

Contenido

<u>1</u>	<u>INTRODUCCIÓN.</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>FUNDAMENTOS TEÓRICOS.</u>	<u>2</u>
<u>3</u>	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>13</u>
3.1	TAMAÑO MÁXIMO DE CRISTAL DE LISOZIMA POR GOTTA Y F, FACTOR DE ÉXITO, AMBOS A 20 Y 21°C.	18
3.2	ESTUDIO DE LA METAESTABILIDAD DE LA LISOZIMA (20°C).	18
<u>4</u>	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	<u>19</u>
4.1	TAMAÑO MÁXIMO DE CRISTAL DE LISOZIMA POR GOTTA Y EL FACTOR DE ÉXITO A 20 Y 21°C. MÉTODO DE HANGING DROP (HDM).	19
4.2	ESTUDIO DE LA METAESTABILIDAD DE LA LISOZIMA, 20°C.	23
<u>5</u>	<u>CONCLUSIONES.</u>	<u>26</u>
<u>6</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS.</u>	<u>27</u>

1 Introducción.

La irradiación con ultrasonidos ha demostrado ser un eficiente método para conseguir nucleación heterogénea en la cristalización de lisozima de clara de huevo.

Se han analizado y ajustado las condiciones de irradiación, de modo que estas no resultasen perjudiciales, dañando los cristales o incluso esparciendo las gotas de las placas de cristalización. Estos daños son producidos a causa de la cavitación, causada por la irradiación ultrasónica (ondas acústicas), y el aumento de temperatura de la muestra que esta pueda implicar.

Con cortos periodos de irradiación seguidos de un mayor intervalo en su ausencia y un ligero aislamiento en el equipo, desapareció cualquier tipo de daño observable en las gotas.

Los experimentos realizados usando los métodos de *hanging drop* y *microbatch* a 20 y 21°C, demostraron claramente que el uso de ultrasonidos promueve la nucleación. Habiendo obtenido cristales en un mayor rango de condiciones, se comprobó que el efecto producido corresponde a la disminución de la zona de metaestabilidad.

A las temperaturas estudiadas, el tamaño de los cristales en ausencia de irradiación resultó ser mayor que en su presencia. Este efecto no parece contribuir a la mejora de la calidad de los cristales, pero son necesarios más conocimientos, por lo que se realizarán estudios futuros al respecto.

2 Fundamentos Teóricos.

La complejidad de los procesos biológicos se basa en la simplicidad de los comportamientos de las unidades que los constituyen.

Las proteínas son macromoléculas orgánicas constituidas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, aunque frecuentemente contienen azufre, fósforo e incluso algunos metales como hierro, magnesio o cobre. Todas coinciden en su estructura química central, diferenciándose por su estructura primaria, lo que definirá sus diferentes funciones en el organismo (estructurales, metabólicas o reguladoras).

Estas macromoléculas son cadenas de aminoácidos que se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional. Su estudio detallado será fundamental para conocer y comprender bien el funcionamiento de las mismas, pudiendo así desarrollar fármacos, materiales o terapias, además de acelerar considerablemente los procesos y reducir los costes de forma relevante [1].

“La cristalización de grandes moléculas biológicas es un problema de gran dificultad que se aborda utilizando desde las teorías clásicas de crecimiento cristalino hasta las últimas tecnologías de investigación espacial. Su importancia reside en que es el paso ineludible para desvelar la estructura íntima y para comprender el funcionamiento de estas moléculas, protagonistas indudables de la ciencia del siglo XXI.” —————→ *Juan Manuel García Ruíz & Fermín Otálora Muñoz [2].*

Existen inmensos ejemplos desarrollados siguiendo estas técnicas, de los más conocidos es el caso de los fármacos contra el VIH, los inhibidores de la transcriptasa-reversa-proteasa [3]. Otro ejemplo podría ser el Imatinib, fármaco altamente selectivo con tirosina-quinasa, causante de la leucemia mieloide crónica (CML) [4].

En el caso del VIH, tras conocer la estructura de la proteasa implicada (1989), los investigadores empezaron a desarrollar moléculas más y más pequeñas con efecto inhibidor de la enzima y corrigiendo todos los errores anteriormente cometidos. En 1995 fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU el primer inhibidor de la transcriptasa-reversa-proteasa, el saquinavir (Hoffmann-La Roche), seguido en 1996 por el ritonavir (Laboratorios Abbott) y el indinavir (Merck). Esto implica un proceso de menos de 8 años, cuando lo normal sería de 12 a 15 años y

millones de dólares invertidos. (“Desarme de un virus mortal: las proteasas y sus inhibidores” [5].

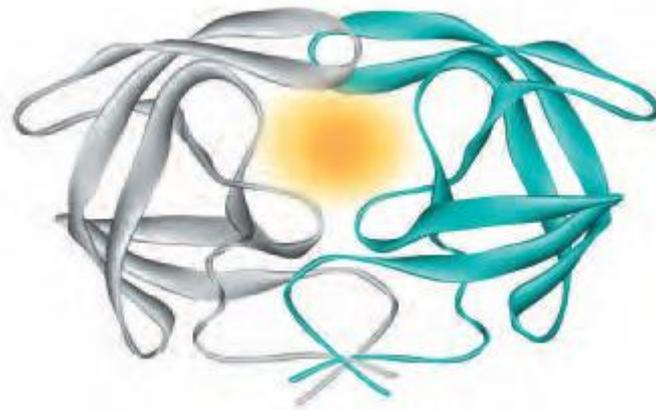


Figura 1. Proteasa causante del VIH. Molécula simétrica con el núcleo activo en el centro y dos partes iguales a los lados [6].

La técnica más usada para determinar estructuras tridimensionales es la cristalografía por rayos X, aunque más tarde comenzó también a ser usada la espectroscopía de RMN, que se aplicó por primera vez, con este uso, en la década de los 80. Fue Kurt Wüthrich, químico suizo, quien comenzó el estudio estructural de biomoléculas con esta técnica. Recibió, por dicho trabajo, el premio Nobel en el año 2002.

La historia de los rayos X comienza en 1895, con su descubrimiento por Wilhelm Conrad Röntgen, primer Premio Nobel de Física (1901). Son necesarios algunos años hasta que Max Von Laue descubre el fenómeno de la difracción (comenzando con él la cristalografía y el primer diagrama de difracción), Premio Nobel de Física en 1914. El hallazgo de Max von Laue no pasó desapercibido, al menos para los británicos William Henry Bragg y su hijo William Lawrence Bragg, quienes en 1915 compartieron el Premio Nobel de Física al demostrar la utilidad del fenómeno que había descubierto von Laue, para obtener la estructura interna de los cristales. A lo largo de los años 40, David Harker, químico Estadounidense, se centró en la resolución del problema de las fases (debido a la diferentes direcciones y ángulos de difracción) con la aplicación de la función de Patterson y con su propio trabajo, desarrollado en colaboración con John S. Kasper, los métodos directos. Con un lugar prominente en la Ciencia del siglo XX, John D. Bernal demostró que, en condiciones adecuadas, un

crystal de proteína podía mantener su cristalinidad al exponerlo a los rayos X, y fue el motor de grandes estudios cristalográficos posteriores.

Rosalind Franklin obtuvo los primeros diagramas de fibra del ADN, pero murió prematuramente a los 37 años y en relación con esta desafortunada historia, Maurice Wilkins, James Watson y Francis Crick recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1962 por el descubrimiento de la estructura de la doble hélice del ADN [7] y [8].

El análisis con cristalografía de rayos X sólo será posible si la muestra se encuentra en forma de monocristal, lo que supone una gran desventaja frente a la posibilidad de trabajar con disoluciones, como sucede con la RMN. Además, la cristalografía de rayos X provoca cierta inestabilidad en la muestra, sin llegar esta a ser destructiva y solucionándose dichos problemas con el uso de condiciones criogénicas [9].

A continuación, se muestra la cantidad de estructuras estudiadas por cada una de las técnicas de citadas anteriormente (Figura 2). En ellas, se observa el trabajo realizado hasta la actualidad, siendo posible establecer una comparación entre ambas.

Como se muestra en la Figura 2a se ha llegado ya hasta un número de 50.000 estructuras analizadas mediante cristalografía por rayos-X, frente a 8.000, estudiadas por RMN (Figura 2b).

