

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Aislamiento, purificación y cristalización de proteínas intraminerales de cascarnes de huevo de emú, como modelo experimental, para entender los procesos de biomineralización de calcio

María Alejandra Dávila Tejeda

Química Farmacéutica

Guatemala, abril de 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Aislamiento, purificación y cristalización de proteínas intraminerales de cascarones de huevo de emú, como modelo experimental, para entender los procesos de biomineralización de calcio

INFORME DE TESIS

Presentado por

María Alejandra Dávila Tejeda

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, abril de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M. A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater Universidad de San Carlos de Guatemala

Por albergarme y brindarme las herramientas necesarias para ser una buena profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por todos los conocimientos transmitidos y ser gran parte de mi formación académica.

Al Laboratorio de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Por las facilidades brindadas para llevar a cabo la parte experimental del presente estudio.

A mis Asesores

Abel y Byron por permitirme aprender de ellos, por su valioso tiempo y aporte profesional en este trabajo

A mis catedráticos

Por contribuir a mi formación académica

Y a todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible este trabajo de tesis

DEDICATORIA

A mis padres: Antonieta y Fredy, por apoyarme en todo momento e inculcarme los valores y principios que me han formado.

A mi esposo: Omar, por su amor incondicional, por sus consejos y ayuda en los momentos más indicados.

A mis abuelas: Carmen y Luisa (Q.E.P.D.), por su apoyo desde el cielo.

A mi abuelo: Rodolfo, por el amor y apoyo que me brinda.

A mi familia: Por sus consejos y ayuda.

A mis compañeros de la Facultad: Marcia, Gaby, Claudia, Elena, Carlos, Taty y Javier por su apoyo, amistad y compañerismo durante la carrera.

Índice

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 Estudios Previos	6
3.2 Marco Teórico.....	8
3.2.1 Proteínas	8
3.2.2 Estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas	8
3.2.3 Biomineralización.....	10
3.2.4 Estructura del cascarón de huevo.....	11
3.2.5 Biosíntesis del carbonato de calcio	13
3.2.6 Formación del cascarón de huevo	14
3.2.7 Intervención de las proteínas de matriz en la mineralización	15
3.2.8 Componentes de la matriz orgánica	15
3.2.9 Proteínas de la matriz orgánica en el cascarón de huevo.....	16
3.2.11 Proteínas intraminerales del cascarón de huevo de la gallina, ganso, avestruz, emú y ñandú	18
3.2.12 Utilización de las proteínas de cascarón de huevo de emú como modelo biomédico	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 GENERAL	21
5.2 ESPECÍFICOS	21
6. HIPÓTESIS.....	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1 Universo de trabajo y muestra.....	23
7.2 Materiales	23
7.2.1 Equipo.....	23
7.2.2 Reactivos.....	23

7.2.3 Otros materiales.....	23
7.3 Métodos	24
7.3.1 Diseño Metodológico	24
7.3.1.1 AISLAMIENTO	24
7.3.1.2 PURIFICACIÓN	25
a) Cromatografía de exclusión molecular	25
b) Cromatografía de fase reversa	25
7.3.1.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	26
a) Cuantificación de Proteína.....	26
b) Geles de Electroforesis Desnaturalizante.....	26
c) Dispersión Dinámica de Luz.....	26
d) Espectrometría de masas.....	27
7.3.1.3 CRECIMIENTO DE CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO	27
8. RESULTADOS.....	29
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIONES	38
11. RECOMENDACIONES	39
12. REFERENCIAS	40

1. RESUMEN

En la naturaleza se llevan a cabo fenómenos importantes de mineralización como la formación de dientes, cascarones de huevos o de conchas de animales marinos como los ostiones, todas estas estructuras se forman bajo los mismos principios. Estas estructuras biocerámicas son estudiadas por la ciencia llamada biomineralización.

El cascarón está compuesto de un estrato calcificado y una fase orgánica, razón por la cual al cascarón se le considera como una estructura biocerámica (Escorcia & Moreno, 2016)

En este trabajo de investigación se buscó aislar y purificar a las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de emú (*Dromaius novaehollandiae*) para poder observar cómo estas proteínas interactúan con el carbonato de calcio.

En la primera etapa del trabajo las proteínas fueron aisladas por métodos bioquímicos clásicos, tales como la eliminación del carbonato de calcio por medio de una extracción ácida y *salting out*. Al finalizar con el aislamiento se procedió a purificar las proteínas por métodos cromatográficos, se utilizó cromatografía de exclusión molecular para ambas proteínas y cromatografía fase reversa para lograr la purificación completa de la proteína de cascarón de huevo de emú. Su pureza se determinó por medio de geles de electroforesis desnaturizante y espectrometría de masas.

En la segunda etapa del trabajo se realizó un estudio tipo *ad hoc*, en el cual se evaluó la influencia de las proteínas intraminerales analizadas, sobre la cristalización del carbonato de calcio. Para ello se crecieron cristales de carbonato de calcio en presencia de diferentes concentraciones de cada una de las proteínas. Los cristales se analizaron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y se pudo observar que las proteínas afectaron el hábito cristalino del carbonato de calcio, es decir la morfología que adopta el cristal en presencia de las proteínas que biomineralizan el calcio.

2. INTRODUCCIÓN

La diversidad de la naturaleza, sobre todo el del mundo mineral, se ve reflejada en la existencia tanto de piedras preciosas como en minerales tales como el cuarzo, calcita, pirita, entre otros.

Desde el punto de vista fisicoquímico los cristales más asombrosos son aquellos que forman estructuras complejas. Estos compuestos de minerales y macromoléculas biológicas, se les llama biominerales, ya que se encuentran en su mayoría en organismos vivos. Estos biominerales se encuentran en huesos, dientes, estromatolitas, cascarones, conchas, etc. (Ruiz-Arellano, R. Moreno, A., 2014).

El término biomineralización hace referencia a los procesos por los cuales los organismos vivos forman minerales asistidos por macromoléculas biológicas y algunos genes específicos, ya sea en condiciones normales (formación de huesos, dientes, entre otros) o patológicas (cálculos renales, pancreáticos, precipitaciones cardiovasculares). Los constituyentes biológicos de estos biominerales son de suma importancia ya que estos regulan y controlan la mineralización. La mineralización patológica lleva a cabo la formación de minerales no deseados, tales como cálculos renales y biliares y placas aterioescleróticas. Existe un gran interés en describir los mecanismos fisicoquímicos y bioquímicos que se ven involucrados en la formaciones de biominerales en organismos vivos, tanto deseables como indeseables (Ruiz-Arellano, R. Moreno, A., 2014).

Una de las características más impresionantes de los biominerales es su compleja arquitectura jerárquica. En los biominerales los componentes orgánicos e inorgánicos son arreglados en bloques, en diferentes niveles de escalas de longitud, con un rango desde nanoestructuras hasta estructuras macroscópicas, como lo son los cascarones de huevos, cuernos, uñas, dientes y huesos (Ruiz-Arellano, R. Moreno, A., 2014).

El cascarón de huevo es la única parte rígida de un huevo de ave. Está formado por carbonato de calcio y algunas macromoléculas biológicas, y tiene una función altamente especializada. La pregunta del rol de las proteínas intraminerales individuales en cascarones, en la calcificación de huevos de aves es un tema importante de investigación, debido a la carencia de información acerca del rol de las proteínas individuales de matriz en la calcificación de cascarones de aves. Además, estos tipos de proteínas han sido estudiadas como sensores

biológicos para carbonato.

Al realizar esta investigación se buscó aislar y cristalizar las proteínas del cascarón de huevo de emú, para luego poder establecer sus parámetros cristalográficos, lo que ayudará a elucidar su estructura tridimensional y así poder compararla con las estructuras de las proteínas de otras especies que están relacionadas filogenéticamente.

Finalmente, en posteriores estudios, la relación de la estructura tridimensional de las diferentes especies y su relación en el árbol filogenético podrá permitir conocer los sitios conservados, las funciones de los distintos dominios de la proteína, y así correlacionarse con las proteínas, que en el ser humano, producen los cálculos renales.

