilidad para mineralizar partes de su cuerpo, obtuvieron una ventaja adaptativa¹⁰. Estas estructuras biogénicas son perdurables al paso del tiempo, es por ello

que constituyen la base para el registro fósil. Los biominerales de los vertebrados están ligados con varios problemas de salud como caries dentales, fracturas de huesos, pérdida de la densidad mineral ósea, y cálculos renales¹.

En los organismos multicelulares, los biominerales son sintetizados por una serie de procesos coordinados por células, como los osteoblastos en hueso y los dentinoblastos en dentina^{2,8}. Recientemente se ha observado la participación de hemocitos y células del manto en la formación de nácar¹¹. Los tejidos mineralizados son formados dentro de una matriz extracelular. Las células y la matriz extracelular controlan el tamaño, distribución y forma de los cristales de hidroxapatita y aragonita, resultando partículas minerales dentro de proteínas estructurales. En los moluscos, los biominerales tienen una morfología de laminas, columnas e incluso pueden tener diferentes formas alotrópicas de CaCO_3 . Estos biominerales durante su construcción son organizados en una forma ordenada, tienen formas bien definidas con ciertos rangos de tamaño, geometría, simetría y orientación cristalina. Todas estas estructuras son controladas a través de macromoléculas.

1.2 PRINCIPIOS BÁSICOS EN BIOMINERALIZACIÓN

Actualmente se conoce una gran cantidad de estructuras biominerales que se encuentran ampliamente distribuidas en distintos organismos. Sin embargo, se conoce muy poco sobre las interacciones moleculares entre los componentes que dirigen la biomineralización, aun cuando se tienen conocimientos básicos bien identificados.

Existen dos tipos de biomineralización; la Biomineralización Inducida (BI) y la Biomineralización Controlada (BC). Estas se presentan en cuatro lugares preferenciales:

- Epicelular: En la pared celular
- Intercelular: En los espacios existentes entre las células
- Intracelular: Compartimientos dentro de las células
- Extracelular: Matriz extracelular compuesta de macromoléculas

En la BI, los minerales inorgánicos son depositados por una precipitación adventicia, ocasionada por interacciones secundarias de los procesos metabólicos y el medio ambiente. Estos minerales llegan a ser precipitados en los alrededores de los organismos y/o adheridos en la pared celular de algunas bacterias. Los cristales formados no tienen forma, estructura, composición, ni organización definidas. Generalmente son pobremente regulares y son heterogéneos, por no estar bajo el control de una matriz extracelular o celular.

En contraste la BC es un proceso altamente regulado que produce biomateriales distinguibles por su alta fidelidad, reproducibilidad y propiedades cristaloquímicas especie específicas. Estos biomateriales tienen:

- Partículas con medidas uniformes
- Composición y estructuras definidas
- Altos niveles de organización espacial
- Morfologías complejas
- Agregación y textura controlada

- Orientación cristalográfica preferencial
- Construcción altamente ordenada y estructuras a escala

Las estrategias de mineralización más conocidas son a través de vesículas de lípidos y matriz extracelular. Las vesículas de lípidos controlan procesos intracelulares de deposición de biominerales, formando microambientes y en su interior se encuentran proteínas que participan en la biomineralización. El tamaño de las vesículas ($\leq 1-10$ μm en diámetro) generalmente no es compatible con la formación de estructuras de mayores dimensiones como el hueso, dientes o conchas. Los cristales de estos biominerales son construidos en espacios extracelulares. Estos procesos son regulados a través de células especializadas que sellan los espacios con la matriz extracelular, consiste de proteínas solubles, proteínas insolubles y polisacáridos. La fase mineral es depositada en asociación con la matriz orgánica. Alternativamente, las células trabajan en grupo y en asociación con la matriz orgánica².

1.3 ANTECEDENTES DE BIOMINERALIZACIÓN EN MOLUSCOS

El phylum protostoma ha sido ampliamente estudiado como modelo de la biomineralización del exoesqueleto de los moluscos. Especialmente bivalvos, escafofodos y gasterópodos. La concha de los moluscos aunque llegan a tener varias formas, generalmente utiliza el mismo tipo de mineral, CaCO_3 . Los carbonatos de calcio usualmente se encuentran

en sus polimorfos de calcita y aragonita, y se encuentran separados espacialmente (Figura 1). Usualmente la capa más externa de la concha se encuentra formada por calcita, también llamada zona prismática debido a la forma de columna de los cristales, mientras que la región interna de la concha está conformada por aragonita. La aragonita es la zona nacarada. La capa prismática es depositada primero y luego se deposita la capa nacarada. El nácar con el tiempo va incrementando su tamaño. La regulación entre los polimorfismos de la concha se

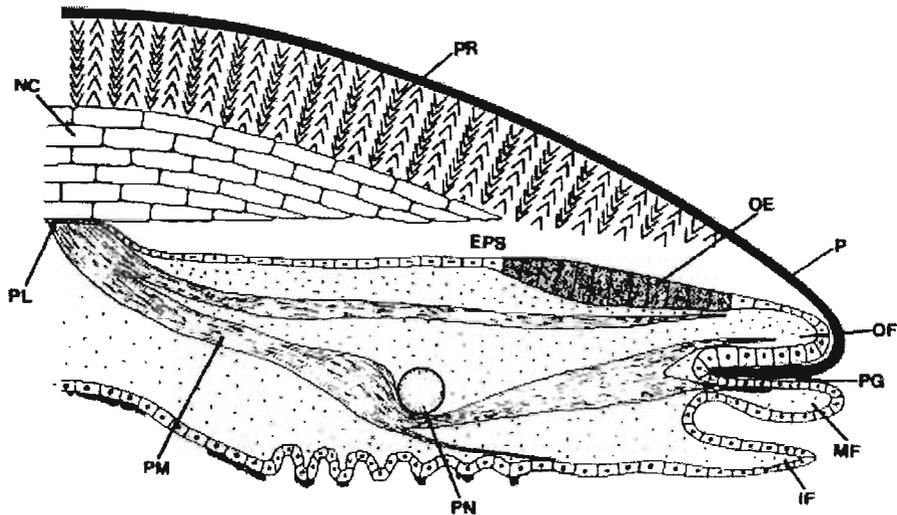


Figura 1. Diagrama del corte longitudinal de un molusco. En la imagen se presenta las capas del periostracum, los prismas de calcita y las tabletas de aragonita, debajo se observa la cavidad extrapalial y el manto. Cavidad extrapalial, EPS; pliegue medio del manto, MF; capa nacarada, NC; epitelio externo del manto, OE; Pliegue externo del manto, OF; Pliegue interno del manto, IF; Periostracum, P; ranura periostracal, PG; línea palial, PL; músculo palial, PM; nervio palial, PN; capa prismática, PR. Imagen tomada de *Differentiation* (2003) 71:237-250

encuentra bajo el control de una capa de células del epitelio externo llamado “Manto”. El manto y la concha se encuentran separados por una cavidad llamada “extrapalial”, que contiene el fluido extrapalial^{12,13}.

Los moluscos durante su ciclo de vida pasan por diferentes estadios: larva, metamorfosis y adulto. Después de que la larva veliger sufre su metamorfosis, la concha de los adultos comienza a formarse por

secreción de las células marginales del manto¹³. Se ha observado que el exoesqueleto de las larvas veliger produce carbonato de calcio amorfo (ACC), que es parcialmente transformado en aragonita. Estos datos sugieren que el ACC es un precursor en la formación de la aragonita en adultos¹⁴.

El manto es un tejido en forma de una hoja discreta adyacente a la concha, y es descrito teóricamente como una serie de compartimientos (Fig. 1). Las principales secciones involucrados en la biomineralización son: 1) la capa de manto, adyacente a la cavidad extrapalial y cercana a la concha que, incluye parte del borde del manto y 2) La cavidad extrapalial que contiene al fluido extrapalial. En esta cavidad tiene lugar la depositación y la formación de la concha. Las células del manto regulan el acceso de materiales a la cavidad extrapalial y secretan las macromoléculas, por un mecanismo todavía no elucidado. Estudios han indicado que el crecimiento de la concha tiene lugar muy cerca de los bordes del manto¹⁵. Las células centrales del manto no están enriquecidas con membranas intracelulares asociadas con la secreción, como en las células del borde. Tsujii en 1976¹², comprobó que las células centrales del manto cambian su morfología a células del borde del manto, cuando se ha realizado un daño en la concha y necesita ser reparado, esto quiere decir que las células del borde pudieran sintetizar la matriz orgánica necesaria para la formación de la concha. Esto no quiere decir que las células centrales del manto no participen en la formación de la concha o estén inactivas en dicho proceso.

La cavidad extrapalial teóricamente, contiene la llave para comprender las condiciones necesarias para la mineralización ordenada. Estudios sobre la composición elemental del fluido extrapalial, demuestran que no es tan diferente del agua del mar. Los valores de calcio en el fluido extrapalial son tan altos como en el agua del mar o la hemolinfa¹². El fluido extrapalial contiene varios iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^{-1} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} y además de CO_2 ¹⁵. Contiene además una mezcla compleja de proteínas, mucopolisacáridos, carbohidratos y probablemente lípidos¹⁶.

El periostracum es una estructura orgánica que cubre la capa prismática de la concha, su grueso varía dependiendo de la madurez de los organismos y la especie. Esta capa está formada por las células de la base del pliegue más externo del borde del manto. El periostracum forma una capa de moléculas escleróticas. Esta estructura probablemente favorezca a la formación de la concha por dos vías: Que el periostracum por su estructura polimérica funcione como un aislante, separando al fluido extrapalial del medio externo y formando una conexión entre el borde del manto y la concha. Segundo, algunas observaciones implican que el periostracum forma un sustrato sobre el cual se inicie la formación de la capa prismática^{12,13}.

En esta introducción se ha dado al lector una base teórica para poder entender el campo de la biomineralización. En la sección experimental se detalla paso a paso el trabajo en la extracción y purificación parcial de una proteína del abulón. A partir la purificación parcial se generó anticuerpos policlonales contra una proteína de una

masa molecular relativa (M_r) de 35 000 y se construyó una columna de afinidad para la misma. Finalmente se detalla la realización de pruebas de cristalización de calcita *in vitro* y su interacción con la proteína de M_r 35 000. En la sección de resultados y discusiones, se presentan los resultados de cada experimento y su análisis. Consecutivamente en el punto 6 de la tesis se presentan las conclusiones y perspectivas. Al final de la tesis se presentan los anexos.

Tabla I. Proteínas Caracterizadas de las Conchas de Moluscos

| PROTEÍNA | ESPECIE | FUNCIÓN | REFERENCIA |
|------------------------|---------------------------|--|---|
| MSP 1 | <i>Pecten jacobaeus</i> | Asociada a la calcita; relacionada a la Lustrina A. | Sarashina y Endo, 2001 |
| Nacreína (N66) | <i>Pinctada fucata</i> | Funciona como una anhidrasa carbónica, además de poseer dominios negativamente cargados que probablemente estén asociados al nácar. | Miyamoto et al., 1996 |
| MSI 31 | <i>Pinctada fucata</i> | Localizada en el borde del manto y por tener dominios ácidos, pudiese estar asociada a la calcita. | Sudo et al., 1997 |
| MSI 60 | <i>Pinctada fucata</i> | Contiene dominios polialanina y poliglicina, y con regiones ácidas en el amino y carboxilo terminal, probablemente interactúe con iones calcio para formar la aragonita. | Sudo et al., 1997 |
| Familia N 16 (Perlina) | <i>Pinctada fucata</i> | Extraída del nácar, en relacionada a la formación de láminas de aragonita. | Miyashita et al., 2000 |
| Mucoperlina 2 | <i>Pinna nobilis</i> | Glucoproteína ácida del nácar asociada a la fase mineral. | Marin et al., 2000 |
| Perlustrina | <i>Haliotis leavigata</i> | Proteína del nácar, relacionada a una proteína de unión a IGF*. | Weiss et al., 1999, 2001 |
| Lustrina A | <i>Haliotis rufescens</i> | Fibra adhesiva ubicada entre las tabletas de aragonita. | Shen et al., 1997 |
| Perlucina | <i>Haliotis leavigata</i> | Lectina tipo C; se une a la quitina en el nácar, induciendo la nucleación de CaCO_3 . | Weiss et al., 1999, Mann et al., 2000, Blank et al., 2003 |
| Perlinhibina | <i>Haliotis leavigata</i> | Inhibe el crecimiento de la calcita. | Trecanni et al., 2003 |
| AP-7&24 | <i>Haliotis rufescens</i> | Proteína ácida del nácar; interactúa con la calcita. | Michenfelder et al., 2003 |
| EP-1 | <i>Mytilus edulis</i> | La mayor proteína del fluido extrapalial; se une al calcio y se ensambla en multímeros. | Hattan et al., 2001 |

*IGF= Factor de crecimiento tipo insulina

2. OBJETIVOS

- a) Extraer la matriz orgánica de la concha del abulón
- b) Analizar y fraccionar alguna(s) macromolécula(s) de la matriz orgánica de la aragonita de la concha del abulón.
- c) Determinar la actividad biológica de la fracción purificada-calcita, en experimentos *in vitro*.

HIPÓTESIS

La matriz orgánica de la concha de los moluscos está conformada por una mezcla compleja de macromoléculas. Estas macromoléculas participan activamente en la nucleación, crecimiento, morfología, organización e inhibición del crecimiento de los CaCO_3 en la concha del abulón.

3. JUSTIFICACIÓN

La formación de los minerales biogénicos es más complicada de entender, en comparación con los cristales inorgánicos. Es generalmente aceptado que la mineralización ocurre dentro de compartimientos específicos o en microambientes, los que estimulan la producción de cristales en sitios específicos e inhiben o previenen estos procesos en otros sitios. El detalle de la composición iónica y el contenido orgánico de estos microambientes, en que los cristales son formados, son poco conocidos. Por ello en esta tesis se ha tratado de dilucidar los componentes de la matriz orgánica de la concha del abulón (*Haliotis fulgens*). Conocer los componentes del sistema es la base necesaria para poder llegar a deducir el funcionamiento del mismo. En el momento en que la ciencia deduzca cual(es) es (son) el (los) mecanismo(s) de la biomineralización, podrá replicarse su mecanismo *in vitro*. Ello nos llevará a una nueva era de los materiales.