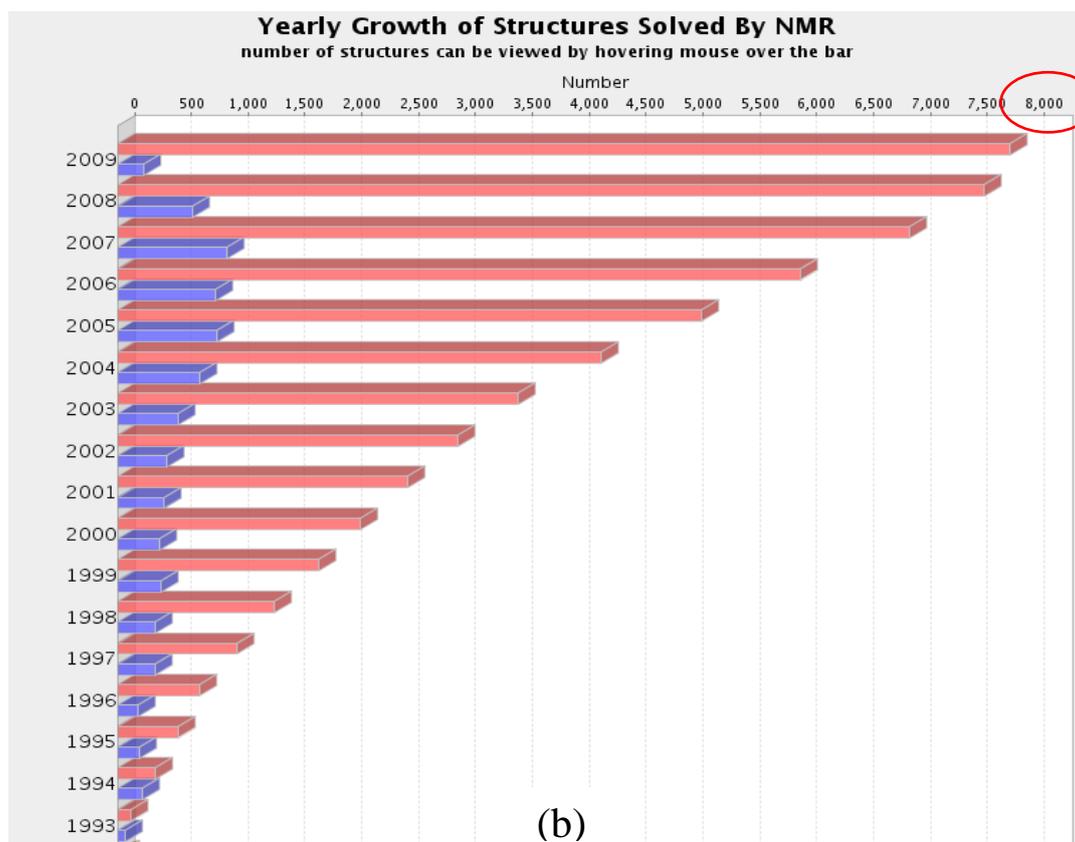
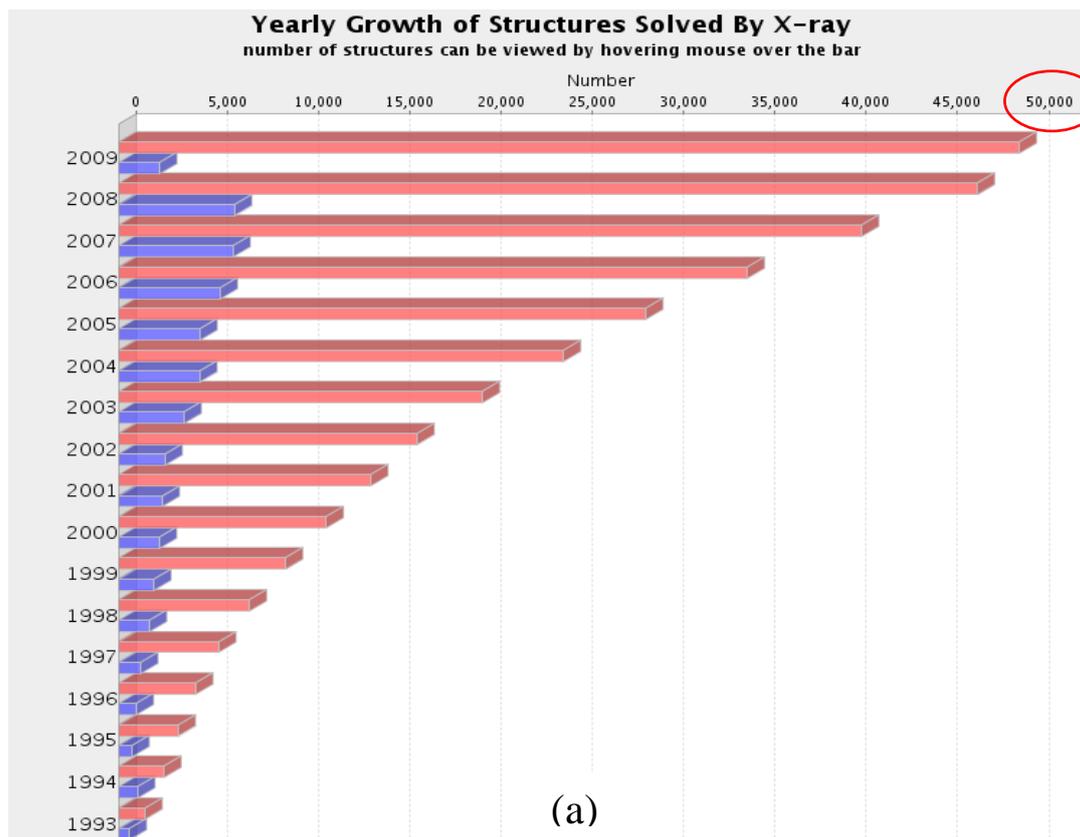


Figura 2. Número de estructuras estudiadas por rayos X (a) y por RMN (b) desde 1993 hasta la actualidad. En ambas figuras es posible observar los datos anuales (azul), como los acumulados a lo largo de los años representados (rojo). (Protein Data Bank, www.pdb.org)

Hay que vencer muchos obstáculos experimentales antes de que la estructura tridimensional de una proteína sea determinada por difracción de rayos X. Primero la molécula debe ser cristalizada y el cristal debe ser singular y de impecable calidad. Se entiende como cristal, la repetición de la celda unidad de átomos, iones o moléculas en tres dimensiones, por lo que deberán tener una correcta organización de dichas celdas además de un cierto tamaño [10].

Por otra parte está el fenómeno de la cristalización en sí. Prácticamente se ha considerado un “arte” (técnica de ensayo-error) hasta no hace demasiado tiempo. Hoy en día hay quien sigue considerándola así, o quien trabaja para transformarla en ciencia [2].

“The first relies on empirical techniques that are based mainly on trial and error, and what is perceived to be the “art” of crystallisation. The second approach is aimed at gaining an understanding of the fundamental principles that govern crystallization” —————→ Chayen NE [11].

Para entender los principios básicos de la cristalización es fundamental estudiar detalladamente el diagrama de fases, necesitando tener claros conceptos como solubilidad y sobresaturación, entre otros.

La solubilidad es la concentración máxima de un soluto en equilibrio para un determinado conjunto de condiciones (pH, temperatura, fuerza iónica...). Cuando la concentración de soluto sobrepasa dicho límite, se dará la sobresaturación, $S = c^*/c$.

El diagrama de fases mostrará el comportamiento de una solución de proteína, su estado más estable, según las diferentes condiciones y parámetros ajustables usados. El parámetro ajustable más habitual es la concentración de agente precipitante, pero puede ser la temperatura, el pH o la concentración aditiva. Conociendo el diagrama de fases se podrán escoger directamente los rangos de interés desde el inicio de la experiencia, evitando así gran cantidad de experimentos de ensayo-error en la búsqueda de las mejores condiciones de cristalización (Figura 3) [11].

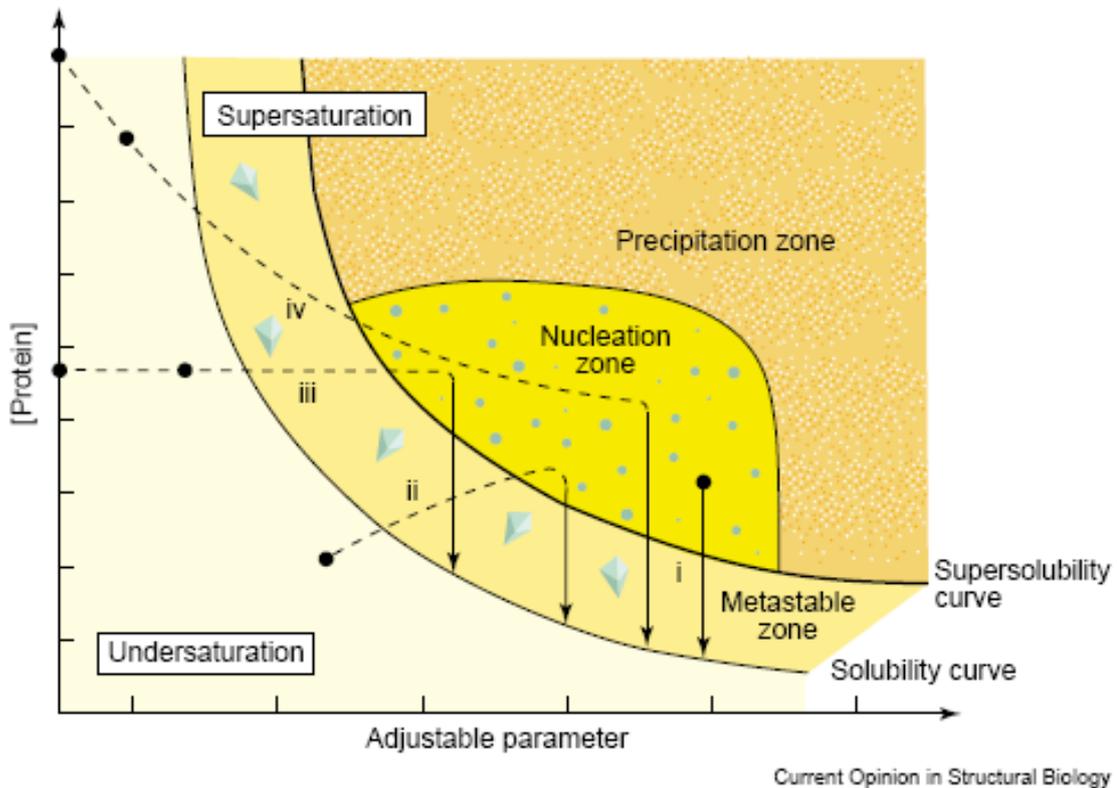


Figura 3. Diagrama de fases de cristalización de proteína, donde habitualmente se asume como parámetro ajustable la concentración de agente precipitante. La curva de solubilidad separa la zona de subsaturación de la de metaestabilidad, por lo que todo el proceso girará en torno a ella. También se observa la curva de supersaturación separando la zona de nucleación de la zona metaestable, razón por la que tendrá gran importancia [11].

Son cuatro los principales métodos de cristalización posibles, diferenciándose por los caminos que seguirán en el proceso (curvas i, ii, iii, iv de la Figura 3) de obtención de cristales estables. Según el objetivo o la experiencia a realizar, habrá que escoger uno de ellos. Los más usados por su simplicidad y resultados, suelen ser los de difusión de vapor, aunque tienen gran importancia también los de microbatch, contradifusión y diálisis [11].