3. ANTECEDENTES

3.1 Estudios Previos

En Guatemala no se han realizado investigaciones relacionadas con el estudio de la biomineralización en seres humanos u otros organismos vivos, pero a nivel internacional, se han realizado investigaciones sobre biomineralización en organismos diversos y tienen implicaciones biológicas y en ciencias biomédicas.

El primer trabajo formal de biomineralización fue realizado por Lowenstam en 1962, posteriormente el mismo autor estableció las bases de estos procesos de mineralización en sistemas biológicos (Lowenstam, 1981), a partir de ello se han hecho una gran cantidad de investigaciones, donde se han encontrado una amplia variedad de biominerales en los seres vivos.

En la investigación realizada por Kalmar, L., et.al., se menciona que las proteínas, involucradas en procesos de biomineralización de vertebrados, muestran un nivel extremadamente alto de desorden intrínseco (Kalmar, Homola, Varga, & Tompa, 2012), lo que ocasiona que el estudio no se realice en humanos, debido a su extrema dificultad. Esto tiene solución en el marco de las ciencias biomédicas, puesto que permitirá realizar el estudio sin necesidad de un estudio clínico o una intervención en humanos.

Según Rose-Martel, et.al., la biomineralización de compuestos de calcio está relacionada estrechamente con procesos patológicos en vertebrados. Este proceso está caracterizado por la interacción proteína-cristal, la cual modula el crecimiento cristalino en la matriz extracelular. Un modelo excelente para el estudio de la biomineralización del calcio, es el cascarón de las aves, el cual tiene el proceso de biomineralización más rápido que se conoce (Rose-Martel, Smiley, & Hincke, 2015).

Hasta el momento, varias proteínas de la matriz orgánica del cascarón de huevo de algunas aves han sido purificadas y caracterizadas. Estas proteínas se han

clasificado en tres grupos: proteínas de la clara, proteínas del hueso no colágenas y proteínas específicas del cascarón (proteínas intraminerales). Algunas de las proteínas más importantes encontradas hasta ahora son la albúmina que forma parte de la matriz orgánica del cascarón de las aves, la lisozima abundante en la clara y la membrana del cascarón, esta proteína tiene una propiedad antimicrobiana y solo se encuentra en el huevo de gallina. Existen además otras proteínas en la matriz orgánica de la fase mineral, tales como la ovotransferina, la osteopontina, la ovocleidina-116, la ovocalixina-32 del cascarón de huevo de gallina, cuya estructura tridimensional no se conoce pero se cuenta con muchos datos de su bioquímica e inmunohistoquímica (Y Nys, Gautron, McKee, Garcia-Ruiz, & Hincke, 2001)

Las proteínas que se encuentran solo en el cascarón (insertas en la fase mineral), se encuentran con mayor proporción en la matriz orgánica y son proteínas con dominio de unión a lectina tipo-C. La primera proteína que fue aislada y caracterizada estructuralmente, vía rayos-X, fue la del cascarón de huevo de gallina llamada ovocleidina-17 (OC-17) (Reyes-Grajeda et al., 2004). La ansocalcina es la principal proteína aislada y caracterizada del cascarón del huevo de ganso. El cascarón de huevo de avestruz presenta como componentes mayoritarios a dos proteínas, la Struthiocalcina-1 y 2 (SCA-1, SCA-2) las cuales han sido caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente (K. Mann & Siedler, 2004; Ruiz-Arellano, Medrano, Moreno, & Romero, 2015; Ruiz-Arellano & Moreno, 2014)

En el estudio realizado por Arellano y Moreno, se aislaron las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de avestruz y emú, estas proteínas se aislaron para demostrar que las mismas regulan el crecimiento y la forma de los cristales de calcio (Ruiz-Arellano et al., 2015)

3.2 Marco Teórico

3.2.1 Proteínas

Una proteína es una molécula compuesta por una o más cadenas de polipéptidos, cada una con una secuencia característica de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (Nelson, D.,Cox, 2013).

3.2.2 Estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas

La estructura primaria es una descripción de todos los enlaces covalentes que unen los aminoácidos de una cadena polipeptídica. El elemento más importante de la estructura primaria es la secuencia de los residuos aminoácidos. La estructura secundaria se refiere a disposiciones muy estables de los residuos aminoácidos que dan lugar a patrones recurrentes. La estructura terciaria describe todos los aspectos de plegamiento tridimensional de un polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina estructura cuaternaria.

Las diferencias en la estructura primaria pueden ser especialmente informativas. Cada proteína tiene número y secuencias características de residuos aminoácidos. La estructura primaria de una proteína determina la forma en que se pliega en una estructura tridimensional única, y esta a su vez, determina la función de la proteína (Nelson, D.,Cox, 2013)

Algunas observaciones sencillas demuestran la importancia de la estructura primaria, o la secuencia de aminoácidos de una proteína. Primero, proteínas con funciones diferentes, siempre tienen secuencias de aminoácidos diferentes. En segundo lugar, se han correlacionado miles de enfermedades genéticas humanas con la producción de proteínas defectuosas. El defecto puede ir desde un único cambio en la secuencia de aminoácidos, a la eliminación de una parte mayor de la cadena polipeptídica. Finalmente, al comparar proteínas, con

funciones similares de diferentes especies, encontramos que estas proteínas tienen a menudo, secuencias de aminoácidos similares. Resulta, por tanto, evidente, la íntima relación existente entre la estructura primaria de una proteína y su función (Nelson, D.,Cox, 2013)

Según Lavelin, I., Meiri, Pines, M., 2000; se calcula que entre el 20 y el 30% de las proteínas humanas son polimórficas, que presentan secuencias de aminoácidos variables entre la población humana. Muchas de estas variaciones de secuencia no tienen ningún efecto, o muy poco, sobre la función de la proteína. Además, proteínas que llevan a cabo una función similar en especies distantes evolutivamente, pueden diferir de manera importante en el tamaño global, y en la secuencia de aminoácidos. A pesar de que la secuencia de aminoácidos puede variar considerablemente en algunas regiones de la estructura primaria, sin afectar a la función biológica, la mayoría de proteínas contiene regiones cruciales que son esenciales para su función, y cuya secuencia, se encuentra, por tanto, conservada (Lavelin, Meiri, & Pines, 2000).

El término estructura secundaria se refiere a cualquier segmento de una cadena polipeptídica y describe la distribución espacial local de los átomos de su cadena principal, sin tener en cuenta la conformación de sus cadenas laterales ni su relación con otros segmentos. Existe un número limitado de estructuras secundarias que son particularmente estables, y que presentan una alta distribución en las proteínas. Las más destacadas son las conformaciones en hélice α y β . Cuando no se observa una estructura regular, la estructura se suele definir como indefinida, o como estructura al azar. Sin embargo, la estructura al azar no describe correctamente la estructura de estos segmentos. En la mayoría de proteínas el camino que sigue una cadena polipeptídica no

es al azar, sino que es constante, y altamente específica con relación a la estructura y función de cada proteína (Nelson, D.,Cox, 2013).

La disposición tridimensional global de todos los átomos de una proteína se conoce como estructura terciaria. La estructura terciaria incluye aspectos de largo alcance en la secuencia de aminoácidos. Aminoácidos que están alejados en la cadena polipeptídica, y que se encuentran en tipos de estructura secundaria diferente pueden interactuar dentro de la estructura totalmente plegada de la proteína. La localización de giros en la cadena polipeptídica, y la dirección y el ángulo de estos giros están determinados por el número y la localización de aminoácidos específicos promotores de su formación. Los segmentos que interactúan dentro de la cadena polipeptídica se mantienen en su posición terciaria característica gracias a diferentes tipos de interacción enlazantes débiles entre los segmentos (Nelson, D.,Cox, 2013). En las proteínas globulares, los diferentes segmentos de la cadena polipeptídica se pliegan sobre otros, formando estructuras muy compactas. El plegamiento proporciona también la diversidad estructural necesaria para que las proteínas puedan llevar a término una amplia variedad de funciones biológicas. Entre las proteínas globulares se incluyen enzimas, proteínas de transporte, proteínas motoras, proteínas reguladoras, inmunoglobulinas y proteínas con muchas otras funciones (Nelson, D.,Cox, 2013).