4. METODOLOGÍA

4.1 COLECTA DE LAS CONCHAS, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PURIFICACIÓN PARCIAL

Las conchas de abulón azul de *Haliotis fulgens*, de juveniles y adultos, fueron colectadas en la bahía de Magdalena, (Fig. 2) en las costas de Baja California Sur. Las conchas de *Haliotis fulgens*, se lavaron con agua corriente y las impurezas que rodean a la concha, como balanos y exceso de sales se eliminaron. Posteriormente se eliminó la capa

de calcita de la concha a través de un lijado, con el fin de obtener solamente la región nacarada. Como método base se utilizaron los trabajos de Karlheinz Mann^{18,19} y se realizaron algunas modificaciones, debido a que no se logró una repetición de los resultados. Pero en términos generales es como se describe a continuación.

Primero se limpió la zona nacarada, para quedar libre de calcita e impurezas. El nácar libre de impurezas fue triturado y molido en un mortero de ágata. Después fue tamizado en

una malla de un diámetro de 0.32 mm. El nácar en polvo se incluyó en



Figura 2. Ubicación de la Bahía de Magdalena.



Figura 3. *Haliotis fulgens*

una solución de ácido acético al 10 % se realizó una molienda del nácar con un mortero de ágata, en una relación 1g/10ml. El método alternativo fue exponer la fracción de aragonita de la concha, directamente, al ácido acético al 20%, sin triturar, manteniendo la misma relación 1g/10ml. En ambos casos, se dejaron reaccionar durante 12 h, a una temperatura de 4°C. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 63907 *g*, 4°C, durante 50 min y concentrados en un equipo de ultrafiltración (AMICON), se utilizó una membrana de nitrocelulosa con un corte de 3 kDa. Posteriormente se dializó contra de Tris base a 25 mM, pH de 7.4, durante 48 hrs. Después fue dializado contra EDTA 5 mM^{23,24}, para eliminar completamente las sales de metales divalentes (Ca²⁺) a un pH neutro. Con los extractos obtenidos se realizaron electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE)²⁰. A continuación fueron dializados contra TRIS 25 mM, 0.01 de TFA y centrifugados, antes de ser inyectado al RP-HPLC (siglas en ingles de “Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa”). Los extractos fueron inyectados en una columna de fase reversa Vydac C4^{21,22}. Se utilizó un gradiente lineal de 0-100% de acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), a un flujo de 0.5 ml/min durante 30 o 60 min. Las fracciones colectadas se concentraron y analizaron por SDS-PAGE.

4.2 ELECTROELUCIÓN

A partir de las fracciones obtenidas en la cromatografía fase reversa, se obtuvieron diferentes proteínas en un intervalo de pesos entre 100 y 10 kDa (Figura 10). La proteína más abundante presentó una masa molecular relativa (M_r) de 35 000 y en esta se centró nuestro estudio. Esta banda se cortó y se electroeluyó. Para la electroelución se utilizó una cámara de BIO-RAD modelo mini-protean II cell y un módulo Electro-Eluter. El fragmento de gel donde se encuentra la proteína fue puesto en un tubo de diálisis. El tubo de diálisis se encuentra en posición horizontal con respecto a la cámara, en una solución de corrido, compuesta de 50 mM de Tris/Acetatos, pH 7.4, 0.1% SDS y 0.5 mM de triglicolato de sodio. Se aplicó un voltaje de 10 volts por tubo de diálisis y un amperaje de 10 mA. Después de tres horas se retiró el tubo de diálisis y se recuperó la fracción electroeluída. La solución el tubo de diálisis, fue posteriormente dializada contra agua Milli-Q y finalmente liofilizada. El liofilizado fue resuspendido en 400 μ L de PBS^{25,26}.

4.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

4.3.1 Inmunizaciones

Para la producción de anticuerpos, se utilizó la fracción electroeluída como antígeno. Se utilizaron conejos de la cepa New Zealand White, los cuales se inmunizaron cada 15 días de forma subcutánea en el cuello. La primera inmunización se llevó a cabo con 100 μ L coadyuvante de Freund completo y otra cantidad igual de antígeno. Las siguientes

inmunizaciones se efectuaron con 50 μ L coadyuvante de Freund incompleto, con una cantidad igual de antígeno. En la primera, tercera y cuarta inmunizaciones se realizó un sangrado (aproximadamente 1 ml) de la vena marginal de la oreja, para determinar la producción de anticuerpos. La exsanguinación de los conejos se realizó 15 días después de la última inyección. Después de colectar la sangre, esta se dejó coagular a temperatura ambiente durante 60 min. Para separar el suero del coagulo, células sanguíneas y cualquier material insoluble restante; se centrifugo a 16770 *g* durante 10 min a 4°C. Después el suero se almacenó a 4°C hasta su utilización^{25,26}.

4.3.2 Inmunotransferencias (Western Blot)

Se corrió un gel SDS-PAGE con la proteína electroeluida y resuspendida en PBS y se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa, en una cámara BIO-RAD modelo mini-protean II cell y un modulo a Mini Trans-Blot cell. Con un voltaje de 50 V y un amperaje de 0.2 A. Se observó la electrotransferencia al teñir la membrana con rojo de Ponceau. Después se bloqueó con leche descremada (blotto). Posteriormente se incubó la membrana con solución blotto y el primer anticuerpo (anticuerpo para la proteína del abulón obtenido de la sangre del conejo), durante una noche a 4°C, a una dilución de 1-100. Después se bloqueó nuevamente la membrana con blotto. A continuación se incubó a la membrana con solución blotto y el segundo anticuerpo (anticonejo), durante 3 h a 4°C y con una dilución de 1-1000. A continuación se bloqueo la membrana con solución blotto, se lavó con PBS y con agua Milli-Q. Finalmente se

reveló la membrana de nitrocelulosa con 3,3' diaminobencidina (DAB)^{25,26}.

4.4 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Se utilizó una columna de Bio-Rad Affi-Gel Protein A. Con un flujo de 1 ml/min. La solución de unión fue PBS, la solución de elución fue 0.1 M glicina pH 2.5 y la solución neutralizadora fue PBS con NaCl 1M. En cada corrida fueron inyectados 4 ml de suero sanguíneo del conejo. La solución eluida se llevó a un pH de 7. Esta solución se dializó contra agua Milli-Q y después se liofilizó^{27,28}.

4.5 CONSTRUCCIÓN DE LA COLUMNA DE AFINIDAD PARA LA PROTEÍNA DE M_r 35 000

Se desarrollaron anticuerpos policlonales para una proteína de M_r 35 000, obtenida de la concha del abulón. Estos anticuerpos fueron acoplados a Sefarosa 4B activada con CNBr (bromida de cianogeno).

Se utilizaron los siguientes materiales:

1. Sefarosa 4B activada con CNBr.
2. Anticuerpos policlonales
3. Solución de 1mM HCl
4. Solución acopladora: 0.1M NaHCO₃ pH 8.3, 0.5M NaCl.
5. Solución de bloqueo: 0.2M glicina pH 8.0.
6. Solución de lavado: 0.1M CH₃COONa:3H₂O pH 4, 0.5M NaCl

7. Agitador Orbital

Los anticuerpos se dializaron durante toda la noche contra la solución de acoplamiento a 4°C. La relación anticuerpo-sefarosa fue de 3.5 mg de anticuerpo por 5 mg de sefarosa. La sefarosa fue hidratada en un tubo cónico de 50 ml en ácido clorhídrico durante 15 min. Después se centrifugó a 377 *g* durante 5 min, y se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces. El gel fue resuspendido en 10 ml de solución acopladora, y transferido a un tubo cónico de 15 ml, y fue centrifugado a 377 *g* durante 5 min y se resuspendió en la solución acopladora con los anticuerpos. La combinación del anticuerpo y el gel fueron agitados durante toda la noche. Después de esta incubación la mezcla se centrifugó a 377 *g* durante 5 min, y se decantó. El gel fue resuspendido en la solución bloqueo y centrifugado a 377 *g* durante 5 min. Esta mezcla se dejó agitando durante una noche. Finalmente se lavó el exceso de anticuerpo con la solución de lavado y centrifugada la muestra a 377 *g* durante 5 min. El gel se lavó con solución acopladora y se centrifugó a 377 *g* durante 5 min. Se lavó alternativamente con la solución acopladora y la solución de lavado, al menos 5 veces^{27,28}.

4.6 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS UTILIZANDO LA COLUMNA DE AFINIDAD

El acoplamiento de los anticuerpos a la sefarosa fue hecho de acuerdo a las instrucciones del proveedor^{27,28}. La proteína de M_r 35 000 se purificó

a partir del extracto de la concha del abulón usando la columna de afinidad. La columna fue generada por conjugación de los anticuerpos purificados a sefarosa activada CNBr (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). La sefarosa acoplada al anticuerpo se montó en una columna de 0.5 cm de diámetro y 15 cm de largo, con un flujo de 1 ml/min. Las soluciones utilizadas en la columna fueron: Unión-PBS, elusión-0.1M glicina pH 2.5 y neutralizadora-PBS+NaCl 1M. En cada corrida se inyectaron 500 μ L de extracto del nácar del abulón. La solución eluida se llevó a un pH de 7. Esta solución fue dializada contra agua Milli-Q, concentrada con un centricon plus-20, y finalmente liofilizada^{27,28}.

4.7 PRUEBAS CRISTALIZACIÓN DE CALCITA *IN VITRO*

Para el crecimiento de cristales de CaCO_3 se utilizó la técnica de gota sedente. Las soluciones utilizadas fueron; A) Carbonato de amonio 100mM pH8.2. B) Cloruro de calcio 40 mM pH7. En los pozos se colocó la proteína a una concentración de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5 y 2 ng/ μ L. En las condiciones control no se utilizó proteína. Los tiempos de cristalización fueron: 24, 48 y 72 hrs. Después de haberse formado cristales, estos fueron retirados y montados en un portamuestras de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)^{29,35}.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 PURIFICACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEÍNA DE M_r 35 000

El nácar es un material compuesto con una organización compleja, las tabletas de aragonita se encuentran embebidas en una matriz orgánica. La matriz orgánica se obtuvo después de desmineralizar el nácar con ácido acético al 10% (en polvo) y 20% (sin triturar). La diferencia entre ambos extractos de 10% y 20%, radica en la concentración de proteína. Mediante el método de Bradford se cuantificó la proteína total obtenida en un gramo de nácar. En un gramo en polvo se obtuvieron 38.6 μg de proteína y en el nácar sin triturar se obtuvieron 46.9 μg de proteína. En la matriz orgánica del nácar se detectaron varias proteínas, visualizadas con electroforesis SDS-PAGE (Fig. 4). La visualización con electroforesis es la misma para ambos extractos. En el carril 4A se presentan los marcadores. En el carril 4B, se observan varias especies de proteínas, se marcaron las más abundantes.

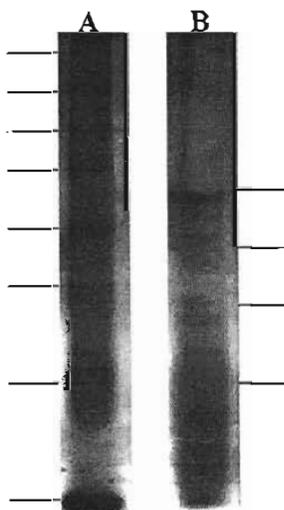


Figura 4. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Carril A, marcadores: 209, 124, 80, 49.1, 34.8, 28.9, 20.6 y 7.1 kDa. Carril B, extracto crudo.

Por el mayor rendimiento de proteína obtenido con el nácar sin triturar, se utilizó solo este método de extracción. Este extracto se inyectó a una columna de fase reversa C4, obteniendo el perfil de elución que se muestra en la figura 5. La fracción donde se obtuvo una mejor visualización de proteína fue a una concentración de 75% de acetonitrilo. La fracción eluída con 75% de acetonitrilo se recirculó en la columna, sin obtener una mejor resolución.

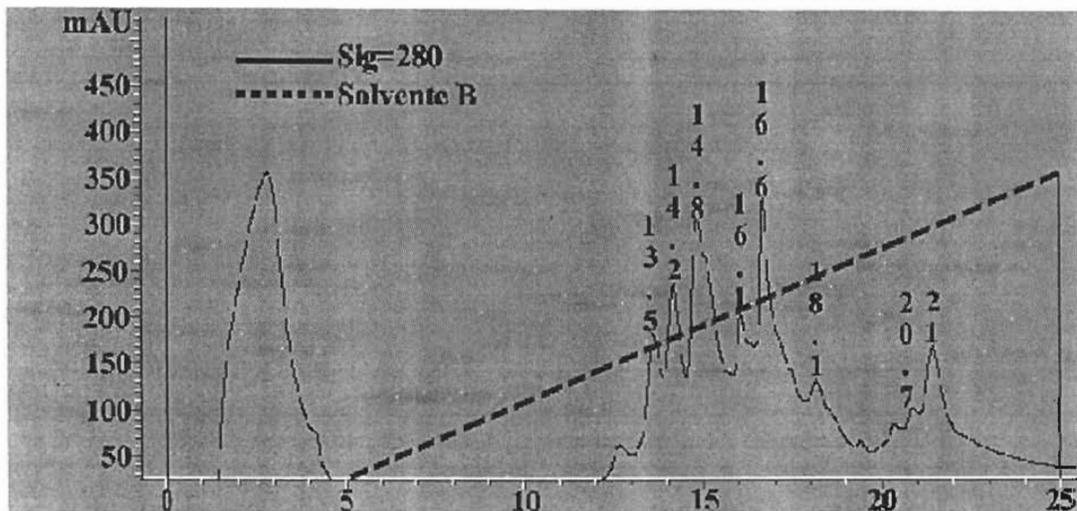


Figura 5. La fracción donde se obtuvo una mayor cantidad de proteína fue eluída a los 75% de acetonitrilo.

En el análisis de la fracción de 75% de acetonitrilo con SDS-PAGE se observó una mezcla de proteínas (Fig. 6). Donde la más abundante es una proteína de M_r 35 000. En la figura 6B, se presentan diferentes bandas de proteínas y la proteína de M_r 35 000. La banda de M_r 35 000 fue cortada del gel y electroeluída. La electroelución se empleó para obtener la proteína pura y utilizarla para producir anticuerpos

policlonales (Fig. 7). En el carril B, se observa pura la proteína de M_r 35 000.

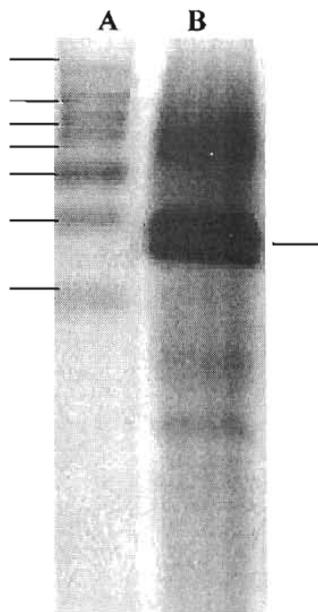


Figura 6. En el carril A se presentan los marcadores con un peso en kDa de: 250, 150, 100, 75, 50, 37 y 25. En el carril B la fracción eluida con 75% de acetonitrilo.