En los métodos de difusión de vapor (Figura 3, curva ii), *hanging drop* y *sitting drop* (gota colgante y sentada) la gota se compone de proteína, agente precipitante y disolución tampón (estas dos últimas suelen ir a la par por encontrarse formando parte del reservorio). Habrá evaporación de las sustancias volátiles (agua o solvente orgánico) hasta que se equilibre la presión de vapor entre la gota y el reservorio (Figuras 4 y 5) [12].

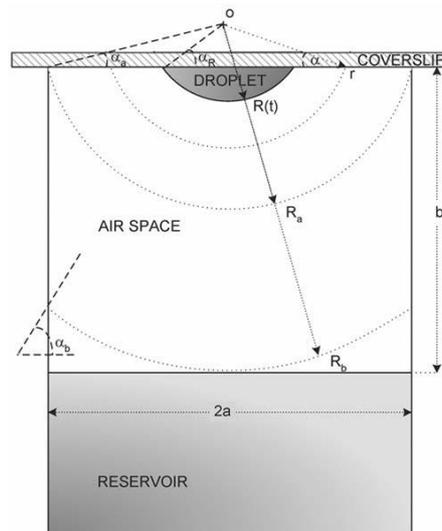


Figura 4. Modelo esquemático de la técnica de *hanging drop* usado para la derivación de la cinética de evaporación teórica [13].

Normalmente el uso de agentes precipitantes disminuye la solubilidad de la proteína en la disolución. Cuando ocurra exactamente lo contrario y se produzca un aumento de la solubilidad, será cuando se use la técnica de microdiálisis (Figura 3, curva iii). El principio básico de la cristalización por microdiálisis se basa en la permeabilidad de la membrana (Figura 5c). Esta dejará pasar pequeñas moléculas como iones o aditivos, pero no a la proteína. La cinética del equilibrio dependerá de la concentración del agente precipitante (tanto dentro como fuera de la membrana), de la temperatura, de la geometría del sistema o/y del *cut-off* [14].

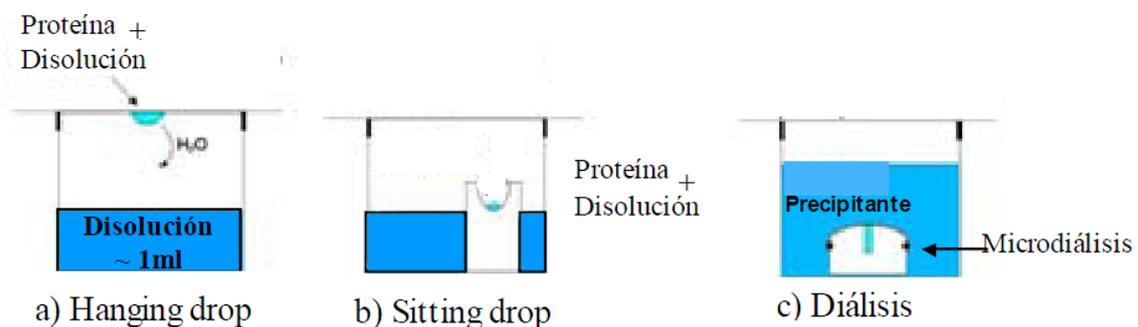


Figura 5. Esquema de los métodos hasta ahora citados de cristalización de proteínas [14].

En *microbatch* (Figura 3, curva i) se usa una concentración de agente precipitante tan alta que la supersaturación es prácticamente instantánea en el momento de la preparación de la gota. Es posible obtener buenos cristales cerca de la zona de

metaestabilidad. Si la supersaturación fuera muy alta, tendrían que disolverse parte de los pequeños cristales o del precipitado para que aumentasen su tamaño los demás cristales existentes (efecto de *Ostwald ripening*) [12] y [15].

El sistema *microbatch* habitual se efectúa cubriendo con parafina, así se forma un sistema cerrado que no permitirá la evaporación de la gota (Figura 6). Existe un método modificado de *microbatch* donde se usa silicona en vez de parafina, o una mezcla de ambas, esto permitirá la evaporación del agua de la muestra, concentrando los reactivos de la gota [16] y [17].

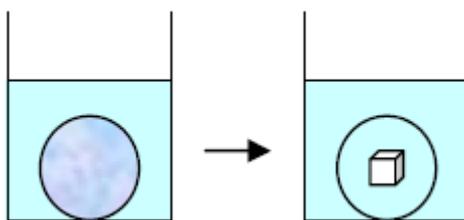


Figura 6. Gota sumergida en aceite inerte según el método de *microbatch* [15].

Otra forma de conseguir *microbatch* sería seguir el procedimiento de la técnica de *hanging drop*, pero ajustando las concentraciones del precipitante entre la gota y su reservatorio, forzando así el equilibrio y evitando cualquier indicio de transferencia de masa [13].

El principal inconveniente de *microbatch* es que es relativamente difícil cambiar las condiciones de uso de una misma proteína [12].

Para el método por contradifusión (Figura 3, curva iv), la técnica se basa en la contradifusión del compuesto que se quiere cristalizar y de su agente precipitante, es decir el compuesto utilizado para disminuir la solubilidad del compuesto a cristalizar. Su implementación necesita por tanto de dos recipientes, en uno de ellos se coloca una solución del compuesto a cristalizar y en el otro una solución del agente precipitante. Ambos recipientes se conectan a través de un tercero que se rellena con un líquido que no interfiera en la reacción de precipitación, por ejemplo el solvente utilizado para preparar las soluciones. El truco en esta técnica consiste en escoger unas condiciones iniciales que mantengan el sistema lejos del equilibrio, es decir justo al contrario de lo que habitualmente se hace en los experimentos de cristalización. Si conectamos ambos recipientes, las dos soluciones empezarán a difundir una contra la otra. Debemos asegurar que una de las dos (concretamente la del agente precipitante) avance más rápido de tal forma que “invada” a la otra [18].

Para cualquier proceso de crecimiento cristalino la cinética de formación de núcleos cristalinos estables (nucleación primaria) tendrá gran importancia. Será imprescindible que la barrera energética sea vencida para que se de la nucleación, superando un radio crítico al que se corresponderán los núcleos estables (Figuras 7 y 8).

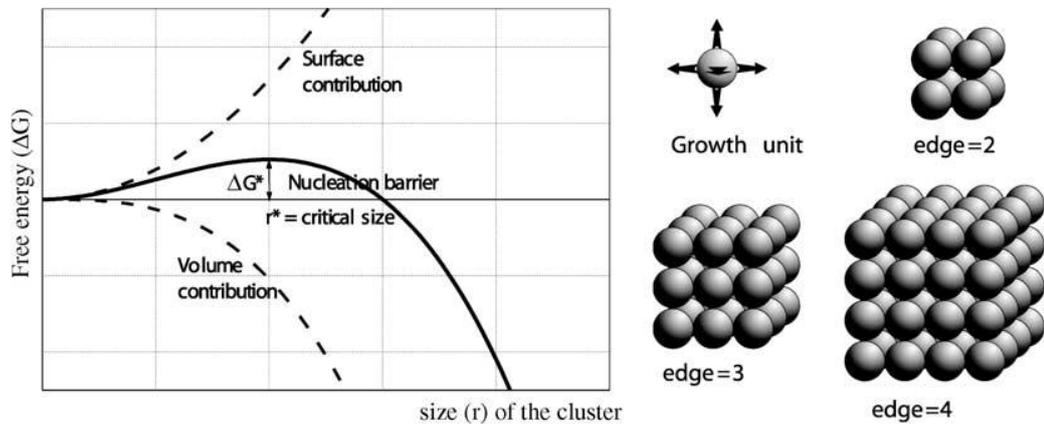


Figura 7. Energía necesaria para la formación del cristal en función de su radio crítico [18].

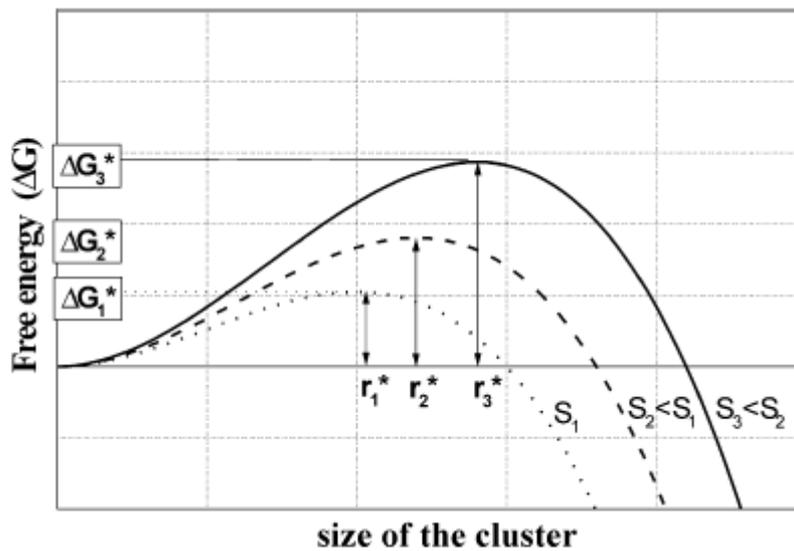


Figura 8. Variaciones en la barrera de la energía de activación en función de la supersaturación [18].

Tras la nucleación comenzará el proceso de crecimiento cristalino, es decir, el proceso de ordenación de átomos, iones o moléculas para formar la red cristalina. La posición más favorable para dicho crecimiento será la del rincón, por lo que tenderán a esta la mayor parte de unidades del sistema.

Por el motivo anteriormente descrito, el crecimiento cristalino seguirá un modelo que contenga el mayor número posible de posiciones de rincón, el *modelo de crecimiento en espiral* (Figura 9), gracias a las dislocaciones helicoidales que se van autogenerando [19].