3.2.3 Biomineralización

La biomineralización se define como una secuencia de eventos en los cuales los minerales secretados en solución por células particulares cristalizan y se estructuran juntos según un plan de construcción definida. Todos los elementos resultantes de este proceso tienen una característica común, están compuestos por una fase inorgánica, frecuentemente sales de calcio, y una fase orgánica que puede estar

compuesta por proteínas, polisacáridos, lípidos y frecuentemente por una mezcla de ellos (Arias, Fink, Xiao, Heuer, & Caplan, 1993)

A pesar del gran número de estructuras minerales diferentes que se han identificado en los organismos vivos, existen cuatro formas minerales de calcio que son las más frecuentes de encontrar: aragonita, calcita, dahlita e hidroxiapatita.

En todo sistema biomineralizado se encuentran dos fases: una matriz orgánica y una fase mineral cristalina, razón por la cual los sistemas biomineralizados son considerados como biocerámicas. Estas biocerámicas se forman generalmente en un medio acuoso, a relativamente bajas temperaturas y en todos los casos analizados, su formación es regulada por una matriz orgánica. La velocidad de depósito de la parte inorgánica de estas biocerámicas varía desde unos pocos gramos al año, hasta el extremo de cinco gramos de calcio por día, como ocurre en la cáscara de huevo. Esto hace de la cáscara de huevo un modelo muy conveniente para el estudio de la biomineralización (Arias et al., 1993).

3.2.4 Estructura del cascarón de huevo

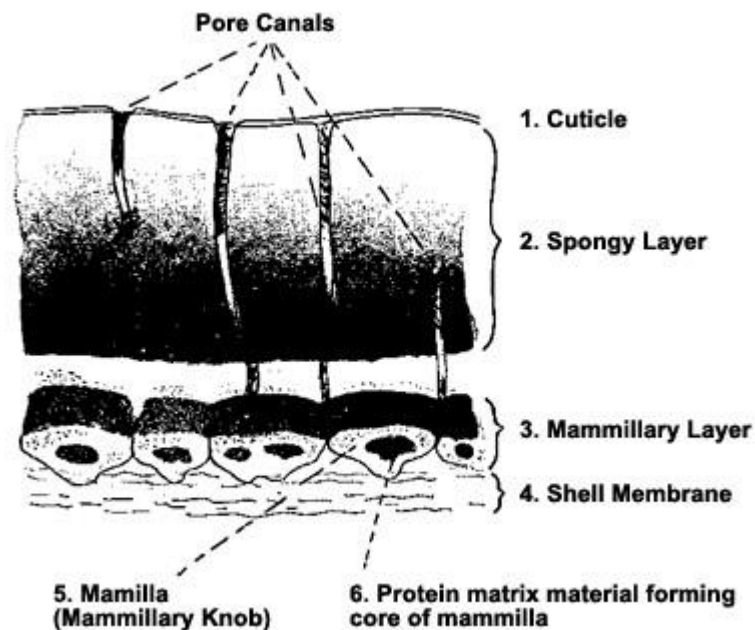
En su gran mayoría, los huevos tienden a adoptar una forma oval, poseen un extremo redondeado y el otro extremo más puntiagudo. El motivo por el cual la forma del huevo es oval, se debe a que esta forma hace que el huevo ocupe de una manera más eficiente el espacio dentro del nido, además evita los giros bruscos, los cuales pueden provocar la ruptura del huevo (Mikšík, Holáň, & Deyl, 1996; Zhao, Xu, Liu, Li, & Yang, 2005).

El cascarón de huevo por lo general tiene un espesor aproximado de 300 micrómetros, esto en el caso de aves pequeñas, y un espesor de 2.5 milímetros en aves de mayor tamaño (K. Mann & Siedler, 2004). El

cascarón de huevo se compone en un 95% de minerales, 3.5% de matriz orgánica y 1.6% de agua (Leach, 1982). El huevo tiene como función proteger al embrión de microorganismos, los pequeños poros que este tiene, permiten regular la dosificación de agua, gases e intercambio iónico, además funciona como un reservorio de calcio, el cual ayuda a la formación del esqueleto del embrión (Rose & Hincke, 2009).

El cascarón de huevo de las aves se ha estructurado en cuatro capas: cutícula, empalizada mineral, botones mamilares internos y membranas.

Figura 1. Estructura del cascarón de huevo



(Olendorf, 2003)

1. Cutícula
2. Capa esponjosa
3. Capa mamilar
4. Membrana del cascarón
5. Nudo mamilar
6. Material de la matriz proteica formando el núcleo mamilar

Cutícula. Capa externa del cascarón, se compone en su mayoría de materia orgánica y posee un grosor promedio de 10 micrómetros, brinda la coloración del huevo. La cutícula protege al huevo de

cualquier contaminación microbiana, además permite intercambios entre el interior del huevo y el medio ambiente externo (Y Nys, Gautron, McKee, Garcia-Ruiz, & Hincke, 2001)

Empalizada mineral. Esta capa tiene 200 micrómetros de espesor, se compone mayoritariamente de minerales y en un porcentaje menor de matriz orgánica, debido a que posee una gran cantidad de poros permite el intercambio de gases entre el interior y el exterior. En esta zona se desarrollan y crecen los cristales (Arias, Fink, Xiao, Heuer, & Caplan, 1993; Sharp & Silyn-Roberts, 1984).

Botones mamilares internos. Los núcleos mamilares forman una capa de aproximadamente 70 micrómetros de espesor y se encuentran sobre la superficie de la membrana de la cáscara externa. A partir de estos sitios de nucleación, es que se forman los cristales de carbonato de calcio, por lo que se les considera los sitios de iniciación de la mineralización (Robertson, 1982).

Membranas. Las membranas están constituidas por un 95% de proteínas, 3% de lípidos y 2% de carbohidratos. Estas membranas contienen una parte interior que se encuentra en contacto con la parte mineral y una membrana externa que es más gruesa (Arias et al., 1993).

3.2.5 Biosíntesis del carbonato de calcio

Para que se logren biosintetizar los cristales de carbonato de calcio, es necesario que exista un espacio biológicamente compartimentado (Mahamid, Addadi, & Weiner, 2011; S. Mann, 1988). En el caso de los cascarones, el espacio extracelular está delimitado por las paredes del útero y la membrana del cascarón en formación. El volumen de contacto entre estas dos entidades es llenado con un fluido libre de células al que se le denomina fluido uterino, que contiene todos los minerales y componentes orgánicos necesarios para la formación del cascarón (Robertson, 1982).

Además de tener un espacio compartimentado, es necesario tener un medio de hipersaturación, debido a que, el mineral se forma en condiciones de saturación, ya que en solución, los cationes y aniones están en equilibrio con el complejo



Por último, para que se dé la precipitación y se forme el mineral, es necesaria la presencia de sitios de nucleación, ya que la hipersaturación y el espacio compartimentado, no son suficientes para precipitar una sal. Para que se dé la formación del mineral, se cree que las proteínas que forman la matriz orgánica, juegan un papel importante en la nucleación y formación de los cristales de calcita

3.2.6 Formación del cascarón de huevo

La formación del cascarón del huevo sucede durante el paso del huevo a través del oviducto, siendo formado por capas sucesivas mientras el huevo pasa a través de los diferentes sectores del oviducto. Luego de la fertilización del óvulo en el infundíbulo y la secreción de albúmina en el magnum, el huevo entra en el istmo, luego de 2 o 3 horas de la fecundación. En el istmo, las células granulares secretan varios componentes de la coraza del huevo, tales como colágeno de tipo X.

La mayoría de los depósitos de calcio de la cáscara del huevo ocurren en la glándula del cascarón. Aproximadamente de 5 a 6 gramos de carbonato de calcio se depositan en un cascarón mediano durante su formación; la mayoría ocurre durante las siguientes 17 a 18 horas luego de que el huevo llega a la glándula. La rapidez con la que tal cantidad de calcio es depositada hace de la mineralización del cascarón uno de los procesos más rápidos de biomineralización conocido (Lavelin et al., 2000)

3.2.7 Intervención de las proteínas de matriz en la mineralización

Los componentes de la matriz orgánica de una mineralización biológicamente conducida juegan un rol de control en la cristalización. Proteínas de matriz extracelular de estructuras biomineralizadas influyen la firmeza y la forma final de la estructura de fosfato de calcio y carbonato de calcio, mediante la modulación del nucleamiento y crecimiento del cristal.