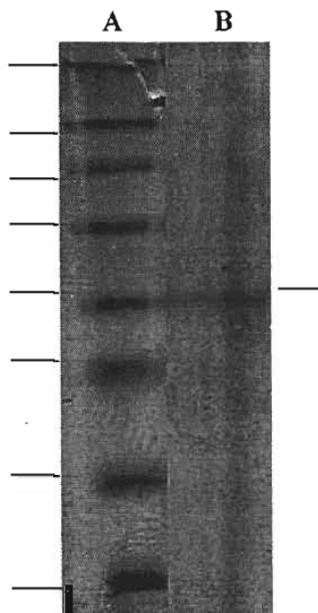


Figura 7. En el carril A se presentan los marcadores con un peso en kDa: 200, 116, 97, 66, 35, 21, 14 y 6. En el carril B; se observa la proteína de M_r 35 kDa.

A pesar de haber seguido el método de Mann, no se obtuvieron los mismos resultados. Es de resaltar que en este estudio se trabajó con otra especie y es posible que el cambio de especie haya tenido un papel importante³⁶. Además hay que resaltar que la mayoría de las proteínas asociadas al fenómeno de biomineralización en moluscos, han sido aisladas e identificadas a partir de mRNA (Tabla 1). Otros autores también se han encontrado con problemáticas similares al tratar de purificar proteínas a partir de este tipo de extractos³⁷⁻³⁹, sin que haya una explicación clara. La purificación parcial de la proteína de Mr 35 000 fue la base para el trabajo posterior.

5.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

A los conejos les fue inyectado el antígeno de la proteína electroeluida, como se estableció en el método experimental. Con las muestras obtenidas se realizaron los western blot y se realizó la purificación de anticuerpos.

5.2.1. Inmunotransferencias (Western Blot)

Antes de la primera inmunización se realizó un sangrado, para monitorear el nivel de anticuerpos. Después la primera y las subsecuentes inyecciones de antígeno con coadyuvante de Freund, se

realizaron sangrados en la vena marginal de la oreja del conejo. Con el fin seguir la respuesta del conejo al antígeno.

En la figura 8, se presenta un western blot donde fue utilizado suero de conejo, después del cuarto refuerzo con el antígeno. En el carril 8A, corresponde a los marcadores. En el carril 8B, se observa claramente una sola banda que pertenece a la proteína electroeluida y reconocida por el anticuerpo del suero del conejo, esta se encuentra debajo del marcador de 39 kDa.

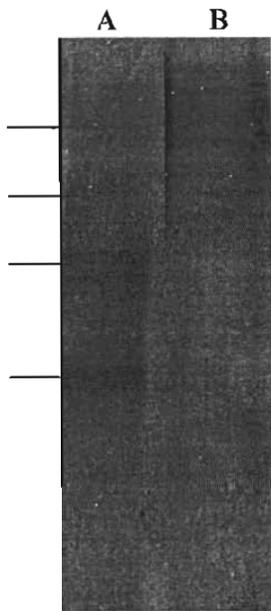


Figura 8. En el carril 9A corresponde a los marcadores, los pesos en kDa son los siguientes: 39, 30, 16.6 y 8.2. En el carril B se observa la proteína electroeluida y reconocida por el anticuerpo.

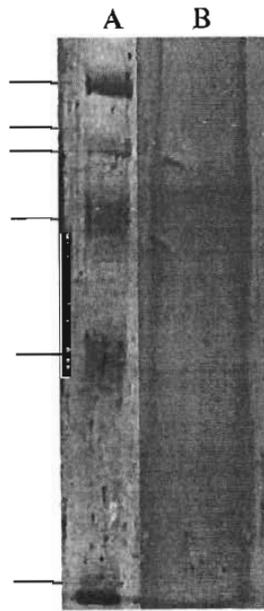


Figura 9. En el carril A, se encuentran los marcadores: 103, 77, 50, 34.3, 28.8 y 20.7 kDa. En el carril B, se observa una sola banda correspondiente a la proteína electroeluida y reconocida por el anticuerpo purificado.

En la figura 9 se presenta el western blot donde fue utilizado como anticuerpo primario, los anticuerpos purificados con la columna de proteína A. En el primer carril se distinguen los marcadores. Mientras en el segundo carril se encuentra una sola banda, arriba de el marcador de 34.3 kDa. Esta banda pertenece a la proteína electroeluida y

electrotransferida, que fue reconocida por el anticuerpo purificado del suero del conejo con la columna de proteína A.

A partir de la purificación del anticuerpo, se logró construir una columna de afinidad de sefarosa activada CNBr (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) acoplada a las IgG. Con el objetivo final de purificar la proteína de M_r 35 000.

5.3 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL ABULÓN POR MEDIO COLUMNA DE PROTEÍNA AFINIDAD A UNA PROTEÍNA DE M_r 35 000.

Mediante cromatografía de afinidad, se logró obtener una fracción con proteínas del abulón. Se analizó la elusión con SDS-PAGE donde se observan tres bandas importantes. La más abundante es una proteína con una M_r de 35 000. En el carril A de la figura 10, se presentan los marcadores moleculares. En el carril B de la figura 10, se presenta la elusión concentrada de la columna de afinidad. La proteína más abundante tiene una M_r de 35 000. Con esta columna se pueden obtener 6.9 μ g de proteína total, a partir de 1 g de nácar. En la figura 11, se presenta un western blot, donde el carril A pertenece a los marcadores, el carril B a el extracto obtenido de la desmineralización del nácar y el carril C es la fracción eluida de la columna. En el carril (C) de la figura 11, se presentan dos bandas importantes una de menos de 34 kDa, la segunda por arriba de 34 kDa. Es probable que la proteína de M_r 35 000 forme dímeros.

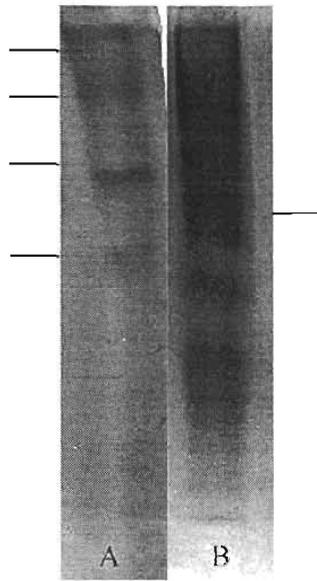


Figura 10. Gel de electroforesis. Carril 11, marcadores: 130, 77, 43 y 31. Carril B, elución de la columna de afinidad.

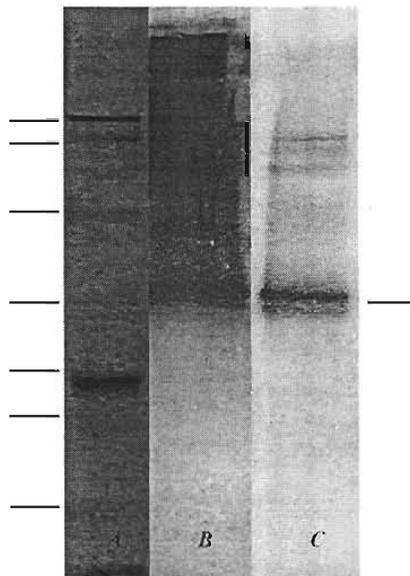


Figura 11. Carril 11A, marcadores: 208, 105, 53, 34, 23, 17, 7. Carril B, inmunodetección de proteínas en el extracto. Carril C, inmunodetección de proteínas en la elución de la columna de afinidad.

5.4 ESTUDIOS DE CRISTALIZACIÓN DE CALCITA *In Vitro*

En esta parte experimental nuestro objetivo fue saber si la proteína de M_r 35 000, tenía algún efecto sobre la cristalización de la calcita, mediante cambios en la morfología de los cristales de carbonatos de calcio, al ser crecidos en presencia de dicha proteína. Para ello se utilizó la técnica de difusión de vapor en gota sedente (Fig. 12). La técnica de gota sedente es uno de los métodos más ampliamente usados para crecimiento de cristales. Debido a que es un método rápido, donde se observan una gran variedad de condiciones.

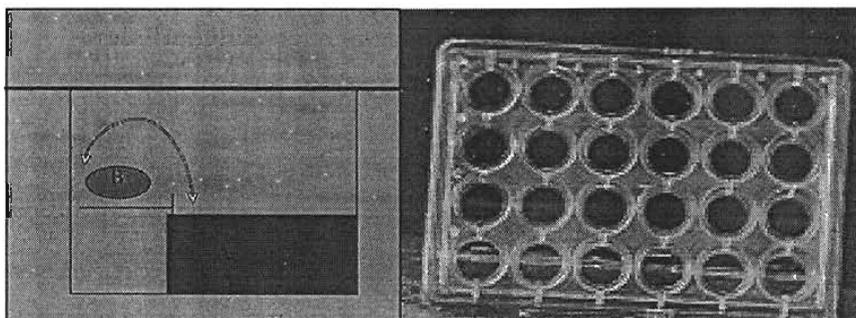


Figura 12. La técnica de difusión en fase vapor en gota sedente.

Las concentraciones de proteína añadidas a las cajas de cristalización fueron 20, 40, 60, 80, 100, 150 y 200 ng/uL, estos intervalos son los convencionalmente utilizados en experimentos de cristalización de calcita con proteínas y otros polipéptidos⁴⁰⁻⁴⁴.

En nuestros experimentos control de cristalización *in vitro*, la calcita presenta su clásica forma romboédrica (Fig. 13). El crecimiento de cristales en la ausencia de la proteína, es siempre en romboedros perfectos.

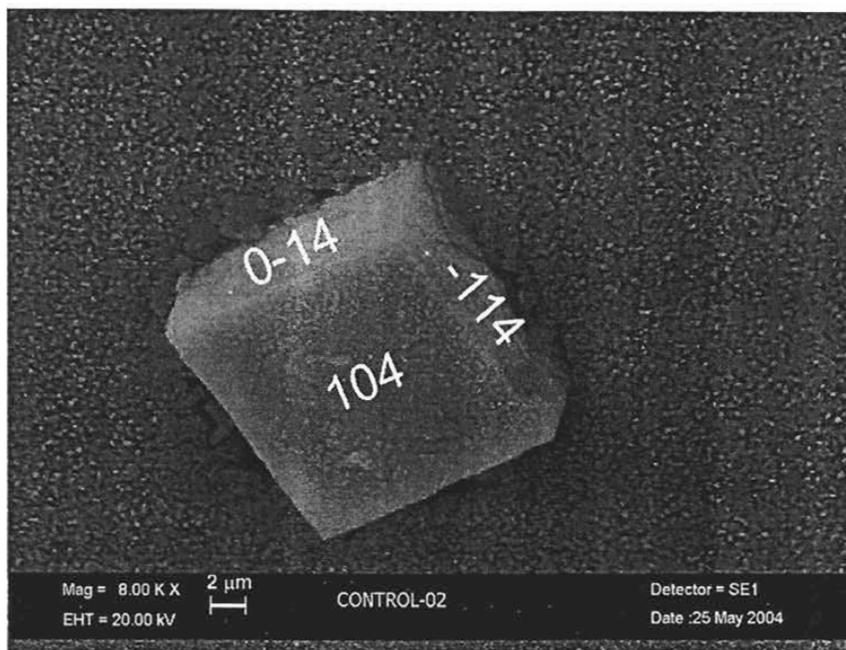


Figura 13. Cristal de calcita crecido en gota sedente. Solución A: $(\text{NH}_4)_2 \text{CO}_3$ 100mM y pH 8.2. Solución B: CaCl_2 40 mM y pH 7.

En la figura 14, se presenta una modificación al hábito cristalino de la calcita debido a la adición 20 ng/ μL de proteína, en 24 h de crecimiento. La proteína de M_r 35 000 es un factor determinante en el cambio del crecimiento y morfología de los cristales de calcita. El romboedro comienza a mostrar escalones de crecimiento sucesivos en sus bordes.

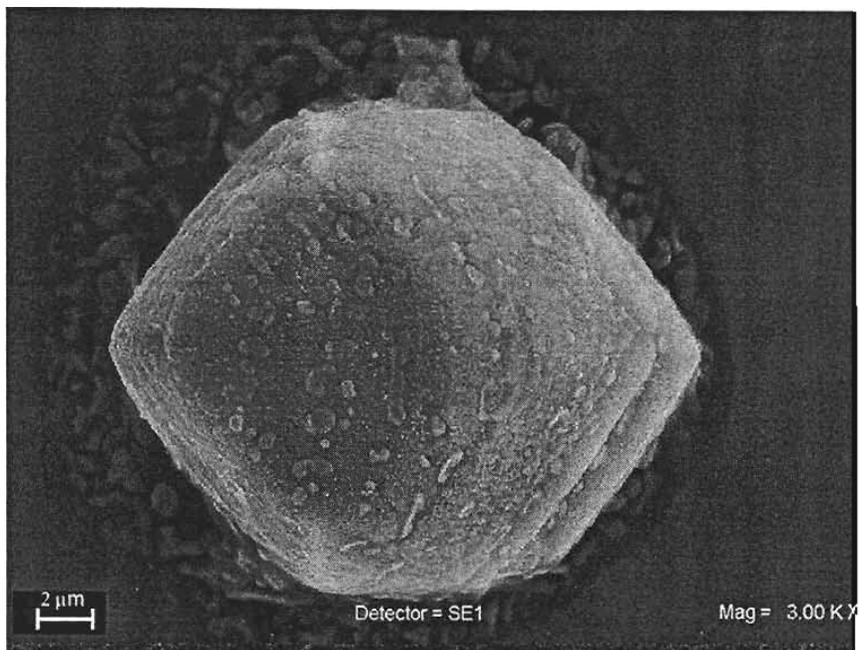


Figura 14. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/μl de proteína. Durante 24 h.