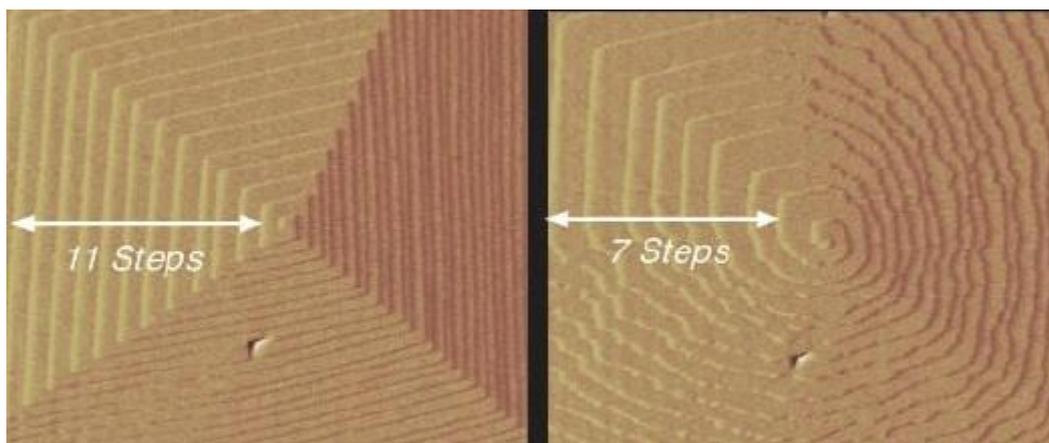


Figura 9. Crecimiento cristalino en espiral [20].

Algunas teorías afirman que este proceso es espontáneo y la velocidad de crecimiento dependiente del radio de curvatura de la espiral [21]. Otras defienden que el proceso es energéticamente activado y la velocidad de crecimiento independiente del radio de curvatura de la espiral, siendo esta V_{∞} una vez alcanzado el tamaño crítico [22].

“Jugando al Tetris se puede comprobar la importancia de la relación "velocidad de transporte" / "cinética de superficie" ("velocidad de caída de fichas" / "pericia del jugador") en la calidad del cristal resultante.” —————> Juan Manuel García Ruíz [23].

“El experimento de cristalización ideal será aquel en el que las moléculas lleguen a la superficie del cristal con velocidad igual o menor a la de su reorganización en la superficie.” —————> Juan Manuel García Ruíz [2].

Con el objetivo de conocer y estudiar los fundamentos básicos de la cristalización de proteínas se proseguirá con la búsqueda de nuevos métodos racionales que ayuden a destapar todos sus misterios, acercándola cada vez más a una ciencia y dejando atrás el arte que suponía este proceso.

El control de la nucleación sería un paso determinativo en este avance y de ahí que se emprendiera con gran esfuerzo, desde 1998, la búsqueda del nucleante universal, aquel que consiga inducir de forma eficiente y controlada la nucleación heterogénea [11].

Han sido estudiados como nucleantes heterogéneos óleos, superficies modificadas, campos magnéticos, presión, *seeding* y ultrasonidos entre otros [24, 25]. Hasta el momento el éxito de estos métodos ha sido limitado, pero se continúa investigando y mejorando dichas técnicas, como es el caso del uso de materiales con mesoporos que albergan moléculas de proteína [11].

Los ultrasonidos consiguen actuar como nucleantes heterogéneos debido al fenómeno de la cavitación ultrasónica [26], [27], [28] y [29]. Durante este proceso se producen burbujas de aire con condiciones de temperatura y presión muy elevadas, lo que favorece la nucleación por reducir considerablemente el radio crítico del núcleo para inducir la nucleación [30]. Otra forma de ver este efecto sería considerar la superficie de las burbujas de la cavitación como centros de nucleación [26] y [31].

3 Materiales y Métodos

Las técnicas de cristalización usadas para realizar las experiencias han sido *hanging drop* (*vapor diffusion*) y una modificación de la habitual técnica de *microbatch*.

Una vez preparadas, las placas se sumergen en dos baños de agua a temperatura constante, uno de ellos con ultrasonidos y el otro sin, lo que permitirá comparar los resultados de ambas condiciones.

Los materiales usados se resumen en placas de cristalización de *hanging drop* (junto a todo el material secundario necesario para la preparación de estas, véase láminas de vidrio (cubres), vaselina...) y las soluciones reactivas:

Disolución tampón de Acetato sódico, pH 4.7.

Disolución precipitante, NaCl.

Disolución de proteína, lisozima

Es imprescindible para una correcta comprensión, tanto de los métodos realizados como de los resultados, definir el factor de éxito (*f*):

El factor de éxito representa la fracción entre las gotas en las que se formaron cristales con respecto al total, analizadas en cada condición. Como su nombre indica, es el porcentaje de éxito de obtención de cristales en las gotas de una misma condición.

La **disolución tampón** se prepara con ácido acético glacial (100%) y acetato sódico trihidratado ($M = 136,08$). Teniendo en cuenta que el pH buscado es 4.7 se procede de la siguiente manera:

$$pH = pka + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

$$M(A^-) = 136.08$$

$$M(HA) = 60.05$$

$$\rho(HA) = 1.05 \text{ Kg/l}$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} \approx 0.871 = \frac{[A]_i \cdot V_A}{[HA]_i \cdot V_{HA}}$$

$$[HA] = 17.485 \text{ M}$$

Se quiere una $[HA]$ de 0.2 M y un volumen de 0.5 litros, por lo que el volumen de ácido y la masa de base a usar serán: $V_{HA} = 5.719 \text{ ml}$ y $M_A = 13.608 \text{ g}$

A continuación se preparan ambas soluciones en volúmenes de 250 ml cada una (matraz aforado). Tras esto, se mezclarán en un vaso de precipitados de 500 ml con la ayuda de un pH-metro (así como agitadores magnéticos que aseguren la homogeneidad de la mezcla) y se filtrará al vacío usando un filtro de celulosa de $0.2 \mu\text{m}$.

Para la preparación de un volumen de 250 ml de **disolución precipitante** de NaCl al 10% serán necesarios 25 g de la sal. Esta solución se preparará en un matraz aforado, siendo el acetato sódico (disolución tampón) el disolvente usado.

Por último se prepara la **solución proteica** (esta será preparada para cada uso). En un volumen de 0.5 ml de acetato sódico, o menor, según la necesidad, se diluirá la cantidad que convenga de lisozima, con la ayuda de un agitador y centrifugando unos 10 minutos. La concentración usada para los ensayos de medida del tamaño máximo por gota y el factor de éxito (véase apartado 3), será de 50 mg/ml. En los casos del estudio de la metaestabilidad se usaron diferentes concentraciones.

Tras la preparación de las disoluciones se procede con las placas. Como ya se ha indicado, las placas usadas han sido de *hanging drop* en todos los ensayos.

A continuación (Figura 10) se muestra un esquema de la planta de una placa y se explicará el procedimiento a seguir con las mismas.

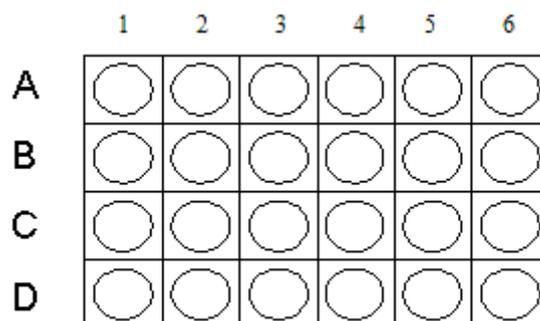


Figura 10. Planta de una placa de *hanging drop*

El primer paso para preparar una placa de cristalización de este tipo será decidir la organización en ella de las diferentes condiciones a estudiar (diferentes concentraciones de la solución precipitante o de la proteica...).

A continuación se preparan las disoluciones para los reservorios con las concentraciones que se crean convenientes de agente precipitante y de solución tampón.

Es necesario aplicar vaselina en el contorno de cada uno de los huecos cilíndricos para conseguir un buen aislamiento y que sólo exista evaporación entre la gota y el reservorio.

El volumen elegido como reservorio será de 1 ml, del que se pipeteará la cantidad necesaria para las gotas.

Tras esto, se preparan las gotas sobre los cubres (láminas de vidrio siliconizado de 22 mm, Hampton). El volumen de la gota apropiado en estos casos es entre 6 y 10 μl y se usará una proporción de 1:1 (proteína/solución del reservorio) en todas ellas. Para todos los ensayos (*vapor diffusion* y *microbatch*) se formaran gotas de 8 μl .

El procedimiento normal (Figura 121) es pipetear 4 μl (o la cantidad que según el caso se haya decidido) del reservorio y depositarlos sobre el cubre. Pipeteando nuevamente de la solución de proteína e incrustando esto sobre la gota ya formada (sin llegar a introducir la punta de la pipeta dentro de la gota, siendo lo correcto que ambas gotas se adhieran por el contacto ya que la interfase es el punto clave de esta transferencia de materia) evitando posibles perturbaciones como burbujas de aire o el contacto de los dedos con el cubre, se consigue la gota donde se dará la cristalización.

Girando el cubre 180 °C y adheriéndolo con la vaselina anteriormente colocada en cada hueco se consigue uno de los veinticuatro sistemas cerrados que lleva cada placa (Figura 112).