Algunas de estas biomoléculas, en las cuales existe evidencia de que juegan un rol regulatorio en la biomineralización, son naturalmente ácidas. En algunos casos están localizadas en la interfase entre el cristal y la matriz extracelular, mientras que en otros, se les puede encontrar directamente dentro de los cristales. Usualmente, estas proteínas ácidas se asocian con moléculas más hidrofóbicas, para formar estructuras tridimensionales extensas. Muchos otros ejemplos similares se han encontrado en estructuras esqueléticas mineralizadas (Lavelin et al., 2000).

3.2.8 Componentes de la matriz orgánica

Dentro de los componentes de la matriz orgánica existen 57 proteínas, presentes en el fluido uterino, estas proteínas tienen diversas funciones, tales como formación de proteoglicanos, proteínas chaperonas, proteasas/antiproteasas, antibacterianas y mineralización (Brionne, Nys, Hennequet-Antier, & Gautron, 2014)

En todas las capas del cascarón de huevo existe matriz orgánica, la cual desempeña un papel en el establecimiento de propiedades mecánicas y de defensa antimicrobiana (Yves Nys, Gautron, Garcia-Ruiz, & Hincke, 2004). La matriz orgánica del cascarón de huevo es una mezcla de 70% de proteínas y 11% de proteoglicanos y polisacáridos (Y Nys et al., 2001; Yves Nys, Gautron, Garcia-Ruiz, & Hincke, 2004)

3.2.9 Proteínas de la matriz orgánica en el cascarón de huevo

Las proteínas principales de la matriz orgánica del cascarón de huevo, se pueden dividir en tres grupos: proteínas de la clara de huevo, proteínas ubicuas en otros tejidos, proteínas específicas del cascarón del huevo.

Las proteínas específicas del cascarón de huevo se han identificado sólo en los tejidos que participan en el proceso de biomineralización, como son el istmo rojo y el útero. Estas proteínas fueron nombradas ovocleidinas (Hincke, Tsang, Courtney, Hill, & Narbaitz, 1995) y ovocalixinas (Y Nys et al., 2001).

La ovocleidina-116 es un componente principal de la matriz del cascarón de huevo, se observa en toda la palizada mineral y abunda en el líquido uterino durante la fase de crecimiento del cascarón (Y Nys et al., 2001; Rose & Hincke, 2009). Está presente en el fluido uterino y en los extractos del cascarón en dos isoformas de 200 y 116 kDa. Su ubicación la convierte en una candidata potencial involucrada en el crecimiento y en la orientación de los cristales de la capa empalizada (Hincke, 1999).

La ovocalixina-25 es otra proteína específica de la matriz orgánica del cascarón que se ha identificado y clonado exitosamente (Y Nys et al., 2001)

3.2.10 *Dromaius novaehollandiae* (emú)

El emú (*Dromaius novaehollandiae*) es la segunda ave más grande, en cuanto al peso, después de otra rátide, el avestruz. Es un ave endémica de Australia, donde es el ave nativa más grande y el único miembro del género *Dromaius*. El hábitat del emú cubre la mayor parte del continente australiano, sin embargo, se encuentra extinta en Tasmania y King Island, luego de la migración europea en 1788. El ave es lo suficientemente común como para encontrarse dentro de la

clasificación especies bajo preocupación menor de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

El emú es un ave de plumas suaves, color café, sin capacidad de volar, con piernas y cuello largo, que puede alcanzar una altura de hasta 1.9 metros. Puede recorrer grandes distancias, y cuando es necesario llegar a una velocidad de 50 Km/h. Se alimenta de una variedad de plantas e insectos, pero se conocen casos en los cuales han estado semanas sin comer. Toman agua de manera poco frecuente, pero la consumen de manera copiosa cuando se presenta la oportunidad. (Clements, 2007)

La reproducción se lleva a cabo en mayo y junio, y luchas entre las hembras por el macho son comunes. Las hembras se pueden aparear varias veces y realizar varias deposiciones de huevos en la misma temporada de apareamiento. (Sibley, C. y Ahlquist, J., 1990)

Los machos se encargan de la incubación; perdiendo una gran cantidad de peso en el proceso, debido a que rara vez ingieren alimento o agua. Los huevos eclosionan luego de alrededor de ocho semanas, y las crías son alimentadas por el padre. Alcanzan la estatura máxima luego de seis meses, pero pueden permanecer como familia hasta la siguiente temporada de apareamiento. El emú es un ícono cultural importante de Australia, apareciendo en el escudo de armas y varias monedas. El ave tiene un lugar prominente en la mitología indígena australiana. (Davies, 1963)

Figura 2. Emú y cascarones de huevo



3.2.11 Proteínas intraminerales del cascarón de huevo de la gallina, ganso, avestruz, emú y ñandú

La ovocleidina 17 (OC-17) es la primera proteína intramineral específica del cascarón de huevo de gallina que se aisló, caracterizó y se determinó estructuralmente (Reyes-Grajeda, 2004). Presenta un peso molecular de 14 kDa y 142 aminoácidos, se expresa exclusivamente en las células tubulares del útero y la expresión ocurre en el fluido uterino durante la fase de crecimiento (Y Nys et al., 2001).

En el cascarón de huevo de otras especies de aves se encuentran proteínas homólogas a la OC-17, como la ansocalcina (ANCA) del cascarón de huevo de ganso (*Anser anser*). Esta proteína contiene siete cisteínas a diferencia de la OC-17 que tiene seis. En el huevo de avestruz (*Struthio camelus*), se encuentran las proteínas estruthiocalcina-1 y -2 (SCA-1 y SCA-2). Por último, el emú (*Dromaius novaehollandiae*) y el ñandú (*Rhea americana*), se encuentran dos proteínas denominadas respectivamente dromaiocalcinas-1 y -2 (DCA-1 y DCA-2) y rheacalcinas-1 y 2 (RCA-1 y RCA-2). Todas estas proteínas tienen similitudes con la secuencia

de la OC-17 que va de 40 a 70% (K. Mann & Siedler, 2006; Ruiz-Arellano, 2014)(Reyes-Grajeda, Moreno, & Romero, 2004).

3.2.12 Utilización de las proteínas de cascarón de huevo de emú como modelo biomédico

Las ciencias biomédicas son un conjunto de ciencias aplicadas que utilizan porciones de las ciencias naturales o las ciencias formales para desarrollar conocimiento, intervenciones o tecnología en cuidado de la salud o salud pública.

El estudio se realizó con cascarones de huevo de emú, debido a que según la filogenia de las especies y la evolución de las proteínas involucradas en la mineralización de carbonato de calcio se encuentra entre las aves de corral más cercanamente relacionada con los mamíferos y de los reptiles que se encuentran más alejados.

Además por su proceso evolutivo permitirá ver la conservación de las estructuras de las proteínas indicando los sitios importantes, relacionados a la biomineralización, no importando la especie.

4. JUSTIFICACIÓN

La biomineralización es el proceso por el que los organismos, tanto procariotas como eucariotas, incluidos los humanos, producen minerales. Este proceso ocurre, por un lado, como resultado de su actividad celular, la cual provoca los cambios fisicoquímicos necesarios para que se produzca la nucleación y posterior crecimiento del núcleo formado y, por otro, por el aporte de superficies (pared celular, membranas, polímeros extracelulares, restos de lisis, entre otros) que actúan como núcleos de cristalización, disminuyendo la barrera energética que es necesario superar para que se produzca la nucleación de una fase mineral. En general todos los procesos de biomineralización en la naturaleza están asociados a un control estructural llevado a cabo por macromoléculas biológicas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos).

Sin embargo, es poca la información que se conoce sobre la estructura de las macromoléculas que actúan en los seres vivos, debido a que la estructura de los biominales está jerarquizada de tal manera, que no es tan fácil elucidar sus estructuras para luego comprender su funcionamiento, a nivel de biología estructural.

Al lograr elucidar las estructuras de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo, y comprobar su correlación con las proteínas involucradas en la calcificación, se puede empezar a explicar cómo el mecanismo estructural afecta la calcificación patológica, siendo los más afectados los tejidos blandos. Sin embargo, este no es el objetivo principal del estudio, sino establecer solamente un modelo bioestructural válido. Los estudios posteriores a esta investigación permitirán establecer aplicaciones biomédicas concretas.