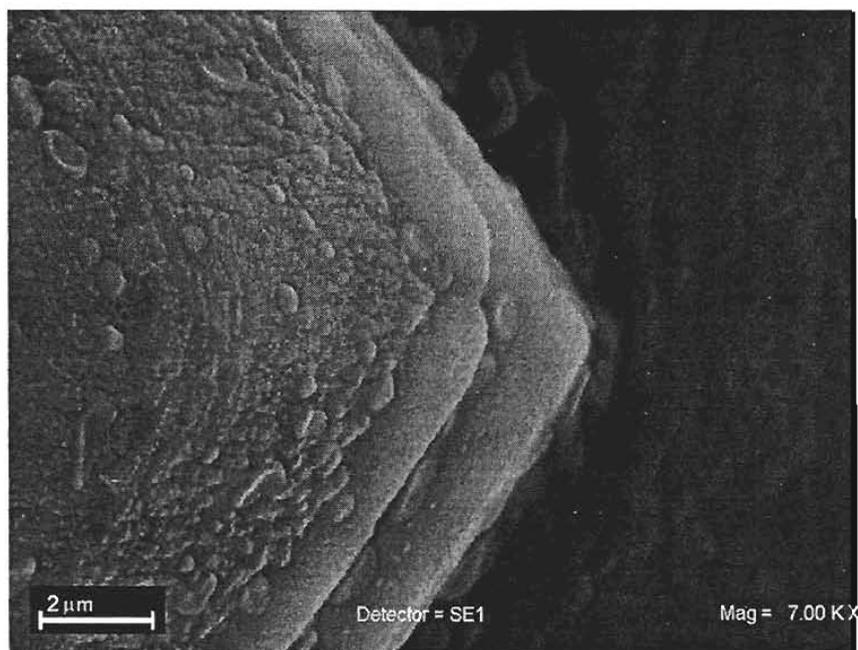


Figura 15. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/μl de la proteína. Durante 24 h.

En la figura 15, se observa un aumento de la figura 14. En esta imagen se presentan los escalones de crecimiento bien definidos y otros que comienzan a formarse en los bordes del cristal. También se observan pequeños cristales sobre los escalones. Por las imágenes mostradas, se considera que el crecimiento sucesivo es controlado o modulado por la proteína. Además este crecimiento pareciera emular las láminas que se presentan en las conchas de los moluscos.

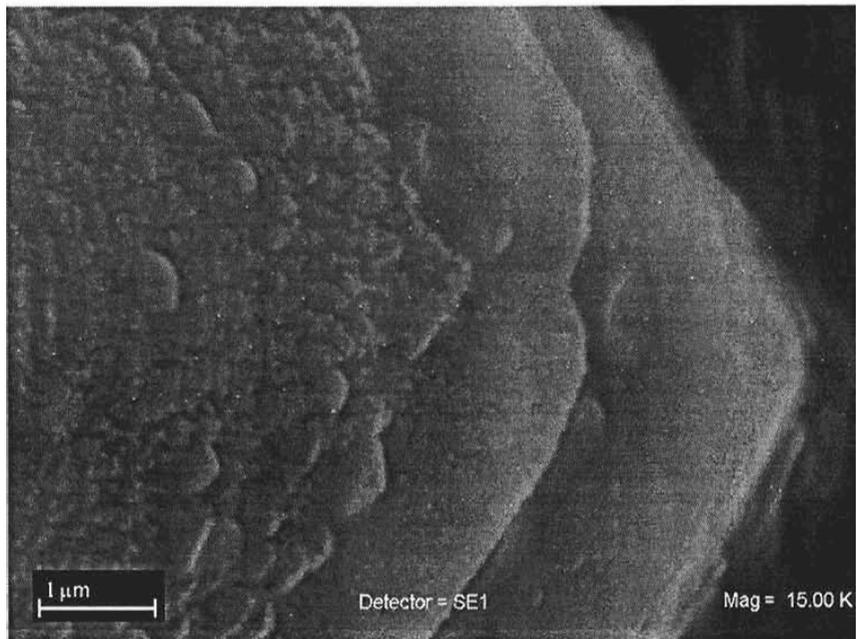


Figura 16. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/μl de la proteína. Durante 24 h.

En la figura 16, se observa la figura 15 con aumento sobre la esquina derecha. Esta figura muestra claramente, lo mencionado anteriormente, es de resaltar la claridad de la formación de los escalones de crecimiento y su regularidad. En la figura 16, se observan además los pequeños cristales que se encuentran depositados sobre los escalones de crecimiento.

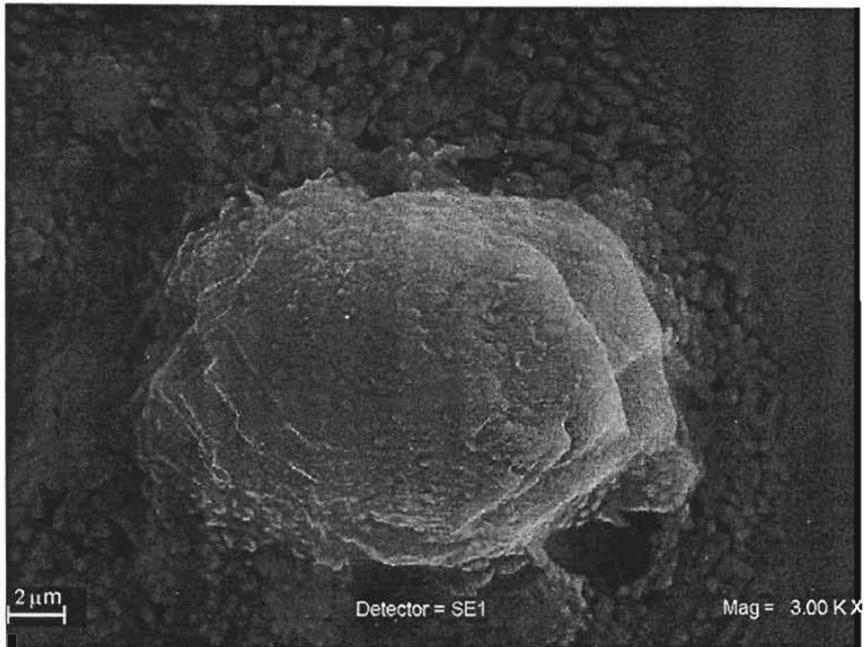


Figura 17. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/μl de la proteína. Durante 48 h.

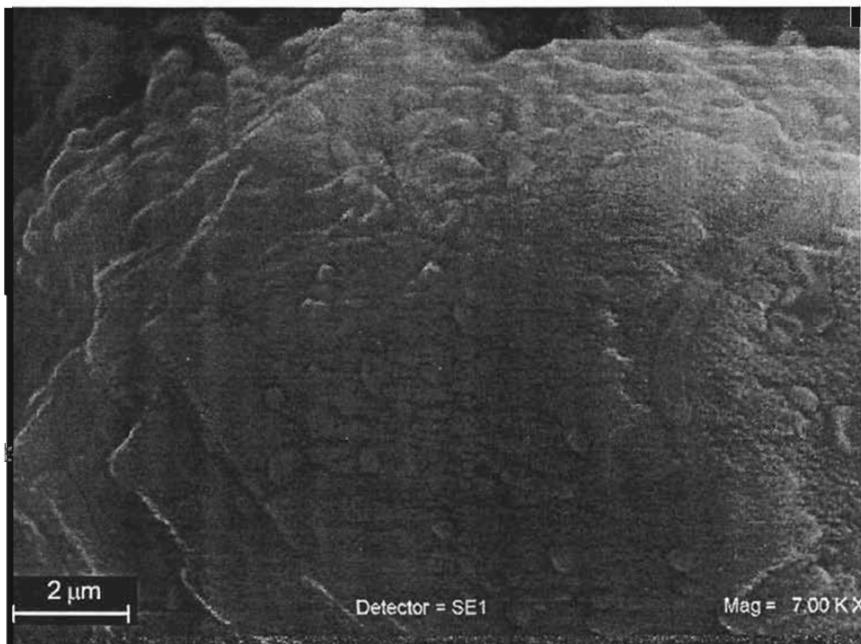


Figura 18. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/μl de la proteína. Durante 48 h.

En la figura 17, se observa la misma condición, con la diferencia de haber crecido durante 48 h. En esta imagen se aprecia cómo el crecimiento de los escalones ha redondeado los bordes del cristal. El crecimiento de los escalones en forma de láminas, han cubierto la mayor parte de las caras cuadradas del cristal, a modo de verse ligeramente redondeado. Se trata de un crecimiento sucesivo, que dará finalmente la forma de un esferulito. En la figura 18, se presenta una magnificación de la figura 18. En esta imagen se aprecia claramente el crecimiento sucesivo, como si fueran olas de crecimiento, formando láminas. En la figura 19, se observa un mayor aumento de las olas de crecimiento.

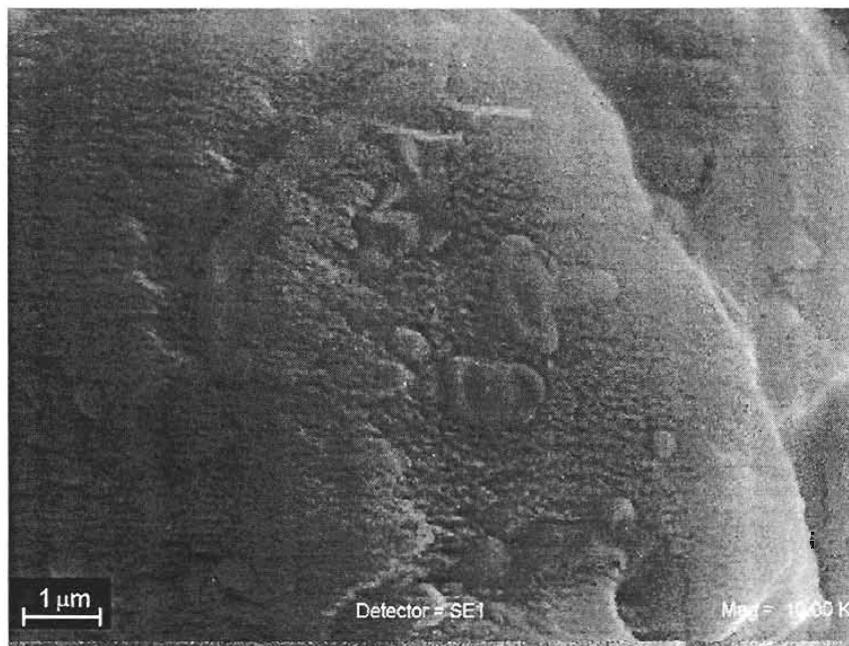


Figura 19. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/μl de la proteína. Durante 48 h.

En la figura 20 se presenta una modificación del habito cristalino de la calcita debido a la adición de 20 ng de proteína en las gotas de cristalización. La diferencia con las anteriores fotografías radica en el tiempo de cristalización, este cristal tiene un tiempo de cristalización de 72 h. Básicamente en este cristal el crecimiento de las láminas ha sido tal que la forma romboédrica desapareció por completo. En su lugar se observan formas de esferulitos claras.

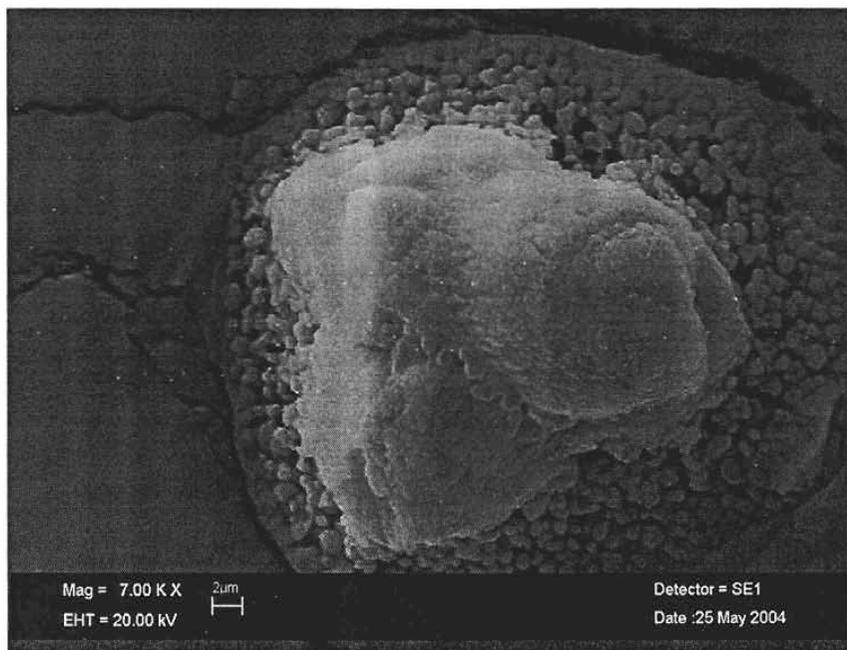


Figura 20. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 20 ng/ μ l de la proteína. Durante 72 h.

En la figura 21 se presenta un cristal con 60 ng de proteína, en 72 h de crecimiento. En este cristal permite observar el crecimiento a partir de los bordes para dar otros esferulitos.

En las figuras 22 y 23, se presentan los resultados de la adición de 100 ng de la proteína en las gotas de cristalización. Se presentan agregados esferulíticos en grupos de tres, también se observa que son

policristalinos. Además, se observan escalones de crecimiento del proceso cristalización a lo largo de los agregados esferulíticos, lo cual demuestra una morfología compleja y parte del mecanismo de crecimiento cristalino.

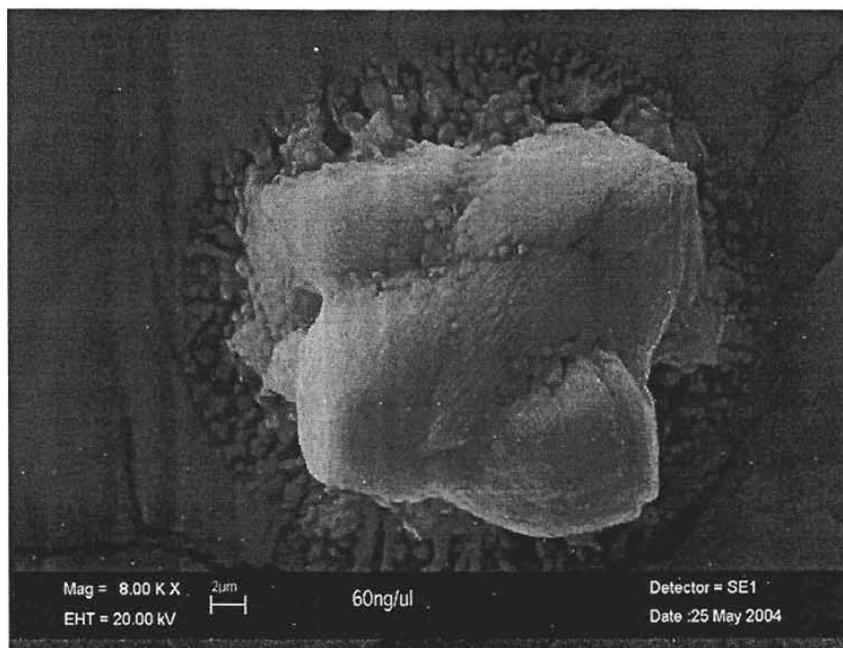


Figura 21. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 60 ng/μl de la proteína. Durante 72 h.