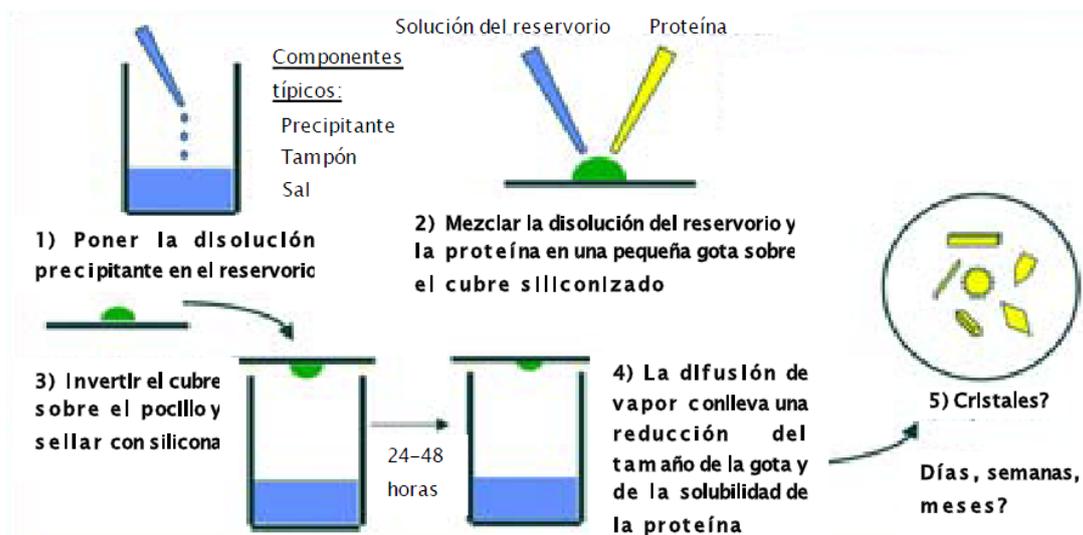


Figura 11. Esquema de preparación de una placa del método de *vapor diffusion, hanging drop* [14].

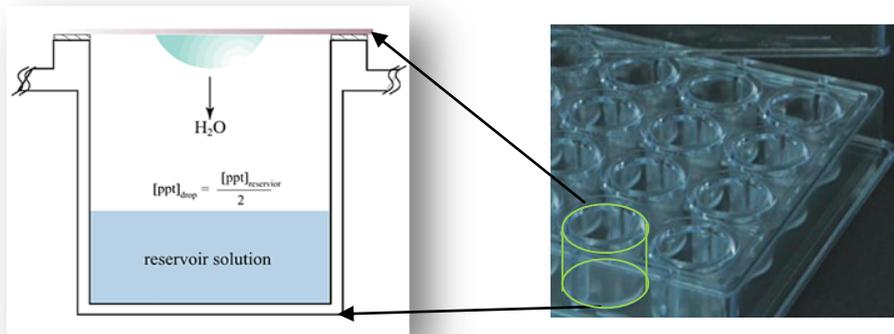


Figura 112. Sistema cerrado propio de la técnica de *hanging drop* (*vapor diffusion*) dentro de la placa de cristalización [14].

En los ensayos destinados al análisis del factor de éxito y a la medida del tamaño máximo de cristal por gota (véase apartado 3), se preparan cuatro concentraciones de reservatorio diferentes, una por cada fila de la placa, con intención de observar los efectos de la variación de la concentración de solución precipitante.

El experimento fue realizado a dos temperaturas diferentes: 20 y 21°C (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes concentraciones de NaCl preparadas para cada temperatura en presencia y ausencia de ultrasonidos por HDM

		Concentración de la disolución de NaCl (%)							
20°C	Con ultrasonidos	2	2,5	3	4	5,5	6	6,5	7
	Sin ultrasonidos	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7
21°C	Con ultrasonidos	4,5	5	5,5	6	6,5	7	8,5	9
	Sin ultrasonidos	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8,5	9

En las experiencias correspondientes al estudio de la metaestabilidad interesa que no exista evaporación alguna (*microbatch*). En vez de recurrir al método habitual de *microbatch* se decide usar una placa de *hanging drop* y ajustar todas las concentraciones del precipitante forzando así el equilibrio entre la gota y su reservatorio, evitando cualquier indicio de transferencia de masa.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones usadas en el experimento realizado a la temperatura de 20°C.

Tabla 2. Diferentes condiciones usadas en las placas de *microbatch*.

[Lisozima] (mg/ml)	Concentración de la disolución de NaCl (%)				
55	1,5	2	2,5	3	6
30	1,5	2	2,5	3,5	6
20	2	2,5	3	5	6
12	2,5	3	3,5	5	6
8	3,5	5	6	7	-

Una vez preparadas las placas, se sumergen en sus respectivos baños, encontrándose estos estabilizados a una temperatura fija.

El baño de ultrasonidos está conectado a un programa de 96 horas de duración durante las que se irradian 3 segundos de cada 3 minutos.

Se muestra a continuación el montaje experimental utilizado durante la experimentación:

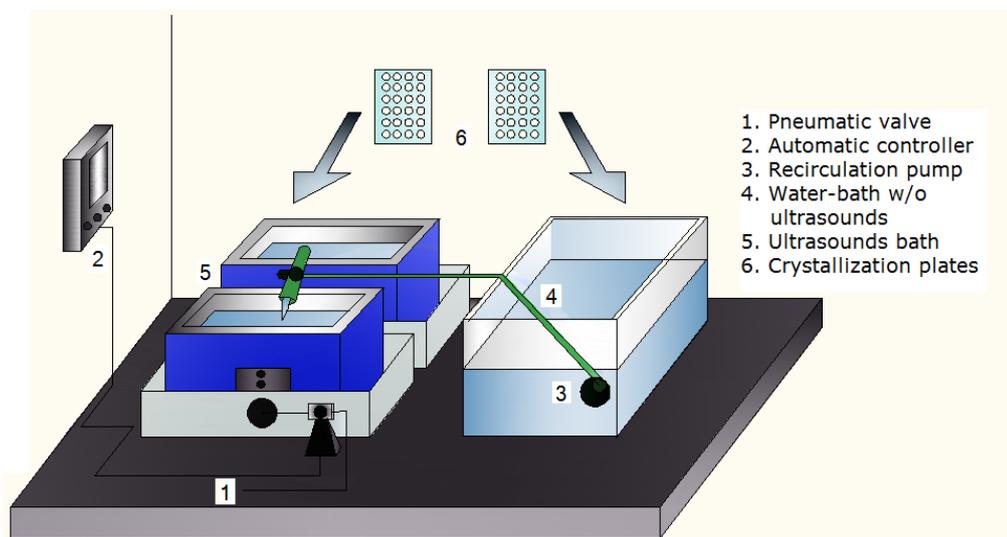


Figura 123. Montaje experimental con dos baños de ultrasonidos (Elmasonic S 30 H) y uno sin conectados en serie-paralelo mediante una bomba de acuario, para garantizar la estabilidad de la temperatura en ambos tanques.

Una vez obtenidos los cristales de proteína han de revisarse periódicamente para comprobar que su crecimiento ha llegado al límite, siendo posible proceder con las

mediciones oportunas. Mediante la comparación de fotografías con un programa gráfico se decide cuando el crecimiento deja de ser apreciable.

El procedimiento a seguir en las dos experiencias difiere considerablemente, por lo que se decide explicar los métodos por separado.

3.1 Tamaño máximo de cristal de lisozima por gota y f, factor de éxito, ambos a 20 y 21°C.

La técnica elegida para realizar esta experiencia es la de *hanging drop*, debido a la simplicidad del método y adecuación al objetivo buscado.

Una vez se observa que el crecimiento de los cristales se ha detenido aparentemente, las placas son retiradas de sus respectivos baños y se sacan fotografías con una determinada amplitud. Estas fotografías son tratadas con el programa gráfico **Photoshop**, con el que es posible medir 2 dimensiones del cristal.

De esta forma se determina el cristal de tamaño máximo de cada gota y se registra en una tabla de datos, así como el factor de éxito (f) para cada condición estudiada.

3.2 Estudio de la metaestabilidad de la lisozima (20°C).

Debido al interés en el conocimiento de las concentraciones de agente precipitante y proteína tanto en la gota como en el reservatorio se decidió usar un método modificado del habitual *microbatch*.

Alcanzado el punto final de crecimiento de los cristales de lisozima, las placas son retiradas de los baños y observadas. Se sacan fotografías con una misma amplitud, y estas acompañarán a los resultados numéricos (véase Figura 17), facilitando la comprensión con un aporte más visual.

4 Resultados y Discusión.

4.1 Tamaño máximo de cristal de lisozima por gota y el factor de éxito a 20 y 21°C. Método de hanging drop (HDM).

Esta experiencia se realizó a 20 y a 21°C con el fin de observar la relevancia de la temperatura en este tipo de ensayos.

Para comprobar si el uso de los ultrasonidos podría desestabilizar la temperatura de los baños por recalentamiento, se tomaron fotografías térmicas de una placa de cristalización sometida a diferentes periodos de irradiación. Es posible observar en la Figura 13(a) que irradiando durante un minuto la placa de cristalización no se vió afectada. La Figura 13(b) muestra las alteraciones de temperatura producidas por periodos de irradiación de 10 minutos. Se comprobó, que con 3 segundos de cada 3 minutos la influencia del recalentamiento era irrelevante.