El estudio se realizará con cascarones de huevo de emú, debido a que solo hay dos casos de estudio bien documentados con datos experimentales (la otra ave es el avestruz), de ellas se tienen datos sobre la caracterización de proteínas intraminerales, desde la secuencia hasta la estructura 3D obtenidas por difracción de rayos-X.

Además por su proceso evolutivo permitirá ver la conservación de las estructuras de las proteínas indicando los sitios importantes, relacionados a la biomineralización, no importando la especie.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Realizar un estudio químico-estructural a proteínas implicadas en procesos de biomineralización de carbonato de calcio en cascarones de huevo de emú y realizar una comparación de estructuras conservadas.

5.2 ESPECÍFICOS

- 5.2.1 Aislamiento de las proteínas involucradas en la biomineralización del calcio, del cascarón de huevo de emú.
- 5.2.2 Purificación de las proteínas de interés involucradas en la biomineralización del calcio.
- 5.2.3 Caracterización bioquímica de las proteínas involucradas en la biomineralización del calcio.
- 5.2.4 Comparación de estructuras cristalinas de las proteínas involucradas en la biomineralización de calcio.

6. HIPÓTESIS

Las proteínas intraminerales encontradas en el cascarón de huevo de emú están relacionadas con los procesos de nucleación, formación de cristales carbonato de calcio y control estructural de la fase mineral. Por lo tanto, el conocer la estructura tridimensional de algunas proteínas implicadas en estos procesos, tal como la estructura de la Dromaiocalcina-1 (DCA-1), permitirá definir su función biológica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo y muestra

7.1.1 Universo de Trabajo

El universo de trabajo serán los huevos de las aves ratides.

7.1.2 Muestra

La muestra serán las proteínas intraminerales de los cascarones de emú, que biomineralizan calcio.

7.2 Materiales

7.2.1 Equipo

- ✓ Espectrofotómetro de dispersión de luz dinámica
- ✓ HPLC con detector UV/Vis
- ✓ Espectrómetro de masas
- ✓ Microscopio de barrido electrónico
- ✓ Difractómetro de rayos X para monocristal
- ✓ Centrífuga

7.2.2 Reactivos

- ✓ EDTA
- ✓ Ácido acético al 5%
- ✓ Ácido acético al 10%
- ✓ Sulfato de amonio al 35-40%
- ✓ Citrato de sodio 50mM pH 4.0
- ✓ Nitrógeno líquido

7.2.3 Otros materiales

- ✓ Filtros amicon ultra
- ✓ Micropipetas automáticas

7.3 Métodos

7.3.1 Diseño Metodológico

7.3.1.1 AISLAMIENTO

Para aislar a las proteínas intraminerales que biomineralizan calcio en el cascarón de huevo, se inició lavando los cascarones con una solución de EDTA al 5% durante 45 minutos a una temperatura de 4°C, esto con el objetivo de poder retirar la membrana interna de los cascarones y esta no interfiera en los próximos ensayos, por último los cascarones se dejaron secando a temperatura ambiente. Luego de que los cascarones ya lavados se secaron por completo, estos se pulverizaron hasta obtener un polvo sumamente fino.

Luego de que se obtuvo la muestra pulverizada, se pesaron 100 gramos de polvo, luego se disolvieron en una solución de ácido acético al 10%, en una relación de 20 mL de ácido acético por 1 gramo de cascarón en polvo, haciendo un volumen total de 2L. La solución se agitó por 72 horas a una temperatura de 4°C. El ácido acético se agregó con el objetivo de eliminar los carbonatos del cascarón de huevo.

El extracto obtenido se filtró con papel Whatman No.2 para poder eliminar los residuos sólidos, cuidando siempre la temperatura, por lo que el procedimiento se realizó a una temperatura de 4°C. Luego se filtró nuevamente en un sistema de tipo embudo Büchner, con una membrana de poro de 0.45 micrómetros.

El extracto filtrado se concentró mediante la técnica de crioconcentración. Esta técnica consiste en lo siguiente:

- Congelar por 24 horas el extracto obtenido
- Pasadas las 24 horas, el contenido se debe centrifugar a una velocidad de 5000 a 5500 rpm.
- Tomar el sobrenadante (en el cual estarán las especies de interés) y se descartó la fase que seguía congelada (Virgen-Ortíz et al., 2012).

El sobrenadante obtenido se dializó con una membrana de un corte de 3 kDa, por 24 horas a 4°C en una solución de ácido acético 5%, para reducir el contenido de ácido acético en el cual se encuentra disuelta la proteína. Transcurridas las 24 horas se le agregó sulfato de amonio al 70% para precipitar las proteínas. La muestra nuevamente se dializó por 72 horas con ácido acético al 5% para eliminar el sulfato de amonio, obteniendo una muestra más concentrada.

Al finalizar la diálisis, la muestra contenida dentro de la membrana se centrifugó para eliminar todo el solvente y obtener la proteína lo más concentrada posible.

7.3.1.2 PURIFICACIÓN

a) Cromatografía de exclusión molecular

La purificación inicial de las proteínas se llevó a cabo por medio de un equipo de Cromatografía Líquida Ultrarápida (UFLC por sus siglas en inglés), se utilizó una columna ShodexKW-802.5 en un equipo SHIMADZU. Se empleó como fase móvil un buffer de 0.1M de acetato de amonio a pH 5 y 50 mM de cloruro de sodio. Se utilizó un flujo de 1mL/min, el volumen de inyección fue de 500 µL, la muestra se leyó a una absorbancia de 220 y 280 nm.

b) Cromatografía de fase reversa

La purificación siguiente se realizó con un equipo UFLC con una columna C-18 Restek en un equipo SHIMADZU. El volumen de inyección fue de 500 µL, el solvente A consistió en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético y el disolvente B consistió en acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético. Se empleó un gradiente de concentración lineal de 0-100% en 60 minutos, la muestra se midió a una absorbancia de 220 a 280 nm. Como paso final se realizó un gradiente de concentración escalonado correspondiente a 0-40%, 40%-55% y 55%-100% (Ruiz-Arellano, R. Moreno, A., 2014).

7.3.1.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

a) Cuantificación de proteína

Mediante espectroscopía ultravioleta, se determinó la concentración de las proteínas, haciendo la lectura a una longitud de onda de 280 nm, para cada una de las fracciones resultantes de la purificación cromatográfica.

b) Geles de electroforesis desnaturizante

La electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, se utilizó para identificar y monitorear el proceso de purificación de las proteínas. Este monitoreo se realizó mediante la determinación de los patrones de bandas proteicas en las distintas fracciones obtenidas en las separaciones cromatográficas.

Los geles se corrieron en un equipo de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3, se montaron sobre placas de cristal de tamaño 0.75mm x 10cm x 7cm. Las muestras se incubaron con el tampón de solubilización durante 10 min a 90°C. La intensidad de la corriente constante fue de 120mA durante aproximadamente 1 hora 40 min a temperatura ambiente. La tinción de los geles se realizó con Azul-Coomassie R-250 al 0.5% en ácido acético:isopropanol:agua (1:3:6) durante 1 horas. La decoloración se realizó con una disolución metanol:ácido acético:agua (2:1:10).

c) Dispersión dinámica de luz

La técnica de Dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), permitió medir las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con respecto al tiempo, a través de la ecuación de Stokes-Einstein, la cual permite derivar el radio hidrodinámico. Para hacer esta relación se tomó en cuenta que la intensidad de luz dispersada es proporcional a la masa molecular y concentración, es posible determinar el tamaño de moléculas y nanopartículas. Al finalizar este

ensayo se obtuvo un estimado de la masa molecular y pureza de la proteína. Prueba complementaria al gel desnaturalizante

d) Espectrometría de masas

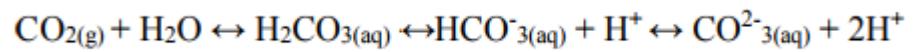
Los análisis de espectrometría de masas se realizaron utilizando la técnica de MALDI-TOF, la cual implica ionización y desorción por láser inducida por matriz. La ionización de las moléculas de la muestra se consiguió tras mezclar éstas con una matriz formada por una sustancia capaz de absorber a la longitud de onda del UV. La mezcla sólida resultante fue irradiada con un láser, cuya energía fue absorbida por la matriz, lo que provocó la ionización de la proteína. Una vez ionizadas y en estado gaseoso, las moléculas se harán pasar a un analizador donde se produce la separación en función de la relación masa/carga. La matriz que se utilizó fue una mezcla de ácido sinapínico y ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Al finalizar esta prueba se obtuvo la masa molecular exacta de la proteína.