Los moluscos modulan el crecimiento y forma de los cristales de su concha por medio de tres mecanismos importantes. Modificando las condiciones de precipitación (iones y pH), por medio de las células del manto. La matriz orgánica de las conchas de los moluscos contiene macromoléculas, y éstas controlan la nucleación, crecimiento y la morfología de los minerales de las conchas, a través de la formación de una matriz que actúa como molde para la cristalización³⁴.

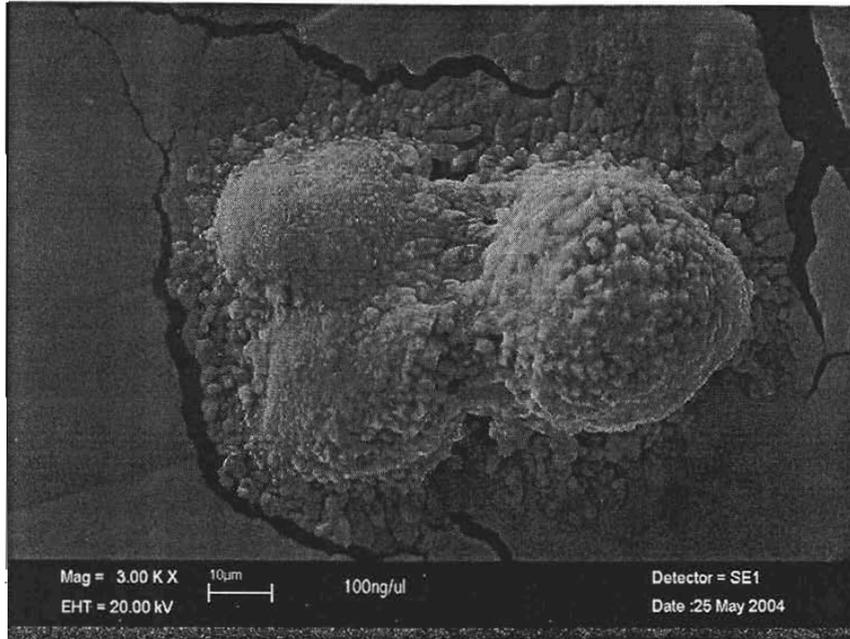


Figura 22. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 100 ng/μl de la proteína. Durante 72 h.

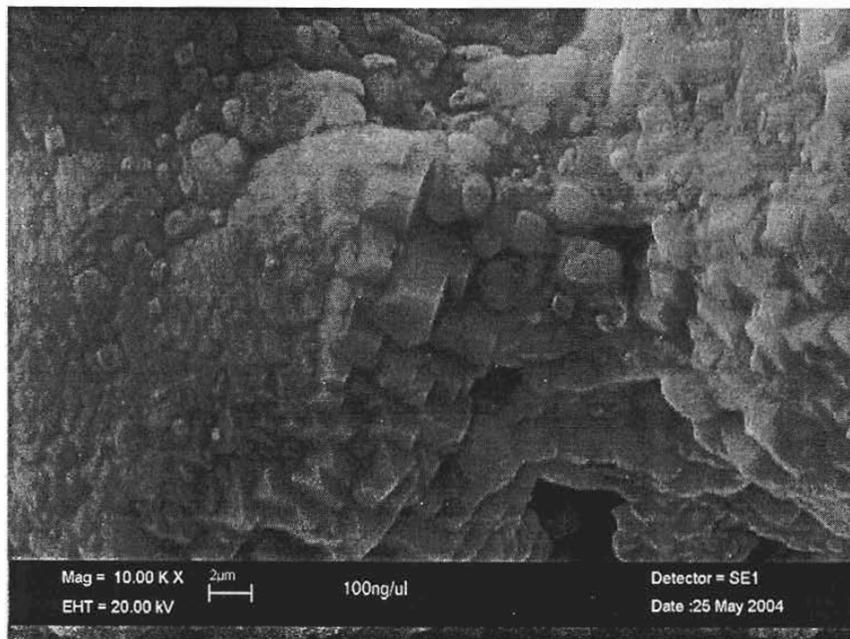


Figura 23. Cristal de calcita crecido en gota sedente con 100 ng/μl de la proteína. Durante 72 h.

Se realizó exitosamente el aislamiento de proteínas por medio de anticuerpos y la construcción una columna de afinidad. Estas proteínas tienen la capacidad de modificar la morfología de la calcita en concentraciones muy pequeñas. Estas macromoléculas se agregan o se unen sobre la superficie del cristal, modificando la tasa de crecimiento y cambiando la morfología romboédrica característica de la calcita, a una forma esferulítica policristalina.

En experimentos de cristalización de calcita, se ha demostrado cómo ciertas impurezas han promovido la formación de esferulitas. Es posible que estas impurezas alteren la solubilidad de la calcita y que la solubilidad se vea incrementada cambiando la morfología. Estas impurezas tienen interacciones sobre los bordes y esquinas del cristal, dado que las esquinas y bordes son puntos de alta energía, llegando a ser inestables. El resultado de esta inestabilidad es un incremento en la solubilidad, favoreciendo la disolución en ciertas caras específicas del cristal y favoreciendo el crecimiento de otras, resultando en una forma esférica^{45,46}.

Kaplan y colaboradores³⁵, diseñaron péptidos con una secuencia consenso de caseína cinasa tipo II y observaron sus efectos sobre la cristalización de la calcita. En estos experimentos se encontró carbonatos de calcio en forma de esferulitas. Los péptidos tienen una secuencia consenso [SerThr]-Xaa-Xaa-[AspGlu], esta secuencia pertenece a un sitio de fosforilación casina cinasa tipo II. Comparando esta información con los resultados obtenidos en el anexo 3, se podría especular que probablemente la proteína tiene esta fosforilación y

además estaría en congruencia con la teoría de que los grupos ácidos de las proteínas participan activamente en el proceso de biomineralización. En coincidencia con otras proteínas biomineralizantes como la sialoproteína y osteopontina^{6,35}.

En la figura 24 se presenta un modelo teórico de la calcita en forma romboédrica y presentando sus caras cristalográficas. Este modelo se diseñó con el programa *FACES*. En la figura 25 se presenta un modelo de la calcita, presentando las caras cristalográficas donde pudiera estar interactuando la proteína de M_r 35 000. Estas caras son: 232, 202, 122, 312 y 12-11. Estas son las caras que probablemente estén interactuando con la proteína, pero no hay datos experimentales para confirmar lo anterior.



Figura 24. Modelo del cristal de calcita

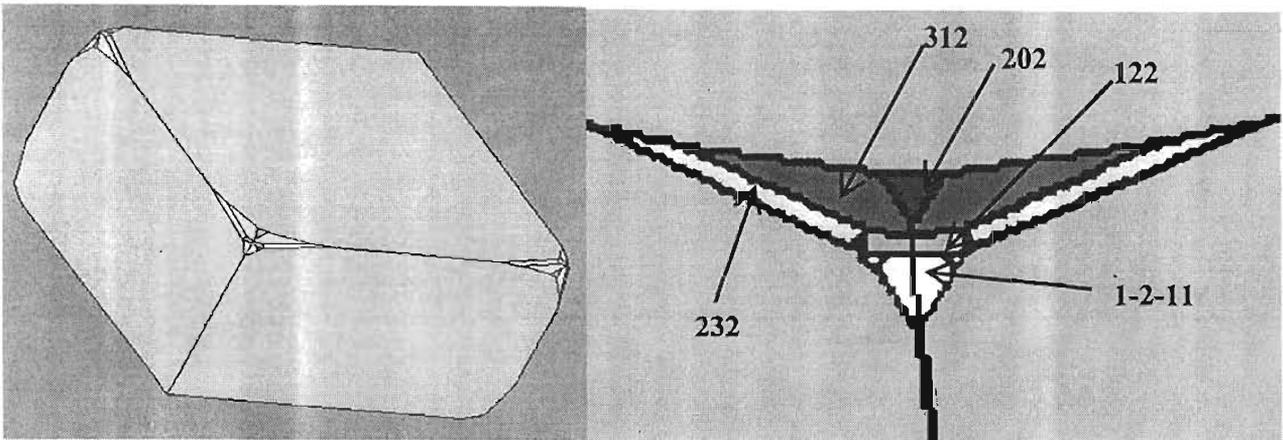


Figura 25. Modelo del cristal de calcita. En este modelo se muestran las probables caras de calcita que pudieran interactuar con la proteína.

Los cambios en la solubilidad de la calcita probablemente promovieron el crecimiento sucesivo, en las caras cristalográficas mostradas en la figura 25. Por medio este crecimiento sucesivo se formaron los escalones de crecimiento y las láminas comenzaron a formar los esferulitos. Los experimentos demuestran que la proteína tiene influencia sobre el proceso de crecimiento del carbonato de calcio *in vitro*. Pero hacen falta experimentos con datos cristalográficos, para profundizar en la estructura. Estos experimentos son necesarios para entender el proceso de biomineralización en los carbonatos de calcio.

6. Conclusiones

- La composición de la matriz orgánica de la concha nácar del abulón es altamente compleja.
- Se purificó parcialmente la proteína de M_r 35 000 por medio de RP-HPLC.
- Se crearon anticuerpos policlonales que reconocen a esta proteína.
- Es el primer reporte de purificación de proteínas relacionadas con la biomineralización en moluscos, a través de una columna de afinidad por medio de anticuerpos.
- La proteína de M_r 35 000 tiene una influencia sobre el crecimiento de la calcita *in vitro*.

7. Perspectivas

- Inmunolocalización de la proteína de M_r 35 000 en el nácar y el tejido del manto.
- Secuenciar los aminoácidos de la proteína.
- Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar el gen que codifica a la proteína.
- Diseño y construcción de un vector de expresión para un sistema Eucarionte.
- Buscar la estructura cristalina de la proteína.

Bibliografia

1. Lowenstam, H. A. and S. Weiner. 1989. On Biomineralization. Oxford University Press.
2. Mann, S. Biomineralization: Principles and concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. 2001. Oxford University Press.
3. Ozin G.A. *Acc Chem Res* **30**: 17-27 (1997)
4. Degens ET, Perspectives on Biogeochemistry. Ed Springer-Verlag. 1989. 342-392.
5. Kirschvink, J.L. *Biographical Memoirs* **83**: The National Academy Press, Washington, D.C.
6. Dauphin, Y. *Current Curr. Opin. Colloid Interface Sci* **7**: 133-138 (2002).
7. Weiner S. & L. Addadi. *Science* **298**: 375-376 (2002).
8. Mann S. *Nature* **332**: 119-124 (1988).
9. Sarikaya, M. *PNAS* **96**: 14183-14185 (1999).
10. Kirschvink J.L. & J.W. Hagadorn,. *10 A Grand Unified theory of Biomineralization*. En Bäuerlein, E., ed., The Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical application. 2000. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany.
11. Mount A. S., Wheeler A. P., Paradkar R. P., & D. Snider. *Science* **304**: 297-300 (2004).

12. Wheeler A.P. *Mechanisms of molluscan shell formation*. En Calcification in Biological Systems. 1992, ed. E. Bonucci, CRC Press, Boca Raton.
13. Wilt F.H., Killian C.E. & B.T. Livingston. *Diffrentiation* **71**: 237-250 (2003)
14. Weiss I.M., Tuross N., Addadi L., & S. Wiener. *J Exp Zool* **293**: 478-491(2002).
15. Wheeler A.P. & K. M. Wilbur. *J Moll Stud* **43**: 155-161 (1977).
16. Nair P. S. & W. E. Robinson. *Biol. Bull.* **195**: 43-51 (1998).
17. Kaplan D.L. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **3**, 232–236 (1998).
18. Mann K. & F. Siedler. *Biochem Mol Biol Int* **47**: 997-1007 (1999).
19. Weiss I.M., Kaufmann S., Mann K. & M. Fritz. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 17–21 (2000).
20. Laemmli U.K. *Nature* **227**: 680–685 (1970).
21. Geng X. & F.E. Regnier. *J. Chrom* **296**: 15–30 (1984).
22. Reversed Phase Chromatography, Principles and Methods. 2002. Amersham biosciences.
23. Compère P., Jaspar-Versali M. & G. Goffinet. *Biol Bull* **202**: 61-73 (2002).
24. Belcher A.M. & Gooch E.E. *15 Protein Components and Inorganic Structure in Shell Nacre*. En Bäuerlein, E., ed., The Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical application. 2000. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany.

25. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. & K. Struhl. Short Protocols in Molecular Biology. 2002. John Wiley & Sons, Inc.
26. Harlow E. & D. Lane. Antibodies: A Laboratory Manual. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory.
27. Antibody Purification Handbook. 2002. Amersham Biosciences.
28. Affinity Chromatography: Principles and Methods. 2002. Amersham Biosciences.
29. Wallwork M.L., Kirkham J., Zhang J., Smith D.A., Clarkson B.H., Brookes S.J., Shore R.C., Wood S.R., Ryu O. & C. Robinson. *Langmuir* **17**: 2508-2513(2001).
30. Zhang Y., Xie L., Meng Q., Jiang T., Pu R., Chen L. & R. Zhang. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **135**: 565-73 (2003).
31. Hunter G.K. & H.A. Goldberg. *PNAS* **90**: 8562-8562 (1993).
32. Matsushiro A., Miyashita T., Miyamoto H., Morimoto K., Tonomura B., Tanaka A. & K. Sato. *Mar Biotechnol* **5**: 37-44 (2003).
33. He G., Dahl T., Veis T. & A. George. *Nature Materials* **2**: 552-558 (2003).
34. Cölfen H. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci* **8**: 23-31 (2003).
35. Li C.M., Botsaris G.D. & D.L. Kaplan. *Cryst Growth Desing* **2**: 387-93 (2002).
36. Karlheinz Mann, comunicación personal.