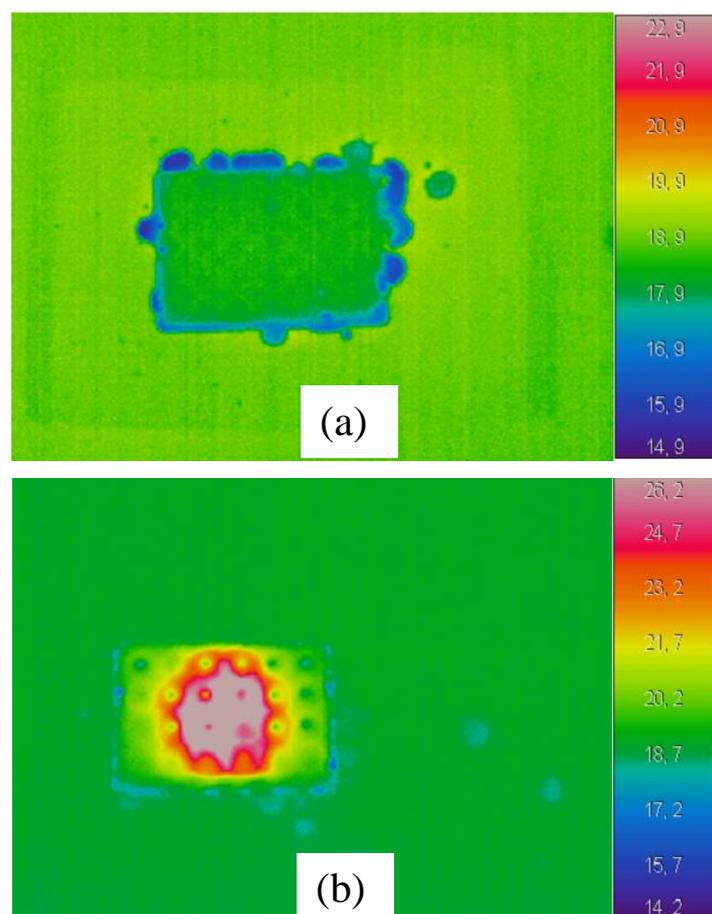


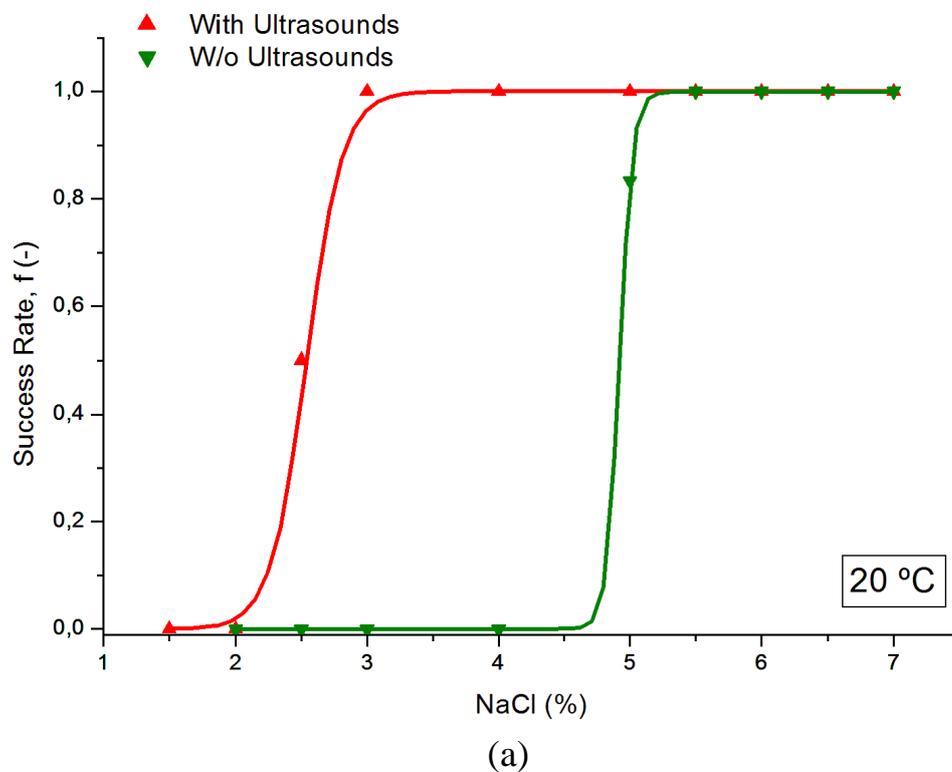
Figura 134. Termogramas de una placa de cristalización sometida a ultrasonidos durante 1minuto (a) y tras 10 minutos de irradiación (b).

Los datos fueron analizados y es posible concluir que un grado centígrado influye significativamente en los resultados obtenidos, así como cualquier inestabilidad en esta u oscilaciones de la misma.

Tanto a 20 como a 21°C, se observa la misma diferencia con y sin la presencia de irradiación. Claramente se aprecia como a concentraciones de NaCl más bajas fueron obtenidos valores de f mayores con el uso de ultrasonidos (Figura 145).

Es obvio que la irradiación ultrasónica consigue una nucleación más precoz, en un mayor rango de condiciones de concentración de NaCl, comparando con el caso sin irradiación (Figura 145).

En cuanto a las diferentes temperaturas, factor de peso en lo que a estas experiencias se refiere, es a la menor de ellas a la que se obtiene nucleación a concentraciones de NaCl más bajas. A 20 °C también se observa un comportamiento menos progresivo, pues en cuanto se da la nucleación en una gota, esta sucede prácticamente en el total de las gotas de dicha condición (Figura 145).



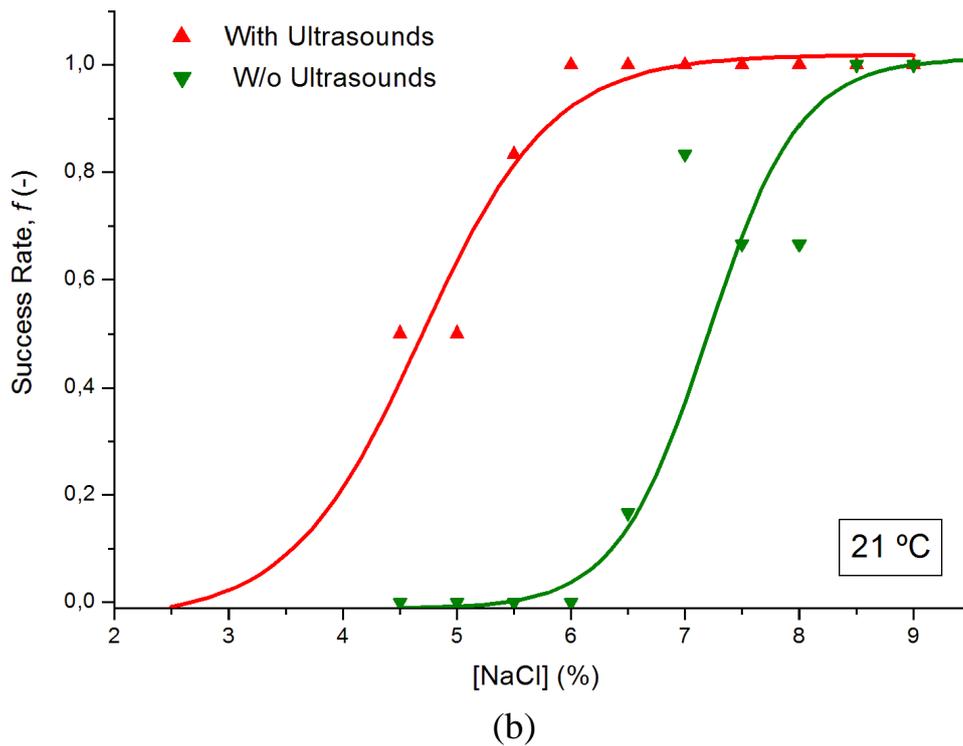
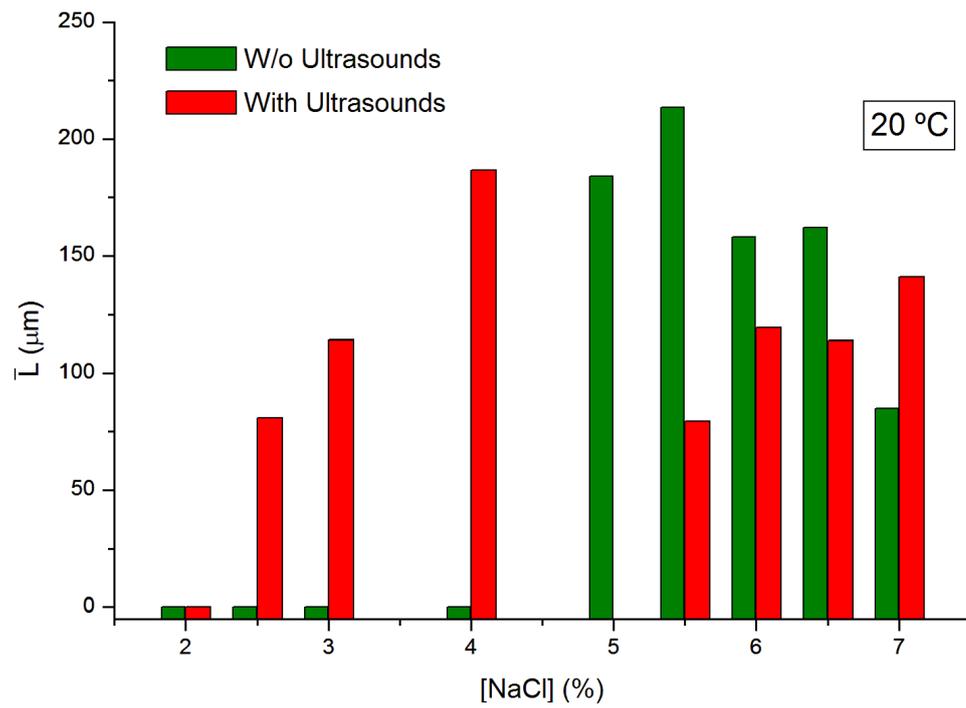
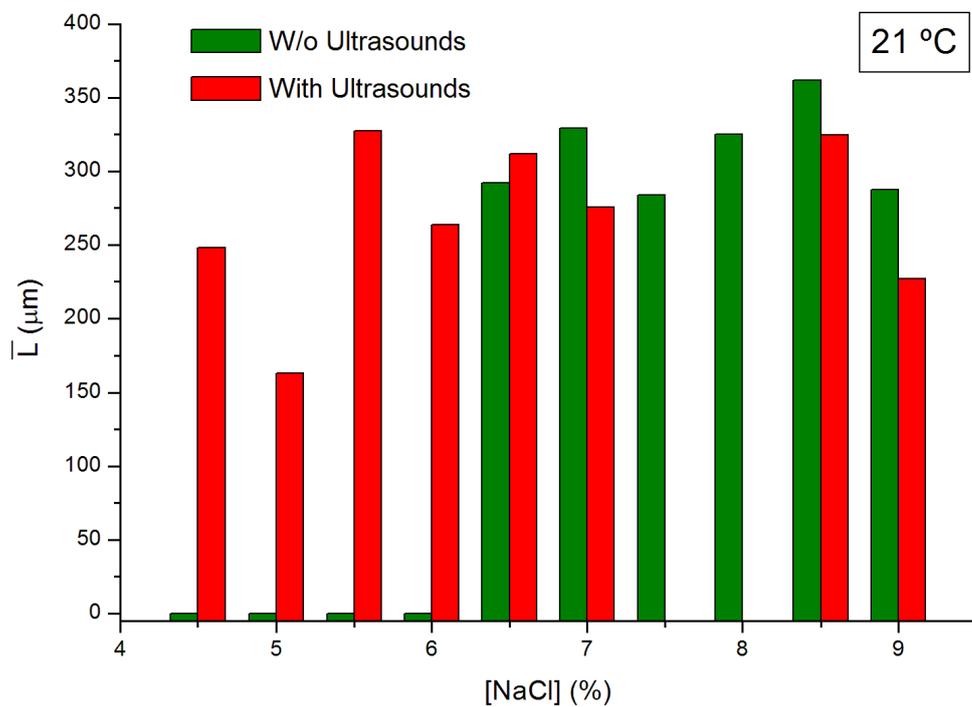