7.3.1.3 CRECIMIENTO DE CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO

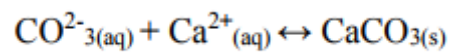
Para determinar el efecto de las proteínas en la morfología de cristales de carbonato de calcio, se sintetizaron cristales de este compuesto en presencia de las proteínas aisladas. Los cristales de carbonato de calcio fueron crecidos mediante la técnica de difusión de fase vapor, utilizando un sistema diseñado *ad hoc*. En el sistema se montaron pruebas control (sin presencia de las proteínas) y con la influencia de diferentes concentraciones de proteínas las cuales fueron 50, 100 y 250 $\mu\text{g/mL}$. Se mezclaron 2 μL de una solución de cloruro de calcio 0.1M con 2 μL de la solución de proteína, el volumen total de las gotas fue de 4 μL . El sistema se selló perfectamente para evitar fugas y el experimento se llevó a cabo a una temperatura de 18°C. Después de 48 horas aparecieron los

cristales de carbonato de calcio, según el mecanismo que a continuación se describe.

Cuando el amonio se difunde, en un sistema cerrado, se produce un incremento en el pH, el cual es necesario para que se produzca la precipitación de carbonato de calcio, según la reacción (Hernandez-Hernandez 2008a)

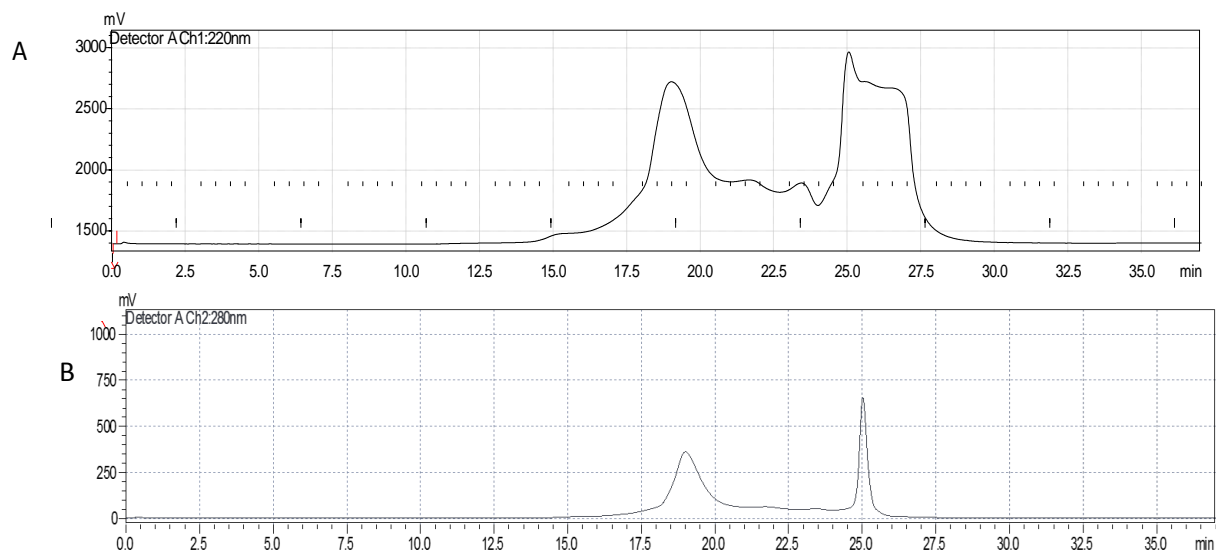


Luego, por la presencia de iones calcio en la solución de la gota, se produce la reacción de precipitación de carbonato de calcio



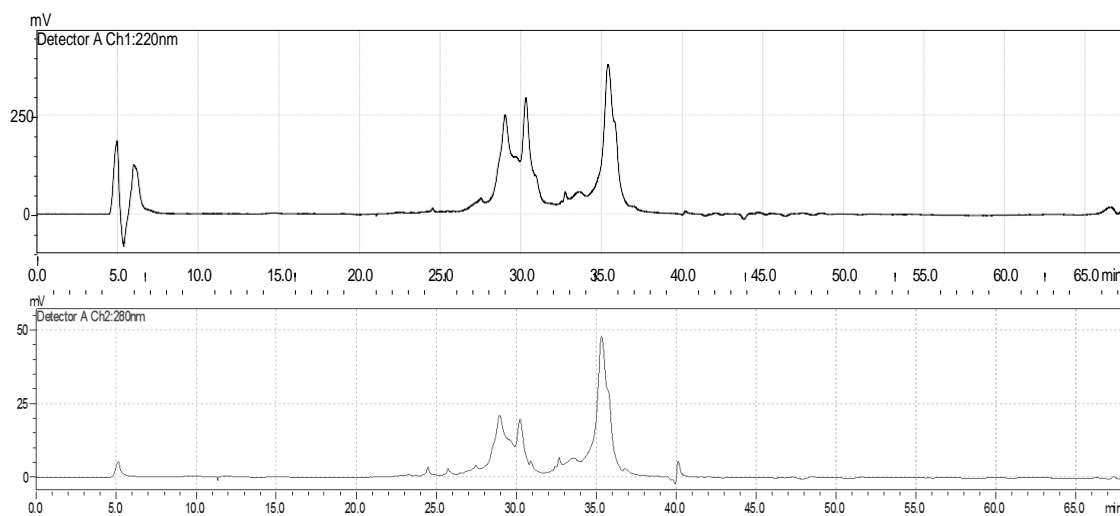
8. RESULTADOS

Figura 1. Cromatograma de exclusión molecular de extracto crudo de cascarón de huevo de emú (DCA-1)



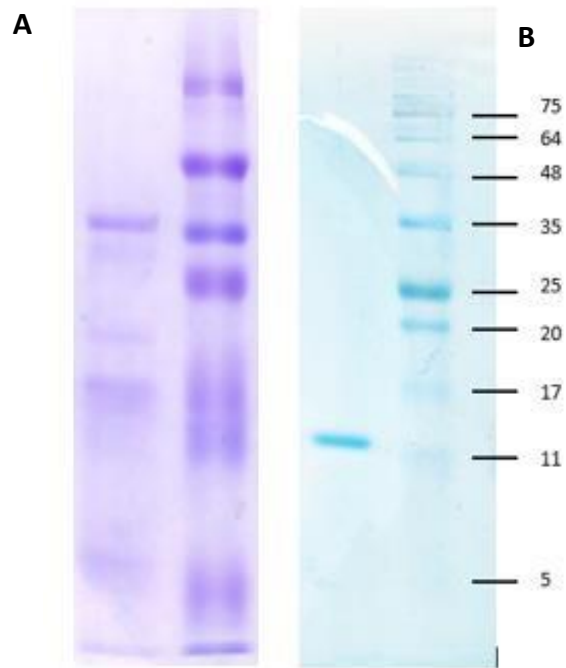
Descripción. En la figura A se muestra el cromatograma obtenido a una longitud de onda de 220 nm y en la figura B, el cromatograma obtenido a una longitud de onda de 280 nm.