37. Pereira-Mouriès L., Almeida M.J., Ribeiro C., Peduzzi J., Barthélemy M., Milet C. & E. Lopez. *Eur J Biochem* **269**: 4994-5003 (2002).
38. Dauphin Y. *J Biol Chem* **278**: 15168-15177 (2003)
39. Dauphin Y., Pereira-Mouries L., Allemand D. & J.P. Cuif. comunicació personal.
40. Ajikumar P.K., Lakshminarayanan R., Tee O. B., Valiyaveetil S. & M. Kini. *Biomacromolecules* **4**: 1321-1326 (2003).
41. Fallini G., Albeck S., Weiner S. & L Addadi. *Science* **271**: 67-69 (1996).
42. Levi Y., Albeck S., Brack A., Weiner S. & L. Addadi. *Chem Eur J* **4**: 389-396 (1998).
43. Belcher A. M., Wu X. H., Christensen, R. J., Hansma P. K., Stucky G. D. & D. Morse. *Nature* **381**: 56-58 (1996).
44. Shena F.H., Fenga Q.L. & C.M. Wangb. *J Cryst Growth* **242**: 239-244 (2002).
45. Tracy S.L., Francois C. J. P. & H. M. Jennings. *J Cryst Growth* **193**: 382-388 (1998).
46. Tracy S.L., Francois C.J.P. & Jennings H.M. *J Cryst growth* **193**: 374-381 (1998).
47. Keattch C.J. & D. Dollimore. An Introduction to Thermogravimetry. 1975. London.
48. Charles M.E. Compositional Analysis by Thermogravimetry. 1988. Philadelphia, Pennsylvania.

49. Silver, F.H. & Christiansen, D.L. 1999. Biomaterials Science and Biocompatibility. Ed. Springer-Verlag New York, Inc. Pags. 1-3.
50. Breme J. *Criteria for Bioinertness of Metals for Osseo Integrated Implants*. Osseo-Integrated Implants, **Vol 1**. Heimke, G. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1990.
51. Vázquez N. G. & O. Echeverría. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. 2000. Ed. FCE.
52. Ojeda-Sahagun J. Métodos de Microscopía Electrónica de Barrido en Biología. 1997. Universidad de Cantabria. Santander, España.
53. Jandt K.D. *Surface Science* **491**: 303-332 (2001).

ANEXO 1

Técnicas Experimentales

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

En 1924, De Broglie demostró avances teóricos sobre las propiedades ondulatorias de un haz de electrones acelerados, esto permitió que se realizaran trabajos experimentales como los de Busch en 1926, quien encontró la forma de hacer lentes para haces electrónicos. Posteriormente varios científicos se consagraron a la construcción de un microscopio que utilizara haces de electrones acelerados como radiación de iluminación. Sólo dos grupos llegaron a la meta en el mismo año, 1932. Brüche y Johannson, construyeron un prototipo con lentes electrostáticas. Otro fue el de Knoll y Ruska, con lentes electromagnéticas. En el año de 1934, Ruska agregó una lente condensadora en su prototipo, logrando obtener por primera vez mayor poder de resolución que en el microscopio de luz.

Un microscopio electrónico requiere que el espacio en que se van a mover los haces de electrones este libre de partículas que puedan interactuar con los electrones. Por ello es necesario crear condiciones de vacío y alto vacío ($\sim 10^{-7}$ torr), para no afectar en la trayectoria de los electrones⁴⁹⁻⁵².

Hoy en día, se utilizan de forma muy regular en las ciencias biológicas, dos tipos de microscopios: el microscopio electrónico de transmisión (MET) y el microscopio electrónico de barrido (MEB). El MEB proporciona imágenes y datos físicos y químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos

a los electrones, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que traducen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen en un monitor de televisión⁵¹.

En el año de 1935, Knoll construyó el primer MEB con una resolución del orden de 100 μm . Los microscopios, actuales cuentan con una configuración básica como sigue: 1) el sistema de iluminación formado por el cañón de electrones, un conjunto de lentes condensadoras y el sistema de deflexión responsable del barrido del haz electrónico; 2) el portamuestras; 3) los sistemas de detección de las diferentes emisiones; 4) el sistema de visualización de la imagen. Con este tipo de equipo se ha desarrollado una amplia variedad de microscopias por electrones secundarios, retrodispersados, Auger, etc. Además, puede hacerse análisis químico y, actualmente cuentan con dispositivos para hacer difracción de electrones. En un MEB, un haz de electrones con una energía de 1 y 50 keV y en un vacío de 10^{-7} bars, se hace incidir sobre una muestra gruesa, generando una serie de interacciones, elásticas e inelásticas, un producto de estas últimas son los electrones secundarios, cuyas energías son del orden de 3-5 eV. Este haz electrónico se focaliza sobre la superficie de la muestra, se producen una serie de fenómenos, entre los cuales destacan, la emisión de electrones secundarios con energías de unas pocas decenas de electrón-voltios y la reflexión de electrones primarios que dan lugar al haz de electrones retrodispersados de alta energía. La corriente emitida por

la muestra se recoge y amplifica, los cambios de aumento se (39) consiguen variando el tamaño del área barrida en la muestra, mientras se mantienen constantes las dimensiones de la imagen en la pantalla, del orden de 10×100 cm. En general, los aumentos pueden variar entre $10\times$ y $200\ 000\times$. La imagen de la muestra, se forma con la totalidad de los electrones procedentes de la misma; esto es, los electrones retrodispersados y los electrones secundarios. Los electrones, son detectados por un centellador y un fotomultiplicador. Los electrones retrodispersados frecuentemente son direccionales, sólo revelan detalles de la muestra que estén en línea con el sistema de detección, mientras que los secundarios, al no tener esa limitación, muestran una imagen de apariencia tridimensional (topografía de la muestra)⁵².

El Método del “*Ion Sputtering*”

Las muestras biológicas son malas conductoras de la electricidad, por lo tanto se necesita para su observación un tratamiento, el cual nos aportará los siguientes beneficios;

1) Impedir que la muestra se cargue eléctricamente, de otra manera, al recibir el impacto del haz de electrones la muestra se cargaría eléctricamente en forma negativa y se distorsionaría la imagen o se podría impedir su formación.

- 2) Facilitar la disipación del calor producido por el bombardeo del haz de electrones, el cual podría producir serias alteraciones de la muestra.
- 3) Aumentar la resolución.
- 4) También se ha reportado que este proceso puede ayudar a aumentar la estabilidad mecánica de la muestra, puesto que el recubrimiento metálico es una película continua que cubre tanto la superficie de la muestra como la del portamuestra, contribuyendo de esta manera a su sujeción. Aunque a este punto lo consideramos muy controversial.

El método del “*ion Sputtering*” utiliza el fenómeno físico denominado ionización que tiene lugar en un gas a bajo vacío cuando se aplica un alto voltaje a dos electrodos entre los que se interponen las moléculas gaseosas residuales. Debido al voltaje aplicado, los electrones se aceleran hacia el ánodo y en su trayecto chocan con moléculas de gas, fenómeno que se manifiesta por emitir una luminiscencia o brillo dando lugar a un ion positivo y un electrón libres; en estas condiciones las moléculas de gas forman un plasma. Los iones positivos son atraídos hacia el cátodo y los electrones hacia el ánodo. Los iones positivos chocan contra el cátodo con una energía proporcional al voltaje aplicado a los electrodos, liberando finas partículas del metal del que está constituido. Estas partículas se dispersan en todas direcciones en trayectorias erráticas no rectilíneas.

El fenómeno que se denomina “*cathode sputtering*” consiste, en que sobre el cátodo se monta el metal con el que se va a recubrir la muestra y ésta, la situamos cerca del ánodo; el resultado es que se recubre con las

partículas metálicas desprendidas del metal y la muestra queda recubierta uniformemente.

El diseño básico de un “ion sputter” consiste en una campana de vidrio en la que puede hacerse vacío con una bomba mecánica. Dentro de la campana están dispuestos el cátodo y el ánodo sobre el que existe un dispositivo para sujetar el portamuestra con la muestra.

Frecuentemente, el cátodo se dispone en un plano superior y el ánodo en uno inferior, aunque pueden estar en el mismo plano. El aparato se completa con un sistema que proporciona alto voltaje e indicadores de vacío, voltímetro y amperímetro; así como los mandos para modificar estos parámetros^{51,52}.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA (RP-HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), por sus siglas en inglés) se ha establecido como una de las herramientas más utilizadas para análisis y purificación de biomoléculas. El RP-HPLC tiene la capacidad de separar polipéptidos de secuencia muy similar por no decir casi idéntica, polipéptidos que difieren por un solo aminoácido pueden ser separados por esta técnica. En la figura a, se ilustra la gran resolución del RP-HPLC, en la imagen se observa la separación de variantes de insulina, las cuales tienen un peso molecular de alrededor de

53 kDa con solo ligeras diferencias entre las secuencias de aminoácidos. La RP-HPLC es capaz de separar la insulina humana de la insulina de conejo, que difieren solamente en un grupo metilado (la insulina de conejo contiene una treonina mientras la insulina humana contienen una serina).

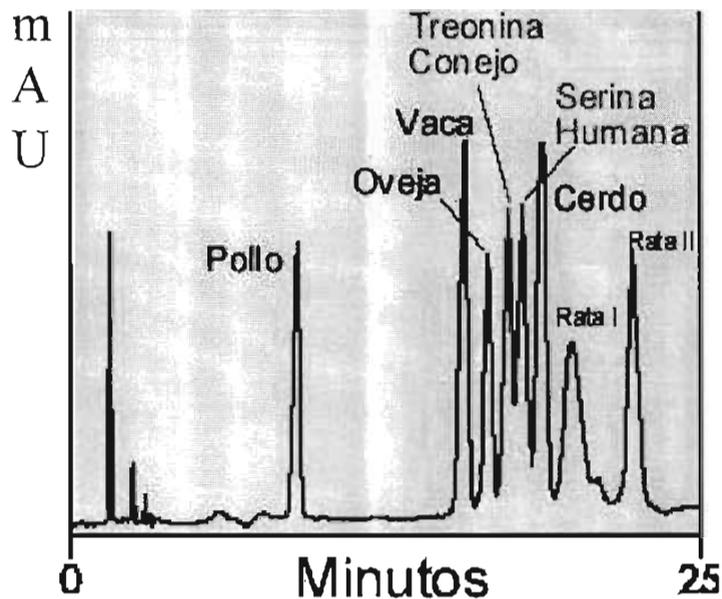


Figura a. Resolución que puede ser obtenida con la cromatografía en fase reversa. La insulina de conejos y la humana, tienen diferencia en un aminoácido.

Comprender el mecanismo de interacción de los polipéptidos con la superficie de la fase reversa, es importante para entender las causas de las separaciones que suceden en el RP-HPLC. La separación de pequeñas moléculas implica la partición-repartición de moléculas entre la fase móvil y la fase estacionaria hidrofóbica. Los polipéptidos son absorbidos a la superficie hidrofóbica después de entrar a la columna y permanecen

absorbidos hasta que la concentración de los modificadores orgánicos alcanzan la concentración crítica necesaria para causar la desabsorción y liberar a los polipéptidos de la columna.

Los polipéptidos unidos a la columna se encuentran en una fase de reposo en la fase estacionaria, con una gran parte de la biomolécula expuesta a la fase móvil y solo una parte de la molécula (el pie hidrofóbico) en contacto con la superficie de la fase reversa. Por lo tanto, es entendible como el RP-HPLC separa a los polipéptidos, basado en las sutiles diferencias de las moléculas. Las diferencias proceden de su secuencia de aminoácidos y las diferencias en su estructura en el espacio.

Al número de modificadores orgánicos (como acetonitrilo) necesarios para separar a los polipéptidos de la superficie reversa, es llamado número Z_1 , pues la desabsorción tienen lugar dentro de una luz muy estrecha de concentración. Por ello la retención es completa hasta alcanzar la concentración crítica de los modificadores orgánicos, la separación es un evento súbito. La desabsorción súbita de los polipéptidos produce bandas agudas de los mismos.

Los polipéptidos son muy sensibles a la concentración del modificador orgánico, en la figura b, se ilustra la sensibilidad a la concentración. Los tiempos de retención del polipéptido, cambia enormemente al modificar la concentración del agente modificador, en este caso acetonitrilo. Por ello el gradiente de lavado tiene muy pocos cambios por unidad de tiempo^{21,22}.

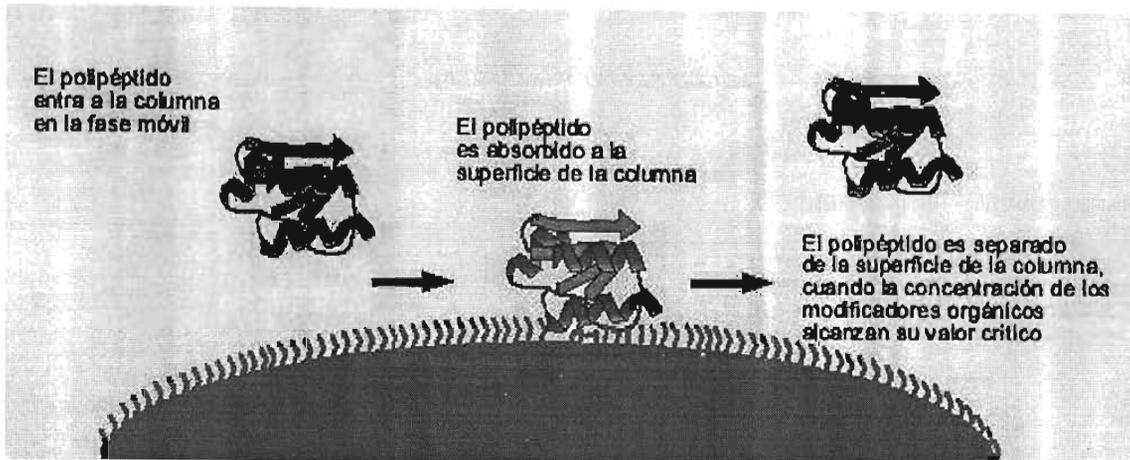


Figura b. En esta imagen se ilustra la fase móvil y la fase estacionaria en la columna de fase reversa.

Microscopia de Fuerza Atómica (MFA)

En la década de los años 80, apareció el microscopio de efecto túnel, este microscopio generó imágenes reales de superficies con resolución atómica. Fue inventado en 1981 por G. Binnig y H. Rohrer (IBM, Zurich). El microscopio de efecto túnel fue el ancestro de todas las técnicas de microscópicas de sonda de barrido (MSB). Más de 25 técnicas diferentes de SPM son conocidas hoy en día. Sin embargo, las técnicas más ampliamente utilizadas son Microscopia de tunel de Barrido (MTB) y MFA. El MTB, fue la técnica más dominante en la investigación de MSB en sus primeros estados de desarrollo. Actualmente la microscopia de fuerza atómica se ha convertido en la técnica más dominante, con relación al número de publicaciones reportadas con su uso.