Figura 145. Fracción de gotas por condición que presentan cristales de proteína usando HDM en presencia y ausencia de ultrasonidos. Fueron analizadas entre 5 y 6 gotas por condición. a) 20 °C. b) 21 °C.

Para poder analizar los resultados del tamaño máximo por gota se calcula una media de los tamaños máximos por condición (concentración de NaCl), y tras esto se representan conjuntamente los obtenidos con la presencia de ultrasonidos y los obtenidos sin irradiación para facilitar la comparación (Figura 156).



(a)



(b)

Figura 156. Media de los tamaños máximos por gota (\bar{L}) en cada concentración de NaCl. Fueron analizadas entre 5 y 6 gotas por condición. a) 20 °C. b) 21 °C.

Se observa el mismo efecto, anteriormente mencionado, con respecto a la influencia de la temperatura en la aparición de nucleación. Referente a los ultrasonidos, estos aceleran el proceso y consiguen que la nucleación suceda a concentraciones más bajas, si se compara con los ensayos sin irradiación, comprendiendo un mayor rango de condiciones para las que es posible obtener cristales de proteína (Figura 156).

El único efecto claro, observable con respecto al tamaño de los cristales, es el menor tamaño obtenido con la presencia de ultrasonidos (a elevadas concentraciones ya que a las más bajas no es efectiva la nucleación en ausencia de irradiación). Respecto a la tendencia por concentración del agente precipitante, lo esperado sería un aumento hasta cierto valor de [NaCl], y pasado este, una disminución por el efecto del precipitado. A valores altos de [NaCl] se darían una gran cantidad de cristales de tamaño pequeño, incluso con la presencia de precipitado. Es posible ver que no es esta la tendencia que muestran las figuras anteriores (Figura 156).

4.2 Estudio de la metaestabilidad de la lisozima, 20°C.

Con una aproximación de los valores mínimos de [NaCl] a los que se produce la aparición de cristales de lisozima para concentraciones de 55, 30, 20, 12 y 8 mg/ml, es posible calcular la curva de metaestabilidad.

Linealizando los datos obtenidos se obtiene la gráfica mostrada a continuación (Figura 167), donde es posible ver que los ajustes son realmente buenos, tanto para el caso con, como para el de sin ultrasonidos. Los datos de la curva de solubilidad proceden de la bibliografía [32], siguiendo el ajuste realizado por Martins et al. [13].

Las ecuaciones de las rectas que se muestran en la Figura 167 están linealizadas bajo la expresión:

$$[Lisozima] = A \exp\left(B \times \frac{100\%}{[NaCl]}\right)$$

Los coeficientes A y B adoptan los siguientes valores numéricos (Tabla 3):

Tabla 3. Valores de los coeficientes A y B en la linealización de las tres curvas representadas en la Figura 167.

Curvas linealizadas	A	B
Metaestable (sin ultrasonidos)	1,3201	0,0619
Metaestable (con ultrasonidos)	1,4091	0,0456
Solubilidad [32]	1,0385	0,0845

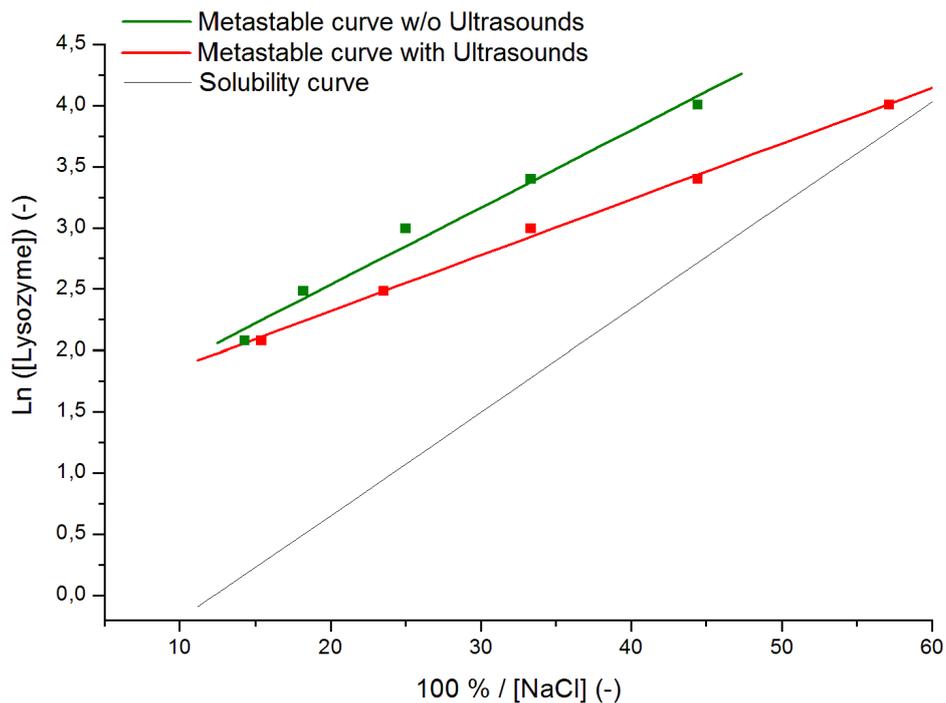
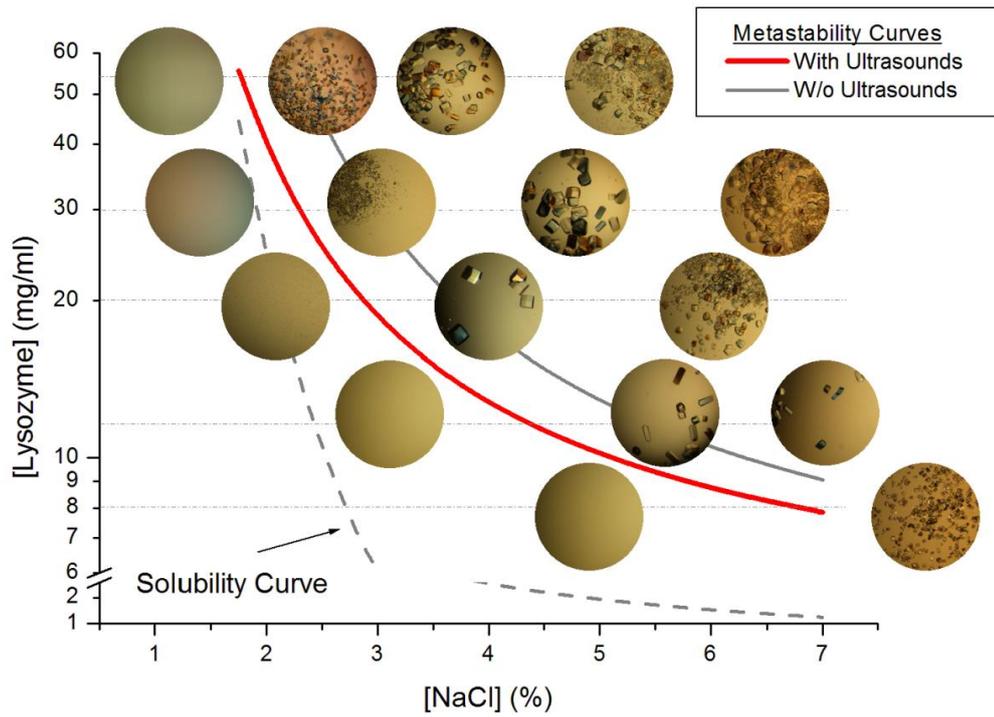
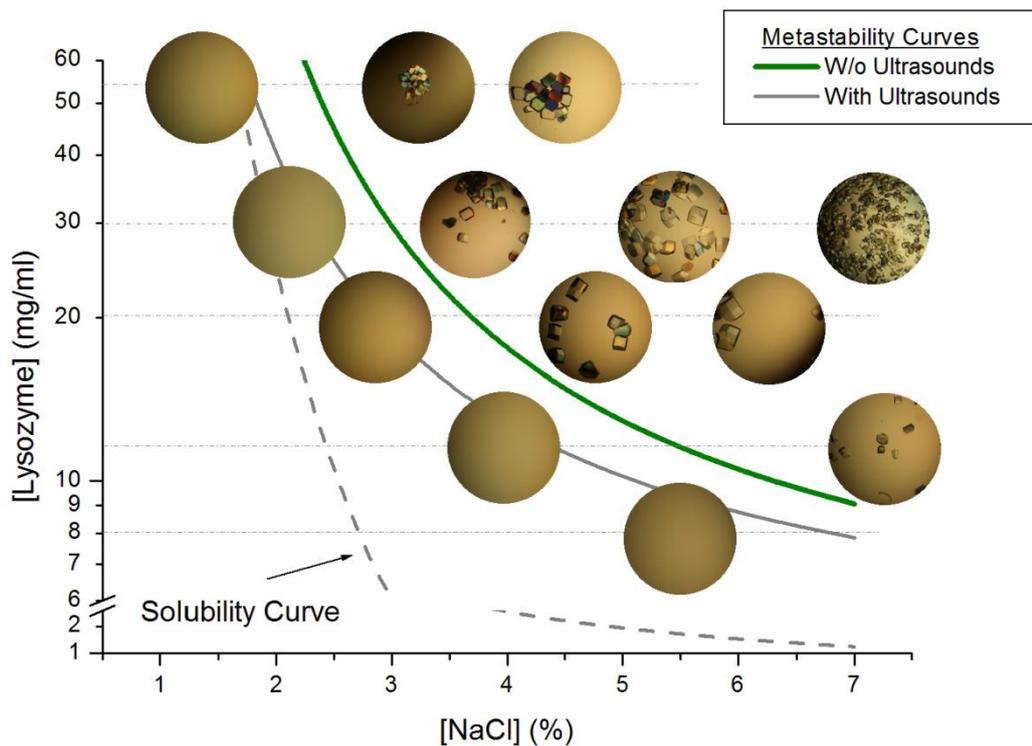