Figura 2. Cromatograma de fase reversa, luego de pasar la muestra por la primera etapa de purificación (exclusión molecular) (DCA-1)



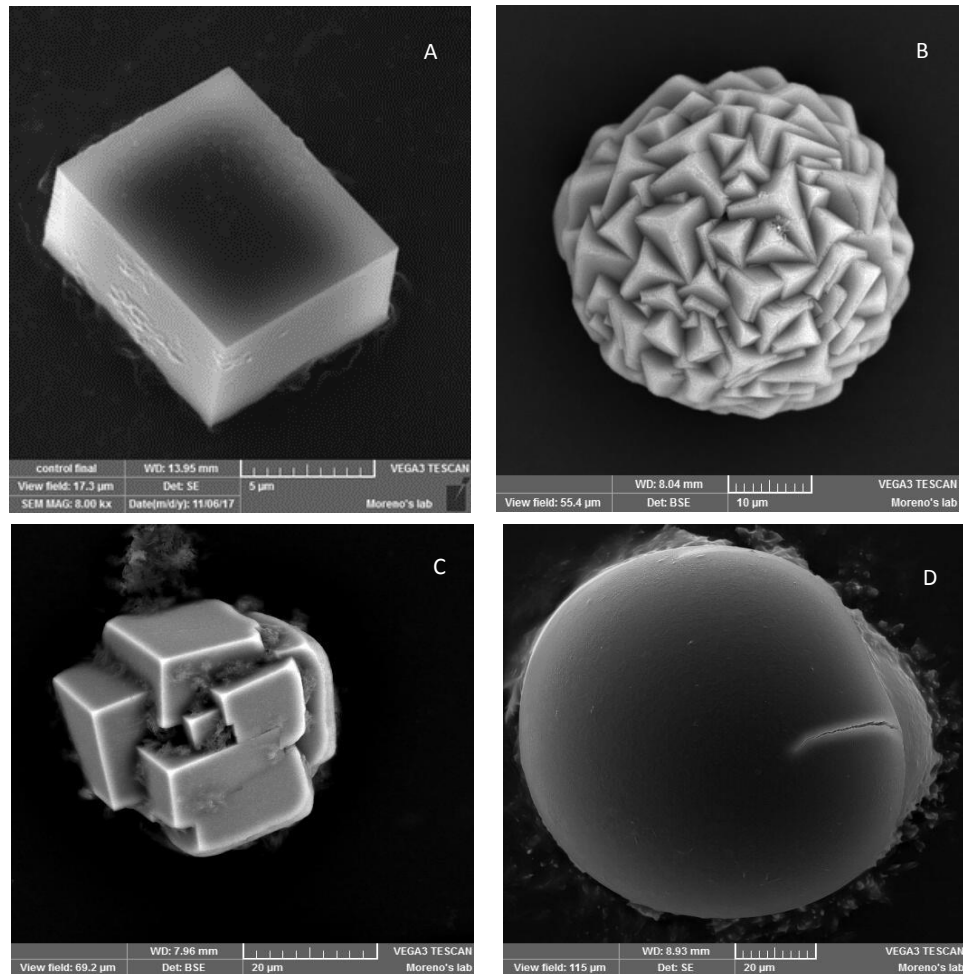
Descripción. En la figura A se muestra el cromatograma obtenido a una longitud de onda de 220 nm y en la figura B, el cromatograma obtenido a una longitud de onda de 280 nm.

Figura 3. Geles de electroferesis desnaturalizante de cascarón de huevo de emú



Descripción. La figura A muestra la cantidad de bandas que aún se encuentran presentes luego de realizada la exclusión molecular (la proteína aún no se encuentra purificada). La figura B muestra una única banda, por lo que se puede decir que la proteína se encuentra purificada.

Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de carbonato de calcio formados en presencia de proteína de cascarón de huevo de emú (DCA-1 o Dromaiocalcina-1)



Descripción. A). CaCO_3 B). $\text{CaCO}_3 + 50\mu\text{g/mL}$ proteína C). $\text{CaCO}_3 + 75\mu\text{g/mL}$ proteína D). $\text{CaCO}_3 + 100\mu\text{g/mL}$ proteína

9. DISCUSIÓN

El estudio de las proteínas requiere que las mismas se encuentren totalmente purificadas y aisladas del medio en que se encuentran, donde cumplen su función.

Aunque a nivel fisiológico las proteínas no funcionan así, es necesario realizar las distintas etapas de purificación, para que cuando se caractericen no existan interferencias de otras proteínas.

Las técnicas cromatográficas son las de elección cuando se trata de mezclas más o menos complejas y que las especies de interés se encuentran en baja cantidad, puesto que permiten una separación diferencial adecuada en función de su comportamiento frente a una técnica determinada (fase reversa y exclusión molecular).

En el caso de la exclusión molecular la separación se debe a los diferentes tamaños que poseen las especies involucradas en la muestra y cómo se modifica el recorrido de las mismas en una columna con diferentes tamaños de poro. Para la fase reversa la diferencia consiste en las hidrofobicidades de las distintas especies en una mezcla de agua y un solvente orgánico.

Cuando se trata de proteínas y la detección de las fracciones se hace utilizando un detector ultravioleta visible, es útil establecer la longitud de onda de trabajo a 220 y 280 nm. Esto se debe a que la longitud de 220 nm es la longitud a la que absorbe el enlace peptídico, mientras que el de 280 nm es la longitud a la que absorbe los aminoácidos aromáticos (Tirosina, Triptófano y Fenilalanina).

Al comparar los dos cromatogramas que se observan en la **figura 1** en el minuto 18 y 25 se observan las fracciones mayoritarias, las cuales fueron recolectadas. Ambas fracciones presentan un comportamiento parecido al Gaussiano. Ahora bien, la fracción colectada al minuto 25 se observa más aguda y la respuesta del detector es más cercana a la línea base en ese mismo tiempo de retención, por lo que podría inferirse que la proteína de interés se encuentra en esta fracción. Esto se ve soportado por la composición de los extractos del cascarón realizado por (Mann, 2004) en los cuales, se observa que las otras proteínas

presentes en esta etapa de la purificación suelen ser otras proteínas de matriz orgánica y membrana, que son de tamaño mayor a las proteínas que biomineralizan calcio en especies estudiadas anteriormente.

En la **figura 2** se muestran los cromatogramas de la fase reversa realizada a la fracción obtenida al minuto 25 de la cromatografía de exclusión molecular. Es importante indicar que al tratarse de una proteína secretada durante los procesos de formación del cascarón, las proteínas que biomineralizan calcio suelen ser muy estables ante procesos de desnaturalización. Esto permite que la cromatografía de fase reversa sea una opción para purificarlas, sin que pierdan su estructura terciaria y por lo tanto su funcionalidad. Al igual que lo observado en la cromatografía de exclusión molecular, la fracción más adecuada para su recolección es la que está presente a los 35 minutos. Debido a la forma de esta fracción, se decidió separar la recolección de las fracciones en la subida y bajada del pico Gaussiano, puesto que el pico no presenta una forma uniforme.

Durante la realización del experimento se realizó una prueba bioquímica para comprobar el aislamiento y purificación de las proteínas. La electroforesis desnaturalizante en gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica que permite observar si las proteínas se encuentran aisladas y si son las de interés. Esta técnica se basa en una migración electroasistida de la proteína en un gel con un grado de entrecruzamiento conocido. La aplicación de un campo electromagnético en una solución buffer dentro del gel permite el movimiento de las proteínas en función de su carga y punto isoeléctrico, mientras que el entrecruzamiento genera una resistencia al movimiento de las proteínas en función de su tamaño y forma. Una vez concluida la migración diferencial se pueden observar las proteínas al teñirse con un colorante adecuado. De esta manera se obtienen una serie de bandas que indican la cantidad de proteínas presentes en la muestra y un peso molecular aproximado si se utiliza una mezcla de composición conocida como marcador de peso molecular.

En la **figura 3** se observa en la parte A, el SDS-PAGE de la fracción recolectada a 25 minutos de la exclusión molecular del emú. La presencia de abundantes bandas en este gel indica que la proteína se encuentra en una mezcla compleja con otras proteínas involucradas en la biomineralización y en la membrana, como se mencionó anteriormente. Esto indica que el proceso de aislamiento y purificación se encuentra incompleto en esta etapa. En el inciso B se puede observar el SDS-PAGE posterior a la cromatografía de la fase reversa. Esta fase se recolectó durante la subida del pico Gaussiano. Puede apreciarse que en este caso la proteína se encuentra sola (ver inciso B, lado izquierdo) y entre las bandas del marcador de peso molecular que se esperaba que esta apareciera, indicando un aislamiento y purificación exitosa de la proteína mayoritaria (DCA - 1) que biomineraliza calcio en el cascarón de huevo del emú.