Los MTB usan una punta, la punta conduce un voltaje de polarización aplicado entre la punta y la muestra. Cuando la punta es acercada

alrededor de 10 Å de la muestra, los electrones de la muestra comienzan a construir el túnel a través de la abertura de 10 Å. (Figura c) Los resultados del tunelaje aunque precisos, varían con el espacio entre la muestra y la punta, y esta señal es usada para crear una imagen MTB. Para que el tunelaje tenga lugar, la muestra y la punta deben ser conductoras o semiconductoras. El MTB mide la corriente de tunelaje (quantum mechanical tunneling current) entre una punta metálica y una superficie conductora. Esta es una diferencia importante con el FMA, que será discutida mas adelante.

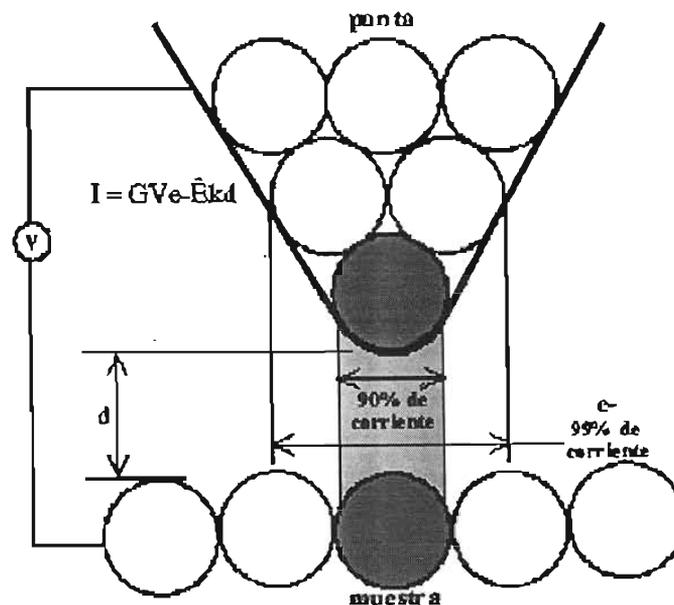


Figura c. Diagrama de las interacciones entre la punta y la muestra en MTB.

La precisión del tunelaje es una función exponencial de la distancia; si la separación entre la punta y la muestra cambia en 10% (un orden de 1 Å), la precisión del tunelaje cambia en un orden de magnitud. Esta

dependencia exponencial se encuentra dada por la marcada sensibilidad del MTB.

La mayor aplicación del MFA es la obtención de imágenes de alta resolución de diferentes superficies de materiales. Los materiales pueden ser desde metálicos hasta materiales compuestos o biomoléculas. Cuando se utilizan muestras con superficies rígidas y ultra planas, se puede tener una resolución atómica. El uso de una celda de fluido en el MFA, puede permitirnos observar fenómenos en condiciones líquidas, como el plegamiento de proteínas en tiempo real. En el MFA se pueden evaluar diferentes propiedades de la muestra como topografía superficial, propiedades de fricción de la muestra con microscopía de fuerza lateral/fricción (MFL/MFF), composición química de la superficie con

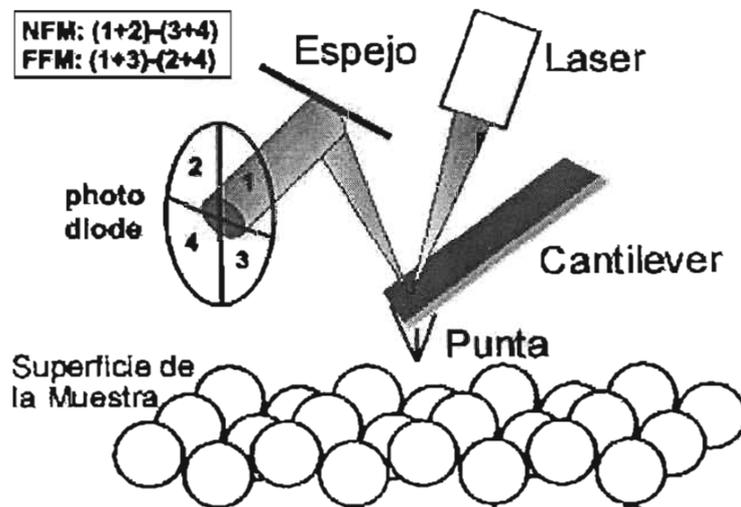


Figura d. Representación esquemática del sistema de AFM. El vínculo punta-cantilever es reflectado por la topografía superficial de la muestra. Las deflexiones del cantilever son proyectadas con sistema de láser.

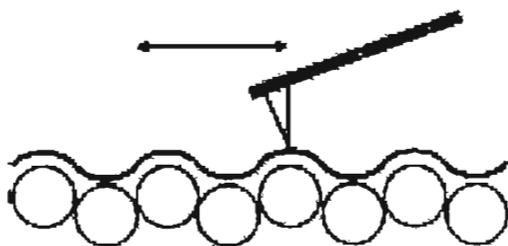
microscopia de fuerza química (MFQ), diferencia en la elasticidad con microscopia de modulación de la fuerza (MMF) y las propiedades magnéticas con microscopia de fuerza magnética.

La resolución única de la mayoría de las técnicas de MFA es basada en la unión de una punta ultra-puntiaguda a un cantilever flexible y a cerámicas piezoeléctricas muy precisas, los cuales hacen un barrido en el plano x - y con una precisión nanométrica. Los piezoelementos se mueven en la dirección z , por ejemplo para mantener una fuerza constante entre la sonda y la muestra. Por ello un control preciso del barrido es realizado en las tres direcciones (x , y y z). El MFA realiza un barrido de la superficie de la muestra con la punta, con un acoplamiento de varias micras y a menudo menos de 100 Å en diámetro. El barrido sobre la superficie de la muestra y registra las interacciones entre la punta y la superficie, por lo que el cantilever puede arquear o ser apartado. Las interacciones incluyen fuerzas electrostáticas de repulsión y atracciones de van der Waals (las fuerzas de van der Waals dependen de la distancia entre la punta y el cantilever), descritas por el potencial de Lennard-Jones, fuerzas capilares y fuerzas de fricción. Un detector registra las deflexiones del cantilever, lo que permite que estas sean capturadas en una computadora para generar un mapa de la topografía superficial (Figura d).

En MFA se cuentan con dos tipos comunes operación (Figura e); el modo de contacto y modo de no contacto. En la zona de contacto, el cantilever se sostiene a menos de unos pocos ángstroms de la superficie de la muestra,

y las interacciones interatómicas entre la punta y la muestra son de repulsión. En la zona de no contacto, el cantilever se sostiene de décimas a cientos de ångstroms entre la punta y la muestra, y las interacciones interatómicas entre el cantilever y la muestra son de atracción. Esta combinación genera una imagen topográfica (tridimensional) de la superficie de la muestra⁵³.

(A) Modo Contacto



(B) Modo de Golpeos Ligeros

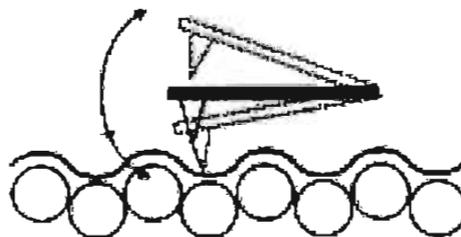


Figura e. A) En el modo de contacto la punta está en permanente contacto con la superficie de la muestra. Ofrece imágenes de alta resolución. B) El modo de golpes ligeros, utiliza una punta oscilante. La punta no entra en contacto con la muestra durante los movimientos laterales durante el barrido. El modo de golpeo ligero nos ofrece información sobre la topografía de la muestra.

Producción de anticuerpos

La inmunogenicidad, es la habilidad de una molécula para inducir una respuesta inmune. Lo anterior es determinado por la estructura química de la molécula o secuencia de aminoácidos y por la respuesta del animal huésped a la molécula. La respuesta es mediada por el sistema inmune del animal huésped. Los anticuerpos son miembros de una familia de moléculas, las inmunoglobulinas, que constituyen una rama humoral del sistema inmune y conforman aproximadamente el 20% de las proteínas plasma en humanos²⁷. Los anticuerpos son sintetizados primariamente por células especializadas (linfocitos). Los linfocitos se replican y pasan por un proceso de diferenciación para reconocer el antígeno. El antígeno es reconocido por un receptor de membrana desarrollado por los linfocitos, anticuerpo. La unión de un antígeno a una molécula superficial (antígeno) de un linfocito B virgen, es un requisito absoluto para la respuesta inmune (producción de anticuerpos al antígeno). Esta unión determina la especificidad de los anticuerpos resultantes. Con estos antecedentes básicos se han diseñado estrategias y protocolos para la producción de anticuerpos. Un paso fundamental en la obtención de un buen anticuerpo, es la pureza del antígeno que será inyectado en el animal huésped. Un método rápido y eficiente de obtener un antígeno, en forma pura a partir de un extracto que contenga n número de proteínas, es en geles de poliacrilamida. Así puede cortar la banda del gel deseada y ser electroeluída para obtener el antígeno puro, que posteriormente será

inyectado. El antígeno generalmente es inyectado al animal, conjugado con algún adyuvante. Un adyuvante es un estimulador no-específico de la respuesta inmune. Un buen adyuvante es esencial para inducir una fuerte respuesta a los antígenos. El adyuvante más comúnmente usado, por su eficacia, es adyuvante de Freund. Los animales con los cuales se trabaja para producir anticuerpos son varios, dependiendo del interés. El conejo es el organismo más utilizado para la producción de anticuerpos policlonales, pues de él se puede obtener una buena cantidad de suero sanguíneo, de alrededor de 60 a 80 ml. Los animales como ratas, ratones y hámsteres, no son generalmente escogidos para la producción de anticuerpos policlonales, debido a sus muy bajos niveles de suero obtenidos. Los conejos son sencillos de cuidar, manejar, pueden ser sangrados repetidamente y sus anticuerpos son fáciles de purificar.

Los anticuerpos igual que muchas biomoléculas pueden ser purificados. El principio usado para ello es el bioreconocimiento, es decir; separar proteínas a partir de las interacciones reversibles entre una proteína (o un grupo de proteínas) y un ligando específico. Este ligando específico se encuentra acoplado a una matriz de sefarosa. Este principio ofrece una muy alta selectividad, resolución y se puede recuperar la proteína de interés en estado activo²⁸. La proteína A presenta una alta afinidad para la región Fc de los anticuerpos policlonales y monoclonales IgG. La proteína A es una proteína bacteriana de *Staphylococcus aureus*, esta proteína cuenta 5 regiones que se unen a la región Fc de las IgG. Así que una vez

acoplada la proteína A en una matriz de sefarosa, se convierte en una herramienta extraordinariamente útil en la purificación de anticuerpos²⁵⁻²⁸.

Construcción de la columna de afinidad

Aún no se han publicado datos para la purificación de proteínas de la concha del abulón por medio de cromatografía de afinidad. Por lo tanto una parte importante del proyecto fue establecer las condiciones necesarias para el ligamiento y elución de proteínas del abulón a los anticuerpos policlonales inmovilizados en la columna.

La matriz de sefarosa 4B es física y químicamente estable bajo condiciones experimentales. Como el uso de proteínas inmovilizadas depende en la absorción específica, la matriz debe estar libre de cualquier efecto de absorción no específica, que pueda obscurecer la separación. El poro de la sefarosa 4B tiene una abertura de 20 millones de daltons, capaz de acoplarse a moléculas grandes, y esto asegura el acoplamiento.

El método de bromida de cianogeno es el resultado de la unión de éste, con las macromoléculas. El acoplamiento se da de forma covalente. La bromida de cianogeno reacciona con los grupos hidroxilo de la sefarosa para formar grupos imidocarbonatos. El acoplamiento se lleva a cabo entre los grupos imidocarbonatos con los grupos amino de la proteína para formar enlaces covalentes estables.

La columna de afinidad fue preparada a partir de los anticuerpos policlonales producidos por conejos de la cepa New Zealand White. Estos

anticuerpos policlonales fueron acoplados a una matriz de sefarosa 4B activada con CNBr²⁵⁻²⁸.

ANEXO 2

Caracterización física de la concha de *Haliotis fulgens*

TERMOGRAVIMETRIA FUERZA ATOMICA

Se realizó una caracterización preliminar de la estructura topográfica de la zona nacarada de la concha del abulón. Estos estudios se realizaron a través de microscopía de fuerza atómica (MFA) y microscopía electrónica de barrido (MEB). En este experimento fue importante el análisis de la estructura del nácar, sin la fase orgánica. Para ello, se realizaron análisis termogravimétricos, con el fin de observar la temperatura de descomposición de la materia orgánica sin afectar la estructura cristalina de la aragonita.

En la figura I, se muestran dos termogramas. En el termograma de la figura IA, se observa que la temperatura de descomposición de la aragonita mineral se encuentra en alrededor de 650 °C y con un máximo de reacción de alrededor de 870 °C. Mientras en la aragonita de origen biogénico, figura IB, la descomposición comienza a los 340 °C y tiene un máximo de reacción de alrededor de 640 °C. Con estos resultados queda de expuesto, las grandes interacciones que existen entre la fase mineral y la fase orgánica de la concha nácar del abulón. Pues ellas son suficientes hacer de la aragonita biogénica un material termodinámicamente menos estable. También con estos resultados resaltamos que a una temperatura inferior de 340 °C, logramos eliminar a la fase orgánica sin llegar a la temperatura de descomposición de la aragonita.

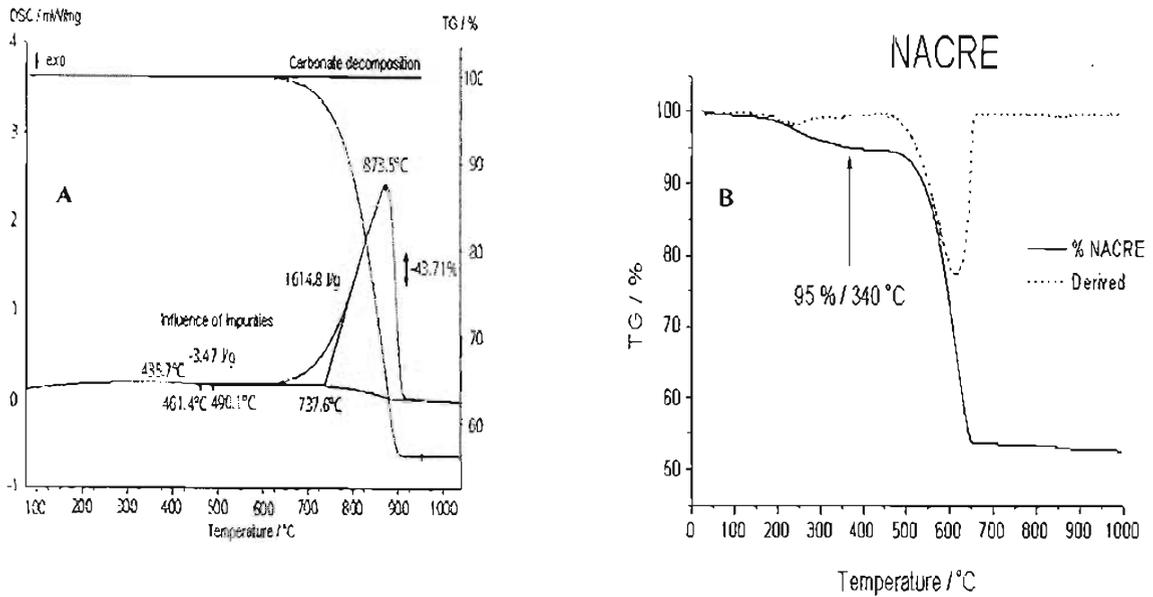


Figura I. En la figura (A) se observa que la temperatura de descomposición de la aragonita mineral es de alrededor 650 °C. Mientras en la aragonita biogénica (B), a los 340 °C es la temperatura de la descomposición de la fase orgánica y la temperatura para la aragonita es de alrededor 450 °C.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En la figura II, se presentan fotografías de los cortes de la concha nácar obtenidas por MEB. En las muestras sin tratamiento térmico, figuras IIA y IIB, no fue posible observar detalles morfológicos de los especímenes. En contraste, las muestras con tratamiento térmico, figuras IIC y IID, fue posible observar que la concha nácar se encuentra constituida por capas de aragonita. Estas capas minerales se organizan con morfologías de folias apiladas. Durante el uso experimental estas capas se desprendían al menor contacto. Haciendo la comparación de las imágenes, podemos

entender que la fase orgánica se debe encontrar entre cada folia, quedando de manifiesto que la fase orgánica le da cohesión y fortaleza al material.

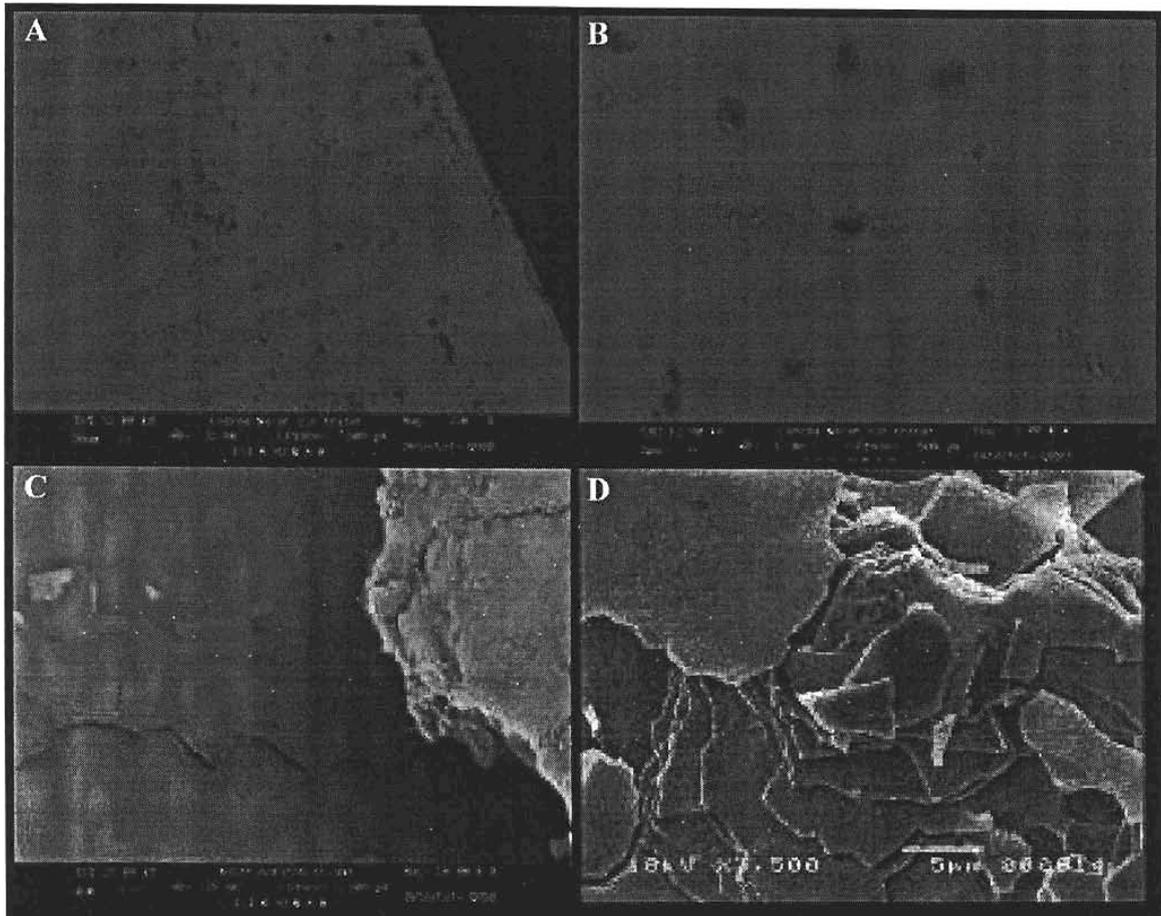


Figura II. En las fotografías IIA y IIB, se observan las muestras de concha nácar sin tratamiento térmico. En las fotografías IIC y IID, se observación las muestras de concha nácar con tratamiento térmico. En ellas se muestran las capas de aragonita.

Microscopia de Fuerza Atómica (MFA)

En las muestras utilizadas para MFA se utilizó el mismo protocolo que para MEB, la diferencia estriba en que las muestras para a MFA no necesitan un recubrimiento metálico. En las fotografías obtenidas por MFA, sin tratamiento térmico se observaron estructuras de tipo columnas o prismáticas. Mientras en las muestras con tratamiento térmico, se

observaron morfologías de gránulos. Estos cambios en la superficie de la concha, pueden ser debidos a la descomposición de la fase orgánica cambia la topografía de la muestra en forma drástica o bien simplemente al descomponerse la fase orgánica permite observar morfologías que estaban cubiertas. Por lo que, es necesario realizar mas experimentos similares para llegar a conclusiones con mayor fortaleza, y determinar un mecanismo claro.

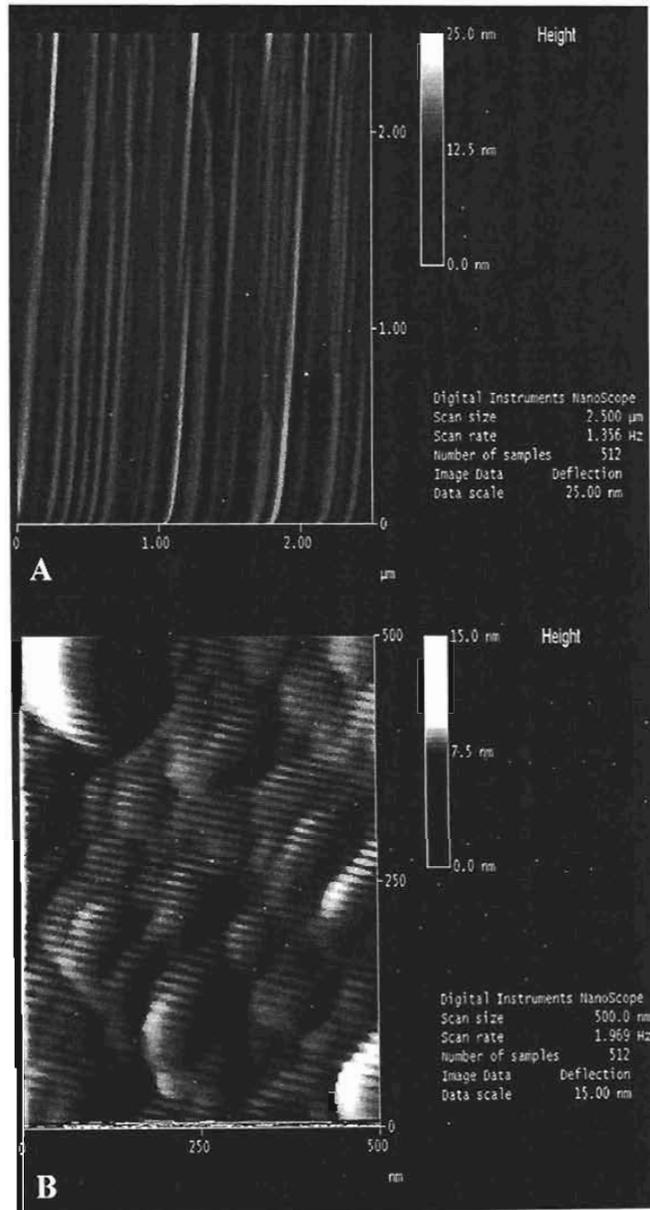


Figura III. En la figura IIIA se muestran las morfologías de prismáticas de la concha nácar del abulón. En la fotografía IIIB se observan los gránulos encontrados en las muestras con tratamientos térmicos.

ANEXO 3

La elución obtenida por medio de la columna de afinidad, fue utilizada para realizar un inmunoblot contra algunas proteínas de otros tejidos mineralizados. Los anticuerpos fueron anticuerpos policlonales para sialoproteína, osteopontina, colágena y CP23 (proteína del cemento de los dientes). Todas las anteriores son proteínas relacionadas con la biomineralización de tejidos óseo. Osteopontina (i), sialoproteína (ii), Colágena (iii) y CP 23(iv). En los western blots anteriores, se observa la misma banda. Es decir, todos los anticuerpos policlonales a las proteínas mencionadas detectaron un epítipo o bien puede ser un artificio de la técnica. Si fueran reconocimientos auténticos, probablemente estén reconociendo una secuencia para la fosforilación llamada CK2_PHOSPHO (CKII).

Este sitio fue observado por primera vez en la Caseína cinasa tipo II, esta es una proteína cinasa cuya actividad es independiente de calcio. Tal vez en estas proteínas la fosforilación interactúe con el calcio.

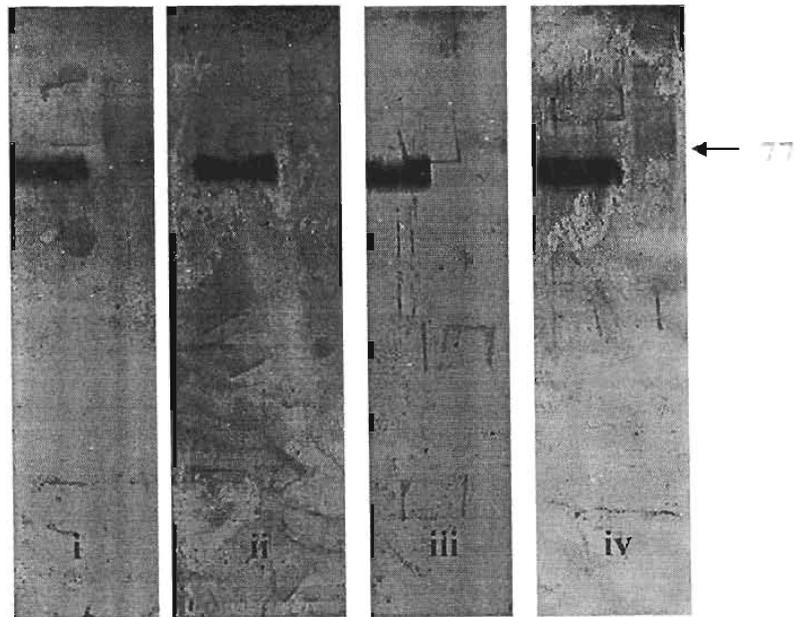


Figura 3. Western blots utilizando otros anticuerpos policlonales para proteínas relacionadas con biomineralización en mamíferos.

ANEXO 4
Trabajo Publicado

Goldschmidt Geochemistry
 Copenhagen 2004

Processes in Geochemistry
Forces, Fluxes and Structure

Conference Themes
The Dynamic Solid
The Dynamic Interface
Fluids of the Earth
The Earth's Surface
The Deep Earth
Early Earth, Moon, Planets

University of Copenhagen
 Denmark
 5 to 11 June 2004

Sponsored by
 European Association for
 Geochemistry
 Geochemical Society
 Mineralogical Society of America
 Geochemical Society of Japan

Hosted by
 The Nordic Countries

Conference Supplement to
Geochimica et Cosmochimica
Acta

Abstracts and Program
 Goldschmidt Conference
 Copenhagen, Denmark
 June 5-11, 2004

27.P02

Isolation of a 35 kDa protein from the organic matrix of seashell of *Haliotis fulgens*

E. VILLARREAL¹, H. ARZATE²,
A. HERNANDEZ-SANTOYO¹ AND A. MORENO¹

¹Instituto de Química, UNAM, Circuito Exterior, C.U.
Mexico, D.F. 04510, Mexico
(carcamo@servidor.unam.mx)

²Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de
Odontología, UNAM, Mexico
(harzate@servidor.unam.mx)

The abalone seashell is an acellular bioceramic containing organic and inorganic phases that are sequentially assembled during the development of mollusk. The seashell usually is constituted by calcium carbonates. The more abundant isoforms are aragonite and calcite; these minerals are spatially separated in distinct parts of the shell. Previous studies have demonstrated that the proteins that involve the organic matrix of the shell participate in the nucleation, growth and formation of minerals. The organic matrix of the nacre of *Haliotis fulgens* was analyzed using reverse-phase HPLC, electrophoresis and immunological characterization. During the analysis of the soluble matrix we observed a complex protein mixture, with proteins of an ample rank of molecular weight. By means of reversed-phase HPLC we separated several fractions of proteins from the seashell extract. With electrophoresis we observed that the most abundant proteins have approximated weights of 17 and 35 kDa. The column fraction containing 17 and 35 kDa proteins was further resolved by SDS-PAGE to separate the two proteins. Gel pieces containing 35 kDa was excised and the protein electroeluted. The 35 kDa protein was used to immunize rabbits for polyclonal antibody production. Once purified, the antibody, was used to purify more 35kDa protein by affinity column. The 35 kDa protein was used for *in vitro* tests of calcite crystallization.