Figura 167. Linealización de la curva de solubilidad procedente de la bibliografía y de las curvas de metaestabilidad experimentales, 20 °C.

Para llevar a cabo estas experiencias se usa el método de *microbatch*, una modificación de esta técnica, véase el apartado 3, tanto la obtenida bajo los efectos de los ultrasonidos como en su ausencia, será posible comparar de una forma más visual ambos resultados. Para esto se recurre también a la curva de solubilidad para 20°C y pH 4.7 de la bibliografía anteriormente mencionada ([32] y [13]) y se muestran en el diagrama de fases fotografías de los cristales obtenidos en las diferentes zonas, acompañando a los datos numéricos.



(a)



(b)

Figura 178. Diagrama de fases de la lisozima, 20 °C y pH 4.7, en el que se observa la curva de solubilidad y las de metaestabilidad correspondientes a la presencia (a) y ausencia (b) de irradiación con ultrasonidos, acompañadas de imágenes de los propios resultados obtenidos en las diferentes zonas del diagrama.

Es obvio que la amplitud de la zona metaestable (MSZW) decrece con el uso de irradiación. Como se muestra en la Figura 18, la zona de metaestabilidad para los datos de [Lisozima] = 20 mg/ml es prácticamente la mitad (en términos de amplitud) con el uso de ultrasonidos.

En todos los casos los cristales han crecido en un tiempo inferior a una semana. Tanto la nucleación como el crecimiento se ven influenciados por diversas variables como la temperatura, el pH, cualquier impureza depositada en el cubre, incluso huellas dactilares, polvo, etc. También es importante el volumen de la gota que se escoja, este comprende variables como el área de contacto, el ángulo de contacto, etc.

Para todas las experiencias fueron usados volúmenes de gota de 8 μ l. Sin embargo, sólo en las experiencias del cálculo de la zona metaestable se observaron daños por causa de los ultrasonidos (gotas ligeramente esparcidas). Esto se explica por la ausencia de evaporación en el método usado (*microbatch modified*). Con un volumen de gota menor se hubiera reducido tal efecto.

5 Conclusiones.

La irradiación con ultrasonidos consigue mayor precocidad en la nucleación abarcando rangos de condiciones más amplios, como bajas concentraciones del agente precipitante. Este efecto tiene gran importancia, pues podría ser visto como un método alternativo al *seeding*, o incluso un complemento a este, logrando con esto mejores resultados, de forma cómoda, sencilla y no suponiendo elevados costes ni de equipamiento ni de manutención.

Los ultrasonidos parecen disminuir el tamaño de los cristales de proteína.

El porcentaje de gotas con cristales (por condición) alcanza su máximo más rápidamente a concentraciones de NaCl más bajas en presencia de ultrasonidos que en su ausencia. Por esto, la irradiación ultrasónica asegura mejores resultados en cuanto a lo que el factor de éxito se refiere.

Por otra parte, está el efecto observado en las experiencias de determinación de las curvas de metaestabilidad. Los ultrasonidos consiguen que la curva de metaestabilidad sea más baja, por lo que la amplitud de la zona metaestable será menor y aparecerán cristales en mayor diversidad de condiciones. Este efecto es más acusado cuanto menores son las concentraciones del agente precipitante.

6 Bibliografía y Referencias.

- [1] José María Teijón Rivera DBG, César Teijón López, Carmen Agrasal Aragón, Belén Castel Seguí, Rosa Olmo López. Bioquímica Estructural Conceptos Y Tests Tebar 2001.
- [2] Laboratorio de Estudios Cristalográficos [cited; Available from: <http://www.lec.csic.es>
- [3] Wlodawer AV, J. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1998:27.
- [4] Winger JA, Hantschel O, Superti-Furga G, Kuriyan J. The structure of the leukemia drug imatinib bound to human quinone reductase 2 (NQO2). BMC Structural Biology. 2009;9.
- [5] Conlan R. , con la colaboración de otros Drs. como por ejemplo Max Perutz. Disarming a Deadly Virus: Proteases and Their Inhibitors. 2000 [cited; Available from: <http://www.nationalacademies.org>
- [6] Cuevas MR. Fundación eSalud y Fundación IMABIS RevistaeSalud 2007 [cited 3; Available from: <http://www.revistaesalud.com/.../viewArticle/163/425>
- [7] Lonsdale K. Crystals and X-rays . New York: D. van Nostrand 1949.
- [8] Ewald PP. Fifty Years of X-ray Diffraction. Utrecht, Netherlands: Oosthoek's 1962.
- [9] Antonio Delgado Cirilo CML, Jesús Joglar Tamargo Introducción a la Química Terapéutica. 2ª ed: Díaz de Santos 2003.
- [10] Sands DE. Introducción a la cristalografía: Reverté s.a 1993.
- [11] Chayen NE. Turning protein crystallisation from an art into a science. Current Opinion in Structural Biology. 2004;14(5):577-83.
- [12] Ducruix AG. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. Oxford: Oxford University Press 1999.
- [13] Martins P.M, Rocha F, Damas A. M. Understanding water equilibration fundamentals as a step for rational protein crystallization. PLoS ONE. 2008;3(4).
- [14] Fisher. Structural studies of b-keto acyl carrier protein reductase from Escherichia coli and Brassica napus. Sheffield: University of Sheffield; 1999.
- [15] UNAM IdB. [cited; Available from: <http://www.ibt.unam.mx>
- [16] D'Arcy AE, C.; Stihle, M.; Johnston, J. E. A novel approach to crystallising proteins under oil. Journal of Crystal Growth. 1996;168(1-4):175-80.
- [17] Brumshtein BG, H. M.; Futerman, A. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Control of the rate of evaporation in protein crystallization by the 'microbatch under oil' method. Journal of Applied Crystallography. 2008;41(5):969-71.
- [18] García Ruiz JM. Counterdiffusion Methods for Macromolecular Crystallization. *Methods in Enzymology* 2003:130-54.
- [19] J.W.Mullin. Crystallization. 4ª ed. Oxford: Butterworth-Heinemann 2001.
- [20] Davis KJD, P. M.; De Yoreo, J. J. Resolving the control of magnesium on calcite growth: Thermodynamic and kinetic consequences of impurity incorporation for biomineral formation. Materials Research Society Symposium - Proceedings; 2000; 2000. p. M9.5.1-M9.5.7.
- [21] Burton WKC, N.; Frank, F. C. Phil Trans R Soc Lond A: Math Phys Sci (UK). 1951:243.
- [22] Martins PM, Rocha F. A new theoretical approach to model crystal growth from solution. Chemical Engineering Science. 2006;61(17):5696-703.

- [23] García Ruiz JM. Arcade Games for Teaching Crystal Growth. *Journal of Chemical Education*. 1999;76(2-4):499-501.
- [24] Tsekova DD, S.; Nanev, C. N. Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth*. 1999;196(2-4):226-33.
- [25] Chayen NES, E. Is lysozyme really the ideal model protein? *Journal of Crystal Growth*. 2001;232(1-4):262-4.
- [26] Hem SLS, D. M.; Beal, H. M. Mechanism of crystallization of hydrocortisone by ultrasonic irradiation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1967;56(2):229-33.
- [27] Kim SW, C.; Kiang, S. Crystallization Process Development of an Active Pharmaceutical Ingredient and Particle Engineering via the Use of Ultrasonics and Temperature Cycling. *Organic Process Research and Development*. 2003;7(6):997-1001.
- [28] Lyczko NE, F.; Louisnard, O.; Schwartzenruber, J. Effect of ultrasound on the induction time and the metastable zone widths of potassium sulphate. *Chemical Engineering Journal*. 2002;86(3):233-41.
- [29] Virone CK, H. J. M.; Van Rosmalen, G. M.; Stoop, A. H., Bakker TW. Primary nucleation induced by ultrasonic cavitation. *Journal of Crystal Growth*. 2006;294(1):9-15.
- [30] Bates HEW, M. J *Electrochem Soc*. 1965;112:693.
- [31] Wohlgemuth KK, Anna; Ruether, Feelly; Schembecker, Gerhard. Experimental study of the effect of bubbles on nucleation during batch cooling crystallization. *Chemical Engineering Science*. In Press, Accepted Manuscript.
- [32] Forsythe ELJ, R. A.; Pusey, M. L. Tetragonal chicken egg white lysozyme solubility in sodium chloride solutions. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1999;44(3):637-40.