En la **figura 4** se observan las micrografías de barrido electrónico de los cristales de carbonato calcio en presencia de diferentes concentraciones de proteína de emú. Se puede observar que el carbonato de calcio cambia de su hábito cúbico a un hábito tipo drusa a concentraciones entre 50 y 75 $\mu\text{g/mL}$, para transformarse en un hábito esférico a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$. Este cambio en los hábitos es un indicativo de que las proteínas ejercen una función específica durante la formación de cascarón de huevo, modificando la forma a nivel micrométrico.

El experimento de dispersión de luz dinámica (DLS) no fue posible realizarse, debido a que el rendimiento de extracción de la proteína de la muestra fue muy bajo, por lo que no fue suficiente para realizar este ensayo.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La cromatografía de exclusión molecular no fue suficiente para aislar la proteína DCA-1, puesto que varias proteínas de membrana y del cascarón poseen tamaños similares.
- 10.2 La cromatografía de fase reversa fue suficiente para aislar la proteína DCA-1, debido a que la proteína de interés es secretada en la naturaleza, lo que le confiere alta estabilidad y permite que no se desnaturalice en este experimento.
- 10.3 El gel de electroforesis desnaturalizante comprueba el aislamiento exitoso de la proteína DCA-1, puesto que se observa una única banda, situada entre el marcador de peso molecular de 11 y 17 kDa, posterior a la elución de la cromatografía de fase reversa.
- 10.4 La DCA-1 a bajas concentraciones forma hábitos cristalinos tipo drusa, mientras que a alta concentración forma hábitos cristalinos tipo esfera, indicando que la proteína aislada tiene un efecto directo en la biomineralización del carbonato de calcio, y que depende de sus concentraciones.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar un gel de isoelectroenfoque para la proteína DCA-1, para encontrar su punto isoelectrico.
- 11.2 Realizar un experimento de DLS con varios buffers con distinto valor de pH y que al menos un buffer incluya carbonatos, para encontrar las condiciones de monodispersión óptimas de la DCA – 1 en solución.
- 11.3 Encontrar las condiciones de cristalización para DCA-1, incluyendo precipitantes, aditivos y temperatura, para obtener los monocristales de mejor calidad posible.
- 11.4 Obtener monocristales DCA-1, para realizar una difracción de rayos X de alta resolución y obtener el mapa de densidad electrónica.
- 11.5 Elucidar la estructura tridimensional de DCA-1, para hipotetizar acerca de cómo los diferentes dominios se ven involucrados en la biomineralización del carbonato de calcio.

12. REFERENCIAS

- Arias, J., Fink, D., Xiao, S., Heuer, A., & Caplan, A. (1993). Biomineralization and Eggshells: Cell-Mediated Acellular Compartments of Mineralized Extracellular Matrix. *International Review Of Cytology Volume 145*, 217-250.
- Brionne, A., Nys, Y., Hennequet-Antier, C., & Gautron, J. (2014). Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process. *BMC Genomics*, 15(1), 220.
- Escorcia, M., & Moreno, A. (2016). *El Casacarón del Huevo* (1st ed., pp. 18, 20, 28 - 34). Ciudad de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández-Hernández, A., Vidal, M., Gómez-Morales, J., Rodríguez-Navarro, A., Labas, V., & Gautron, J. et al. (2008). Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃). *Journal Of Crystal Growth*, 310(7-9), 1754-1759.
- Hincke, M., Gautron, J., Tsang, C., McKee, M., & Nys, Y. (1999). Molecular Cloning and Ultrastructural Localization of the Core Protein of an Eggshell Matrix Proteoglycan, Ovocleidin-116. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(46), 32915-32923
- Hincke, M., Tsang, C., Courtney, M., Hill, V., & Narbaitz, R. (1995). Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). *Calcified Tissue International*, 56(6), 578-583.
- Kalmar, L., Homola, D., Varga, G., & Tompa, P. (2012). Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization. *Bone*, 51(3), 528-534.
- Lavelin, I., Meiri, N., & Pines, M. (2000). New Insight in Eggshell Formation. *Poultry Science*, 79(7), 1014-1017.

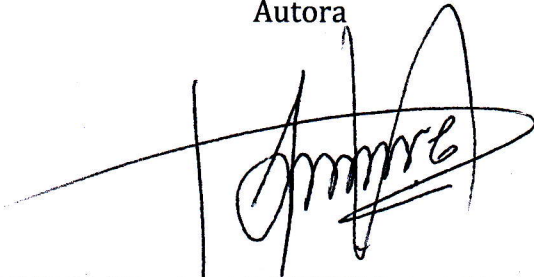
- LEACH, R. (1982). Biochemistry of the Organic Matrix of the Eggshell. *Poultry Science*, 61(10), 2040-2047.
- Lehninger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2013). *Principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Lowenstam, H. (1981). Minerals formed by organisms. *Science*, 211(4487), 1126-1131.
- Mahamid, J., Addadi, L., & Weiner, S. (2011). Crystallization Pathways in Bone. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4), 92-97.
- Mann, K. (2004). Identification of the major proteins of the organic matrix of emu (*Dromaius novaehollandiae*) and rhea (*Rhea americana*) eggshell calcified layer. *British Poultry Science*, 45(4), 483-490.
- Mann, K., & Siedler, F. (2004). Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and posttranslational modifications. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins And Proteomics*, 1696(1), 41-50.
- Mann, K., & Siedler, F. (2006). Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins. *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry And Molecular Biology*, 143(2), 160-170.
- Mann, S. (1988). Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332(6160), 119-124.
- Mikšík, I., Holáň, V., & Deyl, Z. (1996). Avian eggshell pigments and their variability. *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry And Molecular Biology*, 113(3), 607-612.

- Muschol, M. and Rosenberger, F. (1995). Interactions in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: Static and dynamic light scattering results. *The Journal of Chemical Physics*, 103(24), pp.10424-10432.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J., & Hincke, M. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6-7), 549-562.
- Nys, Y., Gautron, J., McKee, M., Garcia-Ruiz, J., & Hincke, M. (2001). Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. *World's Poultry Science Journal*, 57(04), 401-413.
- Olendorf, D. (2003). *Grzimek's Animal life encyclopedia*. Detroit, MI: Gale.
- Reyes-Grajeda, J., Moreno, A., & Romero, A. (2004). Crystal Structure of Ovocleidin-17, a Major Protein of the Calcified Gallus gallus Eggshell. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(39), 40876-40881.
- Robertson, W. (1982). The Solubility Concept. *Biological Mineralization And Demineralization*, 5-21.
- Rose, M., & Hincke, M. (2009). Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 66(16), 2707-2719.
- Rose-Martel, M., Smiley, S., & Hincke, M. (2015). Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization. *Journal Of Proteomics*, 116, 81-96.
- Ruiz-Arellano, R., & Moreno, A. (2014). Obtainment of Spherical-Shaped Calcite Crystals Induced by Intramineral Proteins Isolated from Eggshells of Ostrich and Emu. *Crystal Growth & Design*, 14(10), 5137-5143.

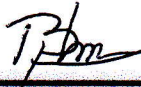
- Ruiz-Arellano, R., Medrano, F., Moreno, A., & Romero, A. (2015). Structure of struthiocalcin-1, an intramineral protein from *Struthio camelus* eggshell, in two crystal forms. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *71*(4), 809-818.
- Sharp, R., & Silyn-Roberts, H. (1984). Development of preferred orientation in the eggshell of the domestic fowl. *Biophysical Journal*, *46*(2), 175-179.
- Virgen-Ortíz, J., Ibarra-Junquera, V., Osuna-Castro, J., Escalante-Minakata, P., Mancilla-Margalli, N., & Ornelas-Paz, J. (2012). Method to concentrate protein solutions based on dialysis–freezing–centrifugation: Enzyme applications. *Analytical Biochemistry*, *426*(1), 4-12.
- Zhao, R., Xu, G., Liu, Z., Li, J., & Yang, N. (2006). A study on eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens. *Poultry Science*, *85*(3), 546-549.



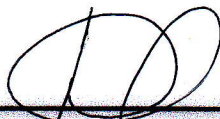
Br. María Alejandra Dávila Tejeda
Autora



Lic. Abel Moreno Cárcamo, Ph. D.
Asesor



Lic. Byron José López Mayorga
Co - Asesor



Lic. Irma Lucía Arriaga Tórtola
Revisora



Lic. Raquel Azucena Pérez Obregón
Directora de Escